

- 9 中国医学科学院药物研究所,等,中药志(第一册).北京:人民卫生出版社,1993:495
- 10 钟纪育,等,热带植物研究,1996(39):34
- 11 中国医学科学院药物研究所,等,中药志(第三册).北京:人民卫生出版社,1993:15
- 12 《广东中药志》编辑委员会,广东中药志(第一卷).广州:广东科技出版社,1994:605
- 13 《广东中药志》编辑委员会,广东中药志(第二卷).广州:广东科技出版社,1996:360
- 14 赖茂祥,等,中国中药杂志,1989;14(5):11
- 15 方鼎,等,广西药用植物名录,南宁:广西人民出版社,1986:525
- 16 江苏省植物研究所,等,新华本草纲要(第一册).上海:上海科学技术出版社,1988:537

(1997-11-04 收稿)

A Survey of Galangal (*Alpinia Roxb.*) Resources of China

Zhao Zhili*, Li Bin, Dong Hui, et al. (*China Pharmaceutical University, Nanjing 210038)

Abstract Galangal (*Alpinia Roxb.*) resources of China was surveyed. A total of 30 species and 2 varieties were identified and classified. A taxonomic list was compiled for reference.

Key words *Alpinia Roxb.* plant resources

人参 RAPD 产物的限制性内切酶消化[△]

中国医学科学院 药用植物研究所(北京 100094) 马小军* 汪小全** 肖培根
中国协和医科大学

摘要 为了鉴定随机扩增产物的同源性以及更有效地利用 DNA 分子标记研究人参种质资源,我们首次将毛细管 PCR 扩增的 RAPD 反应产物进行限制性内切酶消化并有效的进行了酶切位点分析,结果证明 PCR-RFLP 是筛选人参特异 DNA 分子标记的一种简单易行的新方法,可为药用植物种质资源研究提供另一有用的工具。

关键词 人参 种质资源 PCR-RFLP

近年来随着分子生物学技术的发展,寻找和筛选植物 DNA 特异分子标记的方法,已从 80 年代初期经典的 RFLP 分析^[1],发展到今天的 RAPD^[2,3]、AFLP^[4]、SSR^[5]、PCR-RFLP^[6]等各种各样 DNA 指纹的比较研究。大量新发现的分子标记被用于作物的遗传多样性研究、品种鉴别、良种选育、遗传图谱构建和基因定位等领域,有力地推动了这些领域的发展。

有关利用药材分子标记(DNA 指纹)进

行药材品种鉴别的研究近年来时有报道^[7,8],我们也开展了人参种内变异类型的 RAPD 指纹研究^[9],并取得了初步结果。为了获得更多的人参 DNA 遗传信息,鉴定随机扩增产物的同源性以及更有效地利用 DNA 分子标记研究人参种质资源,我们又尝试将结合了 RFLP 和 PCR 二者之长的 PCR-RFLP 方法用于人参的 RAPD 产物的酶切位点分析,获得初步成功,现将该实验报道如下。

1 材料与方法

* Address: Ma Xiaojun, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

马小军 男,博士,1994 年在中国医学科学院药用植物研究所晋升为副研究员。1984 年以来一直从事药用植物研究,研究领域包括药用植物栽培和生理、种质资源、分子生物学等。参加国家级和部级研究课题多项,如国家攻关课题“人参农田栽培的研究”等,获国家和部级成果奖多项。在国内外学术刊物发表论文 40 余篇,参加专著编写多部。

** 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室

△ 本课题得到中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室资助

1.1 人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 实验材料用 4 年~5 年生叶。人参农家品种:大马牙,二马牙,圆膀圆芦分别采自吉林省抚松县、吉安市和辽宁省宽甸县。

1.2 DNA 提取和纯化:材料用硅胶干燥。取 2 片~3 片干叶用 1×CTAB 提取液提取总 DNA。DNA 提取后进行去 RNA 纯化,即将总 DNA 用 1% 的 RNaseA 酶解,等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提,用无水乙醇沉淀后溶于 0.1×TE 中,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度,电泳缓冲液用 1×TAE。

1.3 DNA 扩增条件及程序^[10]:DNA 扩增在 Idaho 1605 型毛细管气浴式 PCR 仪上进行,反应体系为 10 μ L,内含引物(Operon Technologies) 20 ng/ μ L、模板 1 ng/ μ L、dNTP 各 200 μ mol/L,Tag 酶 0.5 U, Ficoll 1%, 酒石黄 1 mmol/L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 此程序 2 个循环后接第二程序:94 $^{\circ}$ C 变性 2 s, 35 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 45 个循环后接 72 $^{\circ}$ C 5 min。

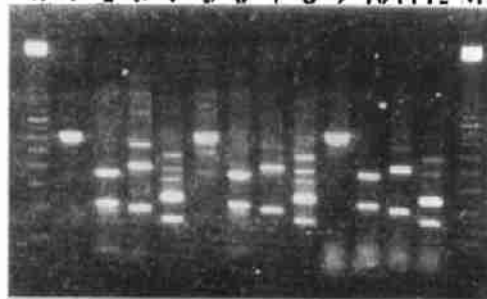
1.4 RAPD 产物的酶切:在 10 μ L 的 PCR 反应产物中,加入 2 U 限制性内切酶和 2 μ L 1×酶解缓冲液至终体积 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h 后将酶切产物做琼脂糖(1.5%)胶电泳分析。

2 实验结果

首先对一些 Operon Technologies 公司生产的随机引物进行了筛选,选择扩增后条带重性好、带型少、信号强、分子量大的引物做 PCR,并用其产物做进一步的酶切位点分析。据此,挑选了随机引物 OPK-18 和 OPY-09,前者扩增出了 1 条 600 bp 带,后者扩增出 2 条 DNA 片段分别为 960 和 600 bp。用限制性内切酶 *Hinf* I、*Rsa* I、*Alu* I、*Msp* I 对 OPK-18 产物进行酶切,分别得到 2、2、5、1 条 DNA 片段,根据计算推测出 4 种酶分别有 1、1、4、0 个酶切位点。对 OPY-09 产物也进行了酶切实验:*Rsa* I、*Alu* I 和 *Msp* I 3 种酶分别有 3、1、1 个切点(表 1)。

经过 2 次重复实验,对 OPK-18 产物进行的 4 种酶切反应结果非常稳定。故用 OPK-18 对人参农家品种大马牙、二马牙和圆膀圆芦进行扩增,均扩出 600 bp 片段,然后进行 *Hinf* I、*Rsa* I、*Alu* I 3 种酶的酶切,结果 3 个品种得到的酶切图谱完全相同,证明在 600 bp 上的 6 个酶切位点没有差别(图 1)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



1~4-大马牙 5~8-圆膀圆芦 9~12-二马牙
2、6、10-*Hinf* I 3、7、11-*Rsa* I 4、8、12-*Alu* I

图 1 酶切图谱

表 1 RAPD 产物的酶切结果

引物扩增条带(bp)	内切酶	酶切片段(bp)	切点
OPK-18 (600)	<i>Hinf</i> I	2(380,220)	1
	<i>Rsa</i> I	2(400,200)	1
	<i>Alu</i> I	5(490,390,350,250,170)	4
	<i>Msp</i> I	1(600)	0
OPY-09 (960, 600)	<i>Rsa</i> I	4(640,520,310,200)	3
	<i>Alu</i> I	3(600,580,380)	1
	<i>Msp</i> I	3(640,600,32)	1

3 小结与讨论

经典 RFLP 方法须经酶切、电泳、Southern 转移、与探针杂交、放射自显影等繁琐的步骤,需要 DNA 的量(μ g 级),因而难以在药用植物研究中广泛应用。而本实验应用 RAPD 分析的副产品进行酶切分析,获得满意的效果。我们首次将毛细管 PCR 扩增的极少的反应产物进行限制性内切酶消化并有效的进行了酶切位点分析,这充分说明 PCR-RFLP 是筛选药材特异 DNA 分子标记的一种简单易行的新方法,为药用植物种质资源研究提供了又一有力工具。尤其对那些因扩增条带太少在 RAPD 分析中本欲摒弃的引物加以再利用,有效地提高了 DNA 指纹的使用效率。

做 PCR 产物的限制性片断长度多态性分析(PCR-RFLP),应注意以下 2 点:1)选适宜的引物:为了便于酶切位点的分析,最好选择扩增条带少、信号强、分子量大、稳定性好的引物。2)选合适的限制性内切酶:首先,应从内切酶的不同类型缓冲液(pH 值和 K、Na、Mg、Cl 离子强度不同)中,挑选与 PCR 反应所用缓冲液相匹配的缓冲液及其适合这种缓冲液的酶。其次,应选择识别序列较短的酶做工具,以便获得较多的切点,例如,按概率计算识别 4 碱基的限制性内切酶在 256 bp 的 DNA 片段有 1 个切点,1 kb 的 DNA 片段概率上有 3 个~4 个切点。

- 1 Palmer J D, *et al.* Theor Appl Genet, 1983; 65: 181
- 3 Williams J G, *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 18: 6531
- 3 Welsh J, *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 18: 7213
- 4 Pieter Vos, *et al.* Nucl Acids Res, 1995; 23: 4407
- 5 Gustavo Caetano-Anolles, *et al.* Bio Technology, 1991; 9 (6): 553
- 6 汪小全,等. 银杉的遗传多样性及系统位置的研究——兼论松科的系统分子学:[博士学位论文]. 北京:中国科学院植物研究所, 1997: 29
- 7 Shaw PC, *et al.* Planta Med, 1995; 61: 466
- 8 Ozeki Y, *et al.* Natural Med, 1996; 50: 24
- 9 马小军,等. 中草药, 1998; (3): 191
- 10 Paul W. Skroch, *et al.* The Rapid Cyclist, 1985; 1(1): 9

(1997-12-08 收稿)

PCR-RFLP Method on Ginseng (*Panax ginseng*)

¹Ma Xiaojun, ²Wang Xiaoquan and ¹Xiao Peigen (¹Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract In order to identify homogeneity of RAPD(random amplified polymorphic DNA) products and to make full use of RAPD markers for the study of ginseng germplasm, it was tried for the first time, to digest PCR products produced by capillary PCR and their restriction sites determined effectively. Results showed that PCR-RFLP was a simple and useful method for screening distinctive molecular markers on *Panax ginseng* C. A. Mey, which provided a new tool for the study of germplasm of medicinal plants.

Key words *Panax ginseng* C. A. Mey germplasm PCR-RFLP

柿叶鉴别的实验研究

广西中医学院(南宁 530001) 甄汉深* 张三平** 唐维宏***

摘要 为更好地利用柿叶这一资源和评价其质量提供科学依据,采用性状、显微、化学、可见紫外分光光度法、薄层色谱法对柿叶进行鉴别研究。结果表明:这些方法可用于柿叶的质量控制。

关键词 柿叶 鉴别 显微 理化

柿叶为柿科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的干燥叶。中医传统认为其味苦、酸、涩,性凉,具有清肺止咳,凉血止血,活血化瘀,降血压之功效,主要用于咳嗽,肺气肿,各种内出

血,高血压等症^[1]。柿叶的生药学鉴定,未见有显微、理化方面的报道,我们就此进行研究,报道如下。

1 仪器与材料

* Address: Zhen Hanshen, Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning

** 广西柳州市人民医院(545001)

*** 广西北海市中医院(536000)