

。药材。

同种不同产地牛蒡子 DNA指纹图谱特征研究

徐朝晖,杨松松,康廷国*

(辽宁中医学院 中药系,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨同种不同产地牛蒡子 DNA指纹图谱特征。方法 采用 RAPD技术对全国四大商品区的中药牛蒡子生品和其中两个商品区的制品进行了 DNA指纹图谱特征研究。结果 四大商品区的生品牛蒡子 DNA指纹图谱一致,制品牛蒡子的 DNA指纹图谱与生品的有较大差异。结论 DNA指纹图谱用于鉴定同种药材的生品结果可靠。

关键词:牛蒡子; RAPD; DNA指纹图谱

中图分类号: R282.7103 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0541-02

Studies on DNA fingerprinting of *Arctium lappa* from different localities

XU Zhao-hui, YANG Song-song, KANG Ting-guo

(Department of Chinese Materia Medica, Shenyang College of TCM, Shenyang Liaoning 110032, China)

Abstract Object To study the DNA fingerprinting of *Arctium lappa* L. obtained from different localities. **Methods** DNA fingerprinting of samples of crude and processed *A. lappa* collected from four large commercial centers were examined by RAPD. **Results** All crude *A. lappa* showed similar fingerprinting characteristics, while the processed products gave considerable different results. **Conclusion** DNA fingerprinting study is a reliant method to differentiate crude *A. lappa* from its processed product.

Key words *Arctium lappa* L.; RAPD; DNA fingerprinting

前文已报道过 RAPD法鉴别中药牛蒡子及其混滑品^[1],本文在此基础上,对全国同种不同产地中药牛蒡子的 DNA指纹图谱特征进行了研究

牛蒡子又称大力子,根据产地和商品流通区域划分主要有大力(东北及华北东部)、杜大力(华东)、川大力(西南)、泽大力(华中)四种。根据中药“逢子必炒”的炮制原理,在市场流通中有很多是炒制品

1 材料

本实验采用了全国四大商品区的生品和其中两个商品区的制品(表 1),旨在探求同种药材不同产地及同一产地生、制品药材的 DNA指纹图谱特征。

表 1 实验材料

药材	基源	生(制)品	采集地区	采集时间	标本号
关大力	<i>Arctium lappa</i> L.	生品	黑龙江木兰	1998-07	1
		制品		1996-09	5
杜大力	<i>A. lappa</i>	生品	浙江桐乡	1998-03	2
		制品		1996-04	6
泽大力	<i>A. lappa</i>	生品	河南郑州	1997-02	4
川大力	<i>A. lappa</i>	生品	四川成都	1995-04	3

2 试剂和仪器

试剂: Tris dNTPs Buffer, Tag 酶、β-巯基乙醇引物、BSA 琼脂糖、SDS 100 bp DNA ladder 购自上海生工生物工程有限公司,其余试剂均为国产分析纯

仪器: PCR 仪 (PTC-100TM Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, USA),电泳仪 (DYY-III8B型,北京六一仪器厂),紫外可见分光光度计 (UV755B,上海分析仪器总厂),台式高速离心机 (TGL-16G,上海医用分析仪器厂),紫外反射透射仪 (WFII-201型,上海分析仪器总厂)。

3 方法

3.1 总基因组 DNA的提取与纯化: 根据王培训^[2]等的植物总 DNA提取法加以改进,取 0.2 g 各实验药材样品于乳钵中用液氮冷却研碎成细粉,放入 1 mL Ep 管中,加入 400 μL 56℃提取缓冲液 (100 mmol/L NaOAc, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 2.5% PVP, 3% SDS, 1% β-巯基乙醇, pH 5.5),于 56℃水浴 30 min 后, 10 000 r/min 离心

* 收稿日期: 2000-07-07

基金项目: 国家“九·五”科技攻关课题 基金号: 96-903-02-01

作者简介: 徐朝晖 (1970-),男,安徽省芜湖市人,2000年 7月毕业于辽宁中医学院,获医学博士学位。主要研究方向为天然药物化学和中草药新药的研究与开发。现在上海浦东张江高科技园区从事天然产物的研究与开发工作。

10 min,取上清液加入 2/3体积的 KOAc溶液 (2.5 mol/L, pH4.8),于 4℃放置 15 min后,10 000 r/min离心 10 min,吸上清液移入另一支 1 mL EP管中,加入等体积氯仿-异戊醇 (24:1)抽提,混匀后,10 000 r/min离心 10 min,吸取上清液,重复用氯仿-异戊醇 (24:1)抽提 2次,上清液加入 2倍体积无水乙醇混匀后于 -20℃冰箱中静置 20 min,10 000r/min离心 10 min后所得 DNA沉淀用 70%乙醇洗 2次,空气干燥后溶于无菌重蒸馏水中,在 4℃保存备用。

3.2 RAPD扩增反应:反应总体积为 25μL,其成分为:10× Buffer w/Mg²⁺加 2.5μL 200μmol/L dNTPS, 0.5 g/L BSA, 2 U TaqDNA聚合酶, 20 ng模板。扩增程序为:94℃, 1 min; 36℃, 35 s; 72℃, 70 s; 2个循环 随后 94℃, 10 s; 36℃, 35 s; 72℃, 70 s; 42个循环。最后 72℃保温 5 min

3.3 扩增产物检测:取 RAPD反应液 10μL于 1.6%琼脂糖凝胶上用 10× TBE电泳缓冲液 (0.045 mol/L Tris-硼酸, 0.001 mol/L EDTA, pH8.0)电泳,电压 5 V/cm,电泳距离 4 cm 经 EB染色,在紫外透射反射仪下观察并照相,扩增产物长度与 100 bp DNA ladder标记物比较

4 结果

对 20个随机抽选的引物进行了扩增实验,结果四个引物扩增出 DNA条带,其中引物 S₁₃₆₇ (5'-CACGAGTCTC-3')扩增的结果稳定,如图 1所示:关大力、川大力、杜大力、泽大力生品扩增的 DNA指纹图谱完全一致 分别在 500, 700, 900和 1 000 bp出现条带。而关大力与杜大力制品则与前四者有差异,关大力制品 900 bp的条带不明显,多出 400 bp的条带,而杜大力制品仅在 500和 700 bp处出现两条条带。

5 讨论

5.1 从以上实验结果可知,采用与上一个实验相同的引物^[1],同种不同产地的四种生品牛蒡子扩增出的 DNA条带的位置与上一个实验完全一致,均出



M-100 bp DNA ladder 1关大力 2杜大力 3川大力 4泽大力 5关大力(制品) 6杜大力(制品)

图 1 同种不同产地牛蒡子的 RAPD指纹图谱

现在 500, 700, 900, 1 000 bp 这说明采用该引物在上述实验条件下反应具有较好的重现性。同时,同种不同产地的四种生品牛蒡子扩增出的 DNA指纹图谱相同,再次证明^[3] DNA指纹图谱用于鉴定同种药材的生品结果可靠。

5.2 本实验所提取的基因组总 DNA纯度,按 A₂₆₀/A₂₈₀之值判断(结果见表 2),均符合扩增要求^[4]。而经过炮制的牛蒡子与其生品的 DNA指纹图谱相比,主要缺少较长碱基对的

扩增条带,推测是由于在高温下 DNA降解所造成。这表明对于炮制过的中药材,如何能从中提取出未降解的基因组总 DNA,还有待进一步探讨。另外,同种炮制方法(炒牛蒡子)的杜大力和关大力制品, DNA指纹图谱差异较明显,提示: DNA指纹图谱可用于中药炮制品的质量控制和指导炮制工艺研究。当然,尚需做大量深入的研究工作。

表 2 各样品的总 DNA纯度测定数据

样品	纯度	样品	纯度
对照药材	1.9	杜大力	1.4
关大力	1.5	杜大力(制)	1.3
关大力(制)	1.4	泽大力	1.5
		川大力	1.3

致谢:本实验得到沈阳农业大学辽宁省农业生物技术中心李浩戈老师,吴元华教授的大力协助。

参考文献:

- [1] 徐朝晖,涂为,杨松松,等. RAPD法结合 TLC鉴别中药牛蒡子及其混淆品[J]. 中草药, 2000, 31(6): 455-458.
- [2] 王培训,黄丰,周联,等. 植物中药材总 DNA提取方法的比较[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 18-20.
- [3] 张荣,邵建本,田学明,等. 用 RAPD分析法对铁线莲属 7种中药的鉴定研究[J]. 中草药, 1996, 27(11): 686-687.
- [4] 王培训,黄丰,周联,等. RAPD在商品中药鉴别中若干问题的探讨[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 112-115.

· 最新消息 ·

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和新闻出版署近期发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确,必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”的广告。

医药专业媒体是指具有国家新闻出版管理部门批准的具有国内统一刊号(CN号),由医药卫生科研教育机构、学术团体等专业部门主办的,以医药卫生专业技术人员、管理人员为主要对象的医药卫生类报刊(不含面向大众的科普刊物)。

《中草药》杂志欢迎制药企业来函来电刊登广告!