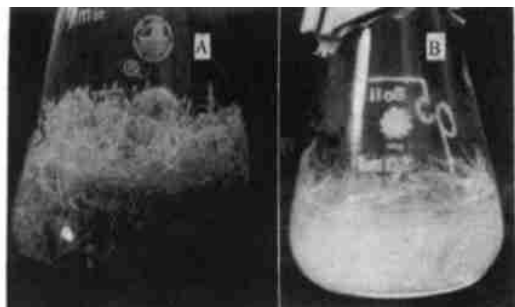


养物性能稳定,有利于提供稳定的次生代谢产物。

由墨旱莲获得的毛状根为绿色,该毛状根在 12 h/d 光照,光照强度 2 000 lx 条件下较黑暗中生长迅速,光照下第 18 天时重量增加 52 倍,而黑暗条件下仅增重 34 倍,并且颜色也不相同,光照下生长的呈黑绿色(图 1-A),在黑暗条件下生长的为淡绿色(图 2-B)。据报道,毛花洋地黄及鬼针草属、万寿菊属的植物诱导出的毛状根在光下培养变成绿色毛状根,其次生代谢产物的合成能力显著增加^[9,10],其机制尚不清楚。墨旱莲的次生代谢产物合成能力如何



A 光照条件下 B 黑暗条件下

图 1 墨旱莲毛状根

也需要进一步的研究。

致谢:墨旱莲种子经我室郑汉臣教授鉴定,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 汤海峰,赵越平,蒋永培.中药墨旱莲的研究概况[J].西北药学杂志,1999,14(1): 32-34.
- [3] 中国药典[S].2000年版.一部.
- [4] 孙敬三.植物细胞工程实验技术[M].北京:科学出版社,1995.
- [5] Morgan A J, Cox P N, Turner D A, *et al.* Transformation of tomato using an Ri plasmid vector [J]. Plant Science, 1987, 49(1): 37-49.
- [6] 常振战,果得安,沈昕,等.掌叶大黄毛状根培养及培养物中蒽醌类成分分析[J].药学报,1998,33(11): 869-872.
- [7] 费厚满,梅康凤,沈昕,等.发根农杆菌对绞股蓝的转化及毛状根中皂甙的产生[J].植物学报,1993,35(8): 629-631.
- [8] 刘伟华,姜静,石锐,等.发根土壤杆菌 Ri 质粒对黄瓜进行遗传转化的研究[J].植物研究,1997,17(4): 436-440.
- [9] 王毅,张美萍,关贺群,等.发根农杆菌感染龙胆再生植株的研究[J].吉林农业大学学报,1994,16(2): 43-45.
- [10] Yoshimatsu K, Satake M, Shimomura K, *et al.* Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Nat Prod, 1990, 53(6): 1498-1506.

当归药材道地性的 RAPD 分析

高文远¹,秦恩强²,肖小河^{2*},余惠曼²,高光跃¹,陈四保¹,赵扬景¹,杨世林¹

(1. 中国医学科学院 药用植物研究所,北京 100094; 2. 中国人民解放军 302 医院,北京 100039)

摘要:目的 从 DNA 分子水平上探讨当归药材道地性的生物学基础。方法 对来自不同产地的 18 个当归样品,提取其基因组 DNA,并进行 RAPD 分析。对筛选出的 10 个引物的 RAPD 结果进行聚类分析,得出 18 个当归样品的聚合树状图。结果 显示地理分布距离越小,当归的遗传差异越小;反之,越大。但生态环境特别是小生境对当归遗传差异的作用亦不可忽视。结论 为我们从分子生物学角度研究当归药材道地性提供了新的启示。

关键词: 当归;道地性; RAPD

中图分类号: R282.7 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)10-0926-04

Analysis on Genuineness of *Angelica sinensis* by RAPD

GAO Wen-yuan¹, QIN En-qiang², XIAO Xiao-he², YU Hui-ming², GAO Guang-yao¹, CHEN Si-bao¹, ZHAO Yang-jing¹, YANG Shi-lin¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China; 2. Hospital 302 of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract **Object** To investigate the genuineness of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels from the level of molecular biology. **Methods** The genomic DNAs of 18 samples of *A. sinensis* collected from different localities were isolated and analysed by RAPD. Based on the cluster analysis of their RAPD strips, the molecular phylogenetic tree of 18 *A. sinensis* samples was described. **Results** The results indicated that the smaller the geographic distance between two *A. sinensis* samples, the smaller their genetic difference; while the genetic difference became greater as their geographic distance increases. However it should not

收稿日期: 2001-05-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (编号 39730500)

* 联系人: Tel (010)66933324; E-mail xiaohx@hotmail.com

be overlooked that the natural environments, especially the local ecological conditions may also show some influence on the genetic variations among different *A. sinensis* samples. **Conclusion** It has provided us with the enlightenment of study on the genuineness of *A. sinensis* from the level of molecular biology.

Key words *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; genuineness; RAPD

在中医药长期医疗实践中,道地药材一直是评价药材品质的独特的综合性标准。道地药材与非道地药材物种来源一致或十分相近,在形态、生药性状及化学成分等特征上具有高度相似性,因而道地药材的鉴别往往不易,具有很大的主观性。

作为现代分子生物学技术重要手段的 DNA 分子遗传标记方法,将使从居群和分子水平上阐明药材道地性的生物学实质成为可能。陈永久等^[1]利用 RAPD 技术研究了冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 的不同地理群体间的遗传分化现象,结果表明:来自同一地方的样品遗传差异甚微,同一区域不同地方的样品间遗传差异较大,不同区域的样品间遗传差异最大,这为冬虫夏草的药材道地性研究提供了分子水平的支持依据。肖小河等^[2]研究表明, RAPD 技术不仅能正确鉴别姜黄属不同种间群体,而且对种内等级亦能进行有效的刻划,可作为姜黄属药用植物的分类鉴定与道地性评价的新手段。

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科多年生草本药用植物,其根含藁本内酯、阿魏酸等多种有效成分,有补血活血、润燥滑肠之功能。主产于甘肃省,一般认为甘肃岷县为其道地产区,但甘肃省宕昌、武都、漳县以及四川省南坪的当归也作药用^[3]。为探讨当归药材道地性形成的基因基础,为当归 GAP 生产提供理论依据,我们采集了来自当归不同产区的 18 个样品,采用 RAPD 法对其基因组 DNA 进行了分析,并结合聚类分析定性定量地探讨了不同产区(居群)的 18 个当归样品的基因组 DNA 多态性,从 DNA 分子水平上表征了当归药材道地性的生物学差异的实质。

1 材料

植物的材料来源见表 1,这些材料均由中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所冯毓秀教授鉴定。

2 实验方法

2.1 DNA 的提取: 采取 CTAB 法^[4],并略有修改。取叶片 1 g,用液氮研磨成粉末,研磨时加入 0.2 g PV P 粉。研磨后立即加入 2 mL CTAB 提取缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mmol/L EDTA pH 8.0, 250 mmol/L NaCl, 0.5% SDS,

表 1 用于 RAPD 分析的当归材料(叶片)

编号	植物名称	产地
1	<i>Angelica sinensis</i>	武都 01
2	<i>A. sinensis</i>	武都 02
3	<i>A. sinensis</i>	武都 03
4	<i>A. sinensis</i>	武都 04
5	<i>A. sinensis</i>	南坪 01
6	<i>A. sinensis</i>	南坪 02
7	<i>A. sinensis</i>	南坪 03
8	<i>A. sinensis</i>	宕昌 01
9	<i>A. sinensis</i>	漳县 01
10	<i>A. sinensis</i>	漳县 02
11	<i>A. sinensis</i>	岷县 01
12	<i>A. sinensis</i>	岷县 02
13	<i>A. sinensis</i>	岷县 03
14	<i>A. sinensis</i>	岷县 04
15	<i>A. sinensis</i>	岷县 05
16	<i>A. sinensis</i>	岷县 06
17	<i>A. sinensis</i>	岷县 07
18	<i>A. sinensis</i>	岷县 08

0.5% β -巯基乙醇), 60℃ 水浴保温 45 min, 加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 反复轻摇混匀, 5 500 r/min 离心 10 min (BECKM AN J2-21M 型超速离心机)。取上层水相, 再加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 反复轻摇混匀, 5 500 r/min 离心 10 min, 重复 2~3 次, 直到水相层绿色不明显。在水相中加入 2/3 体积的预冷的异丙醇, 于 -20℃ 静置 30 min 以上。10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 300 μ L TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mmol/L EDTA pH 8.0) 溶解, 加入 Rase A, 终浓度为 20 μ g/mL, 37℃ 保温 1 h, 然后分别用等体积平衡酚, 平衡酚-氯仿(1:1)及氯仿-异戊醇(24:1)各抽提 1 次。吸取上层水相, 加入等体积异丙醇沉淀 DNA, 1 000 r/min 条件下离心 10 min, 沉淀用 75% 冰醋酸洗涤 1~2 次, 干燥后用 200 μ L TE 溶解, -20℃ 保存备用。

2.2 PCR 反应: 参照 William^[5]的方法, 并稍加改动。从 200 个随机引物 (Oligo 公司) 中筛选 20 个 RAPD 引物进行 PCR 扩增。反应总体积为 25 μ L, 内含模板 DNA 1~10 ng, 引物 0.2 μ mol/L, dNTPs 各 0.1 mmol/L, Taq DNA 酶 (Promega 公司) 1 单位, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, gelatin 0.001%, 上盖有 25 μ L 石蜡油。PCR 扩增反应在 Gene CyclerTM 型 DNA 扩增仪 (Bio-Rad 公司) 上进行。反应循环为: 90℃,

1 min; 35℃, 2 min; 72℃, 2 min; 5个循环后改为 94℃, 30 s; 35℃, 1 min; 72℃, 2 min; 40个循环后于 72℃延伸 5 min。PCR扩增产物于 1.3% 琼脂糖 (内含 1μg/mL EB)凝胶中进行电泳检测。

2.3 数据处理: 任意两个样品之间的遗传距离 (D) 可以通过以下公式进行计划: $D = 1 - F$ 其中 F 为两个样品 RAPD 标记的共享度, $F = N_{xy} / (N_x + N_y)$, N_{xy} 为样品 X 和样品 Y 的 PCR 扩增产物分子量相同的 DNA 片段总数, N_x 、 N_y 分别为样品 X 和样品 Y 的 PCR 扩增产物的 DNA 片段总数。根据遗传距离 (D), 利用 UPGMA (unweighted pair method with arithmetic mean) 法进行聚类分析, 并构建聚合树状图。

3 结果与分析

首先采用 25 个 10 bp 的随机引物进行扩增, 从



M₁ 为 11eb ladder; M₂ 为 λ DNA/Hae⁺ HindIII

图 1 引物 Oligo 11-1098 PCR 扩增产物的电泳结果

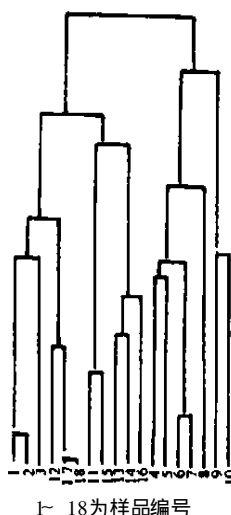
根据筛选出的 10 个引物的 PCR 扩增结果, 计算了各样品间的遗传距离。根据遗传距离, 利用聚类分析构建了不同产地当归 18 个样品的聚类树状图 (图 2)。从图 1 可以看出, 在同一引物的 RAPD 指纹图谱中, 不同供试材料的主谱带基本一致, 说明它们的遗传背景具有很大的相似性, 这也是鉴定当归真伪的重要标记。但不同样品的次谱带之间存在着不同程度的差异, 说明不同产地当归居群的遗传背景又具有丰富的多样性, 这为当归的药材道地性研究提供了分子水平上的参考信息。

图 2 的聚类分析结果综合显示了不同产地的 18 个当归样品由 10 个筛选出的引物进行 PCR 扩增的结果。图 2 比较直观地表明绝大多数地理分布距离越近的样品, 如 1~3 之间, 5~7 之间, 9, 10 之间及 11~18 之间, 在聚类树状图上的距离越近, 说明它们之间的遗传背景差异越小。反之, 地理分布距离越远的样品, 如上述各组之间, 在聚类树状图上的距离越远, 说明它们之间的遗传背景差异越大。但生

中筛选出谱带清晰并呈多态性的引物共 10 个, 表 2 列出了这 10 个引物的序列, 图 1 显示了引物 Oligo 11-1098 PCR 扩增产物的电泳结果。每个引物扩增的 DNA 片段数为 3~9 个, 筛选出的 10 个引物在每个样品中获得的 DNA 片段总数平均为 55 个。

表 2 筛选出的 10 个引物的序列

引 物	序 列
Oligo 11-1006	GCTCTCTGGC
Oligo 11-1021	TGAGTAACCG
Oligo 11-1034	ACCCTTCCCG
Oligo 11-1043	GATCCCGCCG
Oligo 11-1050	CTCTCCTCCG
Oligo 11-1058	TGTGGAAGCG
Oligo 11-1064	GGGGAACGCG
Oligo 11-1089	CTGGGATGCG
Oligo 11-1094	CCTTGCTGCG
Oligo 11-1098	CCAGAAACCC



1~18 为样品编号
图 2 18 个当归样品的 RAPD 聚类系统图

态条件特别是小生境对当归遗传差异的影响亦不可忽视, 如 4 号样品和 1, 2, 3 号样品之间在地理分布距离上虽然较近, 但在分子系统树上的距离却较远, 说明它们之间的遗传差异较大, 这可能是由于样品之间小生境的不同造成的。此外, 图 2 还显示在当归道地产区甘肃省岷县采集的 8 个样品 (11~18 号样品) 中, 12 号与 17, 18 号样品, 11 号与 15 号样品, 16 号与 13, 14 号样品之间在分子系统树上的距离更近, 表明它们在遗传背景上更为接近。这在进行生态遗传与当归药材道地性的相关分析时要引起注意。

可见, 基于当归 RAPD 多态性的聚类分析结果与当归主要产区的地理分布比较吻合; 同一地理分

布范围内,产地生态环境条件不同,当归的遗传背景又存在不同程度的差异。这为我们从分子生物学角度研究当归药材道地性提供了新的启示。可以说,药材的道地性不仅仅是一个地理意义上的概念,同时具有广泛的生物学内涵,更具有丰富的遗传特质。而作为现代分子生物学的重要手段,RAPD分子标记技术对揭示道地药材与非道地药材之间的地理—生态—遗传的差异将是一种十分有效的手段。

参考文献:

- [1] 陈永久,王 文,杨跃雄,等. 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化[J]. 遗传学报,1997,24(5): 410-413.
- [2] 肖小河,刘峰群,史成和,等. 中药分子鉴定学概念[J]. 中药材,2000,23(2): 107-109.
- [3] 肖小河. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药,2000,31(3): 209-212.
- [4] Scott O R. Extraction of DNA from Plant Tissue[J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, A6 1-6.
- [5] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等(颜子颖,王海林译). 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社,1998.

pH对红豆杉愈伤组织生长、PAL活性和紫杉醇含量的影响

盛长忠,王淑芳,王 勇,王宁宁

(南开大学 生物化学与分子生物学系,天津 300071)

摘要: 目的 研究不同 pH 值对东北红豆杉和南方红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响。方法 采用不同 pH 值的 B₅ 培养基培养两种红豆杉愈伤组织,测定生长率、PAL 活性和紫杉醇含量。结果 不同红豆杉愈伤组织所需最适 pH 值不同,而有利于愈伤组织生长的 pH 值均不利于 PAL 活性的提高和紫杉醇的积累。即:愈伤组织生长快时,PAL 活性将下降,紫杉醇含量也减少。结论 pH 值明显影响红豆杉愈伤组织的生长及次级代谢水平,从而影响了紫杉醇的合成与积累。

关键词: 红豆杉;愈伤组织;PAL;紫杉醇

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)10-0929-03

Effect of pH on callus growth, PAL activity and paclitaxel content of plants of *Taxus* L.

SHENG Chang-zhong, WANG Shu-fang, WANG Yong, WANG Ning-ning

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract **Object** To study the effect of pH on callus tissue growth and paclitaxel content of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. and *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu. **Methods** The callus tissues were cultured on B₅ medium with different pH values, and the growth rate, PAL activity and paclitaxel content were determined. **Results** Different callus tissues of taxus need different optimum pH values. The pH values, which could promote callus growth significantly, were all inhibitory to PAL activity and accumulation of paclitaxel. **Conclusion** pH had great influences on the growth of the callus and the level of secondary metabolism, thereby the synthesis and accumulation of paclitaxel were affected.

Key words *Taxus* L.; callus tissue; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); paclitaxel

红豆杉植物中有多种紫杉烷类似物,其中 10 余种具有抗肿瘤活性,尤其是紫杉醇(Paclitaxel)活性最高。紫杉醇主要存在于植物树皮中,来源有限,因此药源十分紧张。近年来,对红豆杉细胞大规模培养这一有希望长期供应紫杉醇来源技术的研究引起国内外高度重视。与之有关的研究也有很多报道。pH 值是影响植物组织生理代谢的重要理化因素之一。Fett-Neto^[1]指出培养基 pH 值在 4.8~7.8 范围内东北红豆杉愈伤组织生长无明显差别,而在我们所

进行的红豆杉愈伤组织培养中发现,愈伤组织对 pH 值非常敏感。为此,本文以东北和南方红豆杉愈伤组织为材料,研究了 pH 值对其生长、PAL(苯丙氨酸转氨酶,为催化苯丙氨酸形成肉桂酸反应的酶,经一些实验证明在紫杉醇合成过程中,肉桂酸可能参与了紫杉醇前体物质 wintersein 的形成)活性及紫杉醇含量的影响,以期细胞大规模培养生产紫杉醇提供理论和实验依据。

1 材料与方法