

# 中药三七根核糖体 18S rRNA 基因的序列分析

吴耀生<sup>1</sup>, Steve Slocombe<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学, 广西 南宁 530021; 2. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, U. K. LS2 9JT)

**摘要:**目的 研究中药三七根核糖体 18S rRNA 基因的序列特征。方法 根据模式植物拟南芥的 18S rRNA 的基因序列设计引物,对三七根的 18S rRNA 基因序列进行基因克隆、测序,并与模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 以及人参属植物喜马拉雅人参 *Panax pseudoginseng* Wall subsp. *himalaicus* var. *angustifolius* 的相应序列进行比较。结果 通过对产于广西靖西的三七 *Panax pseudoginseng* Wall. var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng 根的 18S rRNA 基因进行克隆测序,获得了三七根的 18S rRNA 基因的部分序列特征。结论 利用已完成全基因组序列测定的模式植物拟南芥的分子生物学信息来研究中药植物基源的基因组序列,将有助于加快中药植物基源的分子生物学研究进程。

**关键词:** 三七;拟南芥;18S rRNA 基因

中图分类号: R282.7 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)12-1116-04

## Sequencing of ribosomal 18S rRNA gene from *Panax pseudoginseng* var. *notoginseng*

WU Yao-sheng<sup>1</sup>, Steve Slocombe<sup>2</sup>

(1. Guangxi University of Medical Science, Nanning Guangxi 530021, China; 2. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, U. K. LS2 9JT)

**Abstract Object** To identify the characteristics of 18S rRNA from the root of *Panax pseudoginseng* Wall var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng (PGSN). **Methods** The primers were designed according to the gene sequence of 18S rRNA from the model plant *Arabidopsis thaliana*. 18S rRNA gene sequence of PGSN were cloned and sequenced and compared with that of the model plant *A. thaliana* and *P. pseudoginseng* subsp. Wall *himalaicus* var. *angustifolius*. **Results** Part of the characteristics of ribosomal 18S rRNA gene sequence of PGSN from Jingxi, Guangxi Province were identified, which revealed that the 18S rRNA gene sequence of PGSN was 98% similar to that of *P. pseudoginseng* subsp. *himalaicus* var. *angustifolius* and 96% similar to that of the model plant *A. thaliana*. **Conclusion** The use of informations obtained from the model plant, *A. thaliana* may promote the research progress of molecular biology of TCM drugs.

**Key words** *Panax pseudoginseng* Wall var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; 18S rRNA gene

中药三七是一味应用广泛的传统药物,具有止血、散瘀、消肿、定痛的作用。中药临床上主要用于治吐血、咳血、衄血、便血、血痢、产后血晕、恶露不下、跌扑瘀血、外伤出血、痈肿疼痛。《本草纲目》<sup>[1]</sup>上记载,三七能“止血、散血、定痛。金刃箭伤,跌扑杖伤,血出不止者,嚼烂涂,或为末掺之,其血即止。亦主吐血、衄血、下血、血痢、崩中、经水不止、产后恶露不下、血运、血痛、赤目、痈肿、虎咬、蛇伤诸病。”现代临床研究证明,三七还具有滋补功能,有助于肾上腺皮质激素及雄性激素的产生,帮助改善冠状动脉血流,

用于治疗动脉粥样硬化、高血压、心绞痛等<sup>[2]</sup>。

三七的药用植物基源是五加科植物人参三七 *Panax pseudoginseng* Wall. var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng 的根 (PGSN)<sup>[3]</sup>。目前关于三七植物基源的分子生物学研究在国内外尚未见报道。从分子生物学水平来研究中药植物基源的基因,寻找有效成分的功能基因,对中药现代化研究有重要意义。根据模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh 的 18S rRNA 的基因序列设计引物,对三七根的 18S rRNA 基因序列进行基因克隆,从而获得

\* 收稿日期: 2001-05-14

作者简介: 吴耀生 (1958-), 女, 广西医科大学生物化学教研室副教授, 硕士, 2000-03~2001-03 在英国利兹大学生物化学与分子生物学系作访问学者。 Tel (0771-5350741) E-mail wuyaosheng@hotmail.com

了三七根的 18S rRNA 基因的序列特征

1 材料

1.1 三七根采于广西靖西县三合乡三七产地,为 3 年头,采集后切成厚约 0.2 cm,直径约 1.2 cm 薄片,并立即存放于购自英国 Ambion 公司的 RNAlater 溶液中,三七根与 RNAlater 溶液的体积比为 1:5 拟南芥 *A. thaliana* 由英国利兹大学生物化学与分子生物学系 Green House 提供

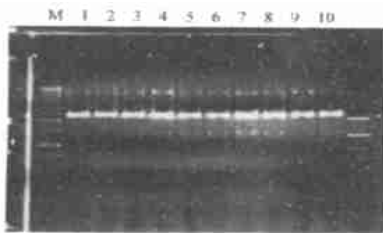
1.2 Nucleon PHYTOpure DNA 提取试剂盒, Scot Lab Bioscience; TaKaRa Ex Tap<sup>TM</sup>, 10× EX Taq<sup>TM</sup> 缓冲液, 2.5 mmol/L dNTP 混合物, TAKARA SHUZO CO., LTD.; QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN; pGEM<sup>R</sup>-T Easy Vector System, Promega; Bam HI EcoR I Sac I SmaI, BioLabs 等

1.3 PCR 引物: 根据拟南芥 18S rRNA 基因的序列 (Accession X16077, GI 16506) 设计一对引物: ATR RNA SI, 5'-AGCCATGCATGTGTAAGTATGAA-3'; ATR RNA ASI, 5'-GGCATCGTTTATGGTTGAGACTA-3'。此对引物对拟南芥基因组的 PCR 扩增产物长度为 989 bp

1.4 PCR 仪 HYBAID; DNA 测序仪, ABI PRISM Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing 373 Sequencer 等

2 方法与结果

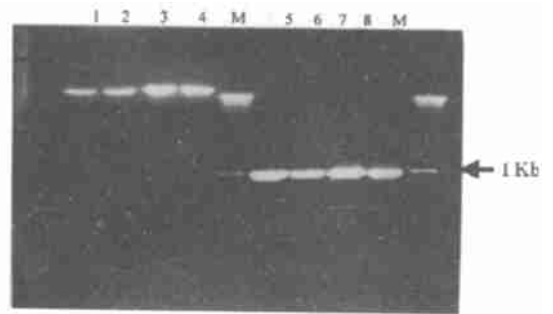
2.1 三七根 DNA 的提取: 将存于 RNAlater 溶液中的三七根切片取出,放在乳钵中,在液氮冷冻条件下研磨为细末,采用 Nucleon PHYTOpure DNA 提取试剂盒,按说明书操作,提取 DNA 所提 DNA 经电泳检测其质量 (图 1),紫外分光法测定其浓度,并



阳性克隆质粒电泳图 M-1Kb DNA ladder  
1-10 阳性质粒

用灭菌双蒸水稀释为 20 ng μL 应用。

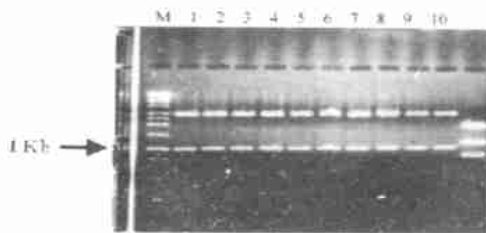
2.2 PCR 及其产物的纯化: PCR 条件为: 10× EX Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 引物 ATR RNA SI (10 μmol/L), ATR RNA ASI (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 *Arabidopsis thaliana* DNA (0.2 ng μL) 2 μL 或 PGSN DNA (20 ng μL) 2 μL, TaKaRa Ex-Taq 0.5 μL, 灭菌双蒸水补足体积为 50 μL 采用热启动 PCR, 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min 35 个循环, 72℃ 10 min 补齐 PCR 产物片段 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙啶染色, 在紫外灯下切出含 PCR 产物条带的凝胶, 采用 QIAquick Gel Extraction Kit, 按说明书操作, 纯化 PCR 产物。



1-PGSN DNA 2-*Arabidopsis* DNA M-1kb DNA ladder  
3-PGSN PCR 产物 4-*Arabidopsis* PCR 产物

图 1 PGSN 或 *Arabidopsis* DNA 及 PCR 产物电泳图

2.3 PCR 产物 PGSN-rRNA 与 pGEM<sup>R</sup> Easy 载体的连接与转化: 采用 Promega 试剂盒按说明书操作, 经 X-Gal/IPTG/Carbenicillin 琼脂板蓝白筛选, 挑出白色阳性克隆, 进一步扩大培养, 纯化质粒, 作酶切鉴定 (见图 2)。



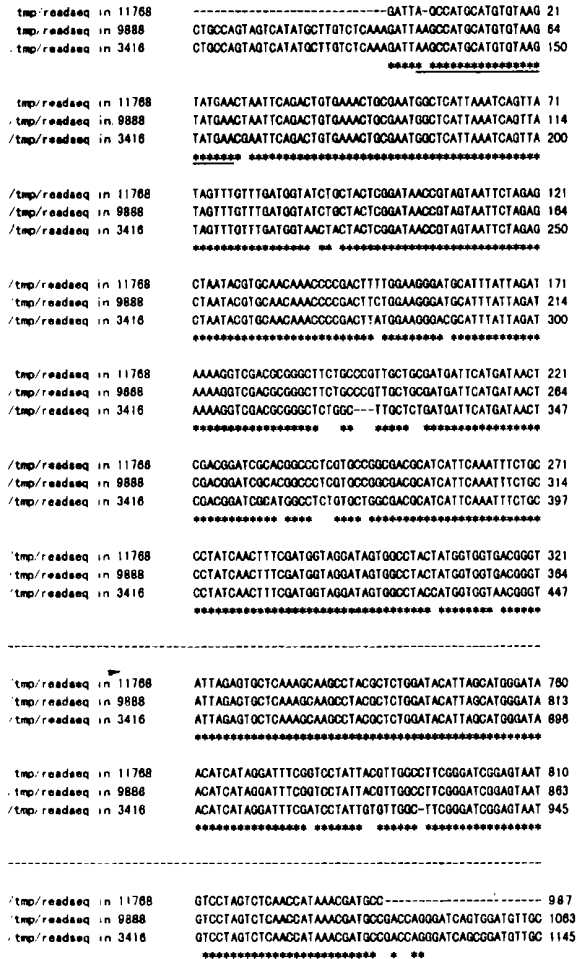
经 EcoR I 酶切的阳性质粒电泳图 M-1Kb DNA ladder  
1-10 经 EcoR I 酶切的阳性质粒

图 2 三七克隆质粒电泳图

2.4 pGEM<sup>R</sup>-T Easy-PGSN-rRNA 的序列测定: 采用 ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing 试剂盒, 按说明书操作, 采用 T7 SP6 启动子序列引物, 进行双向测序反应, 在 ABI PRISM<sup>TM</sup>

Dye Terminator 373 Sequencer 仪上进行序列分析。所得序列已送 Genbank, Genbank Accession Number 为: BankIt418689, AF412275 用 EBI 的 CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Aligem-

nts软件比较拟南芥 *A. thaliana*、人参属植物 *P. pseudoginseng* subsp. *himalaicus* (PGSH) (AC-CESSION AB044902; VERSION AB044902.1; GI 13516365)、三七 (PGSN) 的 18S rRNA 的 DNA 序列。三七与人参属植物 PGSH 18S rRNA 同源区域比较, 同源率为 98%; 人参属植物 PGSH 与拟南芥比较, 同源率为 96%; 三七与拟南芥比较, 同源率为 94%。Multiple Sequence Alignment 结果见图 3



11768-PGSN, 9888-PGSH, 3416-*Arabidopsis*;

下划线,引物位点

图 3 PGSN, PGSH, *Arabidopsis* 的 18S rRNA 序列的比较分析

2.5 PCR产物的酶切分析: 采用 Bam HI EcoR I Sac I Sma I 分别对拟南芥和三七的 ATR RNA PCR 产物进行酶切, 并用 BCM Serach Launcher query sequence 软件对所测定的序列进行酶切位点分析。结果见图 4

### 3 讨论

随着分子生物学技术的飞跃发展及其在生命科

学领域中的广泛应用,使采用现代生物技术研究开发现有中药,实现中药现代化研究迫在眉睫并可能实现。利用已完成全基因组序列测定的模式植物拟南芥 *Arabidopsis*<sup>[4]</sup> 的分子生物学信息来研究中草药植物基源的基因组序列,将有助于加快中药植物基源的分子生物学研究进程



M-1 kb DNA ladder, 1- 5-PGSN; 6- 10, *Arabidopsis* 1, 6未酶切; 2, 7-Eco R I 酶切; 3, 8-Bam H I 酶切; 4, 9-Sac I 酶切; 5, 10-Sma I 酶切

图 4 PGSN 或 *Arabidopsis* PCR 产物限制性酶切分析图

对中药三七根的 18S rRNA 基因的序列研究, 是我们对三七分子生物学研究的一个开端。18S rRNA 是生物进化上保守的一个区域。根据我们对三七 18S rRNA 基因序列的克隆测序结果, 三七与拟南芥有 94% 的同源性, 拟南芥在该序列的 495 bp 处有一个 BamHI 酶切位点, 可将 PCR 产物切成 494 bp、495 bp 两个片段, 琼脂糖凝胶电泳时仅见一条带。三七在该序列的 493 bp 处也有一 BamHI 酶切位点, 酶切后可得 498 bp、489 bp 两个片段, 琼脂糖凝胶电泳时也仅见一条带。可见该酶切点是相当保守的。相对于拟南芥的 324 位碱基, PGSN 和 PGSH 均有插入序列 CCG, 而拟南芥缺乏此序列; 在 319→321 位点, 拟南芥为 CTG, PGSN 和 PGSH 为 TCT; 在 332→333, 拟南芥为 CT, PGSN 和 PGSH 为 GC; 拟南芥在 365→367 位的序列是 TCT, 而 PGSN 和 PGSH 在此位置的碱基是 CTC, 在 921→922 bp 位, 拟南芥是 GT, 而 PGSN 和 PGSH 为 AC。这些位点有可能作为人参属植物基因鉴定的特异位点。在引物对 ATR RNA SI ATR RNA ASI 扩增的 18S rRNA DNA 区域内, 拟南芥及三七均缺乏 EcoR I Sac I Sma I 酶切位点。

我们采用 Ambion 公司的 RNAlater 溶液保存三七块根切片, 常温存放约 1 周, 4℃ 存放约 1 个月, 采用 Nucleon PHYTOpure DNA 提取试剂盒, 可提出质量较好的 DNA; 采用 Ambion 公司的 Plant RNA Isolation Aid 以及 RN Aqueous™ kit, 也可分离出 RNA 用于反转录 PCR, 可解决产地较远时, 植物样品中 DNA 与 RNA 的保存问题。对三

## 七植物的分子生物学研究,仍在继续进行

致谢:本研究是在英国利兹大学生物化学与分子生物学系 Dr. Baker 实验室完成的,得到 Dr. Baker 的大力支持与帮助,Dr. Wayne 提供所需引物,在此特致深切感谢。广西医科大学生物化学教研室蓝秀万讲师帮助部分排版,也在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 校点本上册. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [2] Chevallier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants, Dorling Kindersley [M]. London 1996 ISBN 9-780751-303148
- [3] 江苏新医学院编. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 人民出版社, 1997.
- [4] Eckardt Nancy A. Arabidopsis Genome Conference 2000 How a small Weed Changed the World [J]. The Plant Cell, 2001, 13 5-10, www. plantcell. org

## 短葶飞蓬总黄酮含量的生态生物学分析

苏文华<sup>1</sup>, 陆洁<sup>2</sup>, 张光飞<sup>1</sup>, 王崇云<sup>1\*</sup>

(1. 云南大学生态学与地植物学研究所, 云南 昆明 650091; 2. 云南省第一人民医院, 云南 昆明 650021)

**摘要:** 目的 为研究短葶飞蓬总黄酮含量在个体器官间、个体间、不同地区和不同生境种群间的变化规律。方法 测定了云南邱北、昆明等 8 个地区、大理苍山不同海拔条件下生长和栽培的短葶飞蓬植株体内总黄酮含量。结果 不同地区生长的短葶飞蓬总黄酮含量不同; 同一地区, 总黄酮含量有随海拔升高而上升的趋势。植株地上部分茎、叶和花的总黄酮含量高于地下部分根的, 生长在同一生境的短葶飞蓬不同个体总黄酮含量也有差异。结论 短葶飞蓬体内总黄酮含量的高低是基因和环境条件共同作用的结果。

**关键词:** 短葶飞蓬; 总黄酮; 含量分析

中图分类号: R282. 21

文献标识码: B

文章编号: 0253- 2670(2001) 12- 1119- 03

Ecological and biological analysis of total flavonoids in *Erigeron breviscapus*

SU Wen-hua<sup>1</sup>, LU Jie<sup>2</sup>, ZHANG Guang-fei<sup>1</sup>, WANG Cong-yun<sup>1</sup>

(1. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China; 2. Yunnan First People's Hospital, Kunming Yunnan 650021, China)

**Abstract Object** To study the regular change of total flavonoids in *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz (TFE) in different parts of the plant, different individual plant and population from different habitat. **Methods** Samples of *E. breviscapus* from eight districts around Qiubei, Kunming and at altitude on Cangshan mountain, Dali were collected and their flavonoids determined. **Results** TFE showed different values in samples from different origin, with the tendency to show an increase with increase of altitude. The aerial parts including stem, leaf, and flower were higher than that of the underground root. *E. breviscapus* grown in the same ecological conditions also showed different TFE values from individual to individual. **Conclusion** Variation in TFE was influenced by the combined effects of genotype and ecological conditions.

**Key words** *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz; total flavonoids; quantitative analysis

短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz, 俗名灯盏花, 灯盏细辛, 属菊科短葶飞蓬属的植物, 产于云南、湖南、广西、贵州、四川及西藏等省区<sup>[1]</sup>。是一种民间常用中草药<sup>[2]</sup>, 全草入药, 曾列入《中国药典》1977年版一部<sup>[3]</sup>。70年代起, 对其化学成分进行了大量研究, 发现短葶飞蓬的主要药用

成分为黄酮<sup>[4,5]</sup>。具有扩张血管的作用, 对治疗闭塞性脑血管疾病所致瘫痪及脑出血后遗瘫痪有特效。

已有的研究表明, 短葶飞蓬植株中总黄酮含量有季节变化<sup>[6]</sup>。本研究对其黄酮含量进行了生态生物学分析, 初步探讨短葶飞蓬植株中总黄酮积累规律, 为短葶飞蓬植物资源的有效利用和人工种植技

\* 收稿日期: 2001-01-08

作者简介: 苏文华 (1962-), 男, 硕士, 副教授。研究方向: 野生药用植物驯化栽培。