

参考文献:

- [1] 郁青,沈兆邦,陈祥,等. '97中国银杏开发研讨会文集汇编[C]. 上海:国家科委中国农村技术开发中心, 1996.
- [2] Camponovo F F, Wolfender J L, Maillard M P, *et al*. Evaporative light scattering and thermospray mass spectrometry: two al-

ternative methods for detection and quantitation liquid chromatographic determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaf extracts and phytopharmaceuticals [J]. *Phytochem Anal*, 1995, 6 (3): 141-148.

阳春砂的 ITS 序列分析

周联,王培训,黄丰,曹柳英,梁瑞燕*

(广州中医药大学临床药理研究所,广东 广州 510405)

摘要: 目的 用 ITS 全序列鉴别各地产阳春砂及常见伪品。方法 从各地产阳春砂及常见伪品绿壳砂和海南砂中提取总 DNA,以核基因组通用引物 ITS 为引物进行扩增,扩增产物经纯化后,用 PCR 产物直接法进行测序。结果 各样品的 ITS 序列总长度均为 626 bp,其中 ITS-1 序列长度为 248 bp,5.8 S 序列长度为 155 bp,ITS-2 序列长度为 223 bp;6 个阳春砂和绿壳砂的 ITS-2 序列完全一致,各样品的 5.8 S 序列完全一致,在 ITS-1 中各样品却有不同碱基位点。结论 ITS-1 序列可对阳春砂的道地性作出鉴别,明显区分其伪品。

关键词: ITS 序列;测序;阳春砂;中药鉴别

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0072-04

ITS sequence analysis of *Amomum villosum*

ZHOU Lian, WANG Pei-xun, HUANG Feng, CAO Liu-ying, LIANG Rui-yan

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of TCM, Guangzhou Guangdong 510405, China)

Abstract **Object** To identify *Amomum villosum* Lour. from different producing area by ITS sequence analysis. **Methods** Firstly, total DNA of *A. villosum* from different producing area was extracted and its succedaneum or fake was extracted. Secondly, the ITS sequence was amplified by PCR with universal primer of ITS and sequencing ITS on PCR product was directly sequenced after purification. **Results**

The total length of ITS sequence is 626 bp in the different samples. The ITS sequence can be divided into three fragments: the length of ITS-1 is 248 bp, 5.8 S is 155 bp and ITS-2 is 223 bp respectively. In all the samples, 5.8 S has the same sequence. Six *A. villosum* from different producing area and *Lugiao amomum* have the same ITS-2 sequence. But ITS-1 fragment has bigger diversity in base sequence among the various specimens. **Conclusion** ITS-1 sequence can be used to confirm producing area of *A. villosum*, and find out its fake.

Key words ITS sequence; analysis of ITS sequence; *Amomum villosum* Lour.; Chinese materia medica identification

PCR 直接测序法是 90 年代迅速发展起来的测序技术,具有快速、灵敏、准确率高等特点。近几年,该技术在中药材的鉴别中得到一定的应用,由于目前绝大多数中药材的基因序列尚不知晓,所以现阶段的中药材测序主要是采用通用引物,对样品进行 PCR 扩增,然后进行小片段的测序。常见的引物有 rbcL (叶绿体基因组)、ITS 等 (植物类核基因组)、

cty-b (动物类线粒体基因组)等。其中,ITS-1 序列变异较快,可用于解决属下不同种的系统发育和分类问题^[1]。

阳春砂为四大南药之一,是常见的芳香化湿中药,具有化湿行气、温脾止泻、安胎等功效。我们曾用 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 技术对不同产地的阳春砂与姜科多种常见伪品进行了鉴别分析,结果

* 收稿日期: 2001-03-14

基金项目: 国家中医药管理局科研基金 (950379); 广东省自然科学基金 (950615)

作者简介: 周联,男,广东人,硕士,广州中医药大学临床药理研究所副研究员,长期从事中西医结合基础研究工作,分子生物学技术在中药鉴别中的应用是主要研究方向之一,主讲《医学分子生物学课程》,曾主持或参加国家、部、省级研究项目 15 项,发表论文 20 余篇,是国家级继续教育项目教材《分子生物学技术在中药鉴别中的应用》的主编,《中药免疫学》的主要编写人员,现正在参与主编《中药的分子生物学鉴别》一书。E-mail: zlgzhtcm.edu.cn

发现在 RAPD 指纹图中,各地产阳春砂基本一致,仅有个别在极少数引物的扩增下,呈现了少量的多态性。另外,阳春砂与绿壳砂及海南砂所产生的 RAPD 多态性指纹差异也较少,不易鉴别^[2],因此本实验旨在通过对各地产阳春砂及其伪品的 ITS 测序分析,为中药材的道地性分子鉴别打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料: (见表 1,表中 1~3 号为阳春砂的道地产区) 本校中药资源教研室徐鸿华教授提供并鉴定。

1.2 试剂: Tris (B. M.), SDS (Serva), Taq 酶、琼脂糖 (Promega), PCR 产物纯化试剂盒 (宝灵曼); Marker 加拿大 MBI

1.3 主要仪器: 低温高速离心机 (Beckman GS-15R); 紫外可见分光光度计 (Pharmacia 4000); 凝胶成像仪 (UV P GDS7600G); 低温恒温式电泳仪 (LKB); PCR 仪 (PE 2400)。

1.4 DNA 提取: 称取 0.3 g 各中药材样品,用高盐、低 pH 法^[3]获得总 DNA

表 1 各样品基原、收集时间及样品纯度

序号	样品	收集年月	比值 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1	阳春砂 (广东春湾) <i>Amomum villosum</i> Lour.	1998-03	1.13
2	阳春砂 (广东潘龙)	1997-11	1.95
3	阳春砂 (广东广宁)	1992-09	1.11
4	阳春砂 (广东佛冈)	1998-05	1.04
5	阳春砂 (广西防城)	1996-09	1.12
6	阳春砂 (云南文山)	1998-08	1.22
7	绿壳砂 (广东广宁) <i>A. villosum</i> var. <i>A. xanthioides</i> (W-all. ex Bak) D. T. Wu et Senjen	1998-09	1.39
8	海南砂仁 (海南海口) <i>A. longiligulare</i> T. L. Wu	1998-08	1.29

1.5 DNA 扩增: 50 μL 反应体积含各 5 μL (2 μmol/L) 的引物 a 和 b, 0.2 μL Taq 酶 (5 U μL), 5 μL 10× buffer, 5 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 5 μL 的 dNTP (25 mmol/L) 及 25 ng 模板,加水至 50 μL。扩增条件为 94℃ 预变性 3 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 30 次,最后 72℃ 3 min, 扩增所得 PCR 产物用宝灵曼的 PCR 产物纯化试剂盒纯化 (步骤参照说明书)。

1.6 ITS 测序 (见图 1): 采用 ITS 序列测定的通用引物测序,上游引物为 a 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3', 下游引物为 d 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (引物由大连华运公司合成)^[4,5]; PCR 产物经纯化后,交由上海基康生物技术有限公司进行测序。为了保证序列

测定的精度,除了用 a 和 d 以外,尚用 b 和 c 分别进行逆向测序 (b 的序列为 5'-GCT ACG TTC TTC ATC GAT GC-3'; c 的序列为 5'-GCA TCG ATG AAG AAC GTA GC-3')^[6,4]。

1.7 序列分析: 用 OMIGA 2.0 进行排序分析。

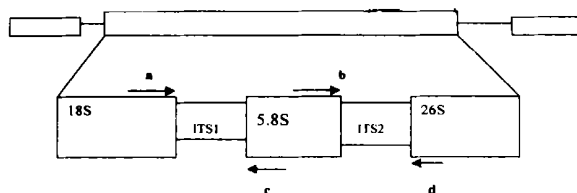


图 1 ITS 基因结构图

2 结果

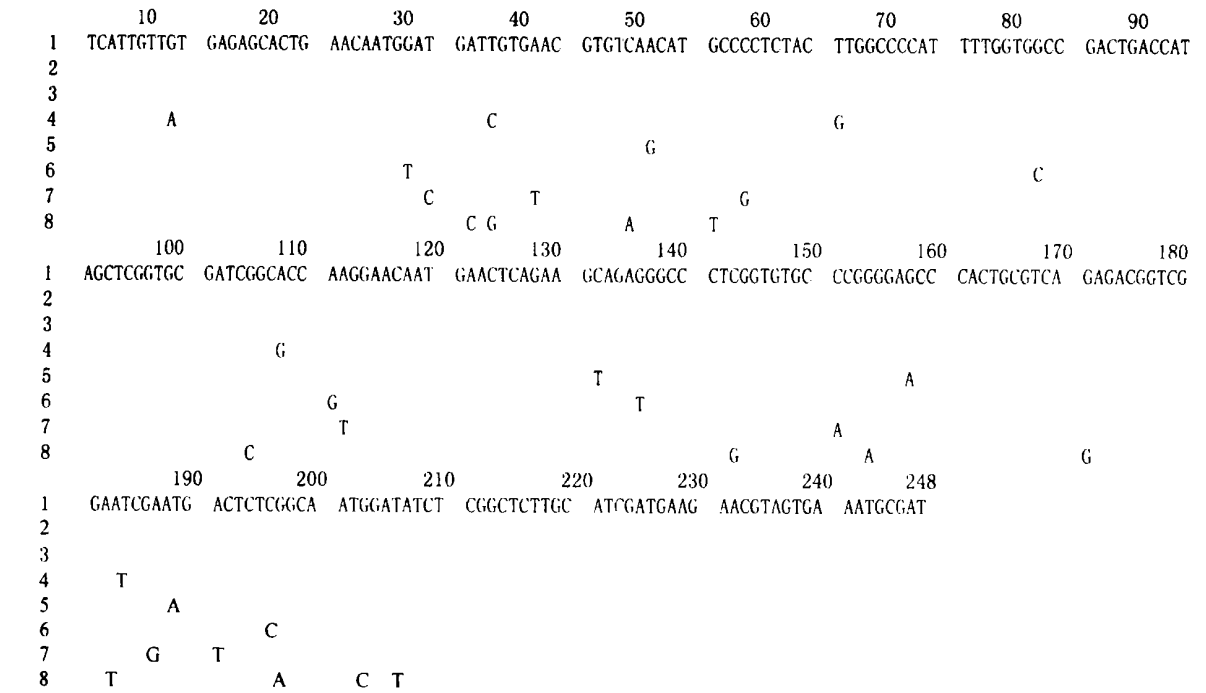
结果见图 2, 3

(1) 8 个样品的 ITS 总长度均为 626 bp, 其中 ITS-1 序列长度为 248 bp (图 2), 5.8S 序列长度为 155 bp, ITS-2 序列长度为 223 bp (图 3)。(2) 6 个阳春砂的 ITS-2 序列完全一致 (404~626), 8 个样品的 5.8S (249~403) 完全一致, 在 ITS-1 中各样品有不同的碱基位点; (3) 阳春砂原产区的 1 号 (广东春湾)、2 号 (广东潘龙)、3 号 (广东广宁) 序列完全一致; (4) 4 号样品 (广东佛冈) 有 5 个碱基与 1~3 号不同, 分别为 9, 34, 61, 108, 190 号; (5) 5 号样品 (广西防城) 有 4 个碱基与 1~3 号不同, 分别为 47, 132, 158, 198; (6) 6 号样品 (云南文山) 有 5 个碱基与 1~3 号不同, 分别为 27, 78, 111, 136, 213 号; (7) 7 号样品 (绿壳砂) 有 8 个碱基与 1~3 号不同, 分别为 30, 38, 54, 112, 151, 194, 203 (ITS-1), 417 (ITS-2); (8) 8 号样品 (海南壳砂) 有 15 个碱基与 1~3 号不同, 分别为 31, 33, 45, 51, 104, 142, 153, 171, 188, 213, 226, 230 (ITS-1), 413, 437, 475。(9) 上述样品均用 2 个以上个体并从 ITS 两端测序, 未检测到个体差异。

从测序结果可知: 各样品的 ITS-1 序列差异大, 而 ITS-2 差异小。阳春砂 (1~3 号) 与海南壳砂的 ITS 序列相差最大, 达 15 个 (2.4%), 与绿壳砂的相差也较大, 为 8 个 (1.28%); 不同产地的阳春砂在 ITS-2 之间没有差异, 在 ITS-1 序列碱基相差最大 5 个 (广东佛冈、云南文山), 最小为 0 (1~3 号)。

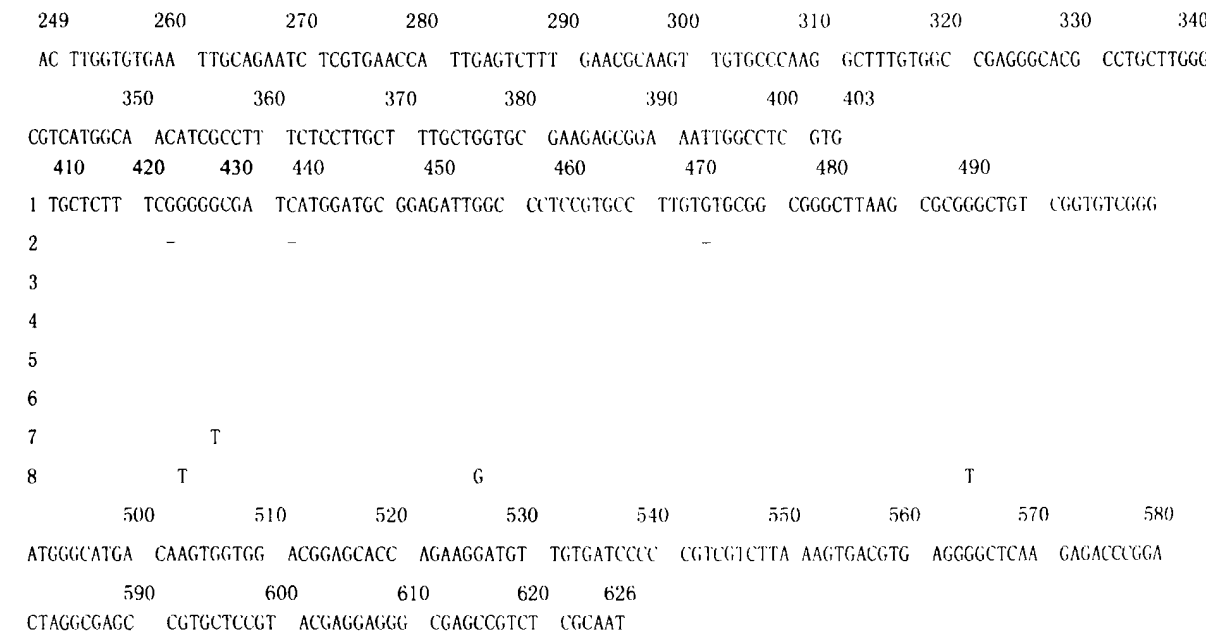
3 讨论

以往的中药材测序研究报道, 大多是种上之间的测序, 所以序列相差较大, 而本实验的样品主要为同种不同产地 (各地产阳春砂) 及亲缘关系较近的



1-阳春砂 (广东阳春湾); 2-阳春砂 (广东潘龙); 3-阳春砂 (广东广宁); 4-阳春砂 (广东佛冈);
5-阳春砂 (广西防城); 6-阳春砂 (云南文山); 7-绿壳砂 (广东广宁); 8-海南壳砂仁 (海南海口)

图 2 8 个样品 ITS-1 序列 (1~ 248)



1-阳春砂 (广东阳春湾); 2-阳春砂 (广东潘龙); 3-阳春砂 (广东广宁); 4-阳春砂 (广东佛冈);
5-阳春砂 (广西防城); 6-阳春砂 (云南文山); 7-绿壳砂 (广东广宁); 8-海南壳砂仁 (海南海口)

图 3 8 个样品的 5.8 S (209- 403)和 ITS-2 序列 (404- 626)

物种 (绿壳砂),从这个角度来讲,序列变异还是相 别时,较为灵敏
当丰富的,虽然这些基因差异不能将各地产阳春砂全 测序鉴别成功与否与引物的选择密切相关,一
部区分开,但也能部分进行不同产地的鉴别,而且与 方面所选用的引物必须灵敏,才能检测出亲缘关系较
RAPD相比,在鉴别阳春砂与绿壳砂及海南砂的差 近的物种.另一方面,所选的序列须缺乏个体差异.从

测序结果看: (1) ITS序列能在各地产阳春砂中测出最多达 5个的变异位点,而在真伪品中则有分别有 8个(绿壳砂)和 15个位点(海南砂),说明变异位点丰富;(2) ITS-1的长度在不同的物种中有一定的差异,如在被子植物中 ITS-1的长度为 187~ 298 bp^[7],实验结果显示 8个样品的长度均为 248 bp,没有长度变化,同时也未发现个体差异,说明 ITS-1在砂仁类的物种进化中又相对保守,实验结果表明我们所选择的引物是合适的。

从报道和实验来看,ITS-1较为适用于亲缘关系较近的中药材鉴别。

参考文献:

- [1] 江小全,洪德元. 植物分类系统近五年的研究进展概况[J]. 植物分类学报,1997,35(5): 465-480.
[2] 王培训,黄丰,周联,等. 阳春砂与几种常见姜科伪充品的

RAPD分析[J]. 中药材,2000,23(2): 71-73.

- [3] 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): 17-20.
[4] 葛颂,Schaal B A,洪德元. 用核糖体DNA的ITS序列探讨裂叶沙参的系统位置——兼论ITS片断在沙参属系统学研究中的价值[J]. 植物分类学报,1997,35(5): 385-395.
[5] Cole B C, Knudtson K L, Oliphant A, *et al.* The sequence of the mycoplasma arthritidis superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens[J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 1105-1109.
[6] Liu J S, Schardl C L. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(2): 775-778.
[7] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82(2): 274.

三七 GAP栽培的环境质量评价

崔秀明,王朝梁,陈中坚,王勇*

(云南省文山州三七研究所,云南 文山 663000)

摘要:目的 对三七GAP种植基地的环境质量进行评价,为制定三七SOP和建立三七GAP种植基地建设提供科学依据。方法 采用文献方法对三七GAP种植基地规划区进行水资源、土壤环境和大气环境进行分析评价。结果 三七GAP种植基地规划区大气环境质量达GB3095-82(大气环境质量标准)一级标准,水资源达GB5084-85(农田灌溉水质标准)的一类标准,土壤环境达GB15618-1995(土壤环境质量标准)二级标准。结论 三七GAP种植区环境质量良好,符合绿色药材栽培的环境质量要求。

关键词:三七;土壤环境;大气环境;水资源;评价;GAP

中图分类号: R282.21 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)01-0075-03

Estimate of environmental condition on GAP culture of *Panax notoginseng*

CUI Xiu-ming, WANG Chao-liang, CHEN Zhong-jian, WANG Yong
(Wenshan Prefecture Institute of Sanqi, Wenshan, Yunnan, 663000, China)

Key words *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen; soil environmental condition; atmospheric condition; aqueous condition; estimate; GAP

按照GAP标准,建立优质中药材药源基地,是我国中药现代化的重要内容。中药材生产的环境质量评价是建立GAP生产基地必须开展的重要内容。三七*Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen是我国人工栽培较早的名贵中药材,已有400余年

的栽培历史。从1997年开始,有关企业积极开展了优质三七基地建设。现已在文山州建立了60公顷优质三七基地。《200公顷优质无公害三七基地建设》项目已经列入云南中药现代化产业基地建设项目。为保证三七GAP基地生产的产品质量,我们对

* 收稿日期: 2001-05-15

基金项目: 云南省应用基础研究重点基金资助项目(1999C0009Z)

作者简介: 崔秀明,男,云南文山人,高级农艺师,1985年毕业于云南农业大学农学系,主要从事三七GAP及新药开发方面的研究工作,承担国家中药现代化项目1项,省中药现代化项目及基金项目多项,发表论文30余篇。

Tel 0876-2141062 E-mail: snaqi30@ Hotmail. com.