

· 药材 ·

RAPD 法鉴定射干类中药

黄芸¹, 秦民坚^{1*}, 杨光², 徐珞珊¹, 周开亚^{2*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 2. 南京师范大学 江苏省资源生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 用 RAPD 技术对射干类药材射干 *Belamcanda chinensis* 及混淆品鸢尾属鸢尾 *Iris tectorum*、野鸢尾 *I. dichotoma*、蝴蝶花 *I. japonica*、德国鸢尾 *I. germanica* 等 5 种药用植物进行分子水平的鉴定。方法 CTAB 法和 DNeasy™ Plant Mini Kit 法提取射干类药材 5 种原植物总 DNA, 以随机引物进行随机扩增。结果 用 OPD-08 (5'-gtgtgccca-3' 等作随机扩增引物进行随机扩增时, 可得到识别这些物种基因组 DNA 的多态片段。结论 RAPD 法能有效的鉴别射干类药材, 把射干和鸢尾、野鸢尾、蝴蝶花、德国鸢尾等药用植物区分开。

关键词: 射干; 鸢尾属; RAPD; DNA 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002-10-0935-03)

Identification of *Belamcanda chinensis* and related Chinese materia medica of *Iris* L. by RAPD analysis

HUANG Yun¹, QIN Min-jian¹, YANG Guang², XU Luo-shan¹, ZHOU Kai-ya²

(1. College of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Key Laboratory of Resources Biotechnology of Jiangsu Province, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Object** To indentify the crude drugs of 'Shegan' [*Belamcanda chinensis* (L., DC.) and related Chinese materia medica of *Iris* L., including *Iris tectorum* Maxim., *I. dichotoma* Pall., *I. germanica* L. and *I. japonica* Thunb. by RAPD technique. **Methods** General DNA was isolated from fresh leaves of *B. chinensis* and five plants of *Iris* L. by CTAB and DNeasy™ Plant Mini Kit. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to identify them. **Results** The polymorphic feather of DNA fingerprints of different species were compared by primer OPD-08. The studies showed that they have different relationships in heredity and the method of RAPD can be used to identify them easily. **Conclusion** Chinese materia medica of *Iris* L. can be idenfified by RAPD, and *B. chinensis* could be differentiated from *I. tectorum*, *I. dichotoma*, *I. japonica*, *I. germanica*.

Key words: *Belamcada chinensis* (L., DC.); *Iris* L.; RAPD; DNA fingerprints

射干为常用中药, 来源于鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L., DC.) 的干燥根茎, 具有清热解毒、利咽消痰的功能, 主要用于咽喉肿痛、痰咳气喘等症^[1]。由于鸢尾属的植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim.、野鸢尾 *I. dichotoma* Pall.、蝴蝶花 *I. japonica* Thunb.、德国鸢尾 *I. germanica* L. 等与射干在原植物形态上比较相似, 极易混淆和误用, 影响射干药材的质量和疗效。有文献记载鸢尾有小毒, 因此更应注意其与射干的区分, 以保证射干用药的安全性。对射干类药材的鉴别在原植物的形态学、解剖学、细胞学、化学分析等方面已有很多报道^[2~4]。

现采用 RAPD 技术, 从分子水平对射干类药材及混淆品共 5 种原植物进行鉴定。

1 材料

样品来源: 见表 1, 野外采样用根茎在南京中国药科大学植物园栽培后取叶供实验。样品经作者鉴定无误。凭证标本存中国药科大学标本馆。

2 仪器与试剂

2.1 仪器: PCR 热循环扩增仪(PE2400)、凝胶成像自动分析仪(UVP GDS 7600G)、稳压稳流电泳仪。

2.2 试剂: 液氮(南京大学制冷设备厂)、CTAB(上海 Sangon 公司)、Tris(南京 格瑞生物技术有限公

* 收稿日期: 2002-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(30170103); 江苏省资源生物技术重点实验室、江苏省自然科学基金资助项目(BK97085)

作者简介: 黄芸(1974-), 女, 江西上饶人, 硕士, 1993 年 9 月~1997 年 6 月就读于中国药科大学, 获理学学士学位, 1997 年 8 月~1999 年 7 月在江西国药有限责任公司质量监督处任助理工程师, 1999 年 9 月~2002 年 6 月就读于中国药科大学, 主要研究方向为药用植物种质资源及其质量评价, 获硕士学位, 现为中国药科大学博士研究生。E-mail: hy9317536@hotmail.com
Tel: 025-5322741

* 联系人 Tel: (025) 5391290 Fax: (025) 5301528 E-mail: minjianqin@sina.com

司、TaqDNA 聚合酶(上海 Sangon 公司、随机扩增引物(由上海 Sangon 公司合成,见表 2、Marker (上海 Sangon 公司 100 bp DNA Ladder Plus、琼脂糖(上海 Sangon 公司、溴乙锭(EB。

表 1 样品基源

编号	样品	代号	学名	产地
1	射干	shg1	<i>Belamcanda chinensis</i> (L. DC.	河南卢氏
2	射干	shg2	<i>B. chinensis</i> (L. DC.	江苏江浦
3	射干	shg3	<i>B. chinensis</i> (L. DC.	江苏南京
4	鸢尾	yw1	<i>Iris tectorum</i> Maxim.	四川峨边
5	鸢尾	yw2	<i>I. tectorum</i> Maxim.	江苏句容
6	鸢尾	yw3	<i>I. tectorum</i> Maxim.	江苏南京
7	野鸢尾	yyw	<i>I. dichotoma</i> pall.	江苏南京
8	德国鸢尾	dg	<i>I. germanica</i> L.	江苏南京
9	蝴蝶花	hd	<i>I. japonica</i> Thunb.	江苏南京

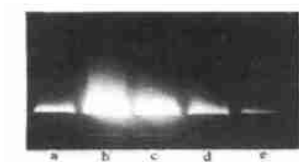
表 2 随机扩增引物

引物	序列
OPD-08	GTGTGCCCA
OPD-11	AGCGCCATTG
OPD-12	CACCGTATCC
OPD-13	GGGGTGACGA
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC

3 方法

3.1 选材:为了探讨种内个体差异对 RAPD 实验结果是否有影响,在做 RAPD 时 5 种植物中每个种植物都选用随机个体的新鲜叶。

3.2 总 DNA 提取: DNeasy™ Plant Mini kit (GEMANGENQUIT (图 1; CTAB 法提取植物总 DNA^[5]。



a-yw1; b-dg1; c-hd1;
d-shg1; e-yyw1

图 1 总 DNA 电泳图(用 DNeasy™ Plant Mini kit 提取

3.3 随机引物:根据 Shimizu 等^[6], Zhuravlev 等^[7]所筛选出的能用于日本及欧洲产鸢尾属植物随机扩增的引物(表 2,再通过合适的 RAPD 反应条件从中选择能有效区分射干类中药及其混淆品的随机引物。

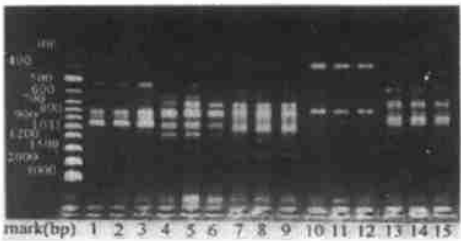
3.4 RAPD 扩增条件:扩增反应体系为 20 μL, 10×buffer 缓冲液(无 Mg²⁺ 2 μL、dNTP(2.5 μmol/L 2 μL、MgCl₂(33.33 mol/L 2.5 μL、扩增引物(4 μmol/L 1 μL、模板 10~100 ng、Taq 酶 0.2 μL、加重蒸水补充 20 μL。在 2400 PCR 热循环仪上,经 95 预变性 5 min,然后 95 变性 40 s, 31 复性 40 s, 72 延伸 1 min,完成 35 个循环后, 72 7 min 补齐。扩增产物 20

μL 加适量载样缓冲液,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB (0.5 μg/mL 染色检查。

3.5 数据分析:电泳图谱中每一条带代表 1 个引物结合位点,有带计为 1,无带计为 0。任意两个样本间的遗传差异用遗传距离指数 D 衡量。 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 、 $D = 1 - F$ (F 为共享度, N_x 、 N_y 分别为第 X 和第 Y 个体拥有的 RAPD 表记数, N_{xy} 为 X 与 Y 个体共享的 RAPD 标记数。

4 结果与讨论

4.1 结果:实验结果表明用 OPA-1、OPA-14、OPA-15、OPD-11、OPD-12、OPD-13 作随机扩增引物对这 5 种植物均有多态性扩增,但不能将它们完全区分;用 OPD-08 作随机扩增引物,可以将射干鸢尾、野鸢尾、德国鸢尾、蝴蝶花等 4 种鸢尾属植物完全区分开(图 2。任意两个样本间的遗传距离指数见表 3,遗传距离指数柱形图见图 3。同时,证明种内个体以 OPD-08 作随机扩增结果基本无差异。



1, 2, 3 分别为 yw1, yw2, yw3; 4, 5, 6 分别为 shg1, shg2, shg3; 7, 8, 9 均为 hd; 10, 11, 12 均为 dg; 13, 14, 15 均为 yyw

图 2 4 种鸢尾属植物 RAPD 指纹图



1 为 yw 与 shg 间的比较; 2 为 yw 与 hd 间的比较; 3 为 yw 与 dg 间的比较; 4 为 yw 与 yyw 间的比较; 5 为 shg 与 hd 间的比较; 6 为 shg 与 dg 间的比较; 7 为 shg 与 yyw 间的比较; 8 为 hd 与 dg 间的比较; 9 为 hd 与 yyw 间的比较; 10 为 dg 与 yyw 间的比较; (x 轴为 1~10; y 轴为遗传距离指数

图 3 任意两个样本间的遗传距离指数柱形

表 3 任意两个样本间的遗传距离指数 D

	1(yw	2(shg	3(hd	4(dg	5(yyw
1(yw	0.0000				
2(shg	0.6000	0.0000			
3(hd	0.4118	0.4444	0.0000		
4(dg	0.5300	0.5293	0.4737	0.0000	
5(yyw	0.7143	0.2000	0.2941	0.6250	0.0000

任意两个样本间的遗传距离指数 D 用柱形图来表示,可见 7(shg 与 yyw 间的遗传距离 的柱高

最小,表明射干与野鸢尾间的亲源关系较近;4 和 10 (yw 与 yyw 间遗传距离 的柱高最大,野鸢尾与鸢尾的亲源关系较远。

4.2 讨论:在中药材的 RAPD 研究中,用 HDeasyTM Plant Mini kit 提取 DNA 的纯度高,降解少,成本高,而 CTAB 法提 DNA 纯度较低及有部分降解,成本较低。本研究发现即使模板中含有一定量杂质和部分将降解时,在筛选了合适的引物后,控制合适的模板浓度、 Mg^{2+} 的浓度、退火温度及反应的循环数同样能达到有效扩增。两种方法提取的 DNA 扩增结果一致,并且重复性较好。因此用 CTAB 法提取的总 DNA 模板能满足 RAPD 法对模板的要求。在传统的形态分类学中,野鸢尾被划分为鸢尾属,而射干被划分为射干属。小分子化学成分的研究及细胞遗传学实验都证明有着密切的亲源关系^[2, 8, 9]。本实验通过总 DNA 核酸大分子随机扩增,结果表明射干与野鸢尾有较近的亲源关系,支持小分子化学研究的结果,有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997.
- [2] Qin M J, Xu G J, Xu L S, *et al.* Pharmacognostical studies of iridaceae (1 morphological and histological studies of "Shegan" and relative crude drug from China [J]. Nat Med, 1995, 49(4): 373-382.
- [3] 秦民坚, 胡 军, 余国奠, 等. 射干和鸢尾的核型分析[J]. 国野生植物资源与环境, 1998, 17(5): 12-14.
- [4] 秦民坚, 王 强, 巫弘翌, 等. 鸢尾科药用根茎类 16 种植物的异黄酮含量测定[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(4): 55-56.
- [5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] Shimizu K, Miyabe Y, Nagaike H, *et al.* Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* thunb. and *I. germanica* L. [J]. Euphytica, 1999, 107: 105-113.
- [7] Zhuravlev Y N, Kozyrenko M M, Artyukova E V, *et al.* Fringerprinting genomes of the far eastern species of the genus *iris* L. by RAPD-PCR [J]. Russ J Genet. 1998, 34 (3): 285-288.
- [8] Pudel P. Anatomy of the Monocotyledons [M]. Oxford, New York: Oxford University Press, 1995.
- [9] Wu Q G, Culter D F. Taxonomic evolutionary and ecological implications of the leaf anatomy of rhizomatous iris species [J]. Bot J Linn Soc, 1985, 90: 253-303.

金线莲 RNA 提取方法的改进

唐明娟, 郭顺星*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 目的 有效提取金线莲 RNA, 为研究内生真菌促进其生长机制奠定基础。方法 CTAB 法制备 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪照相。结果 提取的 RNA A_{260}/A_{230} 为 2.054, A_{260}/A_{280} 为 1.818, 产量达 154.35 $\mu\text{g/g}$ 。电泳条带清晰, RNA 完整性好。结论 用该方法能高质量地制备富含多糖和酚类化合物的药用植物 RNA。

关键词: 金线莲; 酚类化合物; 多糖; RNA

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002 10-0937-03)

Improved method of extracting RNA from *Anoectochilus roxburghii*

TANG Ming-juan, GUO Shun-xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: **Object** Effectively extracting RNA from *Anoectochilus roxburghii* (Wall. Ldl. lays a foundation to research the mechanism of endomycorrhiza promoting its growth. **Methods** RNA was prepared by CTAB, electrophoresis on 1% agroses gel and photo are taken with MutilmageTM Light Cabinet. **Results** The ratios of RNA A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} were 2.054 and 1.818, respectively. And the yield was 154.35 $\mu\text{g/g}$ fresh. The bands were clear on agrose gel and integrity of RNA was good. **Conclusion** RNA with high quality and high quantity is isolated by the method of CTAB for medicinal plants with high

* 收稿日期: 2002-04-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 39970018); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(199950)

作者简介: 唐明娟(1972-, 女, 四川达县人, 博士学位, 1998 年考入中国医学科学院药用植物研究所硕士, 2000 年转为同专业博士, 研究方向为药用植物分子技术。Tel: 010-62889921 E-mail: mingjt@sohu.com; mingjt1153@sina.com

* 联系人: Tel: (010) 62899729