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 HDeasy™ 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,巫弘罡,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 genusfris L. by RAPD-PCR [J]. Russ J Genet. 1998, 34 (3): 285-288.

[8] Pudal P. Anatomy of the Monocotyledons Ⅷ [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 154.35μg/g电泳条带清晰, RNA完整性好。结论 用该方法能高质高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 MutiImage™ 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 154.35μg/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研究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

concentrations of polysaccharides and phenolics.

Key words *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Ldl.; phenolic compounds; polysaccharides; RNA

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Ldl. 为兰科开唇兰属名贵药用植物,野生于台湾、福建、广西等地。该植物具清热凉血、祛风利湿、强心利尿、平肝等功效,主治肾炎、肺炎、糖尿病、风湿病等症[1]。在自然状态下,金线莲生长缓慢,加之过度采挖,药源近于枯竭。采用组织培养技术进行金线莲幼苗的快繁,可以促进金线莲的生产发展和缓解医药市场的供求矛盾。关于金线莲的研究报道不多,内容主要涉及药用价值、组培、生药鉴定、化学、金线莲内生真菌分离[2]、金线莲内生真菌原生质体制备与再生[3]等方面。而金线莲的分子研究未见报道。中国医学科学院药用植物研究所真菌室工作表明,当金线莲与内生真菌建立共生关系后能明显地促进金线莲增高增重[4]。这样在快繁的基础上结合共生可加快金线莲工业化生产。但内生真菌促生的分子机制是什么呢?采用 mRNA差异显示技术可提供菌根共生的重要参考价值。该技术的关键首先是要提取高质量 RNA。而金线莲富含多糖和酚类化合物,采用常规 RNA提取方法不能有效提取 RNA。本文参照一种快速简便的 CTAB法[5]获得了高产高质的金线莲 RNA。这为从分子方面研究药用植物菌根共生机制奠定了基础,具有重要的理论和生产实践意义。

1 材料和方法

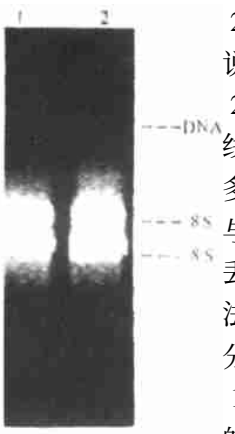
1.1 材料:以福建金线莲 *A. roxburghii* (Wall.) Ldl. 组培苗为材料。

1.2 方法

1.2.1 溶液:(1) SSTE 1 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.0 mol/L NaCl; 0.5% SDS; 10 mmol/L Tril-HCl (pH 8.0)。(2)抽提 buffer: 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide); 2% PVP(polyvinyl pyrrolidinone); 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 25 mmol/L EDTA; 2.0 mol/L NaCl; 0.5 g/L spermidine; 2% β-mercaptoethanol;氯仿-异戊醇(24∶1); 10 mol/L LiCl。

1.2.2 步骤:(1)打开水浴锅调至 65 ℃,向离心管中加入 8 mL抽提 buffer和 160 μL β-巯基乙醇。上下倒置离心管混匀,拧紧管口,65 ℃预热。(2)称 1~2 g金线莲苗,用液氮研磨后移入水浴锅中的离心管,捏住离心管,充分混匀,65 ℃温育 7 min左右(中间晃动离心管一次)。(3)加入 8 mL氯仿-异戊醇(24∶1),上下剧烈振荡 10 s, 10 000 r/min常温离心 20 min。(4)取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24∶1)抽提两次。(5)取上清液,加入 1/4体积 10 mol/L LiCl, 4 ℃沉淀 RNA 6 h或过夜。(6) 4 ℃, 10 000 r/min离心 20 min。(7)去净上清液,加入 500 μL SSTE溶解沉淀加入等体积氯仿-异戊醇(24∶1)混匀后 4 ℃ 12 000 r/min离心 20 min。(8)取上清液,加入 2倍体积无水乙醇, -20 ℃沉淀 2 h或 -70 ℃沉淀 30 min。(9) 4 ℃, 12 000 r/min离心 20 min后去上清液, 70% 乙醇洗沉淀 2次,晾干。(10)加入 50 μL 0.1% DEPC处理的水, 55 ℃溶解沉淀 10 min。(11)取 1 μL测吸光值(*A*)。(12)取 1 μL稀释 5倍后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并且凝胶成像仪成像。

2 结果与分析



1-接菌处理的金线莲 RNA 2-不接菌金线莲 RNA(对照)

图 1 RNA 1% 琼脂糖电泳图

2.1 结果:对于纯 RNA来说, A_{260}/A_{280}比值为 1.70~2.0, A_{260}/A_{230}大于 2.0。已知金线莲含有较多的酚类化合物和多糖。在提取 RNA过程中会与 RNA结合造成 RNA大量丢失。采用经典的异硫氰酸胍法, A_{260}/A_{230}和 A_{260}/A_{280}比值分别为 0.0569和 1.413(表 1),说明制备的 RNA含较多的小分子和蛋白污染,产量很低。而改用该 CTAB法提取 RNA A_{260}/A_{230}和 A_{260}/A_{280}比值分别为 2.054和 1.818(表 1)。说明无小分子和杂蛋白, RNA质量好。且 RNA产量比用异硫氰酸胍法高 16.96倍。电泳分析发现 28 s, 18 s两条带清晰,说明 RNA未降解,完整性好(图 1)。

表 1 不同方法提取的 RNA质量和产量比较

比值	CTAB	异硫氰酸胍
A_{230}	0.238	0.0809
A_{260}	0.489	0.065
A_{280}	0.269	0.046
A_{260}/A_{230}	2.054	0.0569
A_{260}/A_{280}	1.818	1.413
RNA产量 (μg/g fresh)	154.35	9.10

2.2 分析:目前用分子生物学方法研究药用植物报道较少,探索一种有效提取含大量酚类化合物和多

糖的药用植物 RNA是十分必要的,这对深入研究药用植物提供了重要参考。用异硫氰酸胍法不仅由于使用苯酚导致 RNA沉淀为红棕色,而且 RNA产量和质量均很差。其主要原因是由于酚类化合物氧化后不可逆地结合到核酸上并与 RNA共沉淀[6]。为解决酚类氧化问题,用 PVP和β-巯基乙醇作还原剂,氯仿代替苯酚除蛋白。结果制备的 RNA无色且使 RNA的 poly A尾损失减到最小。多糖和 CTAB的去除是采用 2 mol/L氯化钠。高浓度氯化钠有助于多糖的去除[7]和溶解 CTAB-RNA复合物。另外该法提取的 RNA中含有少量的 DNA会影响差异显示实验的进行,所以必须用 DNAaseⅠ处理才能合成 cDNA。目前我们已用该方法制备的 RNA合成了 cDNA片段,大小为 0.2~1 kb,这说明 RNA质量好。

参考文献:

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.

[2] 郭顺星,陈晓梅,于雪梅,等. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(7): 443-445.

[3] 张集慧,郭顺星,曹文芩,等. 金线莲一促生真菌原生质体制备和再生研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 321-323.

[4] 于雪梅. 金线莲与内生真菌相互作用机理研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000.

[5] Chang S J. Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Reptr, 1993(11): 113-116.

[6] Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. Anal Biochemistry, 1991, (197): 91-95.

[7] Fang G, Hammar S, Grnmet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Biotechniques, 1992 (13): 52-55.

中药材白芍的 X射线衍射 Fourier谱鉴定

吴云山[1],王树春[2],李兰燕[1],贺浪冲[2],郑启泰[1],吕 扬[1*]

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所,北京 100050; 2. 西安交通大学 药学院,陕西 西安 710061)

摘 要: 目的 建立中药材白芍的新鉴定分析方法。方法 采用粉末 X射线衍射 Fourier谱鉴定法。结果 通过对1个白芍对照品、1个白芍标本和 3个白芍中药材进行实验、分析,获得了白芍的标准 X射线衍射 Fourier图谱及特征标记峰值。结论 X射线衍射 Fourier谱鉴定法可用于中药材白芍的鉴定。

关键词: 中药材鉴定; X射线衍射 Fourier图谱; 白芍

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)10-0939-03

Identification on root of *Paeonia lactiflora* by X-Ray diffraction Fourier pattern method

WU Yun-shan[1], WANG Shu-chun[2], LI Lan-yan[1], HE Lang-chong[2], ZHENG Qi-tai[1], LÜ Yang[1]

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. College of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract **Object** To develop a new identification and analysis method of the root of *Paeoniae lactiflore* Pall. **Methods** Powder X-ray diffraction Fourier pattern was used. **Results** Experiments and analysis were carried out on five samples. The standard X-ray diffraction Fourier pattern and characteristic diffraction peaks were obtained by one of the root of *P. lactiflora* control, one of the root of *P. lactiflora* sample, and three of the root of *P. lactiflora* Chinese medicinal materials. **Conclusion** This method can be used for identification on Chinese medicinal materials of the root of *P. lactiflora*.

Key words identification on Chinese medicinal materials; X-ray diffraction Fourier pattern; the root of *Paeoniae lactflore*. Pall.

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根。夏、秋两季采挖,洗净,除去头尾及细根,用水煮后去皮晒干。白芍为常用中药材,性苦、味酸微寒,归肝、脾经。有平肝止痛、养血调经、敛阴

* 收稿日期: 2002-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29775034)

作者简介: 吴云山(1978-),男,山西人,在读硕士研究生,研究方向为药物的 X射线衍射分析研究。Tel (010) 63165214

* 通讯作者