

# 柴胡属 5种植物 RAPD分析与分类鉴定

梁之桃<sup>1</sup>, 秦民坚<sup>1\*</sup>, 王峥涛<sup>1</sup>, 黄芸<sup>1</sup>, 王年鹤<sup>2\*</sup>

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 目的 探讨正品柴胡与同属近似种包括柴胡 *Bupleurum chinense* 狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* 竹叶柴胡 *B. marginatum* 小叶黑柴胡 *B. smithii* var. *parvifolium* 大叶柴胡 *B. longiradiatum* 5种柴胡属植物鉴定的分子证据。方法 CTAB法提取柴胡属原植物总 DNA, 以随机引物进行非特异扩增。结果 用随机引物 OPA-1 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPD-8 (5'-GTGTGCCCCA-3') 和 OPD-11 (5'-AGCGCCATTG-3') 能有效地鉴定这 5种柴胡属植物。结论 RAPD法可准确鉴定正品柴胡及其近似种。

**关键词:** 柴胡属; RAPD; 分类鉴定

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1117-03

## Identification of *Bupleurum* L. plants by RAPD technology

LIANG Zhi-tao<sup>1</sup>, QIN Min-jian<sup>1</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1</sup>, HUANG Yun<sup>1</sup>, WANG Nian-he<sup>2</sup>

(1. College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract Object** To define the molecular characters of differentiating *Bupleurum chinense* DC., *B. scorzonerifolium* Willd. from their allied species *B. marginatum* Wall. ex DC., *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li. and *B. longiradiatum* Turoz. **Methods** General DNA was isolated from fresh leaves of *Bupleurum* L. species by CTAB. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to identify them. **Results** Five *Bupleurum* L. species can be identified by primer OPA-1 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPD-8 (5'-GTGTGCCCCA-3'), OPD-11 (5'-AGCGCCATTG-3'). **Conclusion** The method of RAPD can be used to identify the *Bupleurum* L. species and its allied species.

**Key words** *Bupleurum* L.; RAPD; classified identification

柴胡属 (*Bupleurum* L.) 植物主要分布在北半球的亚热带地区, 我国有 36 种, 17 变种, 7 变型, 主要产于西南、西北和东北地区<sup>[1]</sup>。《中华人民共和国药典》(2000 年版) 载了柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 2 种, 但柴胡属多种植物历来在不同地区、不同程度地被药用, 存在着种类混乱、质量下降的问题。潘胜利等人曾对 19 种 (变种)、1 变型柴胡的性状及 16 种 (变种) 柴胡的根组织横切面及粉末特征进行观察, 发现柴胡属植物根的外观性状、横切面及粉末特征均区别较小<sup>[2]</sup>, 本研究利用 RAPD 技术对正品柴胡及其混淆品竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC.、小叶黑柴胡 *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li.、大叶柴胡 *B. longiradiatum* Turoz. 进行分子水平鉴定, 为中药柴胡类药材的分子鉴定提供依据, 同时探讨了这 5 种植物之间的亲缘关系。

## 1 材料与方 法

1.1 供试材料: 野外采样栽种于南京中山植物园后取叶供实验 (表 1)。所有样品均经江苏省中国科学院植物研究所王年鹤研究员鉴定。

表 1 实验材料及来源

| 编号 | 样品    | 学名   | 产地   |
|----|-------|--|------|
| 1  | 北柴胡   | <i>Bupleurum chinense</i> DC.                                  | 陕西   |
| 2  | 北柴胡   | <i>B. chinense</i>   | 河北   |
| 3  | 竹叶柴胡  | <i>B. marginatum</i> Wall. ex DC.                              | 陕西丹凤 |
| 4  | 大叶柴胡  | <i>B. longiradiatum</i> Turoz                                  | 河南信阳 |
| 5  | 小叶黑柴胡 | <i>B. smithii</i> Wolff var. <i>parvifolium</i> Shan et Y. Li. | 甘肃兰州 |
| 6  | 狭叶柴胡  | <i>B. scorzonerifolium</i> Willd.                              | 江苏句容 |

1.2 仪器与试剂: 温热混匀仪 (Eppendorf Thermomixer Comfort, Germany)、PCR 仪 (Eppendorf Mastercycler Gradient, Germany)、电泳仪 (DY Y-III 型电泳仪, 北京六一仪器厂)、凝胶成像系统 (上海四星生物技术公司)、离心机 (Eppendorf Cen-

\* 收稿日期: 2002-03-27

基金项目: 国家自然科学基金 (39930220)

作者简介: 梁之桃, 女, 广东罗定人, 在读中国药科大学 2000 级硕士研究生, 研究方向为药用植物种质资源与质量关系研究。

\* 通讯作者: 秦民坚副教授 Tel (025) 5391290 Fax 5301528 E-mail minjianqin@sohu.com

trifuge5417R, Germany). CTAB(上海 Sangon 公司) Tris(南京格瑞生物技术公司) TaqDNA聚合酶(上海 Sangon公司) 随机扩增引物(上海 Sangon 公司) Marker(上海 Sangon 公司 100 bp DNA Ladder Plus) 琼脂糖(上海 Sangon 公司) 溴乙锭(EB)

1.3 随机引物: 根据实验室具有的 RAPD引物筛选出 3个有效的随机引物(表 2)

表 2 3个有效引物及其扩增情况

| 引物名称   | 序列(5'-3')  | 平态性片段 | 多态性片段 | 总片段 |
|--------|------------|-------|-------|-----|
| OPA-1  | CAGGCCCTTC | 1     | 17    | 18  |
| OPD-8  | GTGTGCCCCA | 1     | 18    | 19  |
| OPD-11 | AGCGCCATTG | 1     | 16    | 17  |
| 合计     |            | 3     | 51    | 54  |

1.4 DNA提取: 参照 Rogers<sup>[3]</sup>的方法并稍加改进。每个供试材料至少从 3个不同的个体上取新鲜叶约 200 mg,用 ddH<sub>2</sub>O冲洗干净,吸去水分,剪成小片在液氮中研碎,转入 1.5 mL离心管中,加入 65℃预热的 2×CTAB提取液(2% CTAB, Tris-HCl, pH8.0, 20 mmol EDTA, pH8.0, 1.4 mol/L NaCl) 1 mL,轻轻混匀,置温热混匀仪于 65℃, 300 r/min下保温 2 h,其间多次轻轻上下颠倒离心管使 DNA提取充分。室温下 8 000 r/min离心 5 min,取上清液转移至另一离心管中,加入氯仿-异戊醇(24:1)萃取液,轻轻颠倒均匀,4℃, 1 000 r/min下离心 10 min,小心吸取上清液,自“加入氯仿-异戊醇……”起,酌情重复此步骤,直至两相间无沉淀物。吸取上清液,加 0.7体积异丙醇沉淀 DNA,于-20℃放置 1~2 h,4℃, 1 200 r/min离心 10 min,弃去液体,在沉淀物中加入 500μL 70%乙醇,用枪头吸吐乙醇洗起沉淀,4℃, 8 000 r/min离心 5 min,倒出上清液,重复一次。将离心管沉淀物置温热混匀仪,30℃烘干,加入 50μL ddH<sub>2</sub>O溶解,取 8μL点样,经琼脂糖凝胶电泳检查后,-20℃保存备用。

1.5 RAPD分析: 扩增反应在 20μL的体系中进行,其中含有 10×buffer缓冲液(无 Mg<sup>2+</sup>) 2μL dNTP(2.5μmol/L) 1.5μL MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/750 μL) 1.8μL 扩增引物(4μmol/L) 1μL 模板 10~100 ng Taq酶 0.2μL 加重蒸水补足 20μL

PCR反应程序: 经 95℃预变性 5 min,然后 95℃变性 50 s, 34℃复性 45 s, 72℃延伸 1 min,完成 35个循环后,72℃ 7 min补齐。扩增产物 20μL加适量载样缓冲液,经 2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色检查

电泳图谱中的每一条带(DNA片段)均为一个

分子标记,并代表一个引物结合位点,根据各分子标记的迁移率及其有或无,统计得所有位点的二元数据: 有带(显性)、弱带或强带均计为 1,无带(隐带)计为 0,采用 SPSS10.1软件对所得二元数据进行统计分析

2 结果与分析

2.1 DNA扩增结果: 从实验室具有随机引物中筛选出对所有试验材料扩增产物具有重复性好、多态性明显的有效引物 3个,分别为 OPA-1 OPD-8 OPD-11(图 1) 3个有效引物共扩增 54个 DNA片段,平均每个引物扩增 18个 DNA片段,54个片段中公共片段 3个,显示多态性片段 51个,占 94.4%(表 2) 扩增结果显示用 OPA-1 OPD-8 OPD-11作随机扩增引物可以将北柴胡、狭叶柴胡、大叶柴胡、竹叶柴胡、小叶黑柴胡 5种柴胡属植物完全区分开,同时表明柴胡属植物种间遗传背景的复杂性和它们之间的共同性

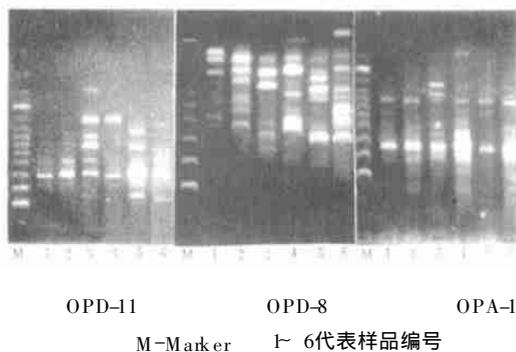


图 1 RAPD指纹图谱

2.2 数据分析: 通过对 RAPD扩增片段进行 0,1型数据化后,依据 54个 DNA片段的有无,采用 SPSS10.1软件(采用类间平均链锁法)对所得二元数据进行统计分析,建立种系发生图(图 2)。由图可见,北柴胡的两个居群先聚在一起,然后与竹叶柴胡、小叶黑柴胡、狭叶柴胡聚在一起,最后与大叶柴胡聚在一起,说明种内的遗传变异比种间遗传变异小,北柴胡与竹叶柴胡、狭叶柴胡、小叶黑柴胡的亲缘关系较近,而大叶柴胡与其他种的亲缘关系较远。

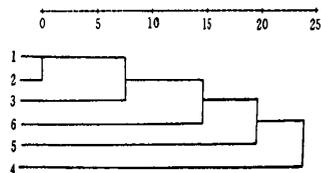


图 2 RAPD分析种系发生图

3 讨论

柴胡为传统中药,其有效成分为柴胡皂苷 a, d,

有抗炎、保肝、降低血中胆固醇等药理活性,市场用量较大,商品原植物种类多,其中竹叶柴胡、小叶黑柴胡、大叶柴胡在地方上均有使用,但据报道小叶黑柴胡的乙醚提取物、大叶柴胡有一定毒性,不宜药用<sup>[4]</sup>。本文利用 RAPD法能有效地鉴别这几种植物,为柴胡属植物的鉴定提供依据。

植物分类学者对柴胡属属内的分类原则,一些种的归属问题一直存在争议,舒璞等人运用数量分类学对柴胡属植物的分类进行了研究,提出中国柴胡属的分类系统,将大叶柴胡单独列为一个亚属,命名为大叶柴胡亚属〔Subgen. *Longifolia* (Wolff) Yuan〕其他柴胡属植物则置于另一个亚属,真柴胡亚属〔Subgen. *Eubupleura* (Briq.) Yuan〕<sup>[5]</sup>,本文结果亦显示大叶柴胡与北柴胡、狭叶柴胡、竹叶柴胡、

小叶黑柴胡 4种柴胡属植物的亲缘关系较远,故支持该分类。

RAPD方法在扩增反应时要求的复性温度低,特异性不高,容易受到多种因素的影响,但只要保持同一反应体系和同一扩增程序,重复性良好,是一种较为有效的鉴定方法。

参考文献:

- [1] 李颖,余孟兰. 中国植物志 [M]. 55卷. 第一分册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 徐国钧,徐珞珊,王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究 [M]. 第三册. 福州: 福建科学技术出版社, 1999.
- [3] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues [J]. PI Molec Biol Manual, 1988, 160-105.
- [4] 王有志,张亚云. 中药柴胡的物种调查和鉴定 [J]. 中国药学杂志, 1994, 29(1): 16-18.
- [5] 舒璞,袁昌齐,余孟兰,等. 中国柴胡属药用植物的数量分类研究 [J]. 西北植物学报, 1998, 18(2): 277-283.

## 不同海拔高度与不同株龄和月份对黄连质量和产量的影响

赵广琦<sup>1</sup>, 杜增平<sup>2\*</sup>

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 宝鸡市中医药学校, 陕西 宝鸡 721004)

**摘要:** 目的 分析不同海拔高度黄连的质量和产量随株龄和月份的变化规律。方法 采用烘干称重法和比色法分别测定不同海拔高度下不同龄期和月份的黄连根状茎重量和小檗碱含量。结果 生长在低海拔地区的黄连产量和质量高于高海拔地区; 黄连根状茎重量在第 5 年达到最大, 而小檗碱含量在第 6 年达到最高; 7 月份是黄连根状茎重量和小檗碱含量在一年中最高的月份。结论 研究结果可为黄连生产和最佳收获期的确立提供科学依据。

**关键词:** 海拔高度; 黄连; 产量; 质量

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)12-1119-03

### Effect on quality and yield of *Coptis chinensis* with its different age and month at different altitude

ZHAO Guang-qi<sup>1</sup>, DU Zeng-ping<sup>2</sup>

(1. Institute of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Baoji School of TCM, Baoji 721004, China)

**Abstract Object** To study the regularity of changes on quality and yield of *Coptis chinensis* Franch. with its different age and month at different altitude. **Methods** Weighting by stoving and colorimetric analysis were used to determine the content of berberine and the weight of *C. chinensis* in different age and month at different altitude. **Results** The yield and quality of *C. chinensis* grown in low altitude region are better than that in high altitude region; the weight of *C. chinensis* in five years old is the biggest. The content of berberine of *C. chinensis* in six years old is the highest. And the weight and berberine content of *C. chinensis* in July is the highest in one year. **Conclusion** Results of the study may provide references for *C. chinensis* production and the selection of the best harvest period.

**Key words** altitude; *Coptis chinensis* Franch.; yield; quality

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为毛茛科多年生 常绿草本植物, 其药用部位为根状茎, 主要药用成分

\* 收稿日期: 2002-03-09

作者简介: 赵广琦 (1964-), 男, 陕西澄城人, 在读博士, 主要从事药用植物学和植物生理生态学研究, 研究方向为环境植物学。  
E-mail: gqzhao2001@yahoo.com.cn Tel: (029) 8307612