

在中药新药研制过程中,除了积极寻找中药有效成分外,也应重视生物技术在改造传统中药中的重要作用。陈炬在烟草中成功表达人 α -干扰素基因^[12]。随后,Edelbaum又分别在烟草和水稻中表达了人 β -干扰素基因^[13]。然而,这些植物本身无药用价值,其用途有限,迄今为止尚未报道人 α -干扰素基因和 RANTES 基因在中药细胞中的成功转化与表达。为此,我们开展的转人 α -干扰素基因苦瓜及转人 RANTES 基因夏枯草的研究工作,首次报道了人细胞因子基因在转基因中药细胞中的瞬时表达,这将有助于最终培育基因修饰 (genetic modification, GM) 中药,由此可将病原体或肿瘤抗原基因、抗病毒基因及其他有用基因引入中药细胞,以育成可以口服的转基因疫苗以及对中药原有药理活性产生增效作用的转基因中药。

References

[1] Liu W B. *Prevention and Treatment of AIDS by Chinese Medicine and Western Medicine* (艾滋病中西医结合防治学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
[2] Chang R S. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus *in vitro* by crude extracts of Chinese medicinal herbs [J]. *Antiviral Res*, 1988, 9: 163-176.
[3] Zeng Q P. *Human AIDS* (人类艾滋病) [M]. Beijing:

People's Medical Publishing House, 2001.
[4] Zhang S M. Application of interferon in treatment of AIDS-related syndrome [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1998, 7(4): 284-287.
[5] Yin H, Fan C R. Biological products and biotechnological drugs approved by Food and Drug Administration of USA [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1998, 7(5): 409-411.
[6] Michael N L, Moore J P. HIV-1 entry inhibitors: evading the issue [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 740-742.
[7] Zeng Q P, Feng L L, Yang R Y, *et al.* Cloning of human interferon and construction of plant gene expression vector [J]. *Chin Sci Abstr* (中国学术期刊文摘), 2002, 6(9): 1152-1154.
[8] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning and sequencing of human RANTES gene [J]. *J China AIDS/STD Prev Control* (中国性病艾滋病防治), 2000, 14(6): 245-247.
[9] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning and expression *in vitro* of human RANTES gene [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 17(3): 349-351.
[10] Wang G L, Fang H Y. *Principles and Techniques of Plant Genetic Engineering* (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
[11] Li B J, Zeng Q P. *Principles and Methods of Plant Biotechnology* (植物生物技术原理和方法) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Publishing House, 1990.
[12] Chen J. Expression of human interferon α cDNA in transgenic tobacco plants [J]. *Sci Sin (B)* (中国科学·B辑), 1990, 3: 253.
[13] Edelbaum A. Expression of active human interferon beta in transgenic plants [J]. *Interferon Res*, 1992, 12: 449.

rRNA 基因间隔区碱基测序对当归进行鉴定的研究

姬可平,李应东*,张西玲**,李啸红*

(甘肃中医学院 生物学教研室,甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 通过 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列测定,对当归进行分子水平鉴定。方法 常规提取当归种籽 DNA,利用合成的特异性引物对其 rRNA 基因内转录间隔区进行套式 PCR 扩增,将扩增产物进行碱基序列测定。结果 琼脂糖凝胶电泳证实当归种籽中 rRNA 基因内转录间隔区 PCR 扩增产物存在;经测序后得到了当归种籽 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列。结论 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列测定可做为分子水平鉴定植物性中药材的又一有效途径。

关键词: 当归;套式 PCR; DNA 测序; rRNA 基因;分子鉴定

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0066-04

Identification by measuring internal transcribed spacer regions of rRNA gene in *Radix Angelicae Sinensis*

Ji Ke-ping, Li Ying-dong, ZHANG Xi-ling, LI Xiao-hong

(Department of Biology, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

Abstract Object To set up an identified standard on the level of molecule through measuring the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene in *Radix Angelicae Sinensis*. **Methods** To extract

* 收稿日期: 2002-04-24

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (ZS011-A25-058-Y)

作者简介: 姬可平 (1956-),男,甘肃中医学院基础课部副主任,生物学教研室副教授,《中国优生与遗传杂志》编委、副主编,1982年毕业于西北师范学院生物系,获理学学士学位,研究方向主要为分子生物学理论与技术在中草药质量控制、鉴定方面的应用及中草药对优生和遗传方面的影响。主持省级科研课题 1 项,厅局级课题 1 项,参加省级课题 3 项,厅局级课题 4 项,获厅局级科研三等奖 1 项。Tel (0931) 8666534

* 本院中心实验室 ** 本院中药鉴定教研室

DNA from the seeds of *Radix Angelicae Sinensis* by conventional method, and use composed peculiar primer amplify with the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene, to measure the base sequence of the amplified products. **Results** It is proved by agar sugar gel electrophoresis that the PCR amplified products of the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene exist. The base sequence of the seeds of *Radix Angelicae Sinensis* internal transcribed spacer regions of the rRNA gene was measured. **Conclusion** To measure the base sequence of internal transcribed spacer regions of the rRNA gene is another effective method to identify the vegetal traditional Chinese medicine on the molecular level.

Key words *Radix Angelicae Sinensis*; nested PCR to measure the sequence of DNA; rRNA gene; molecular identification

随着分子生物学技术的进展,中药材的鉴定方法从最初的性状鉴定,至后来所形成的显微、理化及光谱等方法的应用,已发展到了 DNA 指纹图谱鉴定等分子水平。20 世纪末,国内学者应用随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 及 DNA 测定等技术进行植物类中药材的鉴定^[1,2]。尽管 RAPD 技术有勿须事先知道受试药材的基因组序列的优点,但 RAPD 实验条件苛刻,任何条件的改变都将影响实验结果,同时还存在结果判断的主观性较强的缺点^[3]。从分子水平对甘肃道地药材当归进行鉴定尚未见报道,本研究首次以植物 rRNA 基因内转录间隔区通用引物套叠式扩增当归种籽 DNA 中 rRNA 基因的第 1 和第 2 间隔区对扩增产物进行 DNA 碱基排列顺序的测定,并以获得的当归 rRNA 基因内转录间隔区碱基序列作为分子水平的鉴定标记。

1 材料、仪器及试剂

1.1 材料: 当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 种籽由甘肃省岷县县政府姜德民先生提供,并经本院中药鉴定教研室高岭副教授鉴定。

1.2 仪器及试剂: PE-2400 PCR 仪(美国产),凝胶成像系统 (DH-20, 中国计量科学院华电公司), DY-A 电泳仪 (上海生化所西巴斯生物技术开发公司), TGL-16G 台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂), PCR 测序仪 (ABI377 测序仪,美国 ABI 公司), PCR 测序试剂盒 (美国 MOBLO 公司), PCR 核心试剂盒 (由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌研究员惠赠)。

2 实验方法

2.1 DNA 提取: 将若干粒经形态学鉴定后的当归种籽去除游离部分的种皮后,置于铁质研钵内研碎 (研钵使用前在酒精灯火焰上烤 30 s,以防 DNA 污染)。取少许粉碎物移入 0.5 mL 离心管内,加蒸馏水 50 μ L,充分混匀后,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中 1 h,加 100 μ L 400 μ g/mL 蛋白酶 K 溶液 (为 0.5% 非离子去

污剂 NP40 配制),置 55 $^{\circ}$ C 水浴消化 3 h,然后改置 95 $^{\circ}$ C 水浴中灭活蛋白酶 K 10 min,加 40 μ L 饱和的 Chelex 100 树脂吸附金属离子,置 55 $^{\circ}$ C 水浴 20 min。离心 (10 000 r/min) 30 s,上清液即为扩增之模板。

2.2 引物设计: 上网检索美国国立生物信息中心核酸库中已登录的 rRNA 基因,在保守区设计 5 条寡核苷酸引物: ITS1P-P1 (5-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G); ITS1P1 (5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG GA); ITS1P2 (5-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC); ITS2P1 (5-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC); ITS2P2 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (引物序列由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌研究员设计)。

2.3 扩增策略: 先用引物 ITS1P-P1 和 ITS2P2 扩增 rRNA 基因内转录间隔区全序列;其扩增产物经纯水稀释后,再分别应用引物 ITS1P1 和 ITS1P2 扩增 ITS1 序列;引物 ITS2P1 和 ITS2P2 扩增 ITS2 序列 (图 1) 由此完成套叠式聚合酶链式反应。

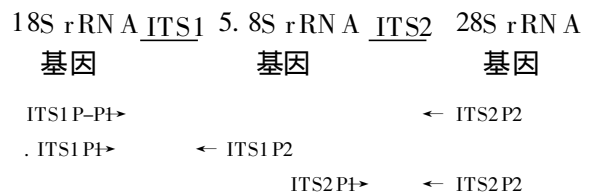


图 1 真核细胞 18S-5.8S-28S rRNA 基因间隔序列及 PCR 扩增区段

Fig. 1 Eukaryon cell's 18S-5.8S-28S rRNA gene spacer sequence and PCR amplified section

2.4 扩增体系参数: 优化后的扩增体系为上、下游引物各 0.5 μ mol/L, dNTPs 各 200 μ mol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, Taq DNA 聚合酶 1 单位。总反应体积 20 μ L, 其中模板液 5 μ L ITS1P-P1 和 ITS2P2 全序列扩增是以吸取 DNA 提取液 5 μ L 为模板;而 ITS1 和 ITS2 两间隔

序列扩增则为将 ITS1P-P1和 ITS2P2扩增产物经纯水稀释 10倍后吸取 5 μ L为模板。热循环参数均为 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后按 93 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 60 s,共 35个循环。最后一个周期 72 $^{\circ}$ C 延长至 5 min。

2.5 扩增产物电泳 将经 nPCR 扩增后的产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,以证实当归种籽 rRNA 基因第 1和第 2内转录间隔区 nPCR 扩增产物的存在。

2.6 碱基序列测定:乙醇纯化 ITS1 序列和 ITS2 序列扩增产物。前者用 ITS1P1引物作正向测序,后者用 ITS2P2引物作反向测序。此步骤由上海博亚生物技术有限公司应用美国 ABI 公司生产的 ABI 377型测序仪以四色荧光标记的双脱氧末端中止循环测序法测定。

3 实验结果

3.1 当归种籽 rRNA 基因第 1和第 2内转录间隔区 nPCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2 电泳条带显示当归种籽第 1和第 2内转录间隔区序列长度 > 214 bp, 且 ITS2 序列长度 > ITS1 序列长度。

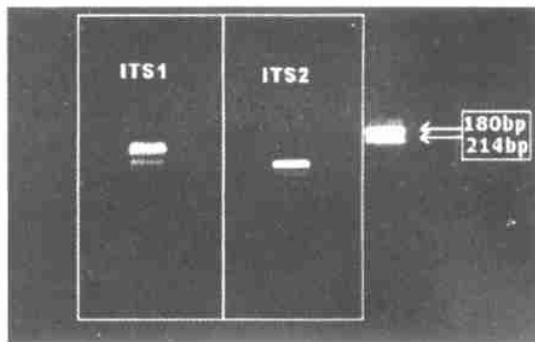


图 2 当归种籽 rRNA 基因 nPCR 扩增产物电泳图谱 (ITS1, ITS2 分别为 rRNA 基因内转录间隔区)

Fig. 2 Electrophoretic atlas of *Radix Angelicae Sinensis* seed's rRNA gene in nPCR amplified products (ITS1, ITS2 are internal transcribed spacer of rRNA gene)

3.2 当归种籽 rRNA 基因内转录间隔区 nPCR 扩增产物测序结果见图 3 (ITS1 正向测序图)。测序结果表明:当归种籽 rRNA 基因内转录间隔区 ITS1, ITS2 碱基序列长度分别为 > 265 和 > 370 bp, 与电泳分析结果相符合;将 ITS1, ITS2 的正反向序列

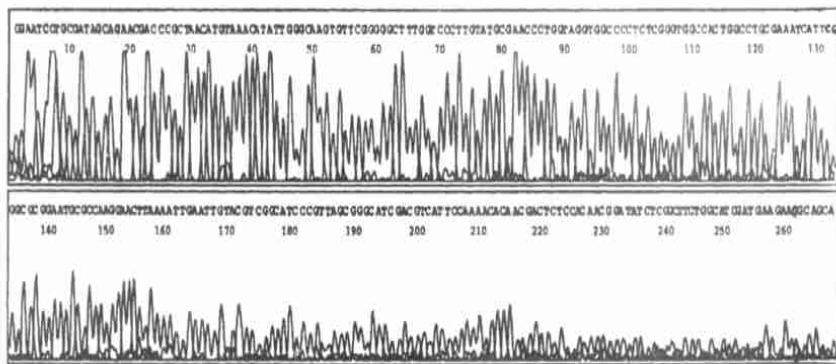


图 3 当归种籽 rRNA 基因 ITS1 正向测序图

Fig. 3 Direct sequence map of *Radix Angelicae Sinensis* seed's rRNA gene ITS1.

拼接后得到当归种籽 rRNA 基因间隔区碱基完整序列,检索美国 Genbank 核酸数据库,尚未发现有当归种籽 rRNA 基因间隔区序列的登录 (图 4)。

4 讨论

4.1 本研究法的先进性: 本研究方法中药材经研钵研碎后用蛋白酶 K 消化,免除了传统十六烷基溴化铵 (CTAB) 破壁和酚-氯仿提取受检药材 DNA 的烦琐步骤^[2,3]。由于采用 nPCR 扩增技术,故检测灵敏度极高。国内外已有的 nPCR 报道中均认为受检标本中只要有一个拷贝的靶基因,即可被 nPCR 扩增检出^[4,5]。本实验所用当归种籽经 nPCR

扩增,第 1 和第 2 间隔区目的条带清晰明亮 (图 2), 显示靶基因扩增成功,从而为碱基测序奠定了基础。目前植物性中药材其基因组序列绝大多数没有阐明,我们利用真核细胞中 18S-5.8S-28S rRNA 基因的保守区序列,自行设计引物扩增 18S-5.8S 间的第 1 间隔区和 5.8S-28S 间的第 2 间隔区。并且完成了该二间隔区扩增产物的 DNA 碱基序列的测定 (图 3)。引物 ITS1P2 和引物 ITS2P1 为互补的等位基因,第 1 间隔区和第 2 间隔区分别进行正、反向测序,由此将二段序列进行拼接即可得到 rRNA 基因内转录间隔区碱基的完整序列。由于生

```

1  GTCGAATCCT GCGATAGCAG AACGACCCGC TAACATGTAA ACATATTGGG CAAGTGTTCC 60
61  GGGGCTTTGG TCCCTTGAT GCGAACCTG GTAGGTGGCC CCTCTCGGGT GGCCACTGGC 120
121 CTGCGAAATC ATTCGGGCGC GGAATGCGCC AAGGAACCTA AAATTGAATT GTACGTCGGC 180
181 ATCCCGTTAG CGGGCATCGA CGTCATTCCA AAACACAACG ACTCTCGACA ACGGATATCT 240
241 CGGCTCTCGC ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAC TTGGTGTGAA TTGCAGAATC 300
301 CCGTGAACCA TCGAGTCTTT GAACGCAAGT TCGGCCCGAA GCCATTAGGC TGAGGGCACG 360
361 TCTGCCTGGG TGTCACGCAT CATCTTTGCC CACAACCACT CACTCCTCGT GGAGCTGTAC 420
421 TGGTATGGGG GCGGAAATTG GCCTCCCGTG CCTTGTGTG -CGGTTGGCGC AAAAGTGAGT 480
481 CTCCGGCGAC GGACGTCGTG ACATTGGTGG TTGTAAAATA CCTCATGTC TTGTCGCGCG 540
541 AATCCGCGTC ATCTTAGTGA GCTCAAGGAC CCTTAGGCGG CACACACTTT GTGCACTTCG 600
601 AATGTGACCC CAGGTCAGGC GGGAC 660

```

图 4 当归种籽 rRNA 基因间隔区碱基完整序列图

Fig. 4 Whole map of base sequence of *Radix Angelicae Sinensis* s seed's rRNA gene spacer regions.

物 rRNA 基因内转录间隔区进化极快,存在科、属、种,甚至株之间的差异,因此近年来已被国内外学者广泛用于真核生物或原核生物物种鉴别^[6,7]。本研究在不同时间(前后相隔 2 个月)对相同的当归种籽进行了 DNA 提取, rRNA 基因内转录间隔区的 nPCR 扩增及扩增产物的碱基序列的测定,但获得了相同的碱基序列。同时,对甘肃道地药材大黄种籽、小秦艽种籽的 rRNA 基因内转录间隔序列亦进行了 DNA 提取, rRNA 基因内转录间隔区的 nPCR 扩增及扩增产物的碱基序列的测定,结果显示当归种籽、大黄种籽、小秦艽种籽的 rRNA 基因内转录间隔序列具有明显差异(另文发表)。本研究提示:植物性中药材 rRNA 基因内转录间隔区的扩增和测序具有重复性较好,特异性强的优点。且可从分子水平显示对比结果,具有一定的先进性。

4.2 植物性中药材 rRNA 基因内转录间隔区的扩增和测序方法前景展望:本方法在真核生物 rRNA 基因保守区设计引物,因此尽管国内植物性中药材绝大多数(包括我国特有的药材)基因组序列尚不明瞭,但仍有分析区别的可能。且 DNA 提取只需微量种籽或药材标本,引物一旦确定可对多种标本进行 rRNA 基因内转录间隔区扩增,扩增产物碱基测序结果可反映植物性中药材的种、属的特异性。若能尽早对国内道地植物性中药材 rRNA 基因内转录间隔区进行碱基序列分析,并建立起道地中药材 rRNA 基

因内转录间隔区碱基序列数据库,则有望建立一种新的、可靠的利用分子生物学理论和技术对中药材进行质量监控和鉴定的有效方法和途径。

致谢:本实验得到无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌研究员技术支持,特致谢意。

References

- [1] Wu T, Wang Y Q, Yu B Y, *et al.* The applications of RAPD in classification of mountain *Ophiopogon* plant [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(1): 37-39.
- [2] Ma X J, Wang X Q, Zou Y G. The capillary PCR method to identified RAPD of ginseng fingerprint [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(3): 191-194.
- [3] Wang J Y, Xiong L J. Identified crude drugs by molecular biology technology [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, 33(12): 757-759.
- [4] Harasawa R. PCR application of nested PCR to detection of mycoplasma [A]. Tully J G, Razin S. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* [C]. San Diego: Academic Press, 1996, 15(9): 52-53.
- [5] Mi Z H, Lu Y H, Qing L. The study of nested PCR to measure reproductive mycoplasma of the people infected by pneumonia [J]. *Chin J Zoonoses* (中国人兽共患病杂志), 1999, 15(9): 52-53.
- [6] Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, *et al.* Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions [J]. *Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 920-924.
- [7] Li G L, Zhuang Y H, Zhao L, *et al.* The sequence analyse of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer1 regions and the applied value of which in mycobacterium s identification [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis* (中华结核和呼吸杂志), 2002, 25(3): 166-170.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和新闻出版署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确,必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”的广告。

电话: (022) 27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青