

· 药材与资源 ·

丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析

汪红¹, 王强²

(1. 浙江中医学院 药理学系, 浙江 杭州 310053; 2. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 研究丹参 ITS 片段遗传多样性, 分析该片段在丹参药材 DNA 分子鉴别和鼠尾草属植物系统学研究中的意义。方法 用一对引物进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后用双脱氧终止法测序。结果 获得核糖体 DNA 中 ITS 和 5.8S rDNA 完整序列, 13 个鼠尾草属植物 ITS1 与 ITS2 序列的长度分别为 222~224 bp、220~223 bp。鼠尾草属植物种间 ITS1 序列差异百分率为 0~12.16%, ITS2 序列的差异百分率为 0.5%~13.51%; 丹参种内 ITS1 序列的差异百分率为 0~0.9%, ITS2 序列的差异百分率为 0~0.5%; 鼠尾草属各类群与外类群的差异百分率 ITS1 序列为 16.07%~20.27%, ITS2 序列为 15.91%~20.27%。用邻接法 (NJ) 根据 ITS1 与 ITS2 序列数据建立系统发生树。结论 两段序列在丹参种内保守, 在属间有较大的差异, 与外类群的差异最大, 可作为中药丹参分子鉴定的标记, 而鼠尾草属植物的系统发生关系尚须进一步研究。

关键词:丹参; 鼠尾草属; ITS 序列**中图分类号:**R282.7**文献标识码:**A**文章编号:**0253-2670(2005)09-1381-05

Analysis of rDNA ITS sequences of *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* and plants of *Salvia L.*

WANG Hong¹, WANG Qiang²

(1. Department of Pharmacy, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Chinese Materia Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: Objective To study the genetic diversity of ITS sequences of *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* (RRSM) and plants of *Salvia L.* and analyze the utility of ITS sequences in molecular authentication of RRSM and phylogenetic of plants of *Salvia L.* **Methods** The ITS gene fragment was amplified using a pair of primers. The PCR products were purified and sequenced by the methods of Sanger dideoxy. **Results** The DNA sequence of 222—224 bp ITS1, 220—223 bp ITS2 gene fragments and 5.8S rDNA were obtained from 13 samples of *Salvia L.* The interspecific substitution varied from 0% to 12.16% at ITS1 and 0.5% to 13.51% at ITS2. The intraspecific substitution of RRSM is 0% to 0.9% at ITS1 and 0% to 0.5% at ITS2. The substitution between group of *Salvia L.* and outgroup varied from 16.07% to 20.27% at ITS1 and 15.91% to 20.27% at ITS2. The phylogenetic tree based on ITS1 and ITS2 data was set up. **Conclusion** The ITS1 and ITS2 gene fragments are highly conservative at intraspecific level in RRSM, while they are less conservative at interspecific level in *Salvia L.* They are least conservative between group of *Salvia L.* and outgroup. Hence, the sequence of this fragment is a good molecular marker for authentication of RRSM and can be used for further study on the phylogenesis for plants of *Salvia L.*

Key words: *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* (RRSM); *Salvia L.*; ITS sequences

DNA 分子标记技术已广泛用于药用植物遗传多样性、系统学、分类学研究, 并逐渐渗透到中药材鉴定领域, 如人参、西洋参、沙参、蒲公英、党参、淫羊藿属、铁线莲属、蛇类、龟板和海马等的 DNA 分子鉴定研究, 但有关丹参的研究尚未见报道, 本实验首次报道了鼠尾草属植物 8 种 1 变型共计 13 个类群

的 ITS 序列分析结果。

1 材料与方法

1.1 样品: 新鲜或干燥药材叶片及根, 原植物经江西省高安市药品监督管理局简洋辉及笔者鉴定学名, 样品来源见表 1。

1.2 仪器与试剂: Eppendorf Thermomixer com-

收稿日期:2004-12-22

作者简介:汪红(1975—), 女, 安徽歙县人, 生药学博士, 讲师, 毕业于中国药科大学, 从事中药的生药学研究。Tel: (0571) 86613576
Fax: (0571) 86613607 E-mail: wanghongxj@yahoo.com

表 1 实验所用样品

Table 1 Plant materials used in present study

组系	名称	拉丁名	代码	产地
丹参组	丹参	<i>S. miltiorrhiza</i>	SM1	江苏南京
	丹参		SM2	安徽繁昌
	丹参		SMC	四川成都
	丹参		SMS	陕西商洛
	白花丹参	<i>S. miltiorrhiza f. alba</i>	SMA	安徽繁昌
	南丹参	<i>S. bowleyana</i>	SB	江西高安
	云南鼠尾草	<i>S. yunnanensis</i>	SY1	云南巍山
	云南鼠尾草		SY2	云南大理
	三叶鼠尾草	<i>S. trijuga</i>	ST	云南大理
	蔓茎丹参	<i>S. substoniifera</i>	SS	浙江杭州
荔枝草组	荔枝草	<i>S. plebeia</i>	SP	江苏南京
宽球苏组	甘西鼠尾草	<i>S. przewalskii</i>	SPZ	云南大理
鼠尾草系	华鼠尾草	<i>S. chinensis</i>	SC	安徽繁昌

fort (1.5 mL), Germany Vortex genie 2 (Scientific industries); Eppendorf Mastercycler gradient; Eppendorf Centrifuge 5417R; DYY—Ⅲ—5 型稳压电泳仪 (北京六一仪器厂); Image System SX—100 扫描系统 (上海四星生物技术有限公司)。

引物为通用水稻引物, P1: 18S 5'-CGT, AAC, AAG, GTT, TCC, GTA, GGT, GAA-3'; P2: 26S 5'-TTA, TTG, ATA, TGC, TTA, AAC, TCA, GCG, GG-3' (上海博亚生物技术有限公司合成); 10×PCR buffer, MgCl₂, dNTP, Taq DNA Polymerase, CTAB, Tris 碱, 琼脂糖凝胶均购自上海生工生物制品有限公司; 液氮购自南京大学制冷设备厂, 其余试剂均为分析纯。

1.3 植物总 DNA 的提取与纯化: 取新鲜叶片 100 mg 或干燥叶片、根 50 mg, 加液氮研磨后, 以 CTAB 法^[1]进行基因组总 DNA 的提取, 新鲜材料加入 20 μL 的 β-巯基乙醇进行温育。总 DNA 用 PCR Pu-

rification Mini Kit (上海华舜生物工程有限公司) 进行纯化。

1.4 ITS 区片段的 PCR 扩增: 采用标准的双链 PCR 反应扩增核基因的整个 ITS 片段 (5'18S—3'26S, 包括 5.8S 编码区)。30 μL 反应体系含 10×PCR buffer 3 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.8 μL, dNTP (2 mmol/L) 2.5 μL, P18S-3' 与 P26S-5' 引物 (20 μmol/L) 各 1 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 模板溶液 (DNA 约 70~80 ng) 1 μL, ddH₂O 补足体积。PCR 扩增反应程序为 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 然后 72 °C 保温 10 min, 反应结束后, 产物置 10 °C 保存。

1.5 PCR 产物 ITS 区序列的测定: 纯化后的 PCR 产物作为测序反应的模板, PCR 反应的引物直接作为测序引物, 采用双脱氧终止法 (Sanger dideoxy), 终端荧光标记, 进行 DNA 序列的测定。

1.6 序列数据的处理: DNA 序列的排序用 Clustal X1.8 软件完成; 排序后的序列使用分子进化遗传分析软件 MEGA2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), 序列碱基统计见表 2, 样品 DNA 序列间的碱基突变位点统计见图 1。以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 位点数 631 (表 3), 在计算遗传距离的基础上, 采用邻接法构建系统树 (图 2)。

2 结果与讨论

2.1 ITS1 和 ITS2 序列的长度与变异: 根据唇形科近缘种类群 (*Monarda clinopodioides*, *M. citriodora*) 已报道的序列资料 (Genebank AF369171, AF369170) 确定 rDNA 内转录区 ITS 1 和 ITS 2

表 2 ITS1 和 ITS2 序列长度和各碱基的质量分数

Table 2 Length and base contents of ITS1 and ITS2 sequences

名称	ITS1					ITS2				
	T/%	C/%	A/%	G/%	序列总长度/bp	T/%	C/%	A/%	G/%	序列总长度/bp
SM1	16.1	31.8	19.3	32.7	223	17.6	35.7	15.4	31.2	221
SM2	16.1	31.8	19.3	32.7	223	17.6	35.7	15.4	31.2	221
SMC	16.1	31.8	19.3	32.7	223	17.6	35.7	15.4	31.2	221
SMS	16.1	31.8	18.8	33.2	223	17.6	35.7	15.4	31.2	221
SMA	16.1	31.8	18.8	33.2	223	18.0	35.6	15.3	31.1	222
SS	16.6	33.6	18.4	31.4	223	19.8	35.1	14.0	31.1	222
SB	16.1	31.8	18.8	33.2	223	17.6	35.3	15.4	31.7	221
ST	16.2	33.8	18.5	31.5	222	19.8	35.6	14.0	30.6	222
SY1	16.6	31.4	20.2	31.8	223	18.1	36.2	13.6	32.1	221
SY2	16.7	31.1	20.3	32.0	222	17.7	36.4	13.6	32.3	220
SP	17.5	32.3	17.0	33.2	223	23.0	32.0	15.3	29.7	222
SPZ	15.6	33.9	17.4	33.0	224	19.7	35.9	14.3	30.0	223
SC	16.1	31.8	19.7	32.3	223	18.1	36.2	14.0	31.7	221
Moel	7.3	40.5	18.2	34.1	220	17.1	37.6	12.8	32.5	234
Moci	8.2	39.5	18.6	33.6	220	17.2	37.3	12.9	32.6	234

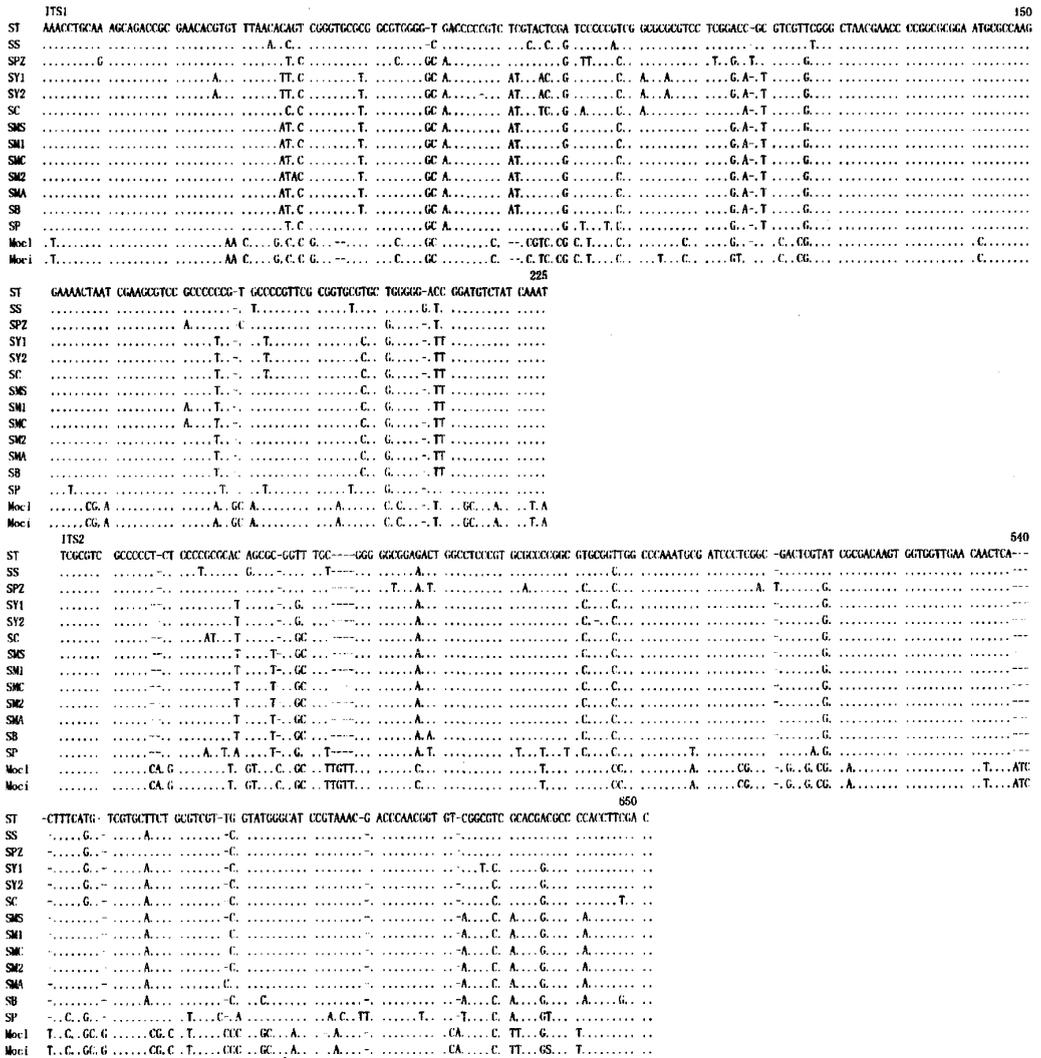


图 1 鼠尾草属植物和外类群 rDNA ITS1 和 ITS2 的完整序列

Fig. 1 Alignments of rDNA ITS1 and ITS2 sequences of plants of *Salvia* L. and outgroups

表 3 鼠尾草属植物和外类群 rDNA ITS 的遗传距离

Table 3 Genetic distances of rDNA ITS sequences of plants of *Salvia* L. and outgroups

	ST	SS	SPZ	SY1	SY2	SC	SMS	SM1	SMC	SM2	SMA	SB	SP	Mocl	Moci
ST															
SS	0.032														
SPZ	0.046	0.053													
SY1	0.064	0.064	0.055												
SY2	0.062	0.062	0.053	0.002											
SC	0.064	0.062	0.058	0.020	0.018										
SMS	0.058	0.065	0.053	0.023	0.022	0.027									
SM1	0.060	0.067	0.051	0.025	0.023	0.028	0.002								
SMC	0.060	0.067	0.051	0.025	0.023	0.028	0.002	0.000							
SM2	0.060	0.067	0.055	0.025	0.023	0.028	0.002	0.003	0.003						
SMA	0.056	0.067	0.055	0.025	0.023	0.028	0.002	0.003	0.003	0.003					
SB	0.063	0.071	0.056	0.028	0.027	0.030	0.005	0.007	0.007	0.007	0.007				
SP	0.081	0.088	0.071	0.077	0.075	0.077	0.069	0.071	0.071	0.071	0.067	0.073			
Mocl	0.149	0.138	0.141	0.147	0.145	0.143	0.144	0.147	0.147	0.147	0.146	0.148	0.164		
Moci	0.151	0.141	0.143	0.149	0.148	0.145	0.147	0.149	0.149	0.149	0.149	0.151	0.164	0.005	

与 3 个编码区 18S、5.8S、26S 的界限 (图 1), 可知所测类群的 5.8S rDNA 极度保守, 没有碱基变异。Mocl 与 Moci 为美国薄荷属植物 *M. clinopodioides*、*M. citriodora*, 在本实验中作为外类群。外类群与鼠尾草属植物的亲缘关系见图 2。各类群序列长度、各碱基质量分数与信息位点见表 2 与图 1。

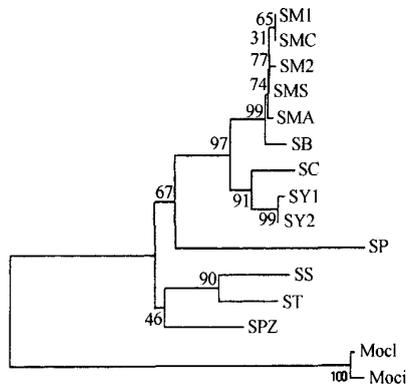


图 2 鼠尾草属植物 rDNA ITS 系统树

Fig. 2 Dendrogram based on rDNA ITS sequences from plants of *Salvia* L.

13 个鼠尾草属植物在 ITS1 与 ITS2 序列的长度上较为接近, ITS1 长度为 222~224 bp, GC 的质量分数为 63.1%~66.9%, 信息位点 42 个, 缺失位点 4 个, 占总位点 20.72%; ITS2 长度为 220~223 bp, GC 的质量分数为 61.7%~68.7%, 信息位点 48 个, 缺失位点 3 个, 占总位点 23.18%。鼠尾草属植物不同种间的差异百分率 (碱基替换率) ITS1 为 0%~12.16%, ITS2 为 0.5%~13.51%; 丹参种内 ITS1 序列的差异百分率为 0%~0.9%, ITS2 序列的差异百分率为 0%~0.5%; 鼠尾草属植物种间从差异百分率和信息位点均表现出 ITS2 的变异分布大于 ITS1, 即 ITS2 的趋异性大于 ITS1, 这与大多数被子植物不同。而来自美国薄荷属的外类群与鼠尾草属各类群间显示较大差异, ITS1 序列长度小于鼠尾草属植物, 而 ITS2 则大于鼠尾草属植物, 差异百分率 ITS1 序列为 16.07%~20.27%, ITS2 序列为 15.91%~20.27%。

2.2 ITS1 和 ITS2 在丹参分子鉴定中的意义: 在中药材的分子鉴别中, RAPD、AP-PCR 技术是较早应用的 DNA 分子标记技术, 但这些方法对 DNA 模板要求高, 限制了在中药材鉴别中的应用。DNA 序列测定技术, 通过比较 DNA 分子中 4 种碱基序列排列顺序的变化, 可反映生物体的遗传上的差异, 不但直观性强, 而且重现性好, 结果准确可靠^[2]。

rDNA ITS 是近年来用于探讨植物种内、种间

变异及近缘属间变异重要的分子标记技术之一。本试验将该序列用于鼠尾草属作为丹参药用的品种的鉴别中, 通过对鼠尾草属 13 个类群和其近缘属美国薄荷属的序列比较分析表明, ITS 区序列信息位点丰富, 不同种的鼠尾草属各类群均有多个特异性的单核苷酸变异位点, 甘西鼠尾草、云南鼠尾草、荔枝草均有一个特异性的双核苷酸变异位点, 三叶鼠尾草有两个特异性的双核苷酸变异位点, 外类群的变异最大。因此可以通过比较两段序列准确地鉴定每一种丹参药材。各序列成对比较也较明显, 陕西与四川产地的丹参的 ITS 序列仅相差一个碱基。对于这种种内保守、种间分化活跃、属间差异明显的 DNA 序列作为鼠尾草属植物的分子标记是可行的。研究中涉及的丹参是《中国药典》品种, 南丹参、华鼠尾、甘西鼠尾、云南鼠尾草等在各地都作为丹参药用, 因此取样具代表性。从丹参的新鲜、干燥的叶、根中提取的 DNA 均能扩增出目的基因片断并能测出完整序列, 因此新鲜和干燥药材均能用此法进行测定, 但干燥药材的年限不宜太长, 随着时间增长, DNA 的降解加剧, 必将影响鉴定的结果。

2.3 ITS1 和 ITS2 在鼠尾草属植物系统学研究中的意义: 分类学性状的好坏与该性状所提供的信息量有密切关系, 在目前所研究过的被子植物中, 大多数类群中这两个片段所提供的信息量相近, 在系统分析中, 虽然单独根据 ITS1 或 ITS2 的序列也可以得出重要的系统学理论, 但考虑到这两个片段的长度有限, 各自的信息量并不十分充足, 因此, 大多数作者在系统学分析中都是将这两个片段综合起来考虑。基于唇形科鼠尾草属 4 组的 13 个丹参类群及外类群美国薄荷属 2 种的 ITS1 和 ITS2 片段序列构建了丹参分子系统树——NJ 系统树 (图 2)。可见, 美国薄荷属和鼠尾草属分化十分明显, 各自为一单系树, 来自鼠尾草属的 13 个类群主要形成 2 个分支, 一支由丹参组 Sect. *Drymosphace* 的丹参、白花丹参、南丹参、云南鼠尾草, 鼠尾草系 Ser. *Japonicae* 的华鼠尾, 荔枝草组 Sect. *Notiosphace* 的荔枝草组成; 一支由宽球苏组 Sect. *Eurysphace* 甘西鼠尾、丹参组 Sect. *Drymosphace* 的三叶鼠尾草、蔓茎丹参组成。其中荔枝草又与同支其余类群分为两支; 三叶鼠尾草、蔓茎丹参形成高度稳定的一支与甘西鼠尾相聚。本研究的 NJ 系统树与鼠尾草属的属下等级划分有一定分歧, NJ 系统树将来自同一组的个体分在不同分支中, 不同组的个体又聚在同一分支。从替代用药的角度考虑, NJ 系统树的分类基本吻合

了地方用药的需求。丹参不同产地的样本差异小,最先聚在一起,其次为其白花变种,再次为与其亲缘最近的南丹参。华鼠尾在经典分类中为 Ser. Japonicae,在陕西将根作丹参药用,与同为丹参组的云南鼠尾草聚为一支,置信度为 97 的一支可认为是地方用药中作丹参药用的一支。荔枝草为全草入药,民间用于治疗跌打损伤、无名肿毒、流感等,不作丹参药用,但荔枝草组与丹参组同属荔枝草亚属,聚为一支。甘西鼠尾根入药,四川作秦艽用,云南丽江作丹参用,呈圆柱锥形,数个根茎合着呈辫子状或扭曲状,质松脆,与别种性状差异较大。三叶鼠尾草根茎短,约 1 cm,生须状根,形态、形状与别种差异较大,也作丹参药用,蔓茎丹参根部性状与三叶鼠尾草相近,但不作丹参药用,这 3 种单独为一支。NJ 系统树

的分类基本兼顾了经典分类与地方用药的需要,具有一定的系统学意义。但由于唇形科是一个高度进化的类群,ITS 序列分析仅仅反映了鼠尾草属植物遗传背景的一个方面,因此仅根据 ITS 序列研究鼠尾草属种系关系是不够全面的,还需结合其他 DNA 分析手段作出更准确的结论。

致谢:江西省高安市药品监督管理局简洋辉、云南省大理州药品检验所许华提供本实验所需样本。

References:

- [1] Shi S H, Wen J, Zhu L F, et al. Sequence analysis of ITS regions of nrDNA from *Siphocranion nudipes* Kudo (Lamiaceae) [J]. *Acta Sci Nat Univ Sun Yat-sen; Nat Sci* (中山大学学报:自然科学版), 1998, 37(2): 52-56.
- [2] Xu H, Li X B, Ding X Y, et al. rDNA ITS sequencing of *Herba Dendrobii* (Huangcao) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36 (10): 777-783.

不同产地毛脉酸模药材 HPLC 指纹图谱研究

王振月¹, 左月明¹, 康毅华¹, 李瑞明², 崔红花³

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300402; 3. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 采用 RP-HPLC (DAD) 对不同产地毛脉酸模药材进行指纹图谱比较。方法 用 Planetsil C₁₈ 分析柱, 甲醇-0.1% 磷酸水线性梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 洗脱时间 50 min, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 测定了 12 个不同产地的毛脉酸模药材的 HPLC 指纹图谱。结果 方法学考察表明, 本研究建立的分析方法有较好的重现性; 不同产地毛脉酸模药材共有峰面积的比值有一定的差异。结论 本方法可用作毛脉酸模药材的具有专属性的指纹图谱的建立。

关键词:毛脉酸模; 指纹图谱; 高效液相色谱; 梯度洗脱法

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)09-1385-04

HPLC fingerprint of *Rumex gmelini* from different habitats

WANG Zhen-yue¹, ZUO Yue-ming¹, KANG Yi-hua¹, LI Rui-ming², CUI Hong-hua³

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Tianjin Tasly Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China; 3. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To compare the HPLC fingerprint of *Rumex gmelini* from different habitats by RP-HPLC (DAD). **Methods** In this paper, 12 different samples were studied. Separation was performed on an Planetsil C₁₈ column, with mobile phase consisting of methanol and 0.1% phosphoric acid-water and with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was 254 nm, column temperature was 35 °C, and the analysis time was 50 min. **Results** The results showed that this method has a good repeatability and the ratio of common peaks' area of different samples had some difference. **Conclusion** This method can be used to establish the chromatographic fingerprint of *R. gmelini* with high specificity.

Key words: *Rumex gmelini* Turcz.; fingerprint; HPLC; gradient elution

收稿日期: 2004-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270156)

作者简介: 王振月 (1956-), 男, 哈尔滨人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源开发与生物技术研究。

Tel: (0451) 82196254, 82195025 E-mail: wangzhen_yue@163.com