

无需花费大量时间进行摸索测试条件。

致谢:上海高校创新团队建设资金资助。

参考文献:

- [1] 杨义芳. 超高效/高分离及快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263
- [2] 杨立伟, 郑伟奇, 蒋忠军, 等. 超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 R<sub>g1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b1</sub> 的含量[J]. 中药材, 2008, 31(1): 55-57

- [3] 李钦, 杜红岩, 杜兰英, 等. HPLC 法测定杜仲雄花和杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷[J]. 中草药, 2009, 40(1): 71-72
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代化研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998
- [5] 李芳东, 杜洪岩, 杜仲[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001
- [6] 戚友维. 杜仲化学成分研究进展[J]. 中草药, 1989(4): 42-44
- [7] 中国药典[S]. 一部. 2005

## 菝葜 RAPD 扩增条件优化

仇萍<sup>1,2</sup>, 刘春林<sup>1</sup>, 盛孝邦<sup>1\*</sup>, 黄宇明<sup>2</sup>, 张光贤<sup>2</sup>

(1 湖南农业大学, 湖南长沙 410128; 2 怀化正好制药有限公司, 湖南怀化 418000)

**摘要:**目的 研究菝葜的 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件。方法 采用 CTAB 提取方法, 从菝葜的嫩叶中提取总基因组 DNA, 以此为模板, 优化菝葜 RAPD-PCR 的反应条件。结果 最适宜的 PCR 扩增体系为: 反应体积 30 μL, 内含 0.20 μmol/L 引物、200 μmol/L dNTP、40 ng 模板 DNA、2 U Taq DNA 聚合酶、2 μmol/L Mg<sup>2+</sup>。结论 通过扩增条件优化实验, 建立了重复性好、稳定性高的药用植物菝葜 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件, 筛选出条带清晰多态性好的 14 条随机引物, 共扩增得到 144 条电泳带, 其中有多态性带 62 条, 检测到了 62 个多态性位点, 多态率为 43%。

**关键词:**菝葜; RAPD; 条件优化

中图分类号: R286.01

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1898-04

菝葜 *Smilax china* L. 为百合科菝葜属植物, 别名金刚藤、金刚刺、铁菱角、马加勒、筋骨柱子、红灯果等。在我国 400 年前就有菝葜药用的记载, 始载于《名医别录》。民间称药用菝葜为金刚藤, 其根茎具有祛风利湿、解毒散瘀的功效, 多用于治疗风湿关节痛、跌打损伤、胃肠炎、痢疾、消化不良、糖尿病、乳糜尿、白带、癌症等, 其叶外用可治疗疔疮、烫伤<sup>[1-2]</sup>。目前市场上以菝葜根茎的提取物为主要组分的药品有金刚藤糖浆、金刚藤颗粒、金刚藤片、金刚藤胶囊、三金片、金鸡胶囊等, 主要用于治疗附件炎和附件炎性包块及妇科多种炎症等, 年销售量达 5~10 亿元人民币, 是临床上治疗妇科炎症的常用药品; 复方菝葜颗粒则用于治疗癌症。因此, 菝葜的药用价值很高, 极具开发潜力。

RAPD 技术是 DNA 分子标记技术的一项创新, 可直接反映染色体组 DNA 多态性, 不受环境限制, 具有操作简单快捷、成本低、通用性好、灵敏度高, 且无需预知基因组的相关分子生物学信息等优点, 广泛应用于遗传多样性、生物种群划分、遗传图谱构建、基因定位等方面的研究<sup>[3-10]</sup>。在用 RAPD

技术进行植物种的遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系, 以确保其结果的可靠性、重复性<sup>[11]</sup>。为此, 本实验就菝葜 RAPD 反应中的模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq 酶用量等因素进行实验, 初步建立稳定性好、重复性高的 RAPD 反应体系, 为深入分析菝葜遗传多样性提供了基础资料。

### 1 材料与方法

1.1 材料: 根据菝葜的分布情况, 于 2005 年 5 月和 8 月分别从金刚藤主产区湖南省芷江、会同、靖州、雪峰山和鸡公界 5 个地区采集。其中材料 1 采自芷江明山下、材料 2~4 采自会同、材料 5~7 采自靖州寨芽、材料 8~10 采自雪峰山大峰、材料 11~15 采自鸡公界。

### 1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂: Taq DNA 聚合酶、15 个随机引物 (Sangon 公司)、10 × Buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP、DNA Ladder Marker、琼脂糖 (西班牙分装)。

1.2.2 仪器: 凝胶成像系统 (Gel DOC 1000, BIO-RAD), 台式高速冷冻离心机 (TGL-16M), Smart

①收稿日期: 2010-05-24

作者简介: 仇萍 (1965—), 女, 湖南省怀化市人, 高级工程师, 在读博士, 湖南正清制药集团股份有限公司总工程师, 长期从事药品的研发、工艺技术及生产管理工作, 先后获得新药证书 6 个, 发明专利 11 个, 先后获得省科技进步奖, 省优秀发明人称号, 研究方向为遗传育种。Tel: 13973161359 Fax: (0731) 88807044 E-mail: qiuping@vip.163.com

\* 通讯作者 盛孝邦

Spec TM plus Spectrophotometer (BIO-RAD, 美国), MDF-U4086S 型三洋超低温冰箱, 电泳仪 (PTC-100 型) 及各种规格电泳槽。

1.3 总 DNA 提取及浓度测定: 提取方法为 CTAB 法。取 1 g 左右的幼嫩叶片, 吸干水分放入预冷的研钵 (研钵置于冰上), 加入 PVP 及石英砂, 再加入液氮反复研磨至冻粉状。迅速转入 5 mL 离心管中, 加入 4 mL CTAB (65 °C 预热) 及 100 μL 2-巯基乙醇, 混匀后于 65 °C 水浴 1 h (期间轻摇数次)。吸上清液, 加入等体积的抽提液氯仿-异戊醇 (24:1), 10 000×g 离心 10 min, 再吸上清液加入抽提液反复离心, 直至上清液较为透亮。在上清液中加入 1/10 体积的乙酸钠, 2 倍体积的 4 °C 无水乙醇, 立即有白色絮状物出现。用吸头将絮状物吸到 1 mL 离心管中, 加入 4 °C 无水乙醇离心漂洗 2 次, 倒掉乙醇, 置于室温下风干至半透明。加入 100 μL TE 溶解 DNA。取 1 μL DNA 样品稀释 25 倍, 在 Smart Spec TM plus Spectrophotometer 上测定浓度、260 nm 及 280 nm 处的吸光度值和 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的值。

1.4 RAPD 反应体系的初步优化

1.4.1 RAPD 主要成分用量的优化: 参照汪小全等<sup>[12]</sup>的方法, RAPD 反应体系的 5 种主要成分引物、dNTP 的用量、DNA 模板、Taq DNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup> 设置 6 个浓度梯度 (表 1)。以引物 S12 (5'-CCTTGACGCA-3') 和菝葜基因组 DNA 为模板进行 RAPD 反应体系的单因素优化实验。当进行某一因素水平实验时, 其他因素均固定在第 3 个浓度梯度, 所有反应体系均为 30 μL。

1.4.2 引物的筛选: 根据已知的具有有效扩增产物的随机引物, 选出了 15 条随机引物对菝葜进行扩增 (表 2), 筛选出扩增效果好、多态性高的引物用于分子标记分析。

表 1 RAPD 反应体系中 5 种成分用量  
Table 1 Different amounts of five components used in RAPD reaction system

| 因素  | 水平   |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|------|
|   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
| 引物/(μmol·L <sup>-1</sup> )                | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 |
| dNTP/(mmol·L <sup>-1</sup> )              | 0.10 | 0.13 | 0.16 | 0.20 | 0.23 | 0.26 |
| 模板 DNA/ng                                 | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Taq 酶/U                                   | 0.50 | 1.00 | 1.50 | 2.00 | 2.50 | 3.00 |
| Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 1.00 | 1.50 | 2.00 | 2.50 | 3.00 | 3.50 |

表 2 引物及序列

Table 2 Primers and sequences

| 引物  | 序列              | 引物  | 序列              | 引物  | 序列              |
|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|
| S3  | 5' CATCCCCCTG3' | S25 | 5' AGGGGTCTTG3' | S48 | 5' GTGTGCCCA3'  |
| S5  | 5' TGCGCCCTTC3' | S28 | 5' GTGACGTAGG3' | S52 | 5' CACCGTATCC3' |
| S7  | 5' GGTGACGCA3'  | S34 | 5' TCTGTGCTGG3' | S59 | 5' CTGGGGACTT3' |
| S12 | 5' CCTTGACGCA3' | S36 | 5' AGCCAGCGAA3' | S67 | 5' GTCCCGACGA3' |
| S17 | 5' AGGGAACGAG3' | S41 | 5' ACCGCGAAGG3' | S75 | 5' GACGGATCAG3' |

1.4.3 PCR 扩增程序及参数: PCR 扩增体系为 30 μL, 其中 dNTP、模板 DNA、引物、聚合酶和 MgCl<sub>2</sub> 按优化筛选结果取量。在 PTC-100 型 PCR 仪上进行扩增, 于 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 50 s, 35 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 39 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.9% 琼脂糖凝胶上电泳 (含 0.5 mg/L 的溴化乙锭), 进胶电压 120 V, 电泳电压 85 V, 电泳 4~5 h 后, 取出凝胶板, 在 Gel DOC1000 凝胶分析系统上进行信息采集、处理、分析、保存和结果输出。

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系主要成分的优化

2.1.1 引物浓度的筛选结果: 引物浓度变化对菝葜 RAPD 反应结果存在影响 (图 1-A)。从图中可以看出, 总的趋势是随引物浓度增加, 扩增带的数量与亮度也增加。当引物浓度水平小于 0.05 μmol/L (1 泳道) 时, 扩增带数量少、亮度弱, 扩增效果不理想。

当引物水平由 0.1 μmol/L 逐渐升高时, 扩增效果明显改善, 扩增带的数量和亮度明显增加。引物浓度达到或大于 0.2 μmol/L 时, 带的数量和亮度趋于稳定一致。在此范围内, 引物水平的不同对扩展结果的影响不明显。从扩增效果和节省开支两方面考虑, 引物浓度以 0.2 μmol/L 为宜。

2.1.2 dNTP 水平的筛选结果: 图 1-B 为不同 dNTP 浓度对菝葜 RAPD 反应结果的影响。dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 是 DNA 合成的底物, 当 dNTP 的浓度为 100 μmol/L (1 泳道) 时, 扩增强度不够, 谱带少而且暗, 说明被扩增的片段和扩增量均较少, 随着 dNTP 浓度的逐渐增加, 扩增强度和背景均逐渐加强, 到 dNTP 为 200 μmol/L (4 泳道) 时达到峰值。其后, 随 dNTP 浓度水平的继续升高 (4~6 泳道), 扩增带数、带型和带的明暗程度变化不大, 出现所谓的平台效应。根据这一实验结果, 选择 200 μmol/L 的浓度水平作为正式扩增条件。

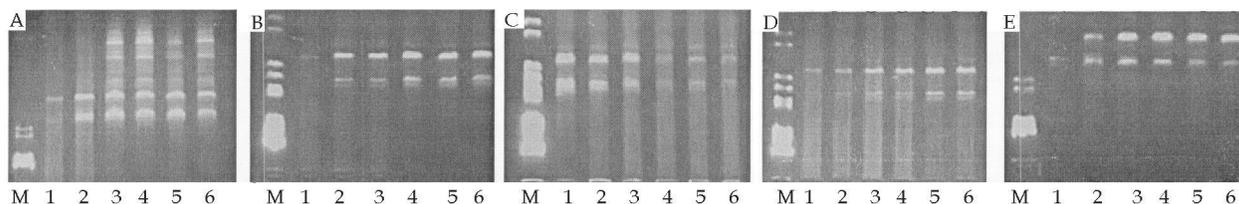
2.1.3 *Taq* DNA 聚合酶水平的筛选结果: 图 1-C 为不同水平的 *Taq* DNA 聚合酶对 RAPD-PCR 反应结果的影响。从图中可以看出, *Taq* DNA 聚合酶对 RAPD-PCR 反应结果的影响比较明显。当每个反应的 *Taq* DNA 聚合酶的用量低于 1.5 U 时(4~6 泳道), 扩增效果较差, 主要表现为带弱; 当 *Taq* 酶为 2, 2.5 U 时(2, 3 泳道), 扩增效果较好; *Taq* 酶达到 3 U 时(1 泳道), 带型则出现模糊现象。因此, *Taq* DNA 聚合酶的用量以 2 U 为宜。

2.1.4 模板 DNA 水平的筛选结果: 图 1-D 为不同水平的模板 DNA 对 RAPD-PCR 扩增结果的影响。从图中可以看出, 模板 DNA 对扩增反应的结果影响相对较大, 当模板 DNA 为 5~10 ng 时(1, 2 泳

道), 扩增产物少且带型模糊; 而从 30~60 ng(3~6 泳道) 均能获得较理想的扩增效果。因此, 选择模板 DNA 的最适水平为 40 ng。

2.1.5  $Mg^{2+}$  浓度的筛选结果: 图 1-E 为不同水平的  $Mg^{2+}$  对 RAPD-PCR 扩增结果的影响。 $Mg^{2+}$  主要通过影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性从而间接影响 RAPD-PCR 扩增, 因为 *Taq* DNA 聚合酶是镁依赖性酶。在反应过程中, *Taq* DNA 聚合酶需要游离的  $Mg^{2+}$ 。从本实验可以看出:  $Mg^{2+}$  用量低于 1.5  $\mu\text{mol/L}$ (1, 2 泳道) 时, PCR 的效果不好, 扩增片段和扩增强度都不够;  $Mg^{2+}$  以 2~3  $\mu\text{mol/L}$ (3~5 泳道) 为宜。

综合上述因素对 RAPD 反应体系的影响, 最后



M 分子量 Marker; 1~6 分别为不同水平  
M- Marker; 1- 6 different level

图 1 RAPD 扩增结果

Fig 1 RAPD Amplification results

确定反应体系为: 引物浓度为 0.20  $\mu\text{mol/L}$ , dNTP 为 200  $\mu\text{mol/L}$ , *Taq* DNA 聚合酶为 2 U, 模板 DNA 为 40 ng,  $Mg^{2+}$  为 2  $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 引物筛选的结果: 图 2 为引物筛选的电泳结果图。从图中可以看出, S36 引物无任何扩增产物和扩增带, 其他的 14 个引物或多或少都有扩增产物和扩增带。这 14 个随机引物是 S3、S5、S7、S12、S17、S25、S28、S34、S41、S48、S52、S59、S67 和 S75。其序列和编号见表 2。选择 14 个引物对供试材料进行正式扩增是为了使实验结果更为客观准确, 因为引物的数目对种类鉴定和亲缘关系分析的结果有一定的影响<sup>[13]</sup>。目前普遍认为, 采用 RAPD 分析植物的亲缘关系时, 引物的数目最好多于 12 条; 所以, 筛选 14 个引物对供试材料进行正式扩增。

2.3 菝葜材料 RAPD 扩增结果: 将筛选出的 14 条随机引物(10 bp) 对供试的 15 个材料进行正式扩增(每个扩增反应均重复一次), 扩增产物电泳后得到了菝葜材料基因组 DNA 的指纹图谱(图 3 显示部分电泳结果)。这 14 条引物共扩增得到 144 条电泳带, 其中有多态性带 62 条, 检测到了 62 个多态性位点, 多态性条带比率为 43%。

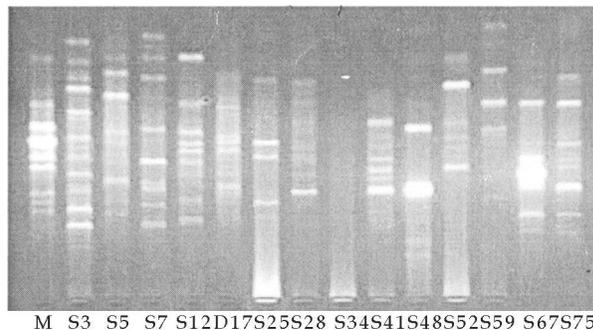
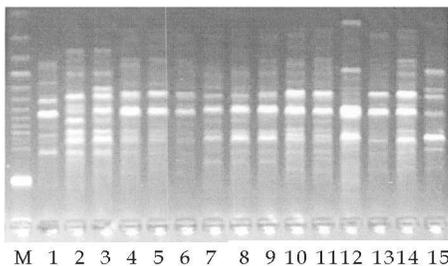


图 2 引物筛选结果

Fig 2 Screen results of primers



M 分子量 Marker; 2~15 菝葜材料  
M- Marker; 2- 15 materials of *S. china*

图 3 S3 引物对菝葜的 RAPD 扩增结果  
Fig 3 RAPD Amplification results of S3 primer on *S. china*

### 3 讨论

RAPD 反应条件严格,由实验结果可知,引物、dNTP、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$  等因素的变化都会对 RAPD 图谱产生一定的影响,从而影响 RAPD 分析的准确性。

RAPD 标记进行遗传多样性分析的前提条件就是首先要保证 RAPD 带谱的准确性和稳定性。为获得重复性和稳定性较高的 RAPD 带谱,在进行某一物种的 RAPD 分析前,筛选最适宜的 RAPD 条件是很必要的<sup>[14]</sup>。虽然 RAPD 反应涉及到诸多因素,但通过严格控制反应条件,尽量保证所有反应在同一反应体系下完成,如使用同一厂家相同批号的 *Taq* DNA 聚合酶,采用相同的扩增程序,就能获得重复性好、稳定性高的结果<sup>[15]</sup>。

通过扩增条件优化实验,建立了药用植物菝葜 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件,即反应体积 30  $\mu$ L,内含 0.20  $\mu$ mol/L 引物、200  $\mu$ mol/L dNTP、40 ng 模板 DNA、2 U *Taq* DNA 聚合酶、2  $\mu$ mol/L  $Mg^{2+}$ ;而且筛选出条带清晰多态性好的 14 条随机引物,共扩增得到 144 条电泳带,其中有多态性带 62 条,检测到了 62 个多态性位点,多态率为 43%。为进一步进行菝葜种质资源的 RAPD 分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供了可靠的实验方法。

### 参考文献:

- [1] 中国中医药研究院中药所. 全国中草药名鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996
- [2] 曾晓霞, 陈锡林. 菝葜传统应用和现代研究概况[J]. 中草药, 2008, 39(6): 952-953
- [3] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系[J]. 中草药, 2006, 37(4): 588-592
- [4] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J]. 中草药, 2005, 36(1): 100-103
- [5] 丁平, 刘瑾, 仰铁锤, 等. 巴戟天遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1869-1872
- [6] 白音, 包英华, 王文全, 等. 不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2007, 38(5): 748-751
- [7] Brauner S, Crawford D J, Stuessy T F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae [J]. *Amer J Bot*, 1992, 79: 1-436
- [8] Buren R V, Andersen W R, Harper K T, et al. Evaluation the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acris* form *isvar. aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA [J]. *Amer J Bot*, 1994, 81: 514-519
- [9] 魏伟, 王洪新, 胡志昂, 等. 毛乌素沙地柃条群体分子生态学初步研究: DAPD 证据[J]. 生态学报, 1999, 19(1): 16-22
- [10] 林菲, 李进斌, 李成云, 等. 利用 RAPD 分子标记定位 2 个水船舶瘟病菌非致病性基因[J]. 中国农业科学, 2002, 35(9): 1079-1084
- [11] 孙丽娜, 严一字, 吴基日. 桔梗 RAPD 反应体系的优化[J]. 广西植物, 2007, 27(5): 410-413
- [12] 汪小全, 邹喻苹, 张大明. 应用遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962
- [13] Packer C, Gilbert D A, Pusey A E, et al. A molecular genetic analysis of kinship of cooperation in Africa Lions [J]. *Nature*, 1991, 351: 562-565.
- [14] 李钧敏, 金则新, 柯世省, 等. 濒危植物七子花 RAPD 条件的优化[J]. 植物学通报, 19(4): 452-456
- [15] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

## 基于淫羊藿苷测定及 HPLC 指纹图谱分析的淫羊藿药材质量差异评价

张萍<sup>1</sup>, 孔维军<sup>1,2</sup>, 鄢丹<sup>1</sup>, 王晶彬<sup>1</sup>, 任永申<sup>1,2</sup>, 赵艳玲<sup>1</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>, 周旭<sup>1</sup>

(1. 解放军 302 医院全军中药研究所 北京 100039; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137)

**摘要:**目的 建立客观评价淫羊藿药材质量差异的方法。方法 采用高效液相色谱法, Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-水(23:77), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 进样量 10  $\mu$ L, 建立不同产地、不同品种淫羊藿药材不同生长部位(茎与叶)的 HPLC 指纹图谱, 并测定其不同生长部位中淫羊藿苷的量。结果 淫羊藿药材不同生长部位(茎与叶)的 HPLC 指纹图谱和淫羊藿苷的量存在差异, 从其叶和茎的特征指纹图谱中分别提取出 19 和 10 个共有峰, 且叶中淫羊藿苷的量是茎中的 4~8 倍; 叶与叶、茎与茎之间的化学特征存在差异, 叶与茎化学特征差异最显著。结论 建立的淫羊藿苷测定方法和指纹图谱的精密性、稳定性、重现性好, 可表征淫羊藿药材质量的差异性, 为淫羊藿药材的质量研究和建立淫羊藿药材的商品规格提供参考依据。

**关键词:**淫羊藿; 淫羊藿苷; 成分; 指纹图谱; 质量评价

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1901-04

淫羊藿是多年生的草本植物, 包括小檗科植物 箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et

①收稿日期: 2010-02-21

基金项目: 军队中医药研发推广重点项目(200623001); 国家杰出青年科学基金项目(30625042); 国家重大新药创制关键技术(2009zx09502022)

作者简介: 张萍(1978-), 女, 山东菏泽人, 硕士, 中药学专业。Tel: (010) 66933325 E-mail: zhp1231@126.com

\* 通讯作者: 肖小河 Tel: (010) 66933322 E-mail: pharmacy302@126.com