

• 药材与资源 •

铁线莲属 8 种药用植物 ITS 序列分析

蒋 明¹, 周英巧¹, 李嵘嵘²

1. 台州学院生命科学学院, 浙江 临海 317000

2. 台州学院医药化工学院, 浙江 临海 317000

摘要: 目的 通过测定并比较柱果铁线莲、单叶铁线莲、威灵仙、山木通、毛蕊铁线莲、转子莲、女娄和天台铁线莲的 ITS 序列, 为铁线莲属药用植物的分子鉴定提供依据。方法 利用 PCR 法从叶片基因组 DNA 中扩增 ITS, 借助 Clustal X、MEGA、DNASTAR 等软件比较和分析 ITS 的序列特征。结果 铁线莲属 8 种药用植物 ITS1 与 ITS2 之间的长度为 534~561 bp, 变异位点 50 个, 信息位点 22 个; 天台铁线莲与转子莲的遗传距离最小, 与女娄遗传距离最大, 亲缘关系最远。序列已提交至 NCBI 数据库, 登录号为 JF714638—JF714645。结论 获得铁线莲属 8 种药用植物的 ITS 序列, 为分子鉴定奠定了基础。**关键词:** 铁线莲属; 药用植物; ITS 序列; 分子鉴定; PCR 法

中图分类号: R287.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1802-05

ITS sequence analysis of eight medicinal plants in *Clematis* L.JIANG Ming¹, ZHOU Ying-qiao¹, LI Rong-rong²

1. College of Life Science, Taizhou University, Linhai 317000, China

2. College of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Linhai 317000, China

Abstract: Objective To provide molecular evidence for identification of medicinal plants in *Clematis* L., sequencing and comparison of ITS from *C. uncinata*, *C. henryi*, *C. chinensis*, *C. finetiana*, *C. lasiandra*, *C. patens*, *C. apiifolia*, and *C. patens* ssp. *tientaiensis* were performed. **Methods** ITS sequences were amplified from leaf genomic DNA by PCR. Sequence features were compared and analyzed using Clustal X, MEGA, and DNASTAR softwares. **Results** Between ITS1 and ITS2 of the eight medicinal plants in *Clematis* L., the length of ITS region varied from 534—561 bp with 50 variable sites and 22 parsimony information sites. The smallest genetic distance was observed between *C. patens* ssp. *tientaiensis* and *C. patens*, and the largest existed between *C. patens* ssp. *tientaiensis* and *C. apiifolia* revealing their farthest genetic relationship. Sequences were submitted to NCBI database with the registry numbers of JF714638—JF714645. **Conclusion** ITS sequences of the eight medicinal plants in *Clematis* L. are obtained, which could provide a foundation for molecular identification.

Key words: *Clematis* L.; medicinal plants; ITS sequence; molecular identification; PCR method

铁线莲属 (*Clematis* L.) 植物为多年生木质或草质藤本, 少数为直立灌木, 分布于热带、亚热带、温带和寒带地区^[1], 全世界有 355 个种^[2], 我国的铁线莲属植物资源十分丰富, 有 155 个种^[3]。铁线莲属植物含三萜皂苷、生物碱、香豆素、木脂素和黄酮类等化学成分, 具有抗菌、消炎、抗肿瘤和镇痛等药理作用^[4-5], 在临床和民间常用于利尿通淋和祛风止痛等^[6]。柱果铁线莲 *C. uncinata* Champ.、单叶铁线莲 *C. henryi* Oliv.、威灵仙 *C. chinensis* Osbeck、山木通 *C. finetiana* Lévl. et Vant.、毛蕊铁线莲 *C. lasiandra*

Maxim.、转子莲 *C. patens* Merr. et Decne. 和女娄 *C. apiifolia* DC. 为常见的铁线莲属药用植物, 近年来, 在化学成分、HPLC 指纹图谱、组织培养和药理作用等方面有一些相关研究^[7-14]。而天台铁线莲 *C. patens* ssp. *tientaiensis* M. Y. Fang 为多年生攀援草质藤本植物, 仅分布在浙江的天台山、括苍山和北雁荡山, 为浙江特有种, 生于海拔 1 000 m 左右的山坡林下及灌丛, 具有一定的药用价值, 在民间常用于止痛、消炎等^[15]。

核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed

收稿日期: 2011-03-05

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目 (2009R428012)

作者简介: 蒋 明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学及其分子调控。E-mail: jiangming1973@139.com

spacer, ITS) 序列由于长度保守、信息位点丰富、核苷酸变异快, 已被广泛用于植物种间、属间和科内的系统发育与分类研究^[16-18]。近年来, 在药用植物的分子鉴定、遗传多样性、系统分类等方面有大量研究^[19-23], 而有关用 ITS 序列鉴定铁线莲属药用植物的研究未见报道。本研究通过测定 ITS 序列, 构建了铁线莲属 8 种植物的系统发育树, 从分子系统学角度探讨它们的亲缘关系, 同时为铁线莲属药用植物的分子鉴定提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

除转子莲采自青岛崂山外, 另外 7 种药材均采自浙江的临海、黄岩、天台和临安, 均由温州大学丁炳扬教授鉴定。柱果铁线莲和转子莲为硅胶快速干燥叶片, 其余 6 种为新鲜、健康叶片, 经蒸馏水冲洗后用于 DNA 提取。来源见表 1。

表 1 铁线莲属 8 种药用植物来源

Table 1 Resource of eight plants in *Clematis* L.

编号	采集地	名称	登录号
ChITS	临海括苍山	单叶铁线莲	JF714638
CtITS	天台华顶	天台铁线莲	JF714639
CpITS	青岛崂山	转子莲	JF714640
CIITS	临海天目山	毛蕊铁线莲	JF714641
CcITS	天台石梁	威灵仙	JF714642
CuITS	黄岩划岩山	柱果铁线莲	JF714643
CaITS	临海括苍山	女娄	JF714644
CfITS	临海大雷山	山木通	JF714645

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的制备采用 SDS 法, 称取约 1 g 叶片, 经液氮研磨成粉末后用于 DNA 的提取。

1.3 ITS 序列的 PCR 扩增

采用 ITS 通用引物 P1: 5'-AACAAGGTTTCC-GTAGGTGA-3' 和 P2: 5'-TATGCTTAAATTCAGC-GGGT-3' 进行 PCR 扩增, 反应在 Bio-Rad C1000 型 PCR 仪上进行。PCR 反应总体积为 20 μ L, 其中含 2 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺), 0.5 μ L dNTP, 0.4 μ L Taq DNA 聚合酶, P1 与 P2 引物各 0.5 μ L, 40 ng DNA 模板, 最后加 ddH₂O 至 20 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55.5 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物全部点样于 1.2% 的琼脂糖凝胶, 电泳结束后, 在紫外灯下用干净刀片割取含目的条带的胶块, 置于 1.5 mL 离心管中备用。

1.4 PCR 产物的回收、连接和测序

PCR 产物采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 操作步骤按其提供的说明书进行。取各样品 5 μ L PCR 回收产物, 克隆到 p-GEM T-easy 载体, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱连接过夜, 将连接产物转入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 涂布于 Luria-Bertani (LB) 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10~13 h, 菌液经 PCR 验证后各取 2 个阳性克隆双向测序。

1.5 序列提交和分析

序列通过在线工具 BankIt 提交至 NCBI 数据库, 并获得相应登录号。ClustalX 1.81 软件用于序列比对, DNASTAR 5.01 软件用于统计 GC 值, 采用 MEGA 3.1 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列比较

测序结果表明, 利用 P1/P2 引物扩增到的序列中除 ITS1、5.8 S 和 ITS2 的全长外, 还包含 18 S 和 28 S 的部分序列, 铁线莲属 8 种药用植物的 ITS 序列已提交至 NCBI, 编号、登录号和对应的植物名称见表 1。序列分析结果表明, 铁线莲属 8 种药用植物 ITS1 和 ITS2 之间的长度为 534~561 bp, 序列最长的是天台铁线莲, 转子莲次之, 两者在长度上仅差 1 个碱基, 序列最短的是单叶铁线莲; ITS1 长度为 156~180 bp, G+C 量为 57.69%~65.00%; ITS2 的长度为 219~223 bp, G+C 量为 66.21%~70.14%; 天台铁线莲和转子莲 5.8 S 序列长度为 158 bp, 其余均为 159 bp。结果见表 2。

表 2 铁线莲属 8 种药用植物 ITS 序列长度及 G+C 量

Table 2 Length and G+C contents of ITS sequences of eight plants in *Clematis* L.

编号	ITS/bp	ITS1		ITS2	
		长度/bp	G+C/%	长度/bp	G+C/%
ChITS	534	156	57.69	219	67.12
CtITS	561	180	65.00	223	69.06
CpITS	560	180	63.89	222	68.92
CIITS	550	172	59.88	219	66.21
CcITS	545	165	58.79	221	70.14
CuITS	542	164	57.93	219	68.95
CaITS	552	173	60.69	220	68.18
CfITS	541	164	58.54	218	67.89

2.2 系统发育分析

利用 Clustal X 1.81 软件对 8 个序列进行比对, 结果表明, CtITS 与其原种 CpITS ITS 序列之间差异最小, 仅存在 4 个碱基的差别, 而其余 6 种与

CtITS 的差别都很大, 除发生转换和颠换现象外, 还存在片段或碱基缺失现象, 如 CfITS、CcITS 和 CuITS 在+61 处缺失 15~16 个碱基, ChITS 在+201 处缺失 13 个碱基 (图 1)。

利用 MEGA 3.1 软件计算 ITS1 和 ITS2 的变异位点及信息位点, 结果表明, ITS1 含 26 个变异位点和 14 个信息位点, 分别占总位点数的 14.21%和 7.65%; 而 ITS2 序列中的变异位点和信息位点分别

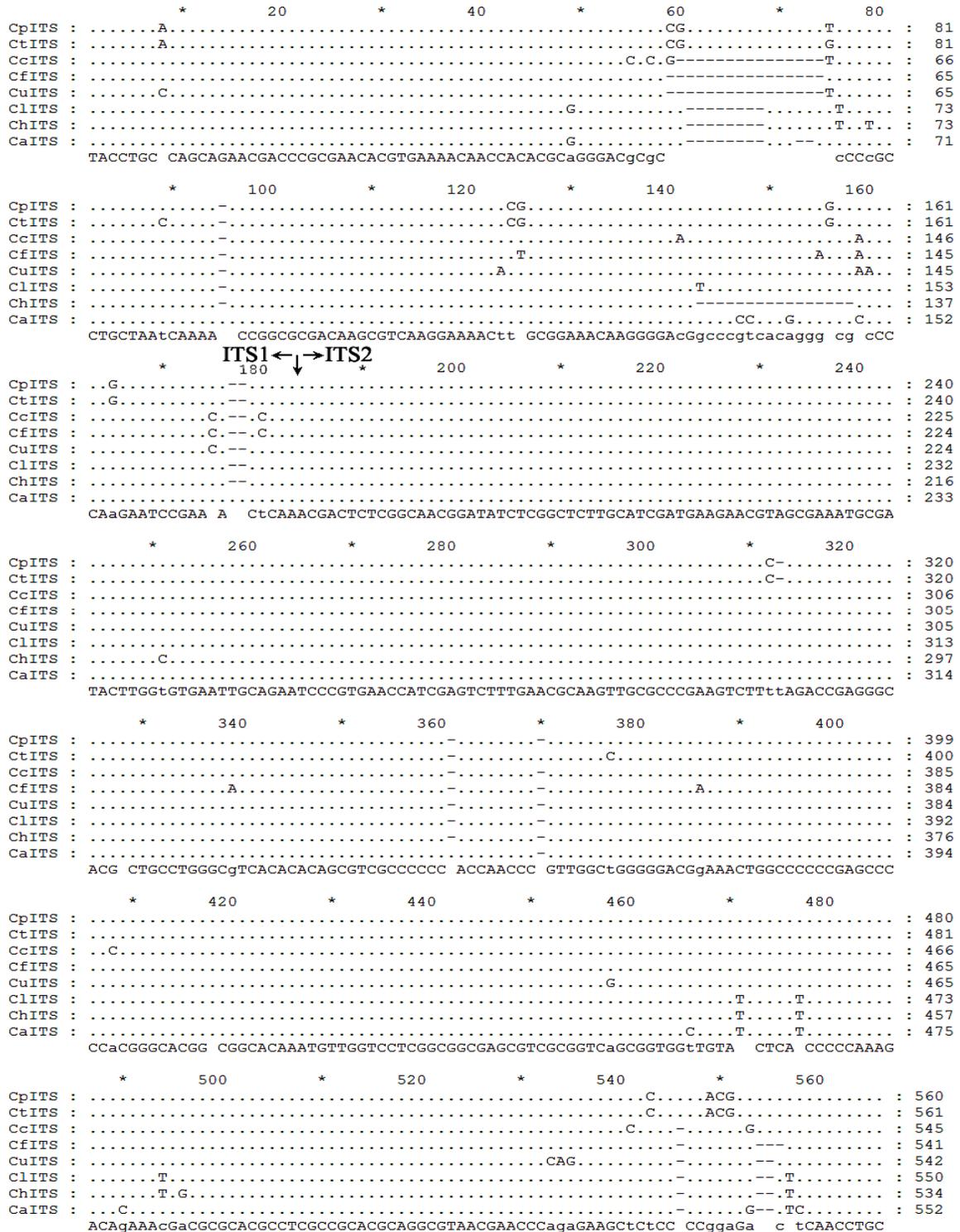


图 1 铁线莲属 8 种药用植物 ITS1 和 ITS2 序列的比对

Fig. 1 ITS1 and ITS2 sequences comparison of eight plants in *Clematis* L.

为 24 和 8 个, 占总位点数的 10.71%和 3.57%。利用 MEGA 3.1 的 Kimura 2-parameter 计算 8 种药用植物之间的遗传距离。结果表明, 天台铁线莲与转子莲之间的遗传距离最小, 为 0.005 5, 两者的亲缘关系最近; 其次是毛蕊铁线莲与单叶铁线莲, 遗传距离为 0.011 1; 天台铁线莲与女娄之间遗传距离最大, 达 0.060 5, 两者关系最远 (表 3)。

基于 ITS1 和 ITS2 序列, 采用 NJ 法构建了系统发育树, 经 1 000 次自举检测, 结果 (图 2) 表明, 8 种植物可分为两大组, 亲缘关系较近的天台铁线莲与转子莲处于同一分支, 山木通与威灵仙处于另一分支, 它们归为一组; 遗传距离较近的毛蕊铁线莲与单叶铁线莲聚为一组, 而女娄和柱果铁线莲各自形成单系树, 归为一组。

表 3 铁线莲属 8 种药用植物的遗传距离

Table 3 Genetic distances among eight plants in *Clematis* L.

编号	CpITS	CtITS	CfITS	CcITS	CuITS	ClITS	ChITS	CaITS
CpITS								
CtITS	0.005 5							
CfITS	0.033 8	0.039 6						
CcITS	0.051 2	0.057 2	0.030 8					
CuITS	0.051 3	0.057 3	0.033 7	0.051 2				
ClITS	0.045 6	0.051 6	0.036 8	0.048 4	0.042 6			
ChITS	0.045 6	0.051 6	0.042 8	0.048 4	0.048 5	0.011 1		
CaITS	0.054 4	0.060 5	0.042 6	0.054 2	0.048 3	0.019 5	0.030 9	

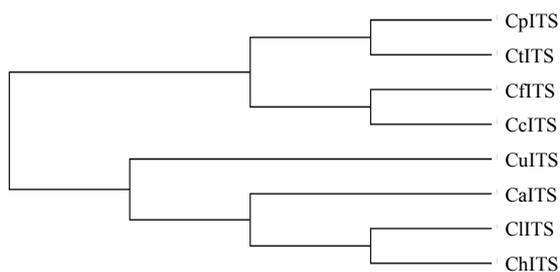


图 2 基于 ITS1 和 ITS2 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on ITS1 and ITS2 sequences

3 讨论

限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR)、随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)、叶绿体 *rbcl*、叶绿体 *trnL-F* 和 ITS 等均为药用植物鉴定、遗传多样性研究、系统演化分析和植物分类常用的分子标记。ITS 序列分析技术具有技术简单、结果准确、重复性好等优点, 近年来广泛应用于药用植物鉴定, 是药学研究中的一种重要分子标记^[24]。

本研究以 8 种铁线莲属药用植物为材料, 利用

PCR 技术分离、测定了各自的 ITS 序列, 并提交至 NCBI 数据库, 登录号为 JF714638-JF714645, 丰富了 GenBank 数据库中铁线莲属植物的序列信息。在本研究中, 由于柱果铁线莲和转子莲的采集地较远, 只能以干燥叶片为样品提取 DNA, SDS 法提取的 DNA 虽然有降解现象, 但并不影响两者 ITS 序列的扩增, 以干叶、干燥茎为材料进行 ITS 序列克隆已有报道^[25-26]。转子莲是天台铁线莲的原种, 两者在形态上十分相似, 通过比较它们的 ITS 序列, 发现在个别碱基上存在差异, 因此, ITS 序列可将两个近缘种区分开。ITS 序列可用于植物种间、属间和科内的系统发育与分类, 本研究中, 铁线莲属植物在 ITS 序列上存在几个到几十个碱基的差异, 变异位点和信息位点丰富, 可作为铁线莲属 8 种药用植物之间鉴定的分子标记。本课题组将继续收集国内外铁线莲药用植物资源, 为开展更全面的分子鉴定、系统发育分析和居群遗传多样性研究奠定基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 第 28 卷. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 王文采, 李良千. 铁线莲属一新分类系统 [J]. 植物分类学报, 2005, 43(5): 431-488.
- [3] 张 燕, 黎 斌, 李思锋. 铁线莲属植物分类学及园艺学研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5): 6-10.

- [4] 黄文武. 铁线莲属植物的研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 285-288.
- [5] 王 锋, 唐秋玲, 马晓黎, 等. 铁线莲属植物的化学成分研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(6): 1-6.
- [6] 孙晓博, 龚友兰, 李兰林, 等. 铁线莲属植物药理活性研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4124-4126.
- [7] 刘 韶, 向大雄, 颜 苗, 等. 单叶铁线莲化学成分研究 [J]. 中成药, 2007, 29(9): 1379-1380.
- [8] 王祥培, 钱海兵, 黄 婕, 等. 威灵仙与柱果铁线莲体内的高效液相色谱对比分析 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2224-2225.
- [9] 孙 凤, 蔡 铮, 杨得坡, 等. 液相色谱-质谱联用定量分析威灵仙及其同属植物中 4 种三萜皂苷 [J]. 分析化学, 2010, 38(9): 1293-1298.
- [10] 章蕴毅, 张宏伟, 李佩芬, 等. 威灵仙的解痉抗炎镇痛作用 [J]. 中成药, 2001, 23(11): 808-811.
- [11] 李宗艳, 唐 岱, 黄开勇. 转子莲的繁殖研究 [J]. 西南林学院学报, 2004, 24(3): 4-6.
- [12] Kyung K H, Woo Y H, Kim D S, *et al.* Antimicrobial activity of an edible wild plant, *apiifolia* Virgin's Bower (*Clematis apiifolia* DC.) [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2007, 16(6): 1051-1054.
- [13] Youn U, Jin W, Song K S, *et al.* Cytotoxic constituents from the aerial part of *Clematis apiifolia* L. [J]. *Korean J Med Crop Sci*, 2006, 14(5): 299-302.
- [14] 邱晓春, 靳风云, 黄 婕, 等. 山木通挥发油化学成分分析 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1888-1889.
- [15] 浙江植物志委员会. 浙江植物志 [M]. 第 2 卷. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992.
- [16] Sonnante G, Galasso I, Pignone D. ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus *Lens* Mill. [J]. *Ann Bot*, 2003, 91(1): 49-54.
- [17] Schmidt G J, Schilling E E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(5): 716-726.
- [18] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, *et al.* ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416-423.
- [19] 蒋玲艳, 郭志刚, 王 翀, 等. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1123-1127.
- [20] 蒋向辉, 余朝文, 许 栋, 等. 七叶一枝花基于 ITS 序列的 DNA 条形码构建研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3295-3296.
- [21] 李沛清, 张 帆, 金建文, 等. 不同产地大黄 ITS 序列分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 136-138.
- [22] 陈随清, 潘成学, 卢小蕾, 等. 山茱萸不同栽培品种的 rDNA ITS 序列分析 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(1): 72-75.
- [23] 王德信. 天麻 ITS 序列分析及变异类型鉴定 [J]. 生物技术, 2010, 20(6): 33-35.
- [24] 于华会, 杨志玲, 杨 旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [25] 金成庸, 陈建伟, 刘忠权, 等. 3 种药材基源 rDNA 内转录间隔区的序列分析鉴定 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 58-61.
- [26] 徐 红, 李晓波, 丁小余, 等. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析 [J]. 药学学报, 2001, 36(10): 777-783.