

表 7 评价单元序列相对于最差参考序列的关联系数与关联度

	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9
	0.5915	0.8810	1.0000	0.6072	0.6610	0.4256	0.6799	0.8830	1.0000
	0.4234	0.7791	0.9929	0.6028	0.6437	0.4876	0.9436	0.7633	1.0000
	0.2125	0.8854	0.3587	0.6353	0.4635	0.5702	0.6840	1.0000	0.5197
	0.5848	1.0000	0.4574	0.8811	0.6580	1.0000	0.6737	0.5154	0.3333
	0.3862	0.3333	0.5020	1.0000	1.0000	0.4450	0.7707	0.7845	1.0000
	1.0000	0.9037	0.4037	0.6659	0.7156	0.7114	1.0000	0.3333	1.0000
关联度	0.5331	0.7971	0.6191	0.7321	0.6903	0.6066	0.7920	0.7133	0.8088

表 8 各样品相对关联度质量优劣排序

项目	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9
相对关联度	0.5752	0.4916	0.5010	0.4839	0.4722	0.5689	0.4006	0.4877	0.3881
质量排序	1	4	3	6	7	2	8	5	9

3.4 相对关联度计算 由公式(6)计算各样品的相对关联度,并按 $r_{(s)}$ 大小排序,见表 8。

4 小结与讨论

由表 8 可见,在 9 个鹿鞭药材样品中,以样品 1、样品 6 及样品 3(即陕西马鹿鞭、四川和辽宁桓仁梅花鹿鞭)的质量较好,这与传统鹿鞭的产地及目前药材市场经营的品种相符合。

中药材的化学成分复杂,具有一定的模糊性,可视为一个灰色系统^[2~5],用灰色系统理论中的灰关联度分析或灰关联聚类来评价中药质量。本研究建立的灰色关联度模型,是以相对关联度为测度,评价鹿鞭药材质量。经实例计算分析,模型与实际情况的拟合效果较好。本研究为利用灰色模型,对药材成分与质量关系进行量化模拟提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 胡雅妮,李峰,康廷国.鹿鞭的生药学研究进展.中草药,2003,34(7):附12

[2] 吴忠,苏薇薇.中药连翘质量的灰色模式识别研究.中药材,2000,23(9):536

[3] 邓聚龙.灰色系统基本方法.武汉:华中理工大学出版社,1987:17

[4] 吴忠,郑少珠.浙贝母、川贝母微量元素灰关联度分析及鉴别分类.中药材,1997,20(6):291

[5] 周彤,刘菲菲.新灰色关联分析法评价水牛角、黄牛角与广角的氨基酸组成相似性.数理医药学杂志,2001,14(6):557

(2007-07-27 收稿)

• 资源 •

金铁锁不同居群 rDNA ITS 序列分析

刘文志¹,戴住波¹,钱子刚^{1,2*}

(1. 云南中医学院,云南昆明 650200 2. 中国科学院昆明植物研究所,云南昆明 650204)

摘要 目的:分析金铁锁不同居群的核糖体 ITS 碱基序列,为鉴别不同产地金铁锁提供分子依据。方法:使用 1 对引物 18P1 和 26P2 进行 ITS 基因的 PCR 扩增并测序。结果:12 个居群金铁锁的 ITS1 片段长度为 225~229 bp,ITS2 片段长度为 166~170 bp,5.8S 片段长度为 261~264 bp。云南昆明、丽江、个旧、鹤庆和四川盐源 5 个居群的 ITS 序列碱基完全一致,云南宣威、会泽、中甸、保山、四川木里、西藏林芝等 7 个居群的 ITS 序列则有不同的变化,碱基变异数目(包括 5.8S 编码区)为 1~4 个。结论:经过比较分析,rDNA ITS 区碱基序列在分布于云南中部、四川西南端等居群与云南西部、西北端、西藏东南部、四川西南部居群具有各自相应的指纹特征,可以作为相应居群的鉴别依据。

关键词 金铁锁;ITS 序列;PCR

中图分类号:R282.71 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2008)02-0192-04

基金项目:云南省中青年学术技术带头人后备人才项目(2004PY01-18)

作者简介:刘文志(1981-),2005 级硕士研究生。

* 通讯作者:钱子刚,教授, Tel:0871-6212605

Ribosomal DNA ITS Sequence of Analysis of *Psammosilene tunicoides* from Different Populations

LIU Wen-zhi¹, DA I Zhu-bo¹, Q IAN Zi-gang^{1, 2}

(1. Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract Objective To analyze the ribosomal ITS sequence variation of *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu from different populations for identifying different local populations. Methods A pair of primers of 18SP1 and 26SP2 with PCR technique had been applied to study the ITS sequences. Results The sequences of ITS1, ITS2 and 5.8S are 225~229 bp, 166~170 bp and 261~264 bp. Among 12 local populations, the sequence of Kunming, Lijiang, Gejiu, Heqing of Yunnan and Yanyuan of Sichuan showed no variation, there were 1~4 variable sites (including 5.8S coding region) in pairwise comparison of the other 7 local populations including Xuanwei, Huize, Zhongdian, Baoshan of Yunnan, Muli of Sichuan and Linzhi of Tibet. Conclusion Comparative analysis shows that the ITS sequences of different local populations in the middle of Yunnan, southwest of Sichuan and west-northwest of Yunnan, southeast of Tibet, southwest of Sichuan have different fingerprint character, so the ITS sequences can be used to identify different local populations. The variation of ITS sequence of *Psammosilene tunicoides* is related to its geographical distribution.

Key words *Psammosilene tunicoides*; ITS sequence; PCR

石竹科 Caryophyllaceae 金铁锁属金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 是我国西南地区特有的单种属植物^[1], 主要分布于云南, 贵州西北部、四川西南部, 西藏东南部亦有少量分布。具有散瘀痛、止血、消肿排脓的功效, 主要用于治疗跌打损伤、风湿痛、胃痛、痈疽疮疥、创伤出血等^[2], 为云南白药的主要组成药材之一。由于长期全靠野生采挖, 资源逐渐减少, 1999 年列入《中国植物红皮书》为国家二级保护植物。随着金铁锁资源越来越缺乏, 药材来源亟待进行质量评价。

近年来, DNA 分析技术的发展, PCR 测序方法已经被应用到了中药品种鉴别领域^[3]。rRNA 的结构与功能十分保守^[4]。在 rDNA 中, 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 位于 18S 和 26S rRNA 基因之间, 被 5.8S rRNA 基因分为 2 段, 即 ITS1 和 ITS2。ITS 区的进化速率较快, 该片段特别适合于科内及属、种间, 以及居群之间的分子系统演化关系和物种鉴别^[5-9]。

1 材料与方法

1.1 材料来源 金铁锁材料采自云南昆明、四川木里、贵州威宁和西藏林芝等 12 个居群 (表 1)。叶片用硅胶带回用于 DNA 提取。凭证标本藏于云南中医药大学植物标本馆, 均由云南中医药大学中药学院钱子刚教授鉴定。

1.2 药品试剂 液氮、CTAB 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.7 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% CTAB, 20 mmol/L 2-巯基乙醇)、琼脂糖、溴化乙锭、凝胶上样缓冲液、10×TBE 缓冲液购自华舜生物工程公司; 寡核苷酸引物、TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工生物工程有限公司。

表 1 金铁锁 12 个居群采集地

编号	代码	采集地点	海拔 (m)	凭证标本号
1	XW	云南宣威	2100	021030
2	ZD	云南中甸	3230	03DXB-56
3	HQ	云南鹤庆	2270	HQ050721
4	HZ	云南会泽	2750	HZ050823
5	KM	云南昆明	2320	XMY-040924
6	YY	四川盐源	3320	20030728
7	BS	云南保山	2050	BSH-040915
8	LJ	云南丽江	2795	LJ050831
9	ML	四川木里	2550	ML040821
10	GJ	云南个旧	2100	03GJ-01
11	WN	贵州威宁	2400	XS040903
12	XZ	西藏林芝	3065	20060822

1.3 仪器设备 PCR 扩增仪 (PE 公司 9600 型), 琼脂糖凝胶电泳槽, 离心机, 凝胶成像系统等。

1.4 方法

1.4.1 DNA 提取: 采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA^[10]。用紫外分光光度计和 1.0% 琼脂糖电泳检测所提取的 DNA。

1.4.2 ITS 序列的扩增、纯化和测序: 9600 型 PCR 扩增仪, 反应体系为 50 μl, 其中含双链 DNA 模板 (约 50 ng) 3.0 μl, 正反引物: 18P1: 5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3'; 26P2 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3' (2 μmol/L) 各 1.0 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl, 10×PCR Buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L MgCl₂) 5.0 μl, dNTP 4.0 μl, 扩增反应程序: 94℃预变性 6 min, 94℃变性 35 s, 55℃退火 35 s, 72℃延伸 1 min, 循环 35 次; 72℃延伸 8 min, 所有 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒纯化。纯

化 PCR 产物由北京三博生物技术有限公司测序。

1.4.3 ITS 序列分析: 用 CLUSTALX (1.83) 程序对位排列 ITS 序列, 用系统发育分析软件 MEGA2 计算和构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 金铁锁不同居群 ITS 碱基序列的异同 12 个居群样品 ITS 全序列的长度为 658 bp 全序列的变异位点列于图 1。云南昆明、四川盐源、云南鹤庆、云南丽江、云南个旧居群 ITS 序列完全一致; 云南中甸、保山和昆明居群只有一个位点的差异, 位于 ITS2 区。云南会泽、四川木里居群的 ITS 序列较一致; 这两支之间只在 ITS2 区有一个碱基的区别。贵

州威宁、云南宣威和云南昆明居群有两个位点差异, 分别在 ITS 区和 ITS2 区。西藏林芝居群变异最大, 与云南昆明居群有 4 个位点的差异, 和其他 11 个居群的样品的序列相比也有较大的差异。

2.2 不同居群 ITS 序列的遗传距离 遗传距离范围为 0.000~0.011(表 2)。

2.3 金铁锁居群的系统树 以 UPGMA 法构建系统树, 如图 2 所示: 西藏林芝的变异最为明显, 自为单系。云南丽江、云南鹤庆、云南昆明、云南个旧、四川盐源以及云南保山、云南中甸居群亲缘关系最近, 组成一个较大分支, 而四川木里、贵州威宁、云南会泽和云南宣威居群组成一个分支。

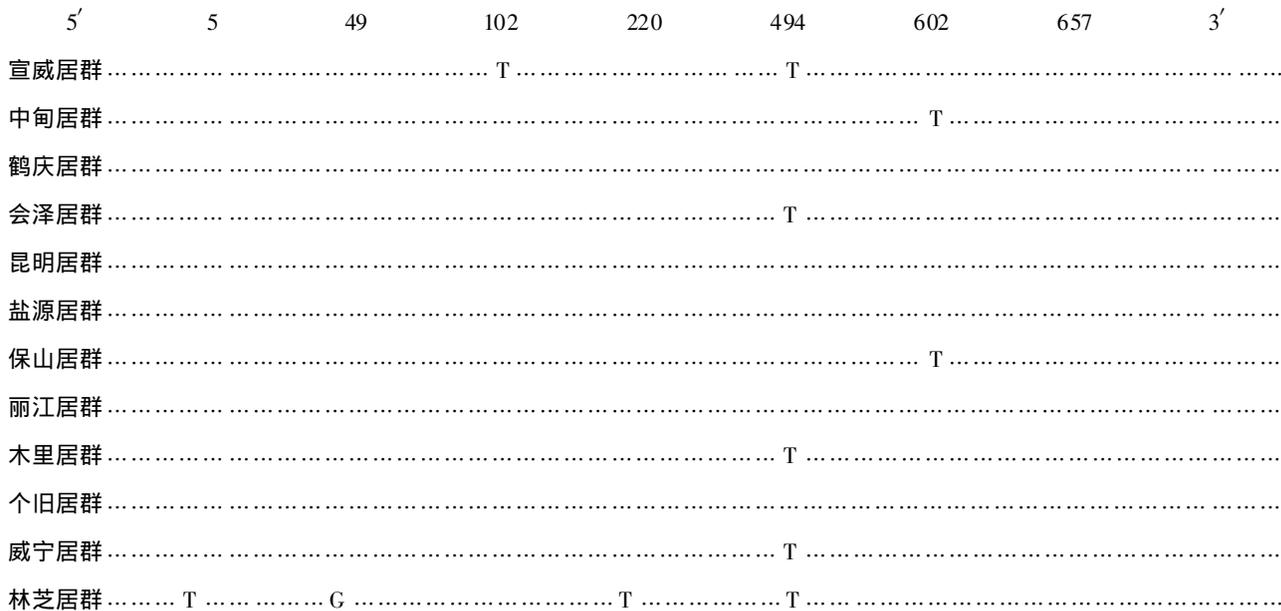


图 1 金铁锁各居群的变异位点

表 2 不同居群金铁锁序列距离

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0.005											
3	0.003	0.002										
4	0.002	0.003	0.002									
5	0.003	0.002	0.000	0.002								
6	0.003	0.002	0.000	0.002	0.000							
7	0.005	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002						
8	0.003	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002					
9	0.002	0.003	0.002	0.000	0.002	0.002	0.003	0.002				
10	0.003	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002			
11	0.003	0.005	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.002	0.003		
12	0.009	0.011	0.009	0.008	0.009	0.009	0.011	0.009	0.008	0.009	0.008	

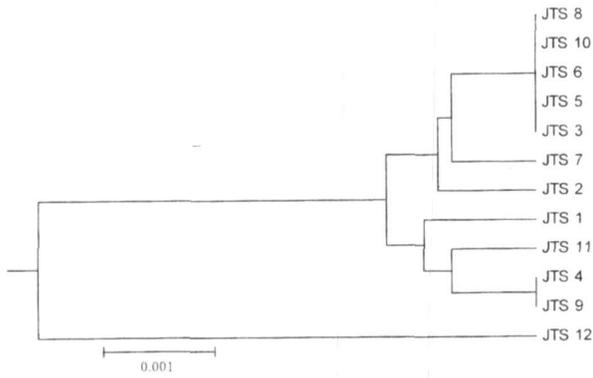


图 2 基于 ITS 序列的 12 个居群金铁锁的系统聚类图

注: JTS1. 云南宣威 JTS2. 云南中甸 JTS3. 云南鹤庆 JTS4. 云南会泽 JTS5. 云南昆明 JTS6. 四川盐源 JTS7. 云南保山 JTS8. 云南丽江 JTS9. 四川木里 JTS10. 云南个旧 JTS11. 贵州威宁 JTS12. 西藏林芝

从结果可以推测: 金铁锁在古地中海起源后, 主要分布于古金沙江流域的四川盐源、云南丽江、云南鹤庆、云南昆明、云南个旧一带。随着古地中海的退却, 向西部、西北部扩张到了云南保山、云南中甸和西藏林芝, 向东北部延伸至云南会泽、四川木里以及云南宣威至贵州威宁。西藏林芝为分布的最西北端, 存在一定的地理隔离, 可能是在喜马拉雅山脉隆起之后分化出的一支。

2.4 不同居群金铁锁的 ITS 区序列的价值 金铁锁 rDNA ITS 的变异与地理分布有关。云南是金铁锁药材的主要产地, 丽江为其地道药材产区。将丽江居群的 ITS 序列设为标准, 而其他产地 ITS 序列的差异大多有各自的指纹图谱, 可作为鉴别来自不同产地金铁锁的参考。此外, 产于云南西北部和云南中部地区的金铁锁可视为药材来源合理性依据。

参 考 文 献

[1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志. 第一册. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 471.

[2] Lu D Q, Liden M, Oxen an B. Psanmosilene in Wu CY, Raven HI, Flora of China Beijing Science Press, 2001: 108.

[3] Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84 (5): 9054.

[4] 万海清, 梁明山, 许介眉, 等. 分子生物学手段在植物系统与进化研究中的应用. 植物学通报, 1998, 15(4): 8.

[5] 王建波, 张文驹, 陈家宽, 等. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407.

[6] 丁小余, 王峥涛, 徐珞珊, 等. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究. 中国中药杂志. 2002, 27(2): 85-88.

[7] 蔡金娜, 周开亚, 徐珞珊, 等. 不同居群蛇床的 rDNA ITS 序列分析. 药学学报, 2000, 35(1): 56-59.

[8] 张君毅, 郭巧生, 吴丽伟, 等. 我国不同地区半夏 rDNA 序列分析. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 1768-1772.

[9] 赵钥, 赵文军, 朱水芳, 等. 核 rDNA ITS 序列在植物种质资源鉴定中的应用. 辽宁农业科学, 2005(5): 26-28.

[10] Clark M S. 植物分子生物学-实验手册. 顾红雅, 瞿礼嘉主译. 陈章良主校. 北京: 高等教育出版社, 2001: 5-6.

(2007-03-29 收稿
2007-10-15 修回)

《中药材》杂志 2007 年合订本已装订完毕, 精装本, 分上、下两册, 订价: 220 元 (包邮资)。需者请汇款至《中药材》杂志编辑部购买。