



一种钩藤属植物的分子鉴定

朱爽¹, 周林¹, 庞惠敏¹, 黄宏靓¹, 高晓霞², 曾常青^{3*}

(1. 广东药学院 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006;

2. 广东药学院 药科学院, 广东 广州 510006; 3. 广东药学院 中药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的:以核糖体转录间隔区(rDNA ITS)序列为分子标记,对1种钩藤属植物归类到种提供分子证据。方法:改良CTAB法提取钩藤植物材料总DNA,通过引物对rDNA ITS区序列进行PCR扩增,经过克隆、测序后,与GenBank中已有的钩藤属植物rDNA ITS区序列进行比对,并应用Clustal X, BioEdit等软件计算分析,用PAUP软件构建系统发育树。结果:测序得到该钩藤植物的rDNA ITS区序列长度为719 bp,序列分析结果显示该钩藤植物与GenBank中已有的华钩藤*Uncaria sinensis* rDNA ITS区序列之间相似性达99.7%,并且在系统发育树中并排聚类成一支。结论:基于rDNA ITS区序列的测序分析和系统发育树构建的分子生物学方法,能够对该钩藤属植物进行准确的分子鉴定,为钩藤属中药材的种类鉴定和种间的分类地位提供分子生物学理论依据。

[关键词] 分子鉴定;钩藤;ITS序列

中药材钩藤为茜草科 Rubiaceae 钩藤属 *Uncaria* 植物,主要分布于我国广西、贵州、云南、广东等西南地区,为中医常用药,药用历史悠久,2005年版《中国药典》规定钩藤为茜草科植物钩藤 *U. rhynchophylla*、大叶钩藤 *U. macrophylla*、华钩藤 *U. sinensis*、毛钩藤 *U. hirsute* 和无柄果钩藤 *U. sessilifructus* 等5种药材^[1]。目前,钩藤属植物的分类鉴定主要依据形态学特征和理化性质。化学成分研究表明,钩藤属中药材的主要有效成分为生物碱,在治疗心血管疾病尤其是高血压方面有较大的优势,但不同种的药效成分有一定的差别^[2]。钩藤属中药材的准确鉴定是药物合理配伍和治疗疾病的基础,有助于增加临床用药的安全性。由于传统鉴定方法在钩藤属植物种间鉴定中存在一定的局限性,为了安全有效地使用钩藤属中药材,有必要运用分子生物学技术进一步对钩藤属种间进行鉴定。分子生物学技术已在药用植物的分子系统发育分析中广泛地应用,但对钩藤属植物种间分子鉴定等基础研究工作还少有报导,仅有陶刚曾对贵州中药材钩藤属植物进行分子鉴定并归类到属^[3,4]。钩藤植物鉴定难,品种混

乱,利用分子系统发育学原理,对钩藤属植物进行遗传分析,有助于正本清源。

本文主要采用分子生物学技术,对据形态特征初步鉴定为华钩藤 *U. sinensis* 的一种钩藤属植物的rDNA ITS区序列进行序列测定并构建其系统发育树,以GenBank中已有的茜草科钩藤属中药材rDNA ITS区序列发育关系为依据,将该钩藤样品归类到种。

1 材料

钩藤实验材料在重庆南川县金佛山采集,由重庆南川药物种植所的植物专家周卯勤鉴定。植物茎枝钩形状弯曲成长钩状,表面黄绿色,叶对生。采集新鲜的叶片和茎枝,在48 h内进行植物总DNA提取,或直接放进含有硅胶的密封袋中迅速干燥备用。

2 方法

2.1 植物总DNA提取 采用改良CTAB法^[5]提取植物总DNA:在预冷的灭菌研钵中,将0.5 g新鲜干叶片或茎枝在液氮中研磨至粉末状;每1 g样品加入5 mL 65 °C 预热CTAB裂解液(CTAB 4%, Tris-HCl 100 mmol · L⁻¹, EDTA 25 mmol · L⁻¹, NaCl 1.4 mol · L⁻¹, β-巯基乙醇 2%, PVP 1%, pH 8.0),充分混匀后按每1 mL混合液分装到1.5 mL Eppendorf管中,并于65 °C温育2 h,期间每隔15~20 min颠倒振荡1次;4 °C, 12 000 r · min⁻¹离心5 min,吸取上清液用等体积的Tris饱和酚抽提2次,酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)和氯仿-异戊醇(24:1)各抽提1

[稿件编号] 20100913007

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30800227)

[通信作者] * 曾常青, Tel/Fax: (020) 39352181, E-mail: gdzqc@163.com

[作者简介] 朱爽, 讲师, 主要从事中药分析与鉴定研究, Tel/Fax: (020) 39352201, E-mail: wenchengji@yahoo.com.cn

次。可以根据情况重复以上操作直至两相分层处没有明显的杂质,然后4℃,12 000 r·min⁻¹离心5 min取上清液并加入NaAc(pH 5.2),使溶液终浓度达到3 mol·L⁻¹,再加入2.5倍体积的无水乙醇,于-20℃沉淀1 h,吸出DNA至1.5 mL的Eppendorf管中,用1 mL 70%冷乙醇洗涤2次,无水乙醇洗涤1次,风干后溶于50 μL无菌TE缓冲液中,-20℃保存备用。

2.2 PCR扩增 选择扩增植物rDNA ITS序列的通用引物(上海生工生物工程公司合成)^[6-7] ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对钩藤总DNA进行rDNA ITS序列的扩增。在20 μL的PCR反应体系中含有10×PCR buffer(2.5 mmol·L⁻¹,含MgCl₂)2 μL,dNTP(10 mmol·L⁻¹)0.4 μL,引物量为10 pmol,rTaq(5 U·μL⁻¹)0.2 μL,加入约50 ng的模板DNA,其余体积以无菌超纯水补足。PCR扩增反应过程为:95℃预变性3 min,94℃变性1 min,52℃退火50 s,72℃延伸50 s,循环35次,最后在72℃延伸10 min。PCR仪型号为Applied Biosystems(2720 Thermal cycler PCR)。

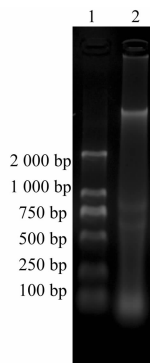
2.3 PCR产物纯化、连接和转化 钩藤rDNA ITS序列的PCR扩增产物(大约720 bp)在紫外灯下从1%的琼脂凝胶进行割胶并采用DNA凝胶回收试剂盒回收。纯化后与pMD18-T-Vecter连接,连接产物转化*Escherichia coli* JM109感受态细胞,并进行氨苄青霉素抗性选择和蓝白斑筛选。

2.4 测序及序列分析 由华大六合基因科技股份有限公司对单克隆菌液进行测序。测序得到的序列通过与国际基因数据库(GenBank)中已有的ITS区序列进行比较分析,得到该序列大概的分子系统发育关系。通过Clustal X程序(版本1.8)进行序列的比对;序列间的比较分析通过Bioedit软件完成。应用PAUP软件(版本4.0 b10),使用最大简约法(maximum parsimony, MP)计算及构建系统进化树,用Bootstrap值(1 000 bootstraps)检验系统树上各节点的置信水平,使用TREEVIEW查看。

3 结果与讨论

3.1 总DNA提取结果 用50 μL TE回溶钩藤的总DNA,取3 μL总DNA样品,用SYBR Green I染色10 min后进行1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统记录结果见图1。钩藤总DNA样品主带清晰完

整,无明显降解。改良CTAB法能够高效提取该钩藤属植物的总DNA。



1. Marker(DL2 000); 2. 钩藤样品(图2同)。

图1 样品总DNA的凝胶电泳

3.2 钩藤rDNA ITS区PCR扩增 植物总DNA模板按1,10,100,1 000,10 000倍的梯度稀释后进行rDNA ITS序列的PCR扩增。模板浓度梯度扩增结果表明,模板的稀释倍数在100~1 000时,rDNA ITS序列能够被高效扩增。在最佳模板浓度下,钩藤样品rDNA ITS序列PCR扩增产物的1%琼脂糖凝胶电泳结果见图2。钩藤样品rDNA ITS序列PCR产物主条带清晰,非特异扩增条带少,大小约为720 bp。由此可见,在最佳的模板浓度下,可以减少钩藤中生物碱等抑制物对PCR的不利影响。

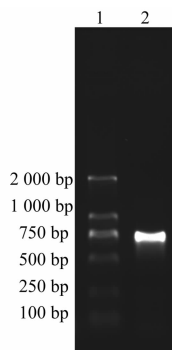


图2 最佳模版浓度条件下PCR扩增

3.3 ITS区序列分析 钩藤样品挑取3个单克隆测序,获得该钩藤样品rDNA ITS序列的长度为719 bp。把该钩藤样品rDNA ITS序列与GenBank中已有的rDNA ITS序列进行比较分析,得到与之亲缘关

系相近的序列,序列之间通过 Clustal X 比对和 BioEdit 计算,发现该钩藤样品与 GenBank 中已有的华钩藤 *U. sinensis* 的相似性最高,达 99.7%,故将该钩藤植物归类为华钩藤 *U. sinensis*。

3.4 分子系统发育分析 把钩藤样品 rDNA ITS 序列与 GenBank 中已有的 rDNA ITS 序列进行比较分析,得到与之亲缘关系相近的钩藤属其他种的序列和与之亲缘关系相近属的序列。采用最大简约法 (MP) 分析,并以 *Nauclea subdita* (AJ346876) 和 *N. xanthoxylon* (AJ346877) 为外群建立一棵钩藤样品的最大简约树,见图 3。

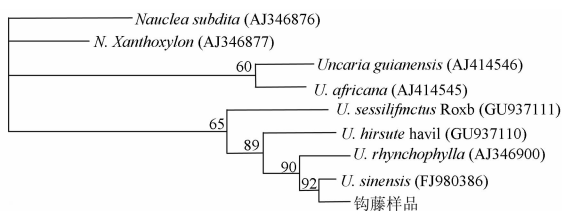


图 3 钩藤样品的最大简约树

从图 3 可以看出,钩藤样品与 GenBank 中已有的华钩藤 (*U. sinensis*, FJ980386) 聚类成为一枝,支持强度高达 92%,接着又依次与钩藤属的其他 3 个种,分别是钩藤 (*U. rhynchophylla*, AJ346900)、毛钩

藤 (*U. hirsuta*, GU937110) 和无柄果钩藤 (*U. sessiliflora*, GU937111) 聚类成 1 支。另外,从遗传分析的角度,该钩藤样品跟 GenBank 中已有的华钩藤 (*U. sinensis*, FJ980386) 亲缘关系最近,并且它们序列之间的相似性高达 99.7%。这样,从分子水平上支持了据形态特征把该钩藤属中药材鉴定为华钩藤 *U. sinensis* 的初步结论。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 180.
- [2] 阮俊,黄永林. 广西钩藤属植物中总生物碱含量变化研究[J]. 广西植物, 2004, 24 (2): 158.
- [3] Sylvain G R, Birgitta B. Phylogeny and classification of *Nauclea* S. L. (Rubiaceae) inferred from molecular (ITS, *rbcL*, and *trnNT-F*) and morphological data [J]. Am J Bot, 2002, 89: 1027.
- [4] 陶刚,刘涛,朱英,等. 贵州中药材钩藤属植物的分子鉴定[J]. 中药材, 2008, 31 (6): 825.
- [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11.
- [6] White T J, Bruns T D, Lee S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. USA San Diego, C A: Academic Press, 1990: 315.
- [7] Chou S J, Yen J H, Fang C L et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. Planta Med, 2007, 73: 1421.

Molecular identification of one *Uncaria* plant

ZHU Shuang¹, ZHOU Lin¹, PANG Huimin¹, HUANG Hongliang¹, GAO Xiaoxia², ZENG Changqing^{3*}

- (1. School of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
- 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
- 3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** In order to identify a species of *Uncaria*, molecular phylogenetic analysis was carried out by using the rDNA ITS sequence as molecular marker. **Method:** Total DNA was extracted from the plant with modified CTAB method and thereby rDNA ITS regions were amplified with universally conserved primer. The rDNA ITS amplicon was characterized by cloning, sequencing, blasting in GenBank and phylogenetic analyses using PAUP by maximum parsimony (MP) criteria. **Result:** The rDNA ITS entire sequence of this species of *Uncaria* was 719 bp. The sequence is related to the *U. sinensis* available in GenBank and the similarity reaches 99.7%. **Conclusion:** Based on molecular biology methods of rDNA ITS region analysis, molecular identification is available in accurate classification on this species of *Uncaria*.

[Key words] molecular identification; *Uncaria*; ITS sequence