

山姜属中药草豆蔻和益智 nrDNA ITS 区序列的测定

赵志礼¹⁾ 周开亚²⁾ 王峥涛¹⁾ 秦民坚¹⁾ 董辉¹⁾ 徐珞珊¹⁾

(¹⁾中国药科大学生药学研究室, 南京 210038; (²⁾南京师范大学遗传资源研究所, 南京 210097)

摘要: 中药草豆蔻、益智的原植物分别为山姜属草豆蔻 (*Alpinia hainanensis* K. Schum.) 与益智 (*A. oxyphylla* Miq.)。本文采用 PCR 直接测序法, 首次测定了它们的核糖体 DNA ITS 区序列, 结果显示, 两者序列长度 (ITS 1 + ITS 2) 分别为 403 bp 与 404 bp, 序列间具有 27 个变异位点 (包括 5.8 S 编码区)。本研究为山姜属中药材的 DNA 分子鉴定提供了必要的序列资料。

关键词: 山姜属; 草豆蔻; 益智; 核糖体 DNA; ITS 区序列

中图分类号: R282.5; Q522+.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)03-0038-03

Determination of nrDNA ITS sequences of Caodoukou (*Alpinia hainanensis* K. Schum.) and Yizhi (*A. oxyphylla* Miq.) ZHAO Zhi-li¹⁾, ZHOU Kai-ya²⁾, WANG Zheng-tao¹⁾, QIN Min-jian¹⁾, DONG Hui¹⁾, XU Luo-shan¹⁾ (¹⁾Department of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038; (²⁾Nanjing Normal University, Nanjing 210097), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(3): 38~40

Abstract: As the traditional Chinese medicines, Caodoukou (Semen *Alpiniae* Katsumadai) is from *Alpinia hainanensis* K. Schum., and Yizhi (Fructus *Alpiniae* Oxyphyllae) from *A. oxyphylla* Miq. Their nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) regions were first sequenced. Sequence analysis showed that the ITS region (ITS 1 + ITS 2) of *A. hainanensis* is 403 bp in length and that of *A. oxyphylla* is 404 bp. There are 27 variable sites (including 5.8 S coding region) in pairwise comparison of the sequences. This study could provide significant data for identifying the medicines at DNA level.

Key words: *Alpinia* Roxb.; *Alpinia hainanensis* K. Schum.; *Alpinia oxyphylla* Miq.; nrDNA; ITS sequence

山姜属 (*Alpinia* Roxb.) 国产近 50 种, 分布于我国东南部及西南部^[1]。无论是种群数目还是在系统演化进程中所处的地位, 在姜科 (Zingiberaceae) 中都是一个举足轻重的属。该属植物具有很高的药用价值, 中药高良姜、益智、草豆蔻、红豆蔻等, 其原植物均来自山姜属, 另据文献报道以及作者的实地调查^[2], 山姜属大部分种类在不同地区作药用。但由于该属植物共性明显, 种内个体变异幅度较大, 加之一些原始文献描述过于简单等原因, 长期以来, 属下等级的划分不尽一致, 一些种群界限不甚清晰, 给中药鉴定带来很多困难。这些长期存在的问题, 经典方法难以有所突破。为此首次对中国山姜属植物进行了分子系统学研究, 测定了草豆蔻 (*Alpinia hainanensis* K. Schum.)、益智 (*A. oxyphylla* Miq.) 核糖体 DNA ITS 区的序列, 评价其系统分类学意义, 为建立更为客观的自然分类系统提供了有

力的 DNA 分子证据; 并为该属中药材的分子鉴定技术研究打下坚实基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

用于提取 DNA 的材料为新鲜叶片, 原植物均经作者鉴定其学名。凭证标本保存于中国药科大学药用植物标本馆 (CPU), 详细情况见表 1。

1.2 总 DNA 提取

参考 Doyle 和 Doyle 的总 DNA 提取方法^[3], 并

收稿日期: 1999-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39600010) 及江苏省资源生物技术重点实验室资助项目

作者简介: 赵志礼, 男, 1956 年 11 月生, 甘肃兰州人, 博士, 副教授, 主要从事生药学、药用植物学、中药资源学的研究。

表1 实验材料来源及凭证标本

Table 1 The origin of materials and vouchers

种类 Taxon	产地 Locality	凭证标本 Voucher
草豆蔻 <i>Alpinia hainanensis</i>	华南植物园栽培	赵志礼 98025
益智 <i>Alpinia oxyphylla</i>	广西药用植物园栽培	赵志礼 98013

加以改动,具体步骤如下:取适量新鲜叶片,经液氮研磨后,加入DNA提取缓冲液[8 mol/L Urea, 0.35 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.02 mol/L EDTA, 2% Sucrose, 5% 饱和酚, 2% SDS],混匀,60℃水浴保温10 min;再加入2/5体积的饱和酚,3/5体积的氯仿-异戊醇(体积比24:1)混合液,轻轻摇匀,混匀,离心;取上清液,用2倍体积的无水乙醇沉淀DNA,离心,倾出液体,将沉淀物用70%乙醇洗涤3~5次,风干,加入80~160 μ L ddH₂O重悬DNA;于4℃静置12h以上,再次离心;最后,弃去沉淀物,上清液-20℃保存备用。

1.3 ITS 区片段的 PCR 扩增与产物纯化

PCR 扩增的引物为 P1(5'-CGT, AAC, AAG, GTT, TCC, GTA, GGT, GAA, C-3'), P2(5'-TTA, TTG, ATA, TGC, TTA, AAC, TCA, GCG, GG-3'),以扩增3'-18S-ITS-5'-26S(包括5.8S编码区)片段。反应体积为30 μ L,其中含10 \times PCR buffer 3 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μ L, dNTP mix (2 mmol/L) 2 μ L, Primer 1(10 pmol/ μ L) 1 μ L, Primer 2(10 pmol/ μ L) 1 μ L, Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.20~0.25 μ L, Template DNA 约70~80 ng, ddH₂O 适量。反应在 GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER 公司)上进行,条件为①95℃预变性4 min,②95℃变性1 min,③62℃复性45 s,④72℃延伸2 min,⑤重复②~④步骤共32个循环,⑥循环完成后,72℃保温3 min,反应结束;产物置4℃保存。

PCR 扩增产物用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System (Promega 公司)进行纯化。

1.4 测序反应与 ITS 区序列的获得

将纯化后的 PCR 产物作为测序反应的模板,所用引物不仅使用 P1、P2,而且从序列中间(5.8 S)插入 P3(5'-GCT, ACG, TTC, TTC, ATC, GAT-3')或 P4(5'-CCA, TCG, AGT, CTT, TGA, ACG, CAA-3'),以确保所测序列准确与完整。测序反应条件为①95℃变性10 s,②50℃复性5 s,③60℃

延伸4 min,④重复①~③步骤共25个循环,循环完成后,反应结束。其他操作均按 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (PERKIN ELMER 公司)使用要求进行;毛细管电泳之后,序列资料直接从该测定仪上得到。

2 结果与讨论

2.1 山姜属 nrDNA ITS 区序列的价值

草豆蔻、益智及山姜属其他17种近缘植物的核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS 1 和 ITS 2 与3个编码区 5.8 S、18 S、26 S 的界限是根据水稻 rDNA 序列确定的^[4]。对所获得的国产山姜属19个分类群 ITS 区序列进行分析比较后表明,ITS 区分化较活跃,该片段对山姜属种间有很好的分辨率(GeneBank accession numbers AF254458 ~ AF254477);而5.8 S编码区高度保守,在所测样品中长度一致,均为164 bp,且变异位点极少;同种不同居群间的 ITS 区序列相一致(包括5.8 S编码区)。因此,山姜属植物 nrDNA ITS 区序列资料在该属中药鉴定中具有较高的应用价值。

2.2 分子标记的确定

进一步对草豆蔻、益智的序列分析显示,两者序列长度(ITS 1 + ITS 2)不等,分别为403 bp 和404 bp(表2)。就序列中插入片段或位点缺失的情况来看,在 ITS 2 区,益智插入1个片段,长度为2 bp。在 ITS 1 区,益智有1个位点的缺失。对位排列比较后发现序列间有27个变异位点;其中有3个是在高度保守的5.8 S编码区发现的,它们均存在于草豆蔻的序列中。各变异位点、序列长度及 G + C 含量等见表2和图1。

表2 草豆蔻和益智 ITS 区序列长度及其 G + C 含量

Table 2 Sizes and G + C content of ITS sequences of *Alpinia hainanensis* and *A. oxyphylla*

种类 Taxon	ITS 区总长度	ITS 1 长度	ITS 2 长度	G + C 含量
	Length (bp)	ITS 1 (bp)	ITS 2 (bp)	content (%)
<i>A. hainanensis</i>	403	178	225	57.7
<i>A. oxyphylla</i>	404	177	227	58.4

上述这些特征为草豆蔻和益智分子鉴定标记的确定提供了依据。由此可见,核糖体 DNA ITS 区序列资料用于山姜属传统中药的分子鉴定是可行的。

