

## 天麻 rDNA ITS 区的 PCR-RFLP 分析

谢渊<sup>1</sup>, 张小蕾<sup>2,\*</sup>, 李毅<sup>1</sup>, 张婷<sup>1</sup>, 单可人<sup>1</sup>

贵阳医学院<sup>1</sup>分子生物学重点实验室,<sup>2</sup>医学检验系, 贵阳 550004

**摘要:** 对来源于贵州大方(DF)、黎平(LP)、台江(TJ)、雷山(LS)、乌当(WD)及云南(YN)的鲜品天麻进行核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS)的 PCR 扩增,并用限制性内切酶 *Bam*HI、*Hinc*II、*Hea*III 进行酶切分析的结果显示,天麻 ITS 区长度约为 750 bp, PCR 产物经 *Hea*III 酶切后 YN、DF 和 WD 株的 RFLP 图谱基上一致, TJ2、LP 和 LS 株的 RFLP 图谱基本上一致, 而 TJ1 株则显著不同;经 *Bam*HI 酶切后, LP、TJ 和 LS 株的 RFLP 图谱相同,除 DF3 外, YN、DF1、DF2 和 WD 株的 RFLP 图谱基本上一致;经 *Hinc*II 酶切后,除 DF3 和 TJ1 RFLP 的图谱显著不同外,其余样本 RFLP 图谱均表现一致。表明天麻的遗传变异特征与其地域分布有一定的联系。

**关键词:** 天麻; 内转录间隔区; PCR-RFLP

## PCR-RFLP Analysis of rDNA ITS in *Gastrodia elata* Bl.

XIE Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Lei<sup>2,\*</sup>, LI Yi<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, SHAN Ke-Ren<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Molecular Biology, <sup>2</sup>Department of Laboratory Science, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

**Abstract:** PCR-RFLP and restriction enzyme digestion were used to analysis the ITS regions of *Gastrodia elata* from Guizhou Dafang (DF), Liping (LP), Taijiang (TJ), Leishan (LS), Wudang (WD) and Yunnan (YN). The ITS length of *Gastrodia elata* totally was about 750 bp. After digested by *Hea*III, the strains of YN, DF and WD had the identical electrophoresis maps, TJ2, LP and LS had identical electrophoresis maps, but TJ1 was different with other. After digested by *Bam*HI, the strains of LP, TJ and LS had the identical electrophoresis maps, YN, DF1, DF2 and WD had the other identical electrophoresis maps, whereas DF3 was different. After digested by *Hinc*II, except DF3 and TJ1, the other strains had the same electrophoresis maps. So we considered that the genetic variations of *Gastrodia elata* were related with their geographical regions.

**Key words:** *Gastrodia elata*; ITS; PCR-RFLP

天麻是在我国已有上千年药用历史的名贵中药材,其块茎主要含天麻素,有多种疗效(邓士贤和莫云强 1979)。它在形态上虽然呈现出一定的差异,如块茎抽苔后茎和花的颜色,但就天麻的药用部位块茎而言,并没有明显的区别。天麻产区生态环境分析表明,海拔、地势、气温、水分和土壤均是影响天麻生长及品种质量的因素(李梁等 2004),其医药品质仅根据产地的不同进行划分。而作为一段高度重复且有较高进化速率的核酸序列的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS),有种内多态性,位于核糖体 rDNA 的 18S RNA 基因和 28S RNA 基因之间,其侧翼片段均为保守序列,近年来已广泛用于植物药材的分子鉴定研究(杨志业等 2006;张君毅等 2006;刘春生等 2005;武莹等 2004)。本文利用限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法。对不同产地天麻样本的 nrDNA ITS 扩增产物进行了分析,以期能为

天麻的分类和系统发育关系提供分子生物学证据。

### 材料与方法

取鲜品天麻(*Gastrodia elata* Bl.)地下块茎或鹦哥嘴嫩芽洗净,刮弃表皮,以避免共生蜜环菌污染,留其核心成分提取天麻基因组 DNA,材料来源见表 1。

仪器:有 Eppendoff 梯度 PCR 扩增仪、Beckman 台式高速离心机、UVP GDS8000 成像仪等。试剂:引物采用 ITS 通用引物 ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3')、ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White 等 1990) (上海生工生物工程有限公司合成);Taq DNA 聚

收稿 2007-12-26 修订 2008-03-21

资助 贵州省中药现代化专项[(2003)22 号]和贵州省科学技术基金[2005]2069号。

\* 通讯作者(E-mail: xiaolei0501@sohu.com; Tel: 0851-6752814-8000)。

表1 天麻材料的产地

Table 1 Origin of *G. elata* used in the study

样品编号	品种	产地
YN	未知	云南
LP	‘红杆’	贵州东南部黎平县野生
DF1	‘乌杆’	贵州西部大方县野生
DF2	‘乌杆’	贵州西部大方县野生
DF3	‘红杆’	贵州西部大方县人工栽培
WD	‘红杆’	贵州中部贵阳乌当区人工栽培
TJ1	‘红杆’	贵州东南部台江县野生
TJ2	‘乌杆’	贵州东南部台江县野生
LS	‘乌杆’	贵州东南部雷山县野生

合酶(Promega 公司); 限制性内切酶 *Bam*HI、*Hinc*II、*Hea*III (Promega 公司)。

基因组 DNA 的提取采用我组改进的 CTAB/SDS 方法(李毅和张小蕾 2005)。

rDNA ITS 的 PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L, 含 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR 缓冲液(50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0.1% 明胶)、1  $\mu$ L DNA 样品、ITS4 和 ITS5 (10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 各 0.5  $\mu$ L、1.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、2  $\mu$ L

dNTP (2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、0.1  $\mu$ L Taq DNA 酶(5 U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 加双蒸水至 25  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环, 最后于 72  $^{\circ}$ C 下延伸 7 min。

rDNA ITS 的 PCR 扩增产物电泳时, 取 6  $\mu$ L PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, DL2000 为标准分子量参照, 200 V 30 min。溴化乙锭染色后用凝胶成像处理系统观察拍照, 记录电泳结果。

rDNA ITS 区的 RFLP 分析反应体系共 20  $\mu$ L, 其中含 8  $\mu$ L rDNA ITS 区 PCR 产物、0.5  $\mu$ L 限制性内切酶(10 U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>)、2  $\mu$ L 酶切缓冲液、加双蒸水至 20  $\mu$ L。置于 37  $^{\circ}$ C 水浴中酶切反应 12 h。

RFLP 的电泳时取 8  $\mu$ L 酶切反应产物以 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 以 DL2000 为标准分子量参照, 200 V 30 min。溴化乙锭染色后用凝胶成像处理系统观察拍照, 记录电泳结果。

### 实验结果

天麻标本 ITS 序列 PCR 扩增产物长度在 750 bp 左右, 但不同来源样本之间有一定差异(图 1-a)。PCR 产物经 *Hea*III 酶切(图 1-b)、

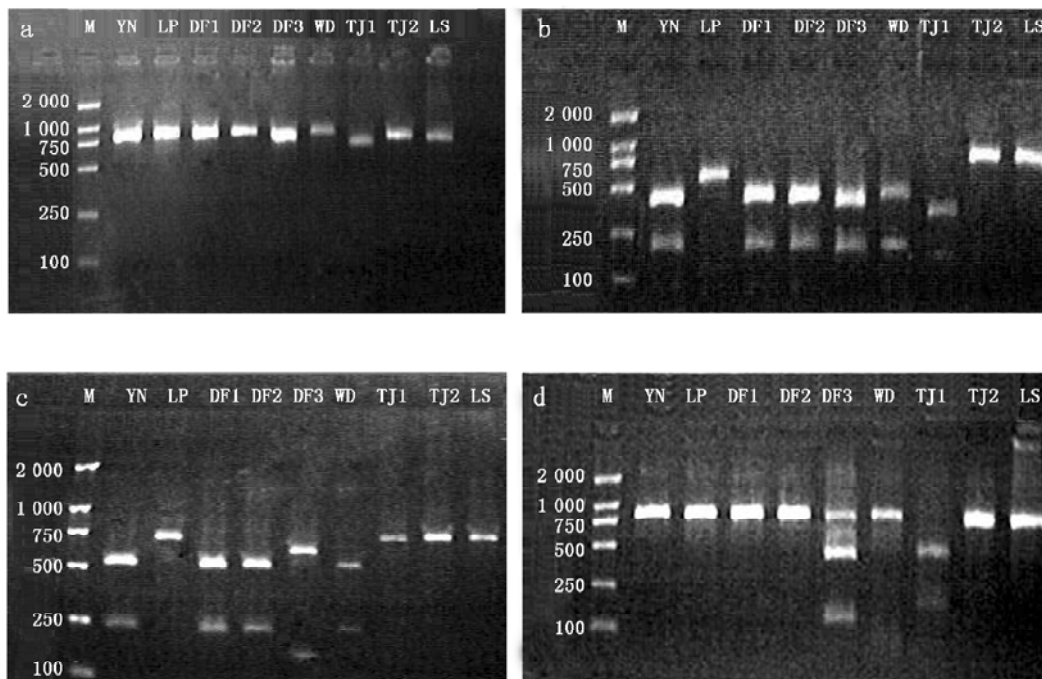


图1 天麻 rDNA ITS 区 PCR 扩增和 RFLP 图谱

Fig.1 PCR amplification results and RFLP analysis of ITS sequence in *G. elata*

a、b、c、d 分别为 PCR 扩增、*Bam*HI、*Hinc*II、*Hea*III 内切酶的酶切图谱; M 为标准分子量参照(DL2000)。

DF2、DF3和WD的RFLP图谱基本上一致, TJ2、LP和LS的RFLP图谱基本上一致, 而TJ1则显著不同; 经 *Bam*HI 酶切(图 1-c), LP、TJ1、TJ2、LS的RFLP图谱相同, 除DF3外, YN、DF1、DF2和WD的RFLP图谱基本上一致; 经 *Hinc*II 酶切(图 1-d), 除DF3和TJ1 RFLP图谱有显著不同之外, 其余的RFLP图谱均表现一致。

## 讨 论

贵州有着得天独厚的气候和丰润的降雨优势, 森林资源丰富, 为天麻生长提供了优越的自然环境, 因而成为中国的主要产区之一。一般传统中药材讲究地道药材, 地道药材是指在一特定自然条件、生态环境的地域内所产的药材, 以致较同种药材在其他地区所产者品质佳、疗效好。贵州天麻向来以品质好、药效高而享誉国内外。天麻品种从茎、花的颜色和块茎的形状可分为‘红杆’天麻、‘绿杆’天麻和‘乌杆’天麻(丁锐 2005), 而在贵州以‘红杆’和‘乌杆’天麻最为常见。本文试对来源于6个地区的‘红杆’和‘乌杆’两个品种共9份天麻的rDNA ITS区进行PCR扩增的结果显示, 各天麻均可扩增出1条750 bp左右的清晰条带。RFLP分析表明在 *Bam*HI 与 *Hinc*III 酶切图谱中, 来源于贵州中部、西部和云南地区的YN、DF1、DF2、DF3和WD天麻株与来源于贵州东南部的LP、TJ1、TJ2和LS株的RFLP图谱之间存在明显的差异, 而在 *Hea*III 酶切图谱中DF3与TJ1显著不同。分析天麻rDNA ITS区间的RFLP, 仅凭一个内切酶的酶切结果进行种间差异分析是不适合的, 如DF3在 *Bam*HI 的酶切结果和YN、DF1、DF2、WD的RFLP图谱一致, 并不表现出种间差异, 而在 *Hinc*II 与 *Hea*III 的酶切结果则表现出明显的差异。TJ1在 *Hinc*II 酶切与LP、TJ2和LS的图谱一致, 而在 *Bam*HI 和 *Hea*III 的酶切结果则表现出明显的差异。我们估计TJ1与TJ2的图谱差异, DF3与DF1、2之间的差异可能同它们的品种不同有关, 这表明在天麻的各群体中可能由于天麻品种的不同

而存在有基因分化的现象。因此认为作RFLP分析时, 必须根据多个酶切结果在总体上反映出共同的规律时, 作出的结论才是可靠的。因此根据3个酶的酶切分析, 供试天麻大致可以按东南部和中西部分为两大支系, 而DF3和TJ1各在其支系里形成分支系。由此我们可以推测天麻的ITS序列特征可能与其地域分布有一定的联系。

此外, 我们还试图从一些存放时间较长的干燥天麻或经加工处理后的商品药材中提取DNA, 结果很难获得DNA, 而且根本扩增不出条带。因此天麻抽提时均采用新鲜天麻的地下块茎或鹦哥嘴嫩芽。而市场上的商品天麻大多是经过一系列的加工处理制成的干品, 其DNA大部分已受到破坏或降解, 这给商品天麻的分子鉴定带来较大的难度, 因此如何从干品天麻中提取DNA, 并寻找一段合适的基因序列进行研究, 应该是今后值得考虑的课题。

## 参考文献

- 邓士贤, 莫云强(1979). 天麻的药理研究. 云南植物研究, 1 (2): 66~73
- 丁锐(2005). 利用EST同工酶鉴定天麻品种及亲缘关系的研究. 食用菌, 4: 8~9
- 李梁, 张艺, 成群芝(2004). 中药天麻产区生态环境分析与评价. 中药研究与信息, 6 (6): 14~16
- 李毅, 张小蕾(2005). 天麻总DNA提取及聚合酶链反应扩增鉴定. 贵阳医学院学报, 30 (4): 311~314
- 刘春生, 王朋义, 王文全(2005). 中国药用甘草物种划分的分子基础研究. 中国中药杂志, 30 (22): 1736~1739
- 武莹, 刘春生, 刘玉法, 阎玉凝(2004). 5种习用柴胡的ITS序列鉴别. 中国中药杂志, 30 (10): 732~734
- 杨志业, 晁志, 霍克克, 吴炳义, 潘胜利(2006). 益母草类中药原植物的核糖体内转录间隔区序列分析. 南方医科大学学报, 26 (11): 1593~1595
- 张君毅, 郭巧生, 吴丽伟, 杭悦宇(2006). 我国不同地区半夏rDNA序列分析. 中国中药杂志, 31 (21): 1768~1773
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 315~322