

中麻黄 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化^Δ

朱田田^{1,2,3*}, 晋玲^{1,2#}, 杜毅^{1,3}, 崔治家^{1,2}, 林丽¹, 高天鹏⁴, 张裴斯¹(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃中医学院药用植物遗传育种研究所, 兰州 730000; 4. 兰州城市学院城市生态与环境生物技术中心, 兰州 730070)

中图分类号 R285; Q291 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4033-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.01

摘要 目的: 建立适用于中麻黄的简单重复序列区间-聚合酶链反应(ISSR-PCR)最佳反应体系。方法: 以凝胶成像系统下特异谱带特征为评价指标, 以 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物和 DNA 模板为考察因素, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验优选条件; 通过单因素试验对反应体系中各种影响因素进行筛选。结果: 中麻黄 ISSR-PCR 最佳反应体系(20 μ l)为 30 ng DNA 模板、0.25 mmol/L dNTPs、2.0 mmol/L Mg^{2+} (10 \times PCR Buffer)、0.4 μ mol/L ISSR 引物、1.5 U Taq DNA 聚合酶; 并筛选出了 12 条 ISSR-PCR 引物的最佳退火温度。结论: 所建中麻黄 ISSR-PCR 反应体系经过 10 份中麻黄材料检验证明该体系稳定可靠, 可用于中麻黄遗传分析。

关键词 中麻黄; ISSR 反应体系; 建立; 优化

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Ephedra intermedia*

ZHU Tian-tian^{1,2,3}, JIN Ling^{1,2}, DU Tao^{1,3}, CUI Zhi-jia^{1,2}, LIN Li¹, GAO Tian-peng⁴, ZHANG Pei-si¹(1. Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China; 2. Key Lab of Chemistry and Quality for Traditional Chinese (Tibetan) Medicines of the College of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 3. Institute of Medicinal Plant Genetic Breeding, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China; 4. Centre of Urban Ecology and Environmental Biotechnology, Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish optimal ISSR-PCR reaction system for *Ephedra intermedia*. METHODS: The reaction system was optimized by $L_{16}(4^5)$ orthogonal test with specific bands under gel imaging system as index using Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA polymerase and primer, DNA template as factors. The influential factors of reaction system were screened by single factor test. RESULTS: The optimal ISSR-PCR reaction system of *E. intermedia* (20 μ l) contained 30 ng DNA template, 0.25 mmol/L dNTPs, 2.0 mmol/L Mg^{2+} (10 \times PCR Buffer), 0.4 μ mol/L ISSR primer and 1.5 U Taq DNA polymerase. The suitable annealing temperature of 12 primers was determined. CONCLUSIONS: It is proved that the established ISSR-PCR reaction system of *E. intermedia* would be stable and credible by the materials testing result of 10 samples of *E. intermedia*. This would provide the basis for the genetic analysis of *E. intermedia*.

KEY WORDS *Ephedra intermedia*; ISSR reaction system; Establishment; Optimization

中麻黄(*Ephedra intermedia* Schrenk ex Mey.)属于麻黄科(Ephedraceae)麻黄属植物,是被《中国药典》收录具有药用价值的正品麻黄之一^[1-2],近年来受经济利益趋使人们对其进行掠夺式采收,致使天然麻黄资源逐渐枯竭,因此中麻黄资源的可持续性利用和保护工作迫在眉睫^[3-4]。目前,国内、外对中麻黄分子生物学研究较少,而基于简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术的中麻黄研究未见报道。ISSR 分子标记已在植物种源鉴定、遗传多样性分析等方面被广泛应用^[5-7],但其稳定性

受到多种因素影响。本研究将采用正交试验和单因素试验相结合的实验设计,对影响其稳定性的各个因子进行筛选,旨在建立最佳的中麻黄 ISSR-聚合酶链反应(PCR)体系,为深入开展中麻黄种源鉴定、遗传多样性、优良性状标记等研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

GelDoc XR System 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); T-Gradient 梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司); TGL16M 型台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); UV-1102 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); DYY-7 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 药材

中麻黄(*E. intermedia*)地上草质茎,采自甘肃省 10 个不同地区,由甘肃中医学院中药资源教研室晋玲副教授鉴定为麻黄科(Ephedraceae)中麻黄(*E. intermedia*)的原植物。其中,用

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31160118);甘肃省教育厅科研项目(No.1106B-07);甘肃中医学院中青年科研基金资助项目(No.ZQ2011-12)

* 讲师, 硕士。研究方向: 中药资源开发与质量综合评价。E-mail: ztt0935@163.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 珍贵濒危和大宗常用中药资源可持续利用。电话: 0931-8765304。E-mail: zyxyjl@163.com

于体系优化和引物筛选的药材源自兰州市仁寿山,其他药材均用作体系验证。

1.3 试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,批号:DH081-1)、乙二胺四乙酸(EDTA,批号:DH118-1)、Tris(批号:DH350-3)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP,批号:DH267-1)、 β -巯基乙醇(批号:DH195-1)、乙酸钠(批号:DS054)购于西安科昊生物工程有限责任公司;RNaseA(批号:DH281-1)、琼脂糖、溴化乙锭(EB,批号:DH117-1)、TaqDNA聚合酶(批号:DH332-2)、dNTPs(批号:DH114-3)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;ISSR随机引物根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

2 方法

2.1 基因组DNA提取与检测

采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[8]提取全部供试药材基因组DNA,利用紫外分光光度法测定其纯度,用琼脂糖凝胶电泳法检测DNA是否降解。将样品贮藏于-20℃冰箱中,用于ISSR反应条件的优化试验。

2.2 ISSR-PCR反应体系优化

2.2.1 ISSR反应体系正交试验 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计确定PCR反应中5个因素(Mg^{2+} 、dNTPs、Taq DNA聚合酶、引物和DNA模板)的最佳水平组合,引物选用UBC-895,总反应体系为20 μ l。PCR扩增程序:94℃预变性4 min,94℃变性45 s,58℃退火45 s,72℃延伸2 min,40个循环,72℃延伸7 min,4℃保存至反应结束。扩增结束后,反应产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为1×TBE,110 V电压下电泳100 min左右,EB(10 mg/ml)染色20 min,在凝胶成像系统下检测并照像。ISSR-PCR反应体系正交试验设计见表1。

表1 ISSR-PCR反应体系正交试验设计

序号	Mg^{2+} ,mmol/L	dNTPs,mmol/L	Taq DNA聚合酶,U/20 μ l	引物, μ mol/L	DNA模板,ng/20 μ l
1	1.0	0.15	0.5	0.2	20
2	1.0	0.20	1.0	0.3	30
3	1.0	0.25	1.5	0.4	40
4	1.0	0.30	2.0	0.5	50
5	1.5	0.15	1.0	0.4	50
6	1.5	0.20	0.5	0.5	40
7	1.5	0.25	2.0	0.2	30
8	1.5	0.30	1.5	0.3	20
9	2.0	0.15	1.5	0.5	30
10	2.0	0.20	2.0	0.4	20
11	2.0	0.25	0.5	0.3	50
12	2.0	0.30	1.0	0.2	40
13	2.5	0.15	2.0	0.3	40
14	2.5	0.20	1.5	0.2	50
15	2.5	0.25	1.0	0.5	20
16	2.5	0.30	0.5	0.4	30

2.2.2 ISSR-PCR反应体系单因素试验 依据正交试验结果,选择扩增效果较好的反应体系,在此基础上采用单因素试验设计,进一步优化影响扩增效果的因素。选取扩增条带相对清晰的随机引物UBC-811,对影响中麻黄ISSR-PCR反应的各个因素(DNA模板、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物、Taq DNA聚合酶)设置不同梯度浓度,每一个最佳条件确定后作为后续研究的一个条件。PCR扩增程序和电泳检测与正交试验设计相同。

ISSR-PCR反应体系单因素试验设计见表2。

表2 ISSR-PCR反应体系单因素试验设计

水平	DNA模板,ng	dNTPs,mmol/L	Mg^{2+} ,mmol/L	引物, μ mol/L	Taq DNA聚合酶,U
1	5	0.05	1.0	0.2	0.8
2	10	0.1	1.5	0.3	1.0
3	20	0.15	2.0	0.4	1.5
4	30	0.2	2.5	0.5	1.8
5	40	0.25	3.0	0.6	2.0
6	50	0.3	3.25	0.7	2.5
7	60			0.8	
8	70			0.9	
9	80			1.0	
10	90			1.1	
11				1.2	

2.3 引物筛选与退火温度的确定

以提取的基因组DNA为模版,在优化体系下对70条ISSR随机引物进行扩增筛选,选择扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物;利用梯度温度PCR仪对筛选好的引物进行PCR退火温度梯度试验,通过比较退火温度对条带数量和条带清晰度的影响,确定其最佳退火温度。

3 结果

3.1 基因组DNA的提取

10个样品均显示出清晰整齐的条带,表明DNA并未发生降解。利用紫外分光光度法测其纯度,供ISSR-PCR试验所用。10个产地中麻黄基因组DNA琼脂糖电泳见图1。

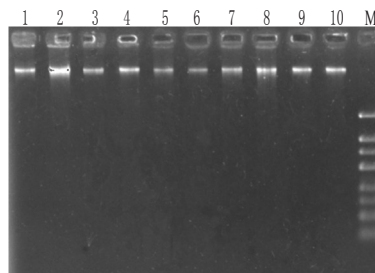


图1 10个产地中麻黄基因组DNA琼脂糖电泳图

1~10.10个基因组DNA样品;M.DL2000 marker

Fig 1 Agarose gel electrophoretogram of *E. intermedia* genomic DNA from 10 producing areas

1-10.DNA samples of 10 gene groups; M.DL2000 marker

3.2 ISSR-PCR正交试验结果分析

第3、4、6、7、8、9、10、11、15号处理均能扩增出条带,但不同处理条带的数目和清晰度不一致。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则,确定第10号处理为中麻黄ISSR-PCR的最佳反应体系。ISSR-PCR正交设计电泳见图2。

3.3 单因素试验结果分析

3.3.1 不同DNA模板质量浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

在一定质量浓度范围内DNA模板用量对ISSR-PCR扩增影响不大,但质量浓度过高会过早把引物结合掉,从而出现非特异性扩增即非目标条带;质量浓度过低则会使DNA不能与引物充分结合而造成无扩增^[9]。在5~70 ng/20 μ l的质量浓度范围内,DNA模板的PCR扩增条带数基本不受其质量浓度高低的影响,但当质量浓度超过80 ng/20 μ l后,扩增条带数会明显

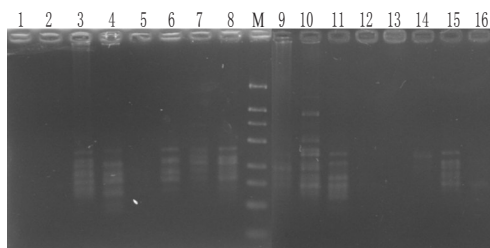


图2 ISSR-PCR 正交设计电泳图

1~16.正交设计 1~16 组;M .DL2000 marker

Fig 2 Electrophoretogram of ISSR-PCR orthogonal design

1-16. groups of orthogonal design;M. stands for DL2000 marker

减少或无扩增。经过清晰度、条带数及经济用量等多方面的考虑,最终确定 DNA 模板的最佳用量为 30 ng/20 μ l,此结果与正交试验结果基本一致。不同 DNA 模板质量浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 3。

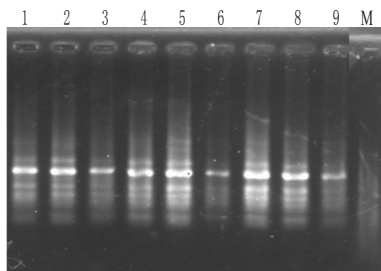


图3 不同 DNA 模板质量浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~10.泳道 1~10 模板质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90 ng/20 μ l

Fig 3 Effect of ISSR-PCR reaction of different concentrations of DNA template

1-10. template concentrations 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ng/20 μ l

3.3.2 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 dNTPs 是 PCR 反应中磷酸的主要来源,参与新链 DNA 的合成过程,一般的使用浓度为 0.1~0.4 mmol/L,浓度过高会与体系中游离的 Mg^{2+} 结合,从而降低 TaqDNA 聚合酶活性;浓度过低则会降低反应物产量,导致条带较弱^[10]。当 dNTPs 浓度低于 0.15 mmol/L 时,条带较少,且条带变弱;浓度在 0.3 mmol/L 时无扩增产物,而在 0.25 mmol/L 时扩增的条带多、稳定、清晰。最终确定 dNTPs 的浓度为 0.25 mmol/L,此结果与正交试验结果基本一致。不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 4。

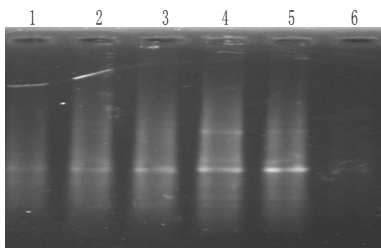


图4 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~6.泳道 1~6 dNTPs 浓度分别为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L

Fig 4 Effect of ISSR-PCR reaction of different dNTP concentrations

1-6. dNTPs concentrations 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mmol/L

3.3.3 不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 Mg^{2+} 浓度是制约 ISSR-PCR 扩增结果的重要因素,适宜的 Mg^{2+} 浓度能

够增强酶蛋白的稳定性,浓度过低会使酶活力显著减弱,过高则会形成复合物而影响背景的清晰度或催化非特异的扩增^[10]。当 Mg^{2+} 浓度低于 1.5 mmol/L 时,扩增条带少且不清晰,当浓度高于 2.5 mmol/L 时特异性条带增多。最终确定最适 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L,此结果与正交试验结果基本一致。不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 5。

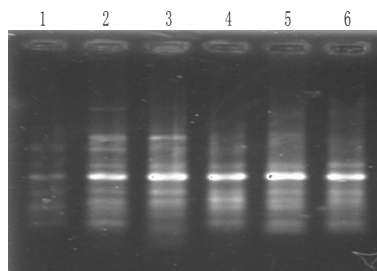


图5 不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~6.泳道 1~6 Mg^{2+} 浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.25 mmol/L

Fig 5 Effect of ISSR-PCR reaction of different Mg^{2+} concentrations

1-6. Mg^{2+} concentrations 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.25 mmol/L

3.3.4 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 引物浓度高低直接关系到扩增产物的质量,引物浓度过低不足以完成循环而导致最后降低 PCR 产率;浓度过高容易形成引物二聚体且产生非特异性产物^[11]。引物浓度在 0.2~0.9 μ mol/L 的范围内均能扩增出条带,但在浓度低于 0.6 μ mol/L 时,扩增条带多,但清晰度会随浓度降低而减弱;引物浓度在 0.7~0.9 μ mol/L 时,扩增条带逐渐模糊;浓度高于 1.0 μ mol/L 时,条带扩增数减少且极模糊。最终确定 0.4 μ mol/L 为 ISSR-PCR 扩增的最适引物浓度,此结果与正交试验结果基本一致。不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 6。

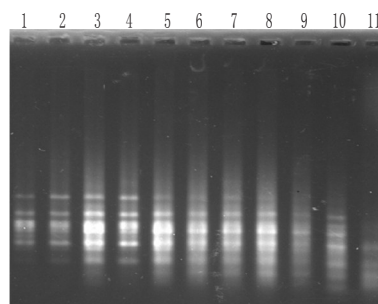


图6 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~11.泳道 1~11 引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 μ mol/L

Fig 6 Effect of ISSR-PCR reaction of different primer concentrations

1-11. primer concentrations 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 μ mol/L

3.3.5 不同 Taq DNA 聚合酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 Taq DNA 聚合酶活性也是影响 PCR 扩增反应的一个重要因素,活性过弱会使 PCR 反应不完全,导致扩增失败;过强则引起非特异性产物增加,扩增条带背景模糊、不易辨认,且造成经济上的浪费^[11]。当活性小于 1.5 U/20 μ l 时扩增条带数减少,高于 2.0 U/20 μ l 时扩增条带的背景开始模糊。考虑到试验成本,最终确定 Taq DNA 聚合酶最适活性为 1.5 U/20 μ l。不同 TaqDNA 酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 7。

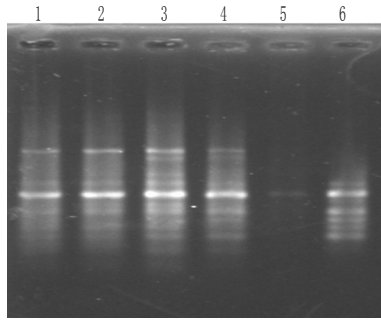


图7 不同 TaqDNA 聚合酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~6.泳道1~6TaqDNA 聚合酶活性分别为0.8、1.0、1.5、1.8、2.0、2.5 U/20 μl

Fig 7 Results of ISSR-PCR reaction of different Taq DNA polymerase concentrations

1-6.Taq DNA polymerase concentrations 0.8, 1.0, 1.5, 1.8, 2.0, 2.5 U/20 μl

3.4 优化后 ISSR-PCR 反应体系的应用

应用优化后的中麻黄 ISSR-PCR 的最佳体系,从 70 个 ISSR-PCR 随机引物中筛选出 12 个扩增稳定、多态性高的引物。以 UBC-826 引物对 10 个不同地区中麻黄基因组 DNA 进行扩增,得到了背景清晰、多态性稳定丰富的 DNA 扩增片段,表明优化后的反应体系稳定可靠,可应用于中麻黄的分子标记研究中。不同 ISSR-PCR 引物最佳退火温度见表 3;引物 UBC-826 的 ISSR-PCR 扩增结果见图 8。

表 3 不同 ISSR-PCR 引物最佳退火温度

Tab 3 The optimal annealing temperature of ISSR-PCR primers for PCR reaction

引物编号	引物序列(5' to 3')	理论退火温度,℃	实际退火温度,℃
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAC	52.00	54.8
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGYT	52.00~54.00	51.3
UBC-826	ACACACACACACACC	52.00	55.5
UBC-827	ACACACACACACACG	52.00	57.7
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAYG	54.00~56.00	54.7
UBC-885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	48.00~54.00	54.7
UBC-846	CACACACACACACART	52.00~54.00	50.4
UBC-825	ACACACACACACACT	50.00	50.4
UBC-895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	58.00	60.7
UBC-848	CACACACACACACARG	54.00~56.00	54.8
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	60.00	59.3
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAYA	52.00~54.00	55.5

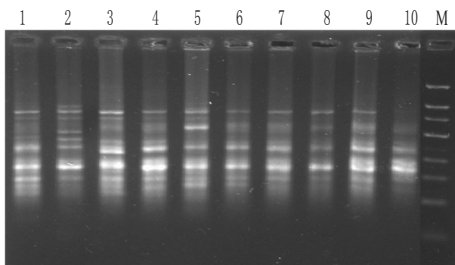


图 8 引物 UBC-826 的 ISSR-PCR 扩增结果

1~10.泳道1~10.不同产地中麻黄样品;M.DL2000 marker

Fig 8 Results of ISSR-PCR reaction of primer UBC-826

1-10.E. intermedia samples from different areas; M.DL2000 marker

3.5 最佳反应体系建立

根据正交试验设计和单因素试验结果,最终确定中麻黄

ISSR-PCR 的最佳反应体系为 20 μl,内含 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus) 2.0 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.5 U, 引物 0.4 μmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L 以及 DNA 模板 30 ng。扩增程序为:94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 45 s,(根据不同引物的退火温度)复性 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,40 个循环,72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存至结束反应。不同 ISSR-PCR 引物最佳退火温度见表 3[表中 R=(A,G);Y=(C,T);B=(C,G,T);H=(A,C,T)]。

4 讨论

ISSR 分子标记虽然重复性比随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)好,但其稳定性仍受多种因素影响,如 Mg²⁺ 浓度、Taq DNA 聚合酶活性、dNTPs 浓度、DNA 模板质量浓度、引物浓度、退火温度等,因此进行 ISSR 研究时,应先对各种影响因素进行优化,确立适合该物种的最佳反应体系以便增加分析结果的可靠性。研究表明,优化 ISSR-PCR 反应体系的方法主要有单因素试验和正交设计两种^[9-13],前者对每个影响 PCR 结果的因素独立分析,可以系统和精细地研究各主要因素的影响结果,但无法探讨因素间的互作效应;正交设计可以综合研究各因素之间的交互作用,但由于其处理水平的设置相对有限,不能真实反映各因素的最佳反应条件。本研究首先采用正交试验初选出可扩增出清晰条带的 PCR 反应体系,然后结合单因素试验进一步优化体系。结果表明,二者确定的 Mg²⁺ 和引物浓度相同,而 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 浓度和 DNA 模板质量浓度差别不大,因此通过两种方法确立的中麻黄最佳 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,可用于后续试验。

不同序列引物或同一引物对不同物种而言,其 PCR 反应退火温度不相同,退火温度的高低取决于引物的碱基组成、长度和浓度,虽然 ISSR 引物的理论退火温度值可以通过公式计算,但在研究过程中部分引物的理论退火温度和实际退火温度存在着一定的出入。本研究结果表明,所筛选出的 12 条引物的实际退火温度多数都比其理论退火温度略高,这是因为一般情况下较低的退火温度可以保证引物与模板结合的稳定性,也会使引物与模板之间未完全配对的一些位点间得到扩增而产生非特异性条带^[14]。因此,可在允许的范围内适当提高引物的退火温度,可减少引物与模板之间的非特异性结合,从而提高反应的特异性。

本研究首次对药用植物中麻黄的 ISSR-PCR 反应体系进行优化,并筛选出适合中麻黄扩增,且多态性高、重复性好的 12 条 ISSR 随机引物,为中麻黄 ISSR 研究填补了技术上的空白,并为今后利用该分子标记技术进行中麻黄种源鉴定与遗传多样性等研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第七卷[M].北京:科学出版社,1978:468-488.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:300.
- [3] 洪浩,陈虎彪,徐凤,等.麻黄药材原植物资源和市场品种调查[J].中国中药杂志,2011,36(9):1129.
- [4] 白可喻,戎郁萍,徐斌.甘草和麻黄资源的生物多样性价值和保护[J].中国农业资源与区划,2009,30(4):64.
- [5] 卢家仕,卜朝阳,吕维莉,等.不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析[J].中草药,2013,44(1):96.
- [6] 陈大霞,李隆云,彭锐,等.青蒿素高含量地区黄花蒿种质

艾叶及其常见混伪品的分子鉴定[△]

李恩波^{1*}, 孙稚颖^{2#}(1.济南市第五人民医院, 济南 250022; 2.山东中医药大学药学院, 济南 250355)

中图分类号 R282.5; R944.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4037-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.02

摘要 目的:对艾叶及其几种常见混伪品进行分子鉴定。方法:通过聚合酶链式反应(PCR)法直接测序,对艾及其8种混伪品进行核糖体DNA内转录间隔区片段2(ITS2)扩增并双向测序,所得序列经CodonCode Aligner拼接后,用系统发育软件MEGA4.0进行相关数据分析,同时利用邻接(NJ)法构建系统聚类树。结果:艾叶基原植物艾ITS2序列长度为225 bp,种内平均Kimura-双参数(K2P)遗传距离(0.000)小于其与混伪品的种间平均K2P遗传距离(0.022);由所构建的系统聚类树图可以看出,艾具有单系性,同时又与其他混伪品明显分开。结论:ITS2序列作为DNA条形码可以方便快捷地鉴别中药材艾叶及其混伪品,可为其质量评价及临床安全用药提供重要的分子鉴别依据。

关键词 艾叶; 蒿属; DNA条形码; 核糖体DNA内转录间隔区片段2; 分子鉴定

Molecular Identification of *Artemisia argyi* and Its Adulterants

LI En-bo¹, SUN Zhi-ying²(1.Jinan Municipal Fifth People's Hospital, Jinan 250022, China; 2.College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify the molecule of *Artemisia argyi* and its adulterants. METHODS: The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA were amplified and sequenced by direct sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using the CodonCode Aligner. Phylogenetic study was performed by using MEGA 4.0 software, meanwhile the phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) methods. RESULTS: The length of ITS2 sequence of *A. argyi* was 225 bp. Its mean intraspecific genetic distance (K2P distance, 0.000) was lower than that (0.022) of adulterants. In the cluster dendrogram, *A. argyi* showed monophyletic, and meanwhile, distinguished from their adulterants. CONCLUSIONS: ITS2 sequence can be used as DNA barcode to identify *A. argyi* and its adulterants effectively, and then provide important molecular evidence for quality evaluation and the safety of drug use in the clinic.

KEY WORDS *Artemisia argyi*; Artemisia Linn; DNA barcode; ITS2; Molecular identification

艾叶为传统常用中药,据2010年版《中国药典》记载,其来源为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Levl.et Vant.的干燥叶,具有温经止血,散寒止痛的功效,外用可祛湿止痒^[1]。然而,由于蒿属植物形态相近,分类难度大,同名异物或同物异名现象比较严重,故现代中药书籍中记载的艾叶,实际上也包括艾蒿的许多近缘种。据报道,目前全国有十几种蒿属植物在各地作

艾叶使用,主要有野艾蒿 (*A. lavandulaefolia* DC.)、魁蒿 (*A. princeps* Pamp)、蒙古蒿 (*A. mongolica* (Fisch. ex Bess.) Nakai)、五月艾 (*A. indica* Willd.)、宽叶山蒿 [*A. stolonifera* (Maxim.) Komar.]、红足蒿 (*A. rubripes* Nakai)、阴地蒿 (*A. sylvatica* Maxim.)等^[2-4]。药材来源的复杂与混乱,必然影响到中药的质量与疗效,所以有必要对这些外形相似的近缘种作进一步鉴

- 资源的简单重复序列区间分析[J].中国药房,2011,22(11):1026.
- [7] 王翀,周天华,杨雪,等.ISSR-PCR鉴别绞股蓝属七种植物[J].中草药,2008,39(4):588.
- [8] 朱田田,晋玲,杜弢,等.中麻黄基因组DNA不同提取方法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,40(4):316.
- [9] 欧立军,颜旺,廖亚西,等.天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J].中草药,2011,42(2):353.

- [10] 张福生,郭顺星.金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J].中草药,2011,42(1):137.
- [11] 吴生,熊宇婷,谢颀,等.正交设计优化翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系[J].中草药,2011,42(5):976.
- [12] 廖丽,郭巧生.夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J].中草药,2009,40(7):1131.
- [13] 申彦晶,赵翊,赵树进.正交实验设计优化白木香 ISSR-PCR 反应体系的研究[J].药物生物技术,2008,15(1):31.
- [14] 赵振华,严萍,焦旭文,等.何首乌 ISSR-PCR 反应体系建立与优化[J].时珍国医国药,2008,19(3):567.

(收稿日期:2013-02-21 修回日期:2013-04-26)

△基金项目:山东省高等学校科技计划项目(No.J12LM05)

*主管药师。研究方向:中药学。电话:0531-82679916

#通信作者:副教授,博士。研究方向:药用植物资源与鉴定。

E-mail:szyww@126.com