

射干及类似药用植物叶绿体 *rbcL* 基因序列分析秦民坚^{1*}, 黄芸¹, 杨光², 徐珞珊¹, 周开亚²

(1. 中国药科大学 中药学院, 南京 210038; 2. 南京师范大学 江苏省资源生物技术重点实验室, 南京 210097)

摘要: 目的 对射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC., 鸢尾 *Iris tectorum* Maxim., 野鸢尾 *I. dichotoma* Pall., 蝴蝶花 *I. japonica* Thunb. 和德国鸢尾 *I. germanica* L. 等 5 种药用植物进行叶绿体 *rbcL* 基因序列分析, 并对其亲缘关系进行探讨。方法 CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取总 DNA, 用作者设计的引物对鸢尾科 5 种药用植物的叶绿体 *rbcL* (ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase Large Gene, *rbcL*) 基因进行扩增, PCR 扩增产物纯化后, 用 ABI310 DNA 自动测序仪测序。结果 获得射干和 4 种鸢尾属药用植物叶绿体 *rbcL* 基因部分序列 (约 750 bp), 除德国鸢尾外, 其余 4 种药用植物的 *rbcL* 基因序列为首次获得; 用 clustal 8.0, MEGA 2.0 等软件分析统计获得的目的基因片段, 得到碱基突变点, 遗传距离 [碱基差异数 (1.000 ~ 20.000) / 颠换数为 (0.000 ~ 9.000) / 转换数为 (0.000 ~ 14.000)], 根据 *rbcL* 基因部分序列数据建立分子系统树。结论 根据叶绿体 *rbcL* 基因序列数据可以很好的鉴别 5 种鸢尾科植物。

关键词: 射干; 鸢尾属; *rbcL* 基因; 基因序列分析; 分子鉴定

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)02 - 0147 - 06

RbcL sequence analysis of *Belamcanda chinensis* and related medicinal plants of *Iris*

QIN Min-jian¹, HUANG Yun¹, YANG Guang², XU Luo-shan¹, ZHOU Kai-ya²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;
2. Jiangsu Province Key Laboratory of Resources Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Aim** To identify "Shegan" [*Belamcanda chinensis* (L.) DC.] and relative medicinal plants of *Iris* including *Iris tectorum* Maxim., *I. dichotoma* Pall., *I. germanica* L. and *I. japonica* Thunb. by ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase Large Gene (*rbcL*) sequence analysis. **Methods** General DNA was isolated from the fresh leaves of *Belamcanda chinensis* and 4 *Iris* spp. by CTAB. A pair of primers was designed to amplify the *rbcL* gene and PCR Preps DNA kit was used to purify the PCR products. The *rbcL* sequences were determined by ABI (Applied Biosystems Inco.) Prism 310 Genetic Analyzer. **Results** A fragment of about 750 bp of *rbcL* gene from *Belamcanda chinensis* and 4 *Iris* spp. were amplified and sequenced. The *rbcL* sequences of *Iris tectorum*, *I. dichotoma* Pall. and *I. japonica* were reported for the first time. The *rbcL* sequences of 5 species of Iridaceae were aligned and analyzed using Clustal (Version 8.0) and MEGA (Version 2.0.) programs. The nucleotide number of difference is from 1.000 to 20.000. The transversions is from 0.000 to 9.000 and the transitions is from 0.000 to 14.000. Phylogenetic tree based on *rbcL* partial sequence data indicated that the eleven samples of 5 species clustered separately. **Conclusion** The sequence variation of *rbcL* can be used to identify *Belamcanda chinensis* and 4 species of relative medicinal plants of *Iris*. The molecular phylogenetic tree accords with the classical taxonomy.

Key words: *Belamcanda chinensis*; *Iris*; *rbcL* gene; nucleotide sequence analyses; molecular identification

收稿日期: 2002-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170103); 江苏省资源生物技术重点实验室; 江苏省自然科学基金资助项目(BK97085)

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 5391290, Fax: 86 - 25 - 5301528, E-mail: minjianqin@sohu.com

射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 为常用中药, 具清热解毒、利咽消痰的功能, 主要用于咽喉肿痛、痰咳气喘等症^[1]。鸢尾 *Iris tectorum* Maxim.、野鸢尾 *Iris dichotoma* Pall. 是鸢尾科常用的地方药, 经常代替射干入药。另外, 鸢尾属植物蝴蝶花 *Iris japonica* Thunb.、德国鸢尾 *Iris germanica* L. 与射干在形态上相似, 极易混淆和误用, 影响射干药材的质量和疗效。作者^[2-4]曾对射干及类似药用植物的形态学、细胞学和成分鉴别等方面做了一些研究。本文从分子水平对鸢尾科这 5 种药用植物叶绿体 *rbcL* 基因的部分同源序列(约 750 bp) 进行分析鉴别。

材料与方法

材料 5 种鸢尾科药用植物的叶均采自新鲜植物(表 1), 经作者鉴定, 凭证标本存中国药科大学植物标本室。

Table 1 Samples of *Belamcanda chinensis* and 4 related *Iris* spp

Species	Code	Location
<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC.	BC1	Jiangpu, Jiangsu
	BC2	Emei, Sichuan
	BC3	Xinyang, Henan
	BC4	Lushi, Henan
<i>Iris tectorum</i> Maxim.	ITE1	Nanjing, Jiangsu
	ITE2	Jurong, Jiangsu
	ITE3	Emei, Sichuan
<i>Iris dichotoma</i> Pall.	IDI1	Nanjing, Jiangsu
	IDI2	Chuzhou, Anhui
<i>Iris japonica</i> Thunb.	IJA	Nanjing, Jiangsu
<i>Iris germanica</i> L.	I GE	Nanjing, Jiangsu

仪器 PCR 热循环扩增仪; DYY-III8 A 稳压稳流定时电泳仪; 310PRISM™ gene analysis 自动测序仪。

试剂 CTAB, TaqDNA 聚合酶, dNTP 和琼脂糖(上海 Sangon 公司); Tris(南京格瑞生物技术有限公司); Taq 聚合酶、溴乙锭、华舜 PCR Preps DNA 纯化试剂盒和 DNA 测序试剂盒(Applied Biosystem Inc. 公司)。

总 DNA 提取 CTAB 法提取植物总 DNA^[5]。取新鲜材料 0.2 g, 蒸馏水冲洗数次。液氮冷冻干燥, 碾磨成粉状, 加 2/3 管体积的 2% CTAB 抽提液(约 1 mL) 温浴振荡(56 °C) 2 h。常温 4 000 r·min⁻¹, 离心 1~3 min, 抽出上清液, 加氯仿-异戊醇(24:1) 至满, 离心(8 000 r·min⁻¹) 10 min, 取上清液置于一离心管中。视情况重复 1~2 次。加入相当于管内液体

约 0.6 体积于 0 °C 冷冻 1 h。取出, 4 °C 离心(8 000 r·min⁻¹) 5~10 min, 倒出上清液, 加入 70% 乙醇约 500 μL, 4 °C 离心(8 000 r·min⁻¹) 3~5 min, 倒出上清液, 重复 1~2 次。真空干燥后, 加重蒸水 50 μL。放 -20 °C 冰箱中备用。

引物设计 根据 Kawanos S^[6], Duvall MR^[7], Chase MW, Fay MF, Nadot S^[8] 在 GenBank 所登记的 *rbcL* 基因序列, 设计有效扩增鸢尾属 *rbcL* 基因部分序列的合适引物 L(轻链)、H(重链), 由上海 Sangon 公司合成。将引物分别配成 10 μmol·L⁻¹ 作扩增引物; 1 μmol·L⁻¹ 作为测序引物。

L: 5'-ACGTAGCTTATCCTTTAGACC-3'

H: 5'-TGGCATAGAGACCCAATCTF-3'

叶绿体 *rbcL* 基因扩增 扩增反应体系为 30 μL, 内含 10 × 缓冲液(无 Mg²⁺) 3 μL, dNTP(2.5 μmol·L⁻¹) 2 μL, MgCl₂(25 mol·750 L⁻¹) 1.4~1.8 μL, 扩增引物 L, H(10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, 模板 1 μL(10~100 μg), Taq 酶 0.2 μL, 加重蒸水补足 30 μL。在 2 400 PCR 热循环仪上, 经 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 57 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 完成 30 个循环后, 72 °C 7 min 补齐。用重蒸水代替模板 DNA, 其余各成分与反应条件相同, 同时进行空白对照。扩增产物取 3 μL 加电泳载样缓冲液, 经 1% 琼脂糖电泳, EB 染色检查。

PCR 产物纯化和 DNA 测序 按华舜 PCR 产物纯化试剂盒操作进行纯化。PCR 反应管中加入 5~10 倍体积的 PB 液, 混匀, PCR 反应产物移入吸附柱, 离心(12 000 r·min⁻¹) 15 s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中, 加入 400 μL PB 液, 静置 1 min 后, 离心(12 000 r·min⁻¹) 15 s。倒掉收集管中的液体, 离心(12 000 r·min⁻¹) 1 min。将吸附柱放入干净的 1.5 mL 离心管中, 吸附膜中央加入 T₁ 液或重蒸水 30 μL, 静置 1 min, 离心(12 000 r·min⁻¹) 1 min。将存 DNA 的离心管贮存于 -20 °C。按 PCR 产物检测方法检测, 得约 700 bp 的扩增片段(图 1)。Mix 小管(已含 5.6 μL 内容物) 中加入测序引物 1.6 μL, 模板 0.8~1.5 μL, 加重



Figure 1 *RbcL* gene amplification from *Belamcanda chinensis* and 4 related *Iris* spp

蒸水补足至 10 μ L。测序反应:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 96 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 50 $^{\circ}$ C 复性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 30 个循环后, 降至 4 $^{\circ}$ C 保存。310PRISMTM gene analysis 自动测序仪测序。

数据分析 所得 DNA 序列输入计算机, clustal

8.0 软件进行对位排列, 系统发生软件 MEGA2 (Kumar *et al*) 统计样品 DNA 序列间的碱基突变位点 (图 2), 选择 models: nucleotide number of difference 计算遗传距离 [碱基颠转数] (表 2), 在计算遗传距离的基础上, 重建系统发生树 (图 3)。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
ITE1	CTAACATGTT	TACTTCCATT	GTGGTAACG	TATTTGGTTT	CAAAGCCCTA	CGAGCTCTAC	GTCTGGAGGA	TCTGCGAATT	CCTCCTGCTT
ITE2	T.....G.....
ITE3	T.....G.....
IJAA.....
BC1	T.....A.....
BC2	T.....A.....
BC3	T.....A.....
BC4	T.....A.....
IGEA.....
IDI1A.....
IDI2A.....
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
ITE1	ATTCCAAAAC	TTTCCAAGGC	CCGCCTCATG	GCATCCAGGT	TGAAAGAGAT	AAATTGAACA	AGTACCGGTCG	TCCCCTATTG	GGATGTACTA
ITE2C.....
ITE3C.....
IJA	C.....	T..C.....
BC1	T.....
BC2	T.....
BC3	T.....
BC4	T.....
IGE	C.....	T.....
IDI1	T.....
IDI2	T.....
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
ITE1	TAAACCAAAA	ATTGGGATTA	TCCGCAAAAA	ACTACGGTAG	AGCGGTTTAT	GAATGTCTAC	GCGGTGGGCT	TGATTTTACC	AAGGATGATG
ITE2	A.....
ITE3	A.....
IJA	G.....	T.....
BC1	G.....
BC2	G.....
BC3	G.....
BC4	G.....
IGE	G.....
IDI1	G.....
IDI2	G.....

	280	290	300	310	320	330	340	350	360
ITE1	AAAACGTGAA	CTCACAACT	TTTATGCGTT	GGAGAGACCG	TTTCTTATTT	TGCGCTGAAG	CAATTTATAA	AGCGCAAGCC	GAAACAGGTG
ITE2
ITE3
IJA	C	G
BC1	G
BC2	G
BC3	G
BC4	G
IGE	T	C
IDI1
IDI2	G
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
ITE1	AAATCAAAGG	ACATTACTTG	AATGCAACTG	CGGGTACATG	TGAAGAAATG	ATCAAAGGG	CTGTATTTGC	CAGAGAATTG	GGAGTTCC-T
ITE2	-
ITE3	-
IJA	-
BC1	G	-
BC2	G	-
BC3	G	-
BC4	G	G
IGE	G	A	-
IDI1	G	-
IDI2	G	-
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
ITE1	ATCGTAATGC	ATGACTACTT	AACTGGGGGA	TTCACCTGCAA	ATACTAGTTT	GGCTCATTAT	T-GCCGCGAC	AACGGCCT-A	CTTCTTCACA
ITE2	-	-
ITE3	-	-
IJA	C	-	-	G
BC1	-	-
BC2	-	-
BC3	-	C
BC4	-	-
IGE	-	T	-
IDI1	-	-
IDI2	T	-

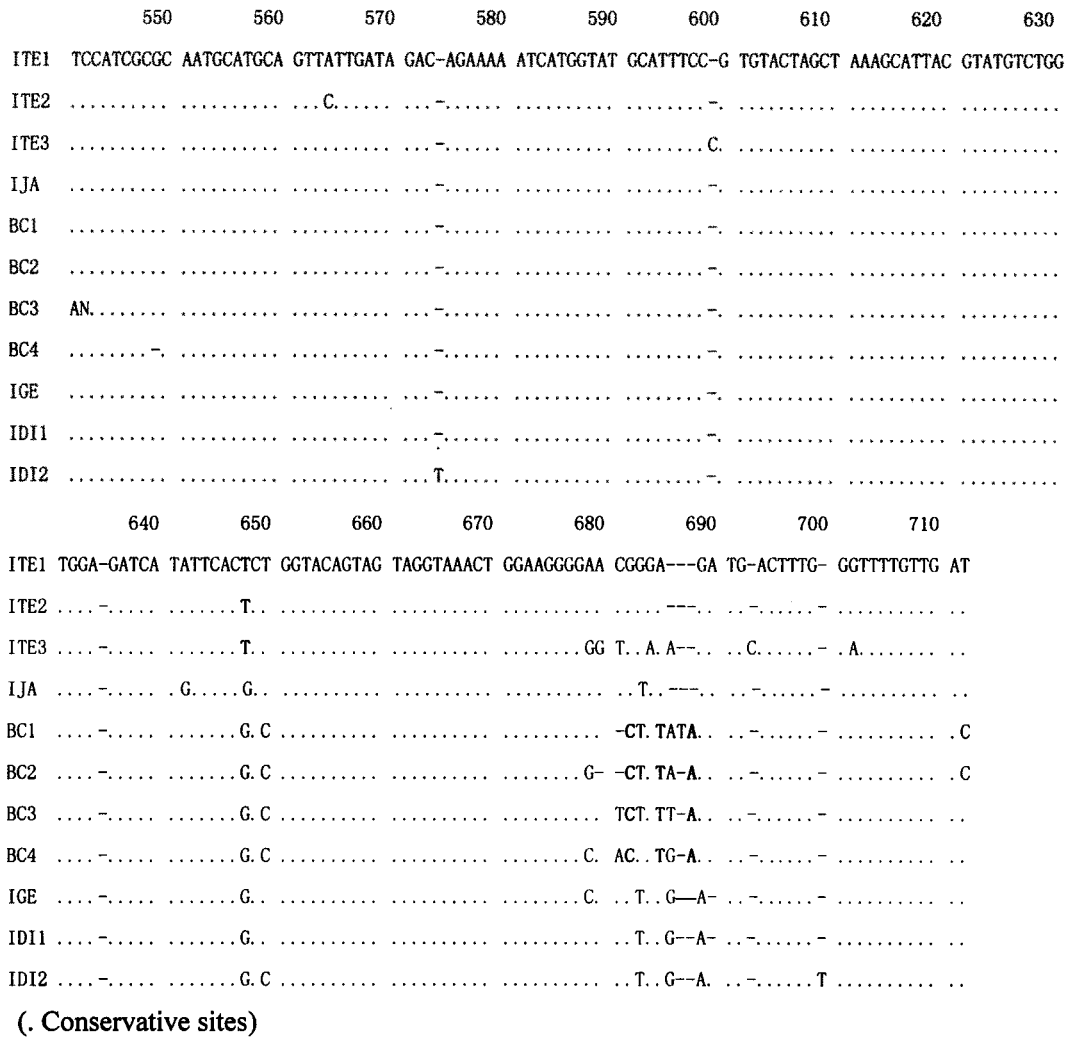


Figure 2 *RbcL* nucleotide sequence of *Belamcanda chinensis* and 4 related *Iris* spp

Table 2 Nucleotide number of difference(transitions and tranversions)

trs./trv.	ITE1	ITE2	ITE3	IJA	BC1	BC2	BC3	BC4	IGE	IDI1	IDI2
ITE1	-	1.000	0.000	3.000	7.000	7.000	8.000	7.000	5.000	4.000	5.000
ITE2	1.000	-	1.000	4.000	8.000	8.000	9.000	8.000	6.000	5.000	6.000
ITE3	4.000	3.000	-	3.000	7.000	7.000	8.000	7.000	5.000	4.000	5.000
IJA	10.000	11.000	14.000	-	4.000	4.000	5.000	6.000	4.000	3.000	2.000
BC1	6.000	5.000	8.000	10.000	-	0.000	1.000	2.000	6.000	3.000	2.000
BC2	7.000	6.000	7.000	11.000	1.000	-	1.000	2.000	6.000	3.000	2.000
BC3	5.000	4.000	7.000	9.000	1.000	2.000	-	3.000	7.000	4.000	3.000
BC4	5.000	4.000	6.000	9.000	1.000	1.000	0.000	-	8.000	5.000	4.000
IGE	8.000	9.000	12.000	12.000	8.000	9.000	7.000	7.000	-	3.000	4.000
IDI1	5.000	6.000	9.000	9.000	3.000	4.000	2.000	2.000	5.000	-	1.000
IDI2	5.000	6.000	9.000	9.000	3.000	4.000	2.000	2.000	5.000	0.000	-

(1,2,3 = ITE1,ITE2,ITE3; 4 = IJP; 5,6,7,8 = BC1,BC2,BC3,BC4; 9 = IGE; 10,11 = IDI1,IDI2)

结果与讨论

射干和 4 种鸢尾属药用植物的 *rbcL* 基因序列(约 750 bp)如图 2 所示,除德国鸢尾外,其余 4 种药用植物的叶绿体 *rbcL* 基因的序列是首次获得。鸢

尾科这 5 个种植物种间的 *rbcL* 基因(750 bp)的碱基序列存在差异,有多个突变位点,而种内居群间碱基序列差异明显小于种间差异,且这种差异不随个体的生长情况而改变,有很好的稳定性。鸢尾居群间

碱基差异百分率(0.003 ~ 0.006)与射干居群间碱基差异百分率(0.001 ~ 0.007)基本一致。种间碱基差异百分率(0.009 ~ 0.025)远远大于种内。鸢尾居群间转换数、颠换数(0.001 ~ 0.006, 0.000 ~ 0.001)与射干居群间转换数、颠换数(0.001 ~ 0.004, 0.000 ~ 0.003)基本一致。种间转换数、颠换数(0.003 ~ 0.018, 0.003 ~ 0.013)大于种内。在本实验所获得的 *rbcL* 基因序列中,射干在 5' 开始端起第 682 nt, 685 nt 和 688 nt 处有别于其他鸢尾属植物的特异性替代位点;鸢尾在 68 nt, 155 nt, 221 nt 和 649 nt 处有别于其他 4 种鸢尾科植物的特异性替代位点;蝴蝶花在 116 nt, 158 nt, 242 nt, 284 nt, 474 nt, 530 nt 和 642 nt 处有别于其他 4 种鸢尾科植物的特异性替代位点;德国鸢尾在 130 nt, 275 nt, 333 nt, 394 nt, 423 nt 和 523 nt 处有别于其他 4 种鸢尾科植物的特异性替代位点。根据 *rbcL* 基因序列所建立的分子系统树,已在 GENEBANK 上登录的射干 *rbcL* 基因序列(登录号: AJ307078, AJ309694)与本次实验获得的射干 *rbcL* 序列聚在一起,并且与其他 4 种鸢尾属药用植物可以很好区分,表明根据叶绿体 *rbcL* 基因序列数据可以很好的鉴别这 5 种鸢尾科药用植物。

射干和野鸢尾的属间杂交和细胞遗传学实验(Chimphamba BB. 1973b^[9])以及作者进行的比较解剖学和异黄酮成分分析^[2,4]的研究表明两者有较近的亲缘关系。*RbcL* 基因序列中射干和野鸢尾的各居群在第 188 nt 和 650 nt 处共同有区别于其他鸢尾属植物的替代位点。基于 *rbcL* 基因序列分析所作的分子系统树中(图 3),射干和野鸢尾紧密地聚合在一起,从分子水平上进一步证实了两者较近的亲缘关系。同属于鸡冠状附属物亚属(Subgenus Crossiris)的鸢尾和蝴蝶花在分子系统树中也较近的结合,说明根据 *rbcL* 基因序列数据所得的系统树与传统的植物分类结果一致。

由于叶绿体 *rbcL* 基因是其遗传物质 DNA 的一部分,在鸢尾科植物中具稳定性,不随季节的改变而发生变化,因此 *rbcL* 基因序列差别为鉴别射干类药材基源提供了可靠的分子标记。且只需很微量的叶片组织材料(新鲜叶片约 100 mg ~ 200 mg),取样后

并不影响植物生长,可以在幼苗时就进行检测,从而保证药用植物栽培基源的准确性和药材的安全性。

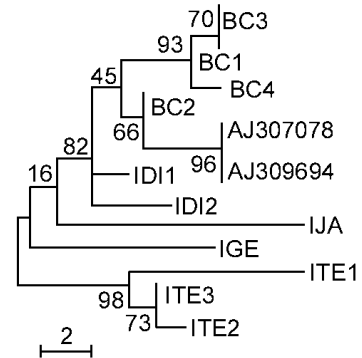


Figure 3 Phylogenetic tree reconstructed using with number of distance (transitions + transversions) based on *rbcL* nucleotide sequences of *Belamcanda chinensis* and related 4 *Iris spp*
AJ307078 and AJ309694 are *rbcL* sequences of *B. chinensis* have been registered in GENBANK

References :

[1] New Medicinal College of Jiangsu. *Chinese Materia Medica Dictionary* (中药大辞典) [Z]. Shanghai : Shanghai Science and Technology Publisher , 1997 .1883 - 1884 .
[2] Qin MJ, Xu GJ, Xu LS, et al. Pharmacognostical studies of Iridaceae (1) Mophplogical and histological studies of "Shegan" and relative crude drug from China [J]. *Nat Med* , 1995 ,49(4) :373 - 382 .
[3] Qin MJ, Hu J, Yu GD, et al. Analysis of chromosome karyotypes of *Belamcanda chinensis* and *Iris tectorum* [J]. *Chin Wild Plants Resour* (中国野生植物资源) , 1998 ,17(5) :12 - 14 .
[4] Qin MJ, Wang Q, Wu HG, et al. Determination of isoflavones in 16 species of rhizomatous medicinal plants from Iridaceae [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境) , 1996 ,5(4) :55 - 56 .
[5] Ausabel F, Breunt R, Kingstone RE, et al. *Short Protocols in of Moleculer Biology* [M]. Beijing : Science Press , 1999 . 37 - 38 .
[6] NCBI : GenBank Register Number D28332 .
[7] NCBI : GenBank Register Number L05037 .
[8] NCBI : GenBank Register Number AJ309636 .
[9] Chimphamba BB, Intergeneric hybridization between *Iris dichotoma* Pall. and *Belamcanda chinensis* Leman [J]. *Cytologia* , 1973 ,38(4) :539 - 547 .