

# 泽泻 rDNA ITS 区序列特征及其居群鉴别研究

沈洁, 丁小余, 贺佳, 褚必海, 刘冬扬, 丁鸽

(南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

**[摘要]** 运用 PCR 产物直接测序法对川泽泻、建泽泻和江泽泻的 rDNA ITS 区(包括 ITS1, 5.8S, ITS2)碱基序列进行了序列测定和分析。泽泻 rDNA ITS 区的碱基序列总长度确定为 640 bp, 江泽泻和建泽泻的 ITS 区碱基序列完全一致, 川泽泻与建泽泻(江泽泻)在 rDNA ITS 区碱基序列有 2 个稳定的变异位点, 分别位于 ITS1 和 ITS2 区段。我国的泽泻与意大利泽泻在 5.8S 保守区(第 289 位)有一个碱基差异。依据泽泻 rDNA ITS 区的序列特征可以进一步鉴别川泽泻和建泽泻, 为泽泻居群的鉴别提供可靠的分子标记。

**[关键词]** 泽泻, 居群, rDNA ITS 区, 分子鉴别

**[中图分类号]** Q946, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2005)03-0086-03

## Studies on Characteristics of rDNA ITS Sequences and Population Authentication of *Alisma orientale*

Shen Jie, Ding Xiaoyu, He Jia, Chu Bihai, Liu Dongyang, Ding Ge

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

**Abstract:** rDNA ITS regions (including ITS1, 5.8S and ITS2) of *Alisma orientale* from Sichuan, Fujian and Jiangxi provinces were sequenced by PCR products sequencing method and analyzed. The sequences of rDNA ITS region of *Alisma orientale* ranged 640 bp. The sequence of *Alisma orientale* from Jiangxi and Fujian provinces was the same, and there were 2 stable variable sites among *Alisma orientale* populations which were collected from Sichuan and Fujian (Jiangxi) provinces. One was in ITS-1, and the other was in ITS-2. There was another different site in 5.8S (No. 289) region of rDNA ITS region between *Alisma orientale* of China and Italy. The difference of rDNA ITS sequences can be used to authenticate accurately the populations of *Alisma orientale* from Sichuan and Fujian, and to provide reliable molecular markers for identifying *Alisma orientale* populations.

**Key words:** *Alisma orientale*, population, rDNA ITS regions, molecular authentication

## 0 引言

泽泻(*Alisma orientale*)为泽泻科多年生水生药用植物,常分布于海拔 800 m 以下的沼泽地带,以块茎入药,具有清热、渗湿、利尿的功效。主治肾炎水肿、肾盂肾炎、肠炎泄泻、小便不利、尿路感染、痰饮、眩晕等症<sup>[1]</sup>,近几年研究表明,泽泻还有抗脂肪肝、降血脂、抗过敏等功效。

泽泻主产福建、四川、江西三省,素有“建泽泻”、“川泽泻”、“江泽泻”之称,以建泽泻、川泽泻量大且使用广泛,其中又以建泽泻质佳,被载入中国的道地药材——南药。然而,由于缺乏对泽泻种质道地性居群的遗传标记研究,到目前为止,进行泽泻道地居群的鉴别主要还是采用传统的方法(如形态比较和化学成分分析),使得道地性药材的判断受主观因素的影响很大,让不法商贩有机可乘,将功效较差的非道地性

收稿日期: 2005-03-25.

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2003101).

作者简介: 沈洁,女,1969-,硕士研究生,连云港师范高等专科学校讲师,主要从事植物分子生物学的学习与研究.

E-mail: shenjie691111@msn.com

通讯联系人: 丁小余,1965-,教授,博士生导师,主要从事植物学的教学与研究, E-mail: dingxynj@263.net

泽泻药材充当道地的“建泽泻”和“川泽泻”出售,影响了泽泻的疗效.因此,准确鉴别野生居群的道地性、寻找泽泻道地性药材的 DNA 分子标记已是当务之急.

随着分子生态学的迅猛发展,道地性药材的鉴别不仅可以根椐道地性化学成分特征性指纹图谱<sup>[2]</sup>,而且还可以根据 DNA 分子指纹标记<sup>[3]</sup>.植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区(rDNA ITS 区)序列的进化速率较快,可以提供较丰富的变异位点和信息位点,不仅广泛用于近缘属间、属内种间的分子系统学及鉴别,而且也被用于种内居群间的差异性研究<sup>[4-6]</sup>.为此,本文拟测定建泽泻、川泽泻的 rDNA ITS 序列,比较二者之间 rDNA ITS 区序列特征的差异,从 DNA 序列上进一步阐明泽泻居群间的差异,为泽泻类道地药材的栽培、繁殖和质量评价提供依据.

1 材料

实验所用的泽泻居群材料采自我国福建、四川、江西泽泻的主产区,实验材料及引用材料详见表 1.

表 1 泽泻居群样本药源

居 群	基 源	编号	样本数量	登录号
福建 建瓯	<i>Alisma orientale</i> ( Sam. ) Juzep	ZX-1	30	DQ016540
江西 文昌	<i>Alisma orientale</i> ( Sam. ) Juzep	ZX-2	28	DQ016541
四川 都江堰	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	ZX-3	28	DQ011501
福建 吉阳	<i>Alisma orientale</i> ( Sam. ) Juzep	ZX-4	来自 GenBank	AY519469
四川 眉山	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	ZX-5	来自 GenBank	AY588940

2 方法

2.1 DNA 提取及检测

根据 QIAGEN 试剂盒的使用指南进行实验材料总 DNA 提取,采用分光光度计法定量检测其浓度,并根据基因组 DNA 的浓度值将样品稀释至 50 ng/μL 用于 PCR 扩增.

2.2 PCR 扩增

利用 rDNA ITS 区的通用扩增引物 P1 和 P2 进行该序列的扩增.引物序列如下:P1 为 5'-CGTAA-CAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3',位于 18S 上,P2 为 5'-TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG-3',位于 26S 上. PCR 扩增反应在 30 μL 的反应体系中进行.反应液 10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.1% Triton X-100,Taq 酶 1U,4 种 dNTP 各 150 mmol/L,2 个引物各 10 pmol/L, DNA 模板约 100 ng.反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行,循环参数为 95℃ 预变性,4 min,然后是 94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环后,72℃ 延伸 7 min 补齐,以 dd H<sub>2</sub>O 代替模板作空白对照.

2.3 PCR 产物的纯化

PCR 产物用 Vitagene 试剂盒纯化,按试剂盒操作指南进行.

2.4 rDNA ITS 序列测定

PCR 产物主要采用直接测序,扩增产物纯化后用 10 μL TSR 溶解,热循环仪上变性 2 min,移入全自动测序专用管.用 ABI310 全自动测序仪进行序列测定.

2.5 DNA 序列数据分析

所得 DNA 序列输入计算机后,用 ClustalX 软件对位排列,并辅以人工校对.用 MEGA2.0 (Kumar *et al.* 2000) 软件分析各样品 DNA 序列间的差异.

3 结果

泽泻 rDNA ITS 区的起始端和终点参考了 GenBank 中泽泻 16S-28S rDNA 及 ITS 区段以及泽泻科相近的水鳖科植物的 ITS 序列.泽泻完整 ITS 序列的长度范围为 640 bp,居群间无长度变异.所测类群 5.8 S 编码区的序列长度均为 158 bp.各样本的 ITS 长度及碱基含量列于表 2.

表 2 ITS1 及 ITS2 的序列长度和 GC 含量

Taxon	ITS1	ITS2	ITS ( including 5.8S )	
	Length/bp	Length/bp	Length/bp ( G + C ) / %	
ZX-1	243	239	640	58.6
ZX-2	243	239	640	58.6
ZX-3	243	239	640	58.8

从以上 3 个泽泻居群的 rDNA ITS 序列中,我们发现,建泽泻和江泽泻的 ITS 区碱基序列完全一致,没有碱基变异.建泽泻(江泽泻)和川泽泻仅在 ITS1、ITS2(非编码区)区各存在一个碱基的差异,分别是第 16 位 T-C 间的颠换和第 562 位 A-T 间的转换(见表 3).经反复验证,以上两个碱基变异位点可以作为泽泻居群的差异性识别位点,可对建泽泻(江泽泻)和川泽泻进行准确的分子鉴别.

表 3 泽泻居群间 rDNA ITS 区的差异性位点

差异性位点	ZX-1	ZX-4	ZX-2	ZX-3	ZX-5	ZX-6
第 16 位	T	T	T	C	C	C
第 289 位	T	T	T	T	T	C
第 562 位	A	A	A	T	T	T

4 讨论

4.1 泽泻 rDNA ITS 区的序列长度

本文作者在 GenBank 中共搜索到泽泻 rDNA ITS 区段碱基序列 3 条,除登录号 AJ012291(本实验编号 ZX-6)出自意大利学者 Ficca, A. G. 以外,其余[登录号为 AY588940(ZX-5)、AY519469(ZX-4)]均为中国陈志彤等提交的泽泻 18S-26S rRNA 及其 ITS 片段<sup>[7]</sup>.据 Baldwin 等<sup>[6]</sup>统计,被子植物 ITS1 的长度为 187~298 bp,ITS2 的长度为 187~252 bp.作者用 BLAST 软件对所递交的泽泻 3 条序列进行相似性比较后,发现两位学者在泽泻 ITS 序列起始端的划分上有分歧,且 ITS2 的长度超出常规,为 311 bp.所以,作者在判断泽泻 ITS 序列起止端时,未采纳以上两位学者对该种植物 ITS 区的划分,而是参考了 Genbank 中泽泻科、水鳖科的 ITS 序列对泽泻 ITS 区的序列重新进行了界定.本文将泽泻 ITS 序列全长确定为 640 bp,其中 ITS1 为 243 bp、ITS2 为 239 bp、5.8S 为 158 bp,G+C 的平均含量是 58.7%.

4.2 rDNA ITS 区序列在泽泻居群鉴别方面的作用

作者将 GenBank 中登录的 3 条泽泻 ITS 序列和本次实验的 3 条序列,经 ClustalX 软件对位排列,然后用 MEGA2.0 软件分析各 DNA 序列间的差异(见表 3).实验结果表明:建(江)泽泻和川泽泻在 ITS 的第 16 位、第 562 位点存在稳定的碱基差异,依据这两个位点可建(江)泽泻和川泽泻加以鉴别.同时,我们还发现意大利学者 Ficca, A. G. 登录的泽泻序列与国内在建(江)泽泻序列除在第 16、第 562 位有碱基差别外,在 5.8S 保守区(第 289 位)还有一个碱基差异.这与前人报道的“关于同种植物的 rDNA ITS 区碱基差异多见于 ITS1、ITS2 范围内不在 5.8S 区域”的结论有所不同<sup>[5]</sup>.而与我们所报道的我国铁皮石斛的 rDNA ITS 区的居群变异情况类似<sup>[8]</sup>,说明 Ficca 所研究的意大利国的泽泻与我国泽泻确有明显差异,这可能与所研究的不同泽泻居群长期适应不同的气候、环境密切相关,从而发生了稳定的遗传变异.

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会,编.中华人民共和国药典(一部)[M].广州:广东科技出版社,1995.  
[2] 王永刚,吴忠,魏凤环,等.中药指纹图谱研究的现状与未来[J].中药材,2003,23(11):687—688.  
[3] Kojoma M, Kurihara K, Yamada K, *et al.* Genetic identification of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the trnL-trnF chloroplast DNA[J]. *Planta Medica*, 2002, 68(1): 94—96.  
[4] Ding X Y, Xu L S, Xu H, *et al.* Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of “Fengdou” and authentication by the analysis of their sequences[J]. *Acta Pharm Sin*, 2002, 37(7): 567—573.  
[5] 蔡金娜,周开亚,徐璐珊,等.不同居群蛇床的 rDNA ITS 序列分析[J].药学学报,2000,35(1):56—59.  
[6] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995, 82(2): 247—277.  
[7] 陈志彤,陈坚,郑伟文,等.泽泻 18S-26S rRNA 及其 ITS 片段的克隆及序列分析[J].闽西职业大学学报,2004,2(1):111—115.  
[8] 丁小余,王峥涛,徐璐珊,等. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究[J].中国中药杂志,2002,27(2):85—89.

[责任编辑:孙德泉]