

采用 ISSR 标记分析草珊瑚的 DNA 指纹图谱与其品质相关性

魏艺聪¹, 林培玲¹, 陈莹², 杨群雄¹, 罗林泉¹, 陈艺娟¹, 梁一池^{1*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002

摘要: 目的 分析不同质量级别的草珊瑚样品的 DNA 指纹图谱与其品质相关性, 为进一步利用这些资源进行分子辅助育种奠定一定基础。方法 采用 ISSR-PCR 方法对 UBC801~UBC900 共 100 个 ISSR 引物进行筛选, 筛选出多态性好的 ISSR 引物 23 个。利用这 23 个 ISSR 引物扩增 18 份草珊瑚样品, 以 18 份草珊瑚样品的 ISSR 扩增谱带为基础, 利用 Excel 文件建立供试材料扩增条带指纹数据库。结果 共获得 198 条谱带, 平均每个引物扩增出 8 条谱带, 其中多态性谱带 184 条, 多态性条带比率为 92.9%。从 23 个多态性好的 ISSR 引物中遴选出 UBC811、UBC825 2 个引物中 7 个位点为一个组合, UBC827、UBC834、UBC842 共 3 个引物中 7 个位点为另一个组合, 分别建立了 18 份受试草珊瑚样品的基因组的 DNA 指纹图谱, 并从 184 条多态性谱带中筛选出了 u844-6 条带与样品质量有一定相关性。结论 ISSR 分子标记可以有效辨别 18 份受试草珊瑚样品的 DNA 指纹图谱, 并筛选获得一条与其品质有一定相关性的特征条带。

关键词: 草珊瑚; ISSR; DNA 指纹图谱; 品质; 相关性分析

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1620-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.022

Analysis on DNA fingerprints of *Sarcandra glabra* and correlation with its quality using ISSR molecular markers

WEI Yi-cong¹, LIN Pei-ling¹, CHEN Ying², YANG Qun-xiong¹, LUO Lin-quan¹, CHEN Yi-juan¹, LIANG Yi-chi¹

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To analyze the correlation of DNA fingerprints of *Sarcandra glabra* with different quality levels and its quality.

Methods Using ISSR-PCR, 100 ISSR primers (UBC801—UBC900) were screened, and 23 of them were polymorphic. The 23 ISSR primers were used to amplify 18 *S. glabra* samples from different habitats. Based on the 18 ISSR amplified bands, the data base of amplified bands fingerprint was established using Excel. **Results** one hundred and ninety-eight bands were obtained. Each primer amplified eight bands on average. The number of polymorphic DNA bands was 184, and the polymorphic proportion of DNA bands was 92.9%. Seven sites in two primers (UBC811 and UBC825) screened from 23 polymorphic ISSR primers were in one group, and seven sites in three primers (UBC827, UBC834, and UBC842) were in another group. The DNA fingerprints of 18 *S. glabra* samples were established, and U844-6 bands were screened from 184 polymorphic bands to correlate with sample quality. **Conclusion** ISSR molecular markers could identify the DNA fingerprints of 18 *S. glabra* samples, and screen one band that is related to the quality.

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; ISSR; DNA fingerprint; quality; correlation analysis

草珊瑚(又名肿节风、九节茶、接骨木)为常用中药,系金粟兰科(Chloranthaceae)草珊瑚属 *Sarcandra* Gardn. 植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的全草^[1],主要分布于福建、浙江、江西、安徽等省区^[2-3]。草珊瑚是一种广谱中药材,全株可入药,具有很高的药用价值。《中国药典》2005

年版列为法定药材使用,同时,以草珊瑚为原料的草珊瑚片、血康口服液、复方草珊瑚含片也已收入《中国药典》2010 年版,草珊瑚注射液被部颁标准中药 14 册收载,还被广泛应用于食品、饮料、保健品、日用化工等方面,随着用途的日益拓宽,草珊瑚原料需求不断增加,市场前景十分广阔。近几年

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 福建省教育厅 A 类项目(JA11138); 福建省科技重大项目(2011Y4005)

作者简介: 魏艺聪(1981—),男,讲师,研究方向为中药生物技术。E-mail: yicongwei@126.com

*通信作者 梁一池,教授,博士生导师,主要从事中药材品质评价与质量标准研究。E-mail: fafulyc@126.com

来,草珊瑚野生资源急剧减少,药材质量参差不齐,因此对其进行质量鉴定,收集优良种质,通过人工栽培提高草珊瑚药材来源的稳定性是保障草珊瑚资源可持续利用,以及相关制药业可持续发展的必然要求^[4]。而目前草珊瑚相关研究主要集中在生物活性成分分析方面,运用 DNA 指纹图谱的方法进行其药效成分与遗传多态性的相关性研究尚未见报道,而 DNA 分子水平评价可以从遗传背景出发判断种质材料之间的差异,为种质资源的评价提供更加稳定、可靠的参考依据,还可为进一步分子辅助育种,及其药物有效成分代谢相关基因的定位奠定基础。因此很有必要进行其 DNA 指纹图谱与其活性成分相关性的分析。

简单序列重复区间扩增多态性分子标记(inter-simple sequence repeat, ISSR)是近年来发展起来的十分有效的分子标记技术,具有稳定、多态性高,简便及易操作等优点,被视为理想的遗传标记方法^[4]。目前已在多种动植物的亲缘关系、种质鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性等研究方面得到应用^[4-9]。传统药用植物种质资源的鉴定评价方法依赖于宏观特征,如叶片形状等,但可用的形态性状少且受环境影响大,因此需要高效、准确、不受环境因素影响的鉴定技术。ISSR 技术不会受到环境因素的影响,因此在中药材真伪品种的鉴定和道地药材的鉴别上有很大的优势^[10]。

本实验以 ISSR 多态性谱带为基础,利用 Excel 程序,绘制出 18 份草珊瑚种质资源的 DNA 指纹图谱,并进行其 DNA 指纹图谱与其品质相关性的分析,为进一步的分子辅助育种及药物有效成分代谢相关基因的分析进行初步的探讨。

1 仪器与材料

PCR 仪(Eppendorf, 型号 5332),电泳系统(北京市六一仪器厂, 型号 DYY—12),低温冷冻离心机(Eppendorf, 型号 5810R),凝胶成像分析仪(BIO-RAD ChemiDoc XRS),微量移液器(Eppendorf)。

CTAB 提取液, TAE 缓冲液, 琼脂糖(Promega 公司), 溴化乙锭(Fluka 公司), DNA Taq 聚合酶(Takara 公司), 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇均为国产分析纯。

本研究实验样品是由福建中医药大学梁一池教授鉴定并收集的采自不同产地的 18 批样品,为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, 集

中种植于福建中医药大学时珍园,本课题组已通过 HPLC 特征指纹图谱分析方法对这 18 个草珊瑚样品的 7 个活性成分进行了分析^[11],并按优、良、中、差把 18 个样品进行了分级,随机编号,见表 1。

表 1 18 份样品信息

Table 1 Basic information of 18 samples

编号	产地	样品质量级别
S1	福建南平西芹	差
S2	福建南平市	中
S3	福建泉州永春	中
S4	福建泉州安溪	中
S5	广东省河源市	差
S6	福建三元岩前	高
S7	福建三元坂头	差
S8	江西省赣州市	差
S9	福建龙岩南阳	中
S10	福建三明格氏栲	差
S11	福建明溪沙溪	差
S12	福建龙岩连城	中
S13	福建漳州华安	中
S14	福建漳州平和	差
S15	福建龙岩漳平	差
S16	福建漳州永泰	差
S17	福建南平建阳	差
S18	福建福州闽侯	中

2 方法

2.1 草珊瑚基因组 DNA 的提取和纯化

采取样品的嫩叶,采用本研究室改良的 CTAB 法提取草珊瑚幼嫩叶片的基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。然后对所提取的草珊瑚 DNA 进行纯化。

2.2 多态性 ISSR 引物筛选及供试材料的 ISSR 分析

以 18 个样品的基因组 DNA 为模板,对 UBC801~900 共 100 个 ISSR 引物进行多态性筛选,ISSR 引物购自上海生工生物技术有限公司。在冰上建立 20 μ L 的 ISSR-PCR 反应体系:40 ng 模板 DNA、0.2 mmol/L dNTPs、2.5 mmol/L Mg^{2+} 、1.0 U Taq DNA 聚合酶、0.4 μ mol/L 引物。ISSR-PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 31~50 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 10 $^{\circ}$ C 保存。退火温度因扩增产物的效果而调整。PCR 产物经 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色检测。然后

对 18 份草珊瑚样品进行标记分析, 获得扩增谱带。

2.3 扩增带谱的编号及草珊瑚 DNA 指纹图谱的绘制

对于 18 份草珊瑚样品的 ISSR 扩增谱带, 只分析清晰可辨的电泳条带。对于每条 ISSR 引物的扩增产物, 按照扩增条带的相对分子质量从大到小编号和读取。如引物 UBC807 扩增出相对分子质量最大的条带编为 u807-1, 以此类推, 将 PCR 扩增谱带以 Excel 表格中黑框表示, 把电泳结果的图形资料转换成 Excel 表格中的黑白框的带谱图资料, 将每个 ISSR 引物对 18 份草珊瑚样品的扩增结果记录为一张 Excel 表格, 以方便进行运算分析。通过运算分析, 构建出可以辨别 18 份草珊瑚资源的 DNA 指纹图谱。

2.4 草珊瑚 DNA 指纹图谱与质量相关性分析

为寻找与质量级别相关性的特征条带, 即只在

特定某一级别或某一级别以上的样品中出现的条带, 对所获得的所有多态性谱带逐一与 18 份草珊瑚样品的质量级别进行对比分析, 筛选与某一质量级别相关性的特殊条带。

3 结果与分析

3.1 供试材料 DNA 提取与多态性 ISSR 引物筛选

采用本实验室已建立的改良 CTAB 法提取草珊瑚总 DNA, 采用已优化的 ISSR-PCR 扩增体系, 以 S1~S18 共 18 份草珊瑚样品的基因组 DNA 为模板, 对 UBC801~UBC900 共 100 个 ISSR 引物进行多态性筛选, 采用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 共选出 23 个多态性较理想的 ISSR 引物 (表 2)。

3.2 多态性引物对供试材料的 ISSR 分析

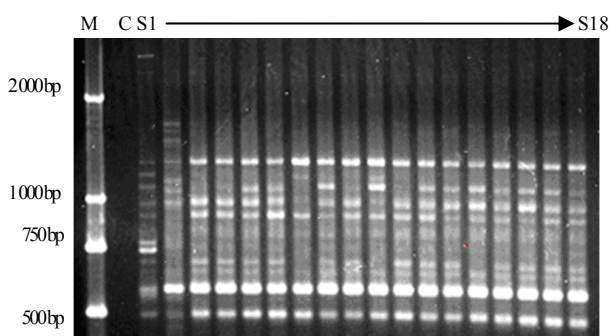
利用筛选出的 23 条多态性引物对 18 个草珊瑚

表 2 23 条 ISSR 引物扩增条带数与多态性比率

Table 2 Numbers and ratios of polymorphic bands amplified by 23 ISSR primers

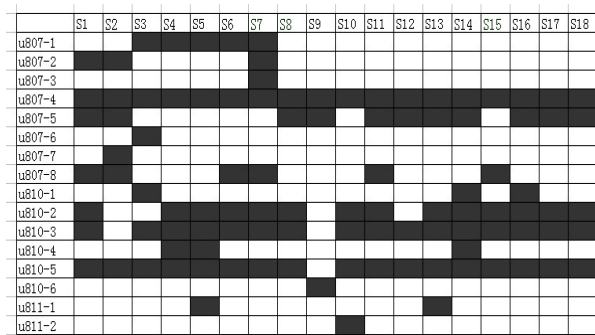
引物	引物序列	退火温度 / °C	扩增带数	多态性条带数	多态性比率 / %
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48	8	8	100.0
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48	6	5	83.3
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	49	8	7	87.5
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	49	9	9	100.0
UBC816	CACACACACACACAT	47	7	7	100.0
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	48	6	6	100.0
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	48	7	7	100.0
UBC825	ACACACACACACACT	48	15	13	86.7
UBC827	ACACACACACACACG	48	13	13	100.0
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	49	6	6	100.0
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGYT	49	9	9	100.0
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	50	5	4	80.0
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	50	6	3	50.0
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	51	6	6	100.0
UBC847	CACACACACACACARC	51	10	10	100.0
UBC848	CACACACACACACARG	51	10	9	90.0
UBC865	CCGCCGCCGCCGCCG	70	15	15	100.0
UBC895	AGAGTTGGTAGCTTTGATC	49	11	11	100.0
UBC831	ATATATATATATTYA	31	5	5	100.0
UBC861	ACCACCACCACCACC	56	9	6	66.7
UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	56	14	13	92.9
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTG	46	5	4	80.0
UBC900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	52	8	8	100.0
统计			198 (合计)	184 (合计)	92.9 (均值)

样品进行 ISSR 分析, 图 1 为引物 UBC881 对 18 个草珊瑚样品的扩增结果。从图中可以看出, 18 个草珊瑚样品的 ISSR-PCR 扩增条带清晰, 可将部分不同产地的草珊瑚样品区分开。对于 ISSR 扩增谱带, 只分析清晰可辨的电泳条带。结果表明, 23 条多态性 ISSR 引物, 共扩增出 198 条谱带, 平均每个引物扩增出 8 条谱带, 其中多态性谱带 184 条, 多态性条带比率为 92.9%, 表明供试的草珊瑚资源遗传多样性较丰富。根据 ISSR-PCR 扩增电泳结果, 对每条引物将 18 个草珊瑚样品的 PCR 扩增谱带以 Excel 表格中黑白框表示 (图 2), 在 Excel 表格中依次录入 23 条 ISSR 引物扩增结果, 以方便进行后续的各种分析, 在筛选出的 23 个 ISSR 多态性引物中, 单条引物不能完全区分 18 个草珊瑚样品, 每个多态性引物分别能扩增出 3~15 条多态性条带, 如引物 UBC825 能扩增出 15 条多态性条带, 不同引物能够区分的草珊瑚资源数不同。



M-Marker C-阴性对照 S1~S18-草珊瑚样品
M-Marker C-negative control S1—S18-*S. glabra* sample

图 1 18 个草珊瑚样品 UBC881 引物扩增结果
Fig. 1 Amplification results of primer UBC881 in 18 *S. glabra* resources



黑框表示含有引物条带, 下图同
Blank means primer strap

图 2 扩增谱带筛选绘制的部分结果图
Fig. 2 Screening results of amplified bands

3.3 构建鉴别 18 份供试草珊瑚样品的 DNA 指纹图谱

由于没有筛选到单独一条引物可以直接鉴别 18 个草珊瑚样品, 利用所有带谱以黑白框的形式录入 Excel 表格所形成的汇总表, 分析扩增产物多态性条带的数量和所能区分的样品数目, 选用 UBC811、UBC825 引物中的 7 个位点为一个组合, UBC827、UBC834、UBC842 共 3 条引物中的 7 个位点为另一个组合, 分别建立了 2 张可以区分 18 个供试草珊瑚样品的基因组的 DNA 指纹图谱, 所构建指纹图谱见图 3。构建 DNA 指纹图谱的 5 个 ISSR 引物的有关信息见表 2。

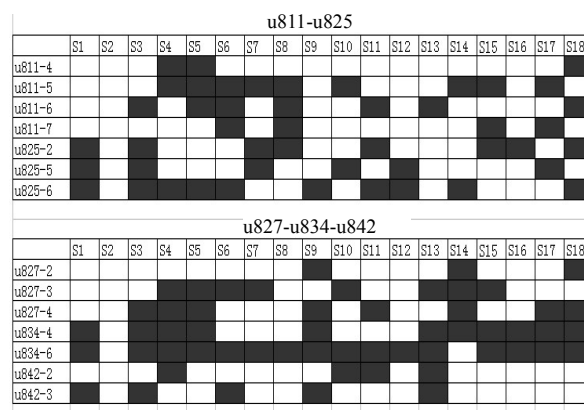


图 3 18 份草珊瑚样品的基因组 DNA 指纹图谱标准模式图
Fig. 3 Standard mode images of genome DNA fingerprints of 18 *S. glabra* samples

3.4 品质相关性的特征谱带的筛选与分析

通过 HPLC 特征指纹图谱分析方法对这 18 个草珊瑚样品的 7 个活性成分进行分析, 并按优、良、中与差把 18 个样品进行了分级, 见表 1。为寻找与质量级别相关性的特征条带, 即只在特定的某一级别或某一级别以上的样品中出现的条带, 以分析特征条带与活性成分的相关性, 对所获得的 184 条多态性谱带逐一与 18 个草珊瑚样品的质量级别进行对比分析, 筛选得到 u844-6 条带与样品质量有一定相关性, 只在中、高质量级别的 S6 及 S9 样品中出现该条带, 而不在差级别的样品中出现, 但没有筛选获得能够完全鉴别某一等级的特异性条带, 而这一相关性的条带是否具有特异性, 还必须进一步进行研究确认。

4 讨论

本研究只选取清晰可辨的 ISSR-PCR 扩增条带进行统计分析, 以确保分析结果的可靠性。ISSR 在不同品种间扩增效果存在较大差异, 不同引物在受

试样品中,最高可扩增出15条带,最低的只扩增出5条带,其中没有筛选到一条引物可以完全区别18个供试样品,为降低成本和提高检测效率,在构建DNA指纹图谱时,遵循利用尽量少的引物及标记分开尽量多的品种原则,从所获得的所有带谱中筛选标记多态性较好的引物及标记,组成了只需2个引物7个标记,或3个引物7个标记的DNA指纹图谱。

另外,本研究尝试利用筛选到的多态性引物对其DNA指纹与其品质的相关性进行分析,初步筛选到与受试的草珊瑚品质具有一定相关性的条带,但是由于样本量比较少,这些条带是否具有特异性,需要进一步分析,一是可以通过扩大样本量进行分析,二是可以通过选出活性成分差异最大的2份个体进行杂交,通过后代群体的品质变异与相关性条带的分析,进行确认或重新筛选与分析。由于ISSR标记利用的是非特异引物,其扩增条带的稳定性是相对的,如在进一步的研究中可以确认与其品质紧密相关的标记,可将ISSR标记中特异性的多态性条带回收、克隆和测序,然后转化成SCAR标记。

本研究尝试为受试的草珊瑚种质资源的评价提供DNA指纹的参考依据,并对进一步利用这些资源进行分子辅助育种,或其药物有效成分代谢相关基因的定位进行初步探讨。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第二十卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 周浙昆. 金粟兰科的起源、演化及其分布 [J]. 云南植物研究, 1993, 15(4): 3212-3311.
- [3] 徐璐珊, 徐国钧. 中国药材学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
- [4] 倪开诚, 闵芳, 郭卫东, 等. 采用ISSR分子标记进行草珊瑚8个种源的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1392-1396.
- [5] 徐莉, 赵桂仿. 微卫星DNA标记技术及其在遗传多样性研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 714-722.
- [6] 张青林, 罗正荣. ISSR及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 2004, 21(1): 54-58.
- [7] 潘敏慧, 冯振月, 田志强, 等. 家蚕胚胎细胞系的DNA指纹图谱分析 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(6): 537-543.
- [8] 阳翠, 刘萍, 刘姣蓉, 等. 苦豆子ISSR标记的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1323-1327.
- [9] 王果平, 樊丛照, 李晓瑾, 等. 基于ISSR的新疆贝母属植物遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 887-890.
- [10] 李婷. 枇杷叶的ISSR遗传差异分析及化学成分含量相关性 [M]. 福州: 福建中医药大学, 2011.
- [11] 林培玲, 曾建伟, 梁一池, 等. 草珊瑚药材HPLC特征指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 856-860.