

• 药材 •

胡萝卜与狭叶柴胡不对称体细胞杂种的分子鉴定

黄贤荣¹, 石俊英¹, 向凤宁², 夏光敏^{2*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014; 2. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100)

摘要:目的 对经同工酶初步确认的4个胡萝卜与狭叶柴胡体细胞杂种进一步从分子水平上证实他们的杂种性质。方法 随机扩增多态性DNA(RAPD)分析和5S rDNA间隔序列差异。结果 4个克隆均含有双亲特征谱带及新带。结论 从分子水平上证实了他们的杂种性质。为进一步分析杂种中柴胡药效成分的含量及筛选出高药效成分含量的细胞系奠定基础。

关键词:狭叶柴胡; 胡萝卜; 体细胞杂种; 5S rDNA间隔序列差异分析; RAPD

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)05-0455-03

Molecular analysis of asymmetric somatic cell hybrids between carrot and *Bupleurum scorzonerifolium*

HUANG Xian-rong¹, SHI Jun-ying¹, XIANG Feng-ning², XIA Guang-min²

(1. Shandong University of TCM, Jinan 250014, China; 2. School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Object Four regenerated somatic cell hybrids between carrot and *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. proved by chromosome analysis were analyzed at the molecular level. **Methods** RAPD analysis and 5S rDNA spacer sequence were adopted. **Results** In the electrophoresis pattern of the PCR products the four somatic cell hybrids had the characteristic bands of two parents and new bands. **Conclusion** Their hybrid nature was clarified at molecular level. This provides a firm foundation to further analyze the main active components, saikosaponin of somatic cell hybrids, and screen out efficacious hybrid cell lines.

Key words: *Bupleurum scorzonerifolium* Willd.; carrot; somatic cell hybrids; 5S rDNA spacer sequence analysis; random amplified polymorphic DNAs (RAPD)

植物体细胞杂交可以使不同来源的原生质体融合后, 获得新型的体细胞杂种。特别是供体和受体不对称融合方法的应用, 增加了成功的机会。狭叶柴胡与胡萝卜进行体细胞杂交, 其研究为获得高含量药效成分的胡萝卜细胞系及再生植株奠定基础, 为中草药现代化探索一条新的途径。胡萝卜与狭叶柴胡体细胞杂交获得的再生愈伤组织在外观表型上难以确认为体细胞杂种。利用DNA分子特征作为遗传标记(DNA分子遗传标记)进行物种鉴别较形态学、同工酶等更为准确、可靠^[1]。据报道^[2], 5S rDNA(即5S rDNA基因)在至今研究的所有真核生物中是以串联重复单位组成的, 与卫星DNA类似, 属简单多基因家族, 120 bp的编码区之间是随不同生物而长度不同的非转录间隔区。基因本身表现出

很高程度的序列保守性, 非转录间隔区由于并未处于与基因本身同样严酷的选择压力下因而变异较大。高等植物的间隔序列长度在90~400 bp之间, 同一属的不同种植物之间以及同一种植物之间间隔序列的碱基序列和长度不同。以保守的5S rDNA编码区的一致序列为基础设计PCR引物, 用来选择性扩增变异较大的非转录间隔区, 以区别融合双方的核基因组, 据此可进行体细胞杂种的鉴定。随机扩增多态性DNA(RAPD)技术是一种运用PCR原理, 以一条随机设计的寡核苷酸单链为引物, 对模板DNA进行PCR扩增的遗传标记技术。本实验采用5S rDNA间隔序列差异分析^[2,3]和RAPD技术对胡萝卜与柴胡体细胞杂种的DNA进行PCR扩增, 从DNA分子水平上为胡萝卜与柴胡体细胞杂种的鉴

* 收稿日期: 2002-10-22

作者简介: 黄贤荣(1970-), 女, 江苏丰县人, 硕士, 讲师, 主要从事中药学鉴别研究。Tel: (0531) 2166858(9)

别提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料:亲本胡萝卜 *Daucus carota* L. var. *sative* DC. 愈伤组织(L)及狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 愈伤组织(C);胡萝卜原生质体与狭叶柴胡原生质体经紫外线照射 1 min 融合再生的愈伤组织 3, 5, 10, 22 号克隆,经同工酶分析确定为杂种。

1.2 样品 DNA 的提取及浓度测定

1.2.1 样品 DNA 的提取:按 CTAB 法提取^[4],称取新鲜愈伤组织,于液氮中迅速研磨成粉末,加入预热至 60 ℃的 CTAB 提取液(1.4 mol/L NaCl, 0.2% 巯基乙醇, 2% CTAB, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 8.0)适量,60 ℃保温 30 min,加入苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)提取 2 次,离心,收集水相,加入适量预冷的异丙醇,混匀,将纤维状 DNA 挑至另一 Eppendorf 管中,用缓冲液(76% 乙醇, 10 mmol/L 乙醇钠)洗 1 次,离心。弃上清, Eppendorf 浓缩仪吹干 DNA,加入适量的 TE(10 mmol/L Tris, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA)缓冲液溶解 DNA。加入 RNase 液,在 37 ℃保温 30 min 以除去 RNA。加入苯酚-氯仿-异戊醇,混匀,离心,收集水相,加入 3 mol/L NaAc (pH 5.2)和冷无水乙醇,-20 ℃放置 0.5 h,离心收集 DNA。Eppendorf 浓缩仪吹干, TE 溶解 DNA,-20 ℃保存。

1.2.2 DNA 浓度测定:琼脂糖平板法测定 DNA 的浓度。在一个小皿中倒入 0.7% 琼脂糖凝胶成平板(含 0.5 μg/mL EB),在平皿背面划线形成方格,做好标记。标准 DNA 和样品 DNA 各取 0.5 μL,按标记顺序小心滴加到琼脂糖凝胶上,5~10 min 后,待 DNA 被凝胶吸收,将平皿倒置于紫外灯下观察样品 DNA 的荧光亮度,与标准 DNA 的亮度比较,得出样品 DNA 的浓度。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 5S rDNA 间隔序列 PCR 反应条件与电泳分析^[5]:选用一对 5S rDNA 特异引物,即 p^{5S1}(5'-GGA TGGGTGACCTCCCGGAAGTCC-3')-25 mer, p^{5S2}(5'-CGCTTAACTGCGGAGTTCTGATGGG-3')-25mer。PCR 反应总体积 25 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 1 min, 65 ℃ 1.5 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环。在 PTG-100 型基因扩增仪中进行扩增反应。反应结束后,取 10 μL 上样,在 3% 琼脂糖凝胶上电泳,50 V 恒压电泳 2 h 后紫外灯下观察,照相并记录。

1.3.2 RAPD PCR 反应条件与电泳分析^[6,7]:PCR

反应总体积 25 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 10 s, 36 ℃ 0.5 min, 72 ℃ 1 min, 43 个循环。在 PTG-100 型基因扩增仪中进行扩增反应。反应结束后,取 10 μL 上样,在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 2 h 后紫外灯下观察,照相并记录。

2 结果

2.1 5S rDNA 间隔序列差异分析:选用一对 5S rDNA 间隔序列引物(25 mer)对部分由同工酶鉴定为杂种的细胞系及双亲 DNA 进行 PCR 扩增。如图 1 所示,所分析的 4 个再生细胞系中均具有双亲特征带及新带。表明这 4 个克隆均为杂种,与同工酶分析的结果相吻合。

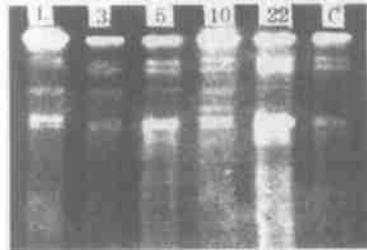


图 1 5S rDNA 序列间隔分析图谱

Fig 1 5S rDNA spacer sequence pattern

2.2 RAPD 分析:随机选用 13 种引物(10-mer Operon primer),对 4 个杂种克隆及双亲 DNA 进行 PCR 分析,结果表明,4 个引物(OPH-01-GGT CG-GAGAA, OPH-04-GGAAGTCCGC, OPH-07-CTG-CATCGTG, OPG-06-GTGCCTAACC)扩增出 DNA 多态性特异片段,如图 2,3 所示。4 个克隆均具有部分双亲特征带及新带,表明这 4 个克隆均为杂种,并且双亲的遗传物质发生了重组,其中 3, 5, 22 号克隆的 RAPD 图谱近似亲本柴胡,10 号克隆的 RAPD 图谱近似亲本胡萝卜。结果同 2.1,进一步从分子水平证实了它们的杂种性质。

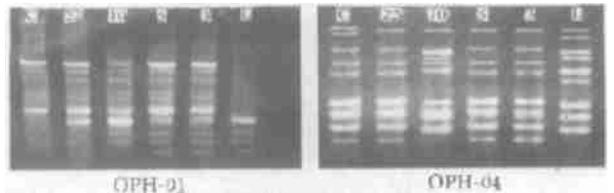


图 2 PCR 扩增谱带

Fig 2 PCR extension pattern

研究表明 5S rDNA 间隔序列和 RAPD 技术可有效地用于胡萝卜与狭叶柴胡体细胞杂种鉴定。

3 讨论

本实验表明,5S rDNA 间隔序列分析操作简单,重复性好,在生长发育的各个时期均能检测,所

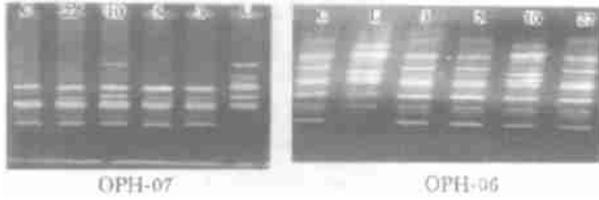


图3 PCR 扩增谱带
Fig 3 PCR extension pattern

需 DNA 量少, 是一种分子水平上鉴定体细胞杂种的好方法, 但此法检测的基因位点数目较少, RAPD 技术无需专门设计 RAPD 扩增反应的引物, 也无需预知被研究的生物基因组核苷酸顺序, 引物是随机合成或随机选定的, 并易于程序化, 方便、快捷, 且检测的基因位点数目多, 但重复性较差。两种分子检测技术相结合, 对体细胞杂种中的异源基因能作出更精确、更全面的定位和分析。

通过原生质体融合获得的体细胞杂种中, 包含有不等量的双亲的遗传物质, 造成这种情况的原因一种可能是两亲本游离原生质体的供体细胞生长(分裂)活跃程度的差异而导致不对称杂种; 另一种可能是两亲本细胞核的 DNA 复制速度不同而造成分配到每个杂种细胞核中的染色体数不相同。

不同产地掌叶大黄 HPLC 指纹图谱的比较

陈斌¹, 蔡宝昌^{1*}, 潘扬², 王天山², 郭胜伟², 钱继红^{2*}

(1. 南京中医药大学 江苏省中药质量控制工程技术中心, 江苏 南京 210029; 2. 江苏中康新药指纹图谱开发有限责任公司, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 应用 RP-HPLC (DAD) 对不同产地掌叶大黄药材进行指纹图谱比较。方法 用 Inertsil ODS-3 分析柱, 1% HA+H₂O 与 1% HA+CH₃CN 梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 280 nm, 参比波长 380 nm。结果 建立了 HPLC 指纹图谱共有模式, 并对其他产地药材进行了相似度比较。结论 对大黄药材中各成分均得到很好分离, 可作为大黄药材的具有专属性的指纹图谱。

关键词: 大黄; 指纹图谱; 高效液相色谱; 梯度洗脱法

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)05-0457-04

Comparison of HPLC fingerprint chromatography of *Rheum palmatum* of different producing areas

CHEN Bin¹, CAI Bao-chang¹, PAN Yang², WANG Tian-shan², GUO Sheng-wei², QIAN Ji-hong²

(1. Jiangsu Engineering and Technical Center for Quality Control of Chinese Materia Medica, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China, 2. Jiangsu Zhongkang New Drug & Fingerprint Chromatography Development Co., Ltd., Nanjing 210029, China)

Abstract: Object To apply RP-HPLC (DAD) to compare the fingerprints of *Rheum palmatum* Linn.

* 收稿日期: 2002-09-08

作者简介: 陈斌(1977-), 男, 南京中医药大学 2000 级在读硕士研究生, 主要从事新药开发与指纹图谱研究。

* 通讯作者 Tel: (025) 6798281

References:

- [1] Xing W X, Bi H M, Tian L, et al. RAPD (random amplified polymorphic DNAs) technology and application of RAPD in pharmacognosy study [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 1999, 15(3): 25-28.
- [2] Cox A V, Bennett M D, Dyer T A. Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S rDNA gene clusters and to locate such clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 684-690.
- [3] Zanke C, Borisjuk N, Ruoss B, et al. A specific oligonucleotide of the 5S rDNA spacer and species specific elements identify symmetric somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. pinatisectum* [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 720-726.
- [4] Sun J S, Gui Y L. *Plant Cell Engineering Experimentation Technology (植物细胞工程实验技术)* [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [5] Zhou A F, Xu C H, Xiang F N, et al. Study on identification of somatic hybrids by PCR with 5S rDNA sequence primers [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 1999, 15(4): 529-532.
- [6] Xiang F N, Xia G M, Zhou A F, et al. Intergeneric asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and bromus inermis [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, 41(5): 458-462.
- [7] Huang L Q. *Molecular Pharmacognosy (分子生药学)* [M]. Beijing: Beijing University of Medical Science and Peking Union Medical College Publishing House, 2000.