

• 药材与资源 •

红景天属植物 DALP 反应体系的建立

李永谊¹, 虞泓^{1,2*}, 朱荣勋¹, 和锐¹, 倪念春¹

(1. 云南英茂生物技术实验室, 云南 昆明 650106; 2. 云南大学生命科学学院生态遗传学实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:目的 利用直接扩增片段长度多态性(DALP)这一新分子标记技术建立一套稳定的红景天属植物的 DALP 反应体系。方法 以红景天基因组 DNA 为模板, 对 DALP 反应程序的一些重要参数进行摸索和优化试验。结果 建立了一套稳定性强、可靠性高的 DALP 应用反应体系; 经过大量重复性实验, 反应体系为 20 μL , Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 1.25 mmol/L, 模板 DNA 的量为 60 ng, 5 pmol/L 选择性引物 1 μL , 5 pmol/L 反向引物 3 μL , 引物浓度比为 1:3, Taq 酶 2 U。反应过程为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 30 个循环, 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 完成整个 PCR 反应。结论 该体系可有效地应用于红景天属药材的分类鉴定和地道性鉴定。

关键词:红景天属; 直接扩增片段长度多态性; 分子标记; 反应体系

中图分类号:R282.710.3

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0419-05

Establishment of DALP reaction system for plants of *Rhodiola* L.LI Yong-yi¹, YU Hong^{1,2*}, ZHU Rong-xun¹, HE Rui¹, NI Nian-chun¹

(1. Inmol Laboratory of Biotechnology, Kunming 650106, China; 2. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Objective Direct amplification of length polymorphism (DALP) as a new molecular marker was used to establish a set of stable DALP reaction system for the plants of *Rhodiola* L. **Methods** Some significant parameters of DALP reaction procedure were investigated and optimized by taking the DNA genome for the plants of *Rhodiola* L. as template. **Results** The reaction system was: 20 μL reaction system containing 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.25 mmol/L dNTPs, 60 ng DNA template, 1 μL 5 pmol/L selective primer, 3 μL 5 pmol/L reverse primer, selective primer: reverse primer is 1:3, and 2 U Taq DNA polymerase. Amplification program is 95 $^{\circ}\text{C}$ pre-denatured for 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ denatured for 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ annealed for 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ extending for 1 min; after 30 cycles, and then 72 $^{\circ}\text{C}$ extending again for 10 min to the end of PCR reaction. **Conclusion** This DALP reaction system is efficient to identify the species and local populations for the plants of *Rhodiola* L. repeatedly with the stronger stability and reliability.

Key words: *Rhodiola* L.; direct amplification of length polymorphism (DALP); molecular marker; reaction system

红景天 *Rhodiola rosea* L. 为景天科红景天属多年生草本或亚灌木植物, 多生长在海拔 3 000~5 000 m 雪域高原的干旱、低温、缺氧、紫外线照射强、风大、积雪的石灰岩和砾岩的恶劣环境^[1]。红景天属植物在全世界有 90 多种, 分布于欧、亚和北美的高寒山区。我国有 70 种分布于东北、华北、西北、西南等地, 云南有 24 种, 主要分布于横断山区^[2]。有

效成分是红景天苷, 它是继人参、刺五加、绞股蓝之后, 抗衰老、抗辐射、抗疲劳、抗高温、抗病毒、补益强壮, 可供防治神经系统、心血管系统疾病的又一值得重视研究的药用植物群体^[3]。

直接扩增片段长度多态性(direct amplification of length polymorphism, DALP)是 1998 年法国科学家 Desmarris, Lannelucl 和 Langel 发展起来的基

收稿日期: 2004-06-06

基金项目: 中药现代化科技产业(云南)基地专项资助项目(2002ZY-18)

作者简介: 李永谊(1978—), 女, 昆明宜良人, 实习研究员, 现从事药用植物分子遗传学及其药材分子鉴定研究。

Tel: (0871)7392577 Fax: (0871)7392576 E-mail: zrx1230@163.net

* 通讯作者 Tel: (0871)7392184 Fax: (0871)7392576 E-mail: fisher@yninmol.com

于随意扩增 PCR (AP-RCR)、用于检测基因多态性并用扩增产物直接测序的一种新方法。这是一种以通用测序引物 M13 为核心序列,在此基础上任意添加少数碱基的引物进行样品基因组的 PCR 扩增,以得到相应的 DNA 指纹的方法。这个方法利用了引物 M13 的序列特性,即其广泛地存在于真核、原核细胞基因组当中,并且出现于多个位点。DALP 拥有 RAPD 信息量大的优点,同时也不需要被分析样品的基因组参考序列。而其引物序列相对 RAPD 较长 (RAPD 引物不多于 10 个碱基),PCR 扩增时使用以相对高的退火温度,这些都使得 DALP 的结果比 RAPD 有更高的重复性和稳定性。同时,由于使用以通用测序引物 M13 为核心序列的双引物扩增,得到的 DNA 条带 5' 端和 3' 端的序列不一样,但都含有对应的 M13 序列,所以可以用充作其核心序列的 M13 测序引物直接测序,省去了繁琐的克隆步骤,简化了实验流程。

DALP 最早应用于检测基因组中微小的插入、缺失、变异和微卫星 DNA 位点^[4],结果在得到的 7 个多态性位点中有 6 个出现微小的插入或缺失现象,1 个含有数量可变的重复序列(微卫星位点)。本研究以红景天基因组 DNA 为模板,通过对 PCR 反应体系中各种参数的优化设置,分析比较各种因素对 DALP 扩增结果影响,找出合适的反应体系,为下一步开展红景天属分子标记奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料:红景天采自云南省中甸并种植在实验田内不超过半年。引物(P₁、P₂、P₃、P₄)为复旦大学生物系提供,其序列列表 1,TaqDNA 聚合酶(含缓冲液和 Mg²⁺)和 dNTPs(购自上海生工公司)。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

引物	名称	序列(5'→3')
正向引物	-40USP(P ₂)	GTTTTCCTCCAGTCACGAC
正向引物	DALP221(P ₁)	GTTTTCCTCCAGTCACGACGC
反向引物	DALPR1(P ₃)	TTTCACACAGGAAACAGC- TATGAC
反向引物	DALPR2(P ₄)	AACAGCTATGACCATGA

1.2 DNA 提取:基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[5,6],并稍作修改。约 0.5 g 植物组织加入到 4 mL 预热到 65 ℃ 的 2×CTAB(含 2%β-巯基乙醇)中,研磨成糊状,65 ℃ 水浴 1 h,冷却,加入 1/3 体积 5 mol/L KAc 冰浴 1 h,4 ℃ 10 000 ×g 离心 10 min,取上清液,CI(氯仿-异戊醇=24:1)抽提 2 次,取上清液加 3/4 体积的异丙醇,-20 ℃ 静置 30~60

min,10 000 ×g 离心 10 min,70%乙醇洗 2 次,无水乙醇洗 1 次凉干。加 1×TE 400 μL,室温静置 2 h,使 DNA 充分溶解,1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用 λDNA (25、50、100 ng/μL) 标定,利用 Kodak 1D 分析软件分析并标定到 20 ng/μL 备用。

1.3 DNA 扩增:按 Desmarais、Lanneluc 和 Lagnel 的方法在 PE9700 扩增仪(美国 PE 公司)上进行,PCR 反应体系为 20 μL。根据有关文献报道和试验要求对 DNA 扩增中的一些重要参数进行梯度设置,并严格控制其他参数和反应条件,确保试验的准确性和可比性。

1.4 电泳检测:扩增产物在 1×TAE、1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,用 GeneRulerTM 100 bp DNA 作相对分子质量标记(MBI Fermentas),电压 3 V/cm,用 Kocad 1D 紫外凝胶成像仪观察照像。

2 结果与讨论

2.1 引物浓度及比对 PCR 结果的影响:见图 1(引物浓度及引物浓度比梯度)及表 2,Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 1 mmol/L,Taq 酶 1 U,2 μL 缓冲液,模板 DNA 量 60 ng。研究结果表明,引物浓度为 5 pmol/L,引物浓度比为 1:3 时获得较好的扩增效果,引物浓度及引物浓度比对 PCR 影响不是很大。

表 2 引物浓度及引物浓度比梯度对 PCR 的影响
Table 2 Effect of primer concentration and primer concentration vs gradient on PCR

泳道	浓度/(pmol·L ⁻¹)		结果
	P ₁	P ₃	
1	2.5	2.5	+
2	5	5	++
3	7.5	7.5	+
4	10	10	+
5	2.5 (1)	5 (2)	+
6	2.5 (1)	6.5 (2.6)	+
7	2.5 (1)	7.5 (3)	++
8	2.5 (1)	10 (4)	+

“+/-”表示扩增产物不稳定,“+”表示扩增产物效率高,“++”表示扩增产物效率较高(表 2~12 注相同)

“+/-”: labile product of PCR,“+”: efficient product of PCR,“++”: more efficient product of PCR (same in chart 2~12)

2.2 dNTPs 浓度对 PCR 结果的影响:见图 1 (dNTPs 浓度梯度)及表 3。Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L,1 μL 5 pmol/L 选择性引物,1 μL 5 pmol/L 反向引物、引物浓度比为 1:1,1 U 的 Taq 酶,2 μL 的缓冲液,模板 DNA 量 60 ng,结果表明:dNTPs 浓度变化对 PCR 带型影响较小。dNTPs 浓度为 1.25 mmol/L 时获得较好的扩增效果,dNTPs 浓度高于 2.5 mmol/L 时带明显减弱。

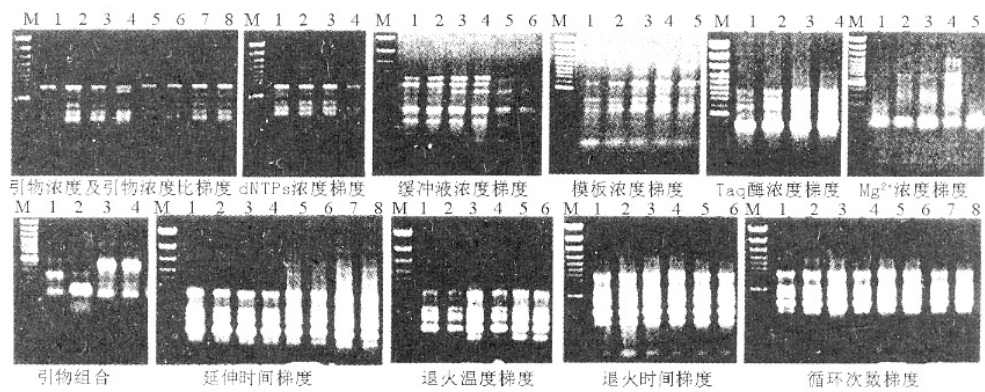


图 1 DALP 的反应体系探索结果

Fig. 1 Amplification results of DALP reaction system

表 3 dNTPs 浓度对 PCR 的影响

Table 3 Effect of dNTPs concentration on PCR

泳道	dNTPs/(mmol · L ⁻¹)	结果
1	1	+
2	1.25	++
3	1.87	+
4	2.5	+/-

2.3 缓冲液用量对 PCR 结果的影响:见图 1(缓冲液浓度梯度)及表 4。Mg²⁺浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 1.25 mmol/L, 1 μL 5 pmol/L 选择性引物, 3 μL 5 pmol/L 反向引物, 引物浓度比为 1:3, 2 U 的 Taq 酶, 模板 DNA 量 60 ng, 以红景天为实验材料的研究结果表明, 缓冲液用量对 PCR 带型影响较大, 达到 2 μL 时获得较好的扩增效果, 高于 2.4 μL 时带型较弱。

表 4 缓冲液浓度对 PCR 的影响

Table 4 Effect of buffer concentration on PCR

泳道	缓冲液/μL	结果	泳道	缓冲液/μL	结果
1	0.8	+	4	2	++
2	1.2	+	5	2.4	+/-
3	1.6	+	6	3	+/-

2.4 模板 DNA 的量对 PCR 结果的影响:见图 1(模板浓度梯度)及表 5。Mg²⁺浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 1 mmol/L, 1 μL 5 pmol/L 选择性引物, 3 μL 5 pmol/L 反向引物, 引物浓度比为 1:3, 1 U 的 Taq 酶, 样品 DNA 稀释为一定梯度进行扩增, 以决定最佳 DNA 量, 模板 DNA 量的变化对 PCR 带的影响较大, 10~20 ng 带较弱, 40~100 ng 带较稳定, 60 ng 为最佳。

2.5 Taq 酶用量对 PCR 结果的影响: Taq 酶用量太低则扩增效率低, 使 DALP 指纹多态性降低, 太高时使 DALP 稳定性降低, 且背景值增高, 甚至出现拖尾

现象^[7]。见图 1(Taq 酶浓度梯度)及表 6, Mg²⁺浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 1.25 mmol/L, 1 μL 5 pmol/L 选择性引物, 3 μL 5 pmol/L 反向引物, 引物浓度比为 1:3, 2 μL 的缓冲液, 模板 DNA 量 60 ng, 以红景天为实验材料的研究结果表明, Taq 聚合酶用量为 2 U 时获得较好的扩增效果。

2.6 Mg²⁺浓度对 PCR 结果的影响: Mg²⁺浓度是 PCR 反应中的一个重要因素。Mg²⁺浓度不但会影响酶的活性及合成的忠实性, 而且还会影响引物与模板的结合效率, 模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成等^[8], 见图 1 (Mg²⁺浓度梯度)及表 7。dNTPs 浓度为 1 mmol/L,

表 5 模板浓度对 PCR 的影响

Table 5 Effect of template concentration on PCR

泳道	模板/ng	结果	泳道	模板/ng	结果
1	10	+/-	4	60	++
2	20	+/-	5	100	+
3	40	+			

表 6 Taq 酶浓度对 PCR 的影响

Table 6 Effect of Taq polymerase concentration on PCR

泳道	Taq 酶/U	结果	泳道	Taq 酶/U	结果
1	0.5	+/-	3	1.5	+
2	1	+/-	4	2	++

表 7 Mg²⁺浓度对 PCR 的影响

Table 7 Effect of Mg²⁺ concentration on PCR

泳道	Mg ²⁺ /(mmol · L ⁻¹)	结果
1	1	+/-
2	1.5	+/-
3	2	+/-
4	2.5	++
5	3	+/-

1 μL 5 pmol/L 选择性引物,3 μL 5 pmol/L 反向引物,引物浓度比为 1 : 3,1 U 的 Taq 酶,2 μL 的缓冲液,模板 DNA 量 60 ng。研究表明,Mg²⁺ 浓度对 PCR 带的影响较大,Mg²⁺ 浓度为 1~2 mmol/L 或 3 mmol/L 时带较弱,Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时获得较好的扩增效果。

2.7 引物组合对 PCR 结果的影响:引物组合中 4 种组合扩增都好,见图 1(引物组合)及表 8。Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 1 mmol/L,1 μL 5 pmol/L 选择性引物,3 μL 5 pmol/L 反向引物,引物浓度比为 1 : 3,1 U 的 Taq 酶,2 μL 的缓冲液,模板 DNA 量 60 ng,2.1~2.7 项反应过程均为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环,再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,完成整个 PCR 反应。

表 8 引物组合对 PCR 的影响

Table 8 Effect of primer combinations on PCR

泳道	引物	结果	泳道	引物	结果
1	P ₂ 、P ₄	+	3	P ₂ 、P ₃	+
2	P ₁ 、P ₄	+	4	P ₁ 、P ₃	+

2.8 PCR 热循环的反应参数:反应过程为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min(最后一个循环 10 min),共 30 个循环。其中摸索延伸时间以 60 s 最好,见图 1(延伸时间梯度)及表 9。退火温度以 50 $^{\circ}\text{C}$ 最好,见图 1(退火温度梯度)及表 10;退火时间以 30 s 最好,见图 1(退火时间梯度)及表 11;循环次数以 30 次最好,见图 1(循环次数梯度)及表 12。

表 9 延伸时间对 PCR 的影响

Table 9 Effect of extending time on PCR

泳道	延伸时间/s	结果
1.2	30	+
3.4	45	+
5.6	60	++
7.8	90	+

表 10 退火温度对 PCR 的影响

Table 10 Effect of annealing temperature on PCR

泳道	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	结果
1.2	52	+
3.4	50	++
5.6	48	+

表 11 退火时间对 PCR 的影响

Table 11 Effect of annealing time on PCR

泳道	延伸时间/s	结果
1.2	30	++
3.4	45	+
5.6	60	+

表 12 退火循环次数对 PCR 的影响

Table 12 Effect of annealing cycles on PCR

泳道	循环次数	结果
1.2	30	++
3.4	35	+
5.6	40	+
7.8	45	+

3 结论

通过对上述 PCR 反应条件中主要参数的试验和比较分析,结果表明,红景天属 DALP 的反应条件为:反应体系 20 μL 、Mg²⁺ 浓度 2.5 mmol/L、dNTPs 浓度 1.25 mmol/L、模板 DNA 量 60 ng,1 μL 5 pmol/L 选择性引物(上海生工合成),3 μL 5 pmol/L 反向引物(上海生工合成)、引物浓度比 1 : 3、TaqDNA 聚合酶 2 U。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环,再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,完成整个 PCR 反应。这一反应体系可直接利用在红景天属 DALP 系统分析和分子鉴定上,DALP 图谱带型清晰、重现性好、稳定性高。在利用 DALP 分子标记对红景天属植物的 3 个种:大花红景天 *R. crenulata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu、长鞭红景天 *R. fastigiata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu、云南红景天 *R. yunnanensis* (Franch.) S. H. Fu,1 个外类群长丝景天 *Sedum bergeri* Hamet 的 22 居群 22 样品的扩增中,6 个寡核苷酸引物对共检测到 257 个基因位点,平均每个引物产生 42.8 条带。在 6 个引物组合中,11 个大花红景天居群除 P₁P₃ 无特征带外,其他 5 个引物组合 P₂P₃、P₃P₃、P₆P₃、P₇P₃、P₂P₄ 共扩增出 9 条特征带(见图 2),1 kb 处箭头指的为大花红景天特征带。

该 DALP 反应体系可直接用于红景天药材品种的分子鉴定,其 DALP 图谱带型清晰、重现性好、稳定性高。由于药材市场上出售的红景天药材均为其根茎,而且被切成块状,有经验的老中医和植物分类学家也很难鉴定其种类和产地。笔者经大量的重复性实验,发现 DALP 技术重复性高,方法简便、快捷,都可以得到 5 个引物组合的 9 条特征带,获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱,可以把不同种类的红景天及其产地清楚地鉴别开来;从 DALP 的 UPGMA 聚类树和遗传距离,可以清楚地把不同产地的各个红景天居群完全分开,为红景天药材的分类鉴定和地道性鉴定提供可靠的分子依据。

在 DNA 分子鉴定的历史上,用于药用植物分

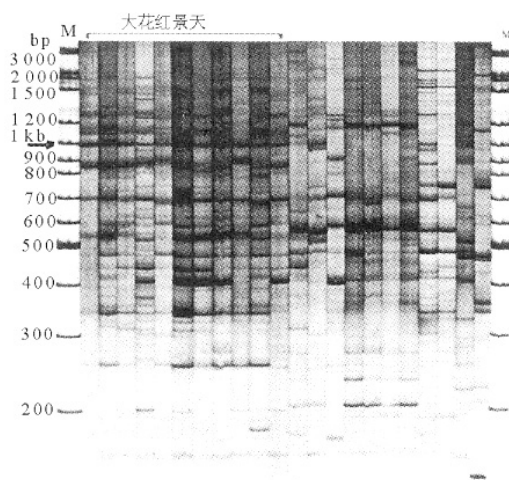


图2 红景天属植物 P_2P_3 组合 DALP 电泳图
(箭头代表大花红景天特征带)

Fig. 2 DALP electrophorogram of $P_2 P_3$ combination with P_3 samples amplification for plants of *Rhodiola* L. (arrow indicates characteristic bands of *R. crenulata*)

子鉴定的 DNA 标记有 10 多种,应用广泛的主要有 RFLP、RAPD、AFLP 和核酸序列分析等。RFLP 在技术上比较费力、成本高、多态性少, RAPD 反应系统不稳定、可靠性差, AFLP 和 ITS 在分子鉴定上优点突出,但是 AFLP 为显性标记、技术难度高, ITS 测序资金耗费大。而 DALP 是共显性标记,能检测出纯和基因型及杂和基因型,提供了完整的遗传信息,技术难度低、耗费小。本实验首次把 DALP 技术

用在传统中药材的鉴定上, DALP 技术的优点克服了传统分子鉴定的缺点,共显性数据提高了数据可信度,有望成为今后中药分子鉴定的首选技术。

致谢:在材料采集中受到和云峰、张时刚、晏婴才等的大力帮助。

References:

- [1] Xu L, Xu H H, Huang S, et al. *New Techniques of Cultivation for Good Agricultural Practice (GAP) and Industrializing Development on the Chinese Rare-medicinal Herbs* (中国名贵药材规范化栽培技术与产业化开发新技术) [M]. Beijing: Beijing University of Medical Sciences and Peking Union Medical College United Press, 2001.
- [2] Institutum Botanicum Kunmingense Academiae Sinicae. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Tomus 8. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Guo Y T, Wang F P, Xiao Z Y. Chemical components from roots of *Rhodiola yunnanensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1993, 5(3): 144-208.
- [4] Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species [J]. *Nucl Acids Res*, 1998, 26: 1458-1465.
- [5] Dolye J J, Dolye J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [6] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, diversity, barbarian and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
- [7] Ren R W, Lu Q, Xu X L. Experience and discussion for improving RAPD stability [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2001, 11(2): 40-41.
- [8] Ling W M. *The Guide of PCR Technology Manipulation and Application* (PCR 技术操作和应用指南) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1993.

ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用

沈颖,徐程*,万小凤,张铭

(浙江大学生命科学院,浙江 杭州 310012)

摘要:目的 采用 ISSR-PCR 方法对石斛属 9 种植物进行鉴别,探讨不同种石斛在 DNA 分子水平上的差异。方法 选取 10 条由 SSR 组成的引物,对 9 种石斛进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分析。结果 10 条引物中有 7 条扩增出多态性条带。每条引物可检测的多态性位点最少 7 个,最多 14 个,扩增片段大小为 220~1 260 bp。其中,引物 UBC-807 和 UBC-864 具有较高的多态性条带比率,均可以独立将所有被测种区分开来。结论 ISSR-PCR 作为一种简便、可靠的分子标记鉴定技术,可以作为石斛属种间鉴别的方法之一。

关键词: ISSR-PCR; 分子标记; 石斛属; 鉴别

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0423-05

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(C03050204)

作者简介: 沈颖(1978—),女,硕士生,研究方向为植物遗传与分子生物学。 Tel: (0571)88273341 E-mail: sheny78@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (0571)81859020 E-mail: xuc123@zju.edu.cn