

黄花蒿 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

邓婧¹, 陈新^{1*}, 宣朴²

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075; 2. 四川省农科院

农业信息与农村经济研究所, 四川 成都 610066)

摘要:目的 用序列相关扩增多态性(SRAP)这一新的分子标记技术建立稳定可重复的黄花蒿 *Artemisia annua* 的 SRAP 最佳反应体系。方法 以黄花蒿 DNA 为模板, 分析了 SRAP 反应体系中的一些重要参数对 PCR 扩增的影响。结果 建立了稳定可重复的 SRAP 反应体系; 25 μ L 反应体系中, 模板 DNA 为 30~105 ng, $MgCl_2$ 为 2.0 mmol/L, dNTPs 为 0.25 mmol/L, *Taq* 酶为 1.0 U, 引物为 2.0 μ mol/L; 扩增程序: 94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 35 $^{\circ}C$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}C$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。结论 本研究建立的黄花蒿 SRAP 体系重复性好, 稳定性强。

关键词: 黄花蒿; SRAP 反应体系; 优化

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0125-04

Establishment and optimization of SRAP-PCR in *Artemisia annua*

DENG Jing¹, CHEN Xin¹, XUAN Pu²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Institute of Agricultural Information and Rural Economy, Sichuan Academy of Agriculture Sciences, Chengdu 610066, China)

Key words: *Artemisia annua* L.; SRAP reaction system; optimization

序列相关扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)是 Li 等^[1]建立的一种新型的分子标记技术, 针对基因外显子中 GC 量丰富而启动子、内含子中 AT 量丰富的特点来设计引物, 因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。SRAP 标记具有简便、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀的特点。适合于遗传多样性研究、遗传图谱构建、基因定位、预测杂种优势、cDNA 指纹图谱等诸多研究领域^[2~5]。目前已经在马铃薯、水稻、柑橘类果树、黄瓜、棉花^[6]、辣椒^[7]等植物和水稻稻瘟病^[8]研究中应用, 多集中于田间作物, 在药用植物中研究较少, 且黄花蒿中未见报道。

SRAP 标记是基于 PCR 的标记, 其反应条件易受各种因素的干扰。为确保 SRAP 分析结果的可靠性和重复性, 进行 SRAP-PCR 反应体系的优化是非常必要的。

青蒿来源于菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分, 味苦、辛, 性寒, 有清热解暑, 除虱, 截疟的功能。其药用有效成分主要为青蒿素, 被

WHO 称为唯一有效的疟疾治疗药物。由于黄花蒿的自交不亲和性, 不同个体间存在遗传差异, 这些导致青蒿素在不同来源黄花蒿植株中的量存在差异, 遗传不稳定也是常规栽培中很难克服的难题^[9]。因此, 对黄花蒿进行遗传育种方面的研究日益重要, 有必要构建高密度的遗传连锁图谱和进行黄花蒿遗传多样性的研究。

本实验以黄花蒿为试材, 对模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 以及 Mg^{2+} 浓度, 预变性, 延伸时间等的最佳反应条件进行探索, 建立了适用于黄花蒿的 SRAP 反应体系, 为今后利用 SRAP 标记技术开展黄花蒿种间遗传变异分析和构建遗传图谱奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 黄花蒿采自成都市, 根据《中国植物志》(第 76 卷), 并经成都中医药大学严铸云副教授鉴定为黄花蒿 *Artemisia annua* L., 按 Li 等^[1]提供的 SRAP 引物序列由 TaKaRa 公司合成, *Taq* 酶和反应底物均购自 TaKaRa 公司。

1.2 黄花蒿总 DNA 提取: 采用 CTAB 法提取总

收稿日期: 2006-03-08

作者简介: 邓婧(1982—), 女, 四川成都, 成都中医药大学药学院硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel.: (028)6668323 E-mail: simple1016@sina.com.cn

* 通讯作者 陈新 Tel.: (028)66683823 E-mail: chennew@tom.com

DNA。取约 100 mg 冷冻的黄花蒿样品研成细粉,转移至 1.5 mL 离心管中,加入 800 μ L CTAB 液,振荡混匀,放置在 65 $^{\circ}$ C 水浴中 30 min(约 10 min 振荡 1 次),加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),抽提两次,10 000 r/min 离心 10 min,将水相转移至另一干净离心管中,在得到的水相中加入等体积的无水乙醇,轻轻颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 沉淀,取出样品在室温下 5 000 r/min 离心 5 min,使 DNA 附于管壁,小心去上清,空气干燥,加入 100 μ L ddH₂O,37 $^{\circ}$ C 保温 30 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用。取 10 μ L,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,电压 140 V,电流 100 mA,紫外灯下观察结果,并用 Totallab v2.01 测定所提 DNA 的量约为 30 ng/ μ L。

1.3 PCR 反应程序的优化:参考 Li 等^[1]的扩增程序。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,35 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。在 Bio-RAD 基因扩增仪上进行反应程序优化。预变性时间为 1、2、3、4、5 min;最后延伸时间为 1、3、5、7、10 min。

1.4 PCR 反应体系的优化:在 25 μ L 反应体系中加入 2.5 μ L 的 10 倍 Buffer (Mg²⁺free) 缓冲液,2.0 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTPs,1 U Taq 酶,模板 DNA 30 ng,1.0 μ mol/L 引物,ddH₂O 加至 25 μ L。以此体系为基础,按以下顺序逐级优化反应参数,选择优化出的最佳参数做下一个参数优化:每反应含模板 DNA 量分别为 6、9、15、30、45、60、90、150 ng;每反应引物浓度分别为 0.3、0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 μ mol/L;每反应 dNTPs 终浓度分别为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 mmol/L;每反应 Mg²⁺浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L;每反应 TaqDNA 聚合酶的用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5 U。

1.5 扩增产物电泳分析:在 2.0% 的琼脂糖凝胶中分离扩增产物,电泳结束后在凝胶成像系统下观察照相。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增的影响:适宜的模板量是保证特异性扩增的前提,模板量过多会降低特异扩增效率,增加非特异性产物。模板 DNA 小于 15 ng 时产物少,在 30~105 ng 时扩增条带稳定且几乎无差异(图 1),因此黄花蒿 DNA 在 30~105 ng 都可以,为节约模板,本实验采用模板为 30 ng。

2.2 引物浓度对 SRAP 扩增的影响:用 ME1-EM1

引物,比较了引物浓度差异对扩增结果的影响。引物浓度小于 1 μ mol/L 时扩增产物较少,在 1.5~4.0 μ mol/L 时条带清晰稳定(图 2),通过比较,选择引物浓度为 2.0 μ mol/L。

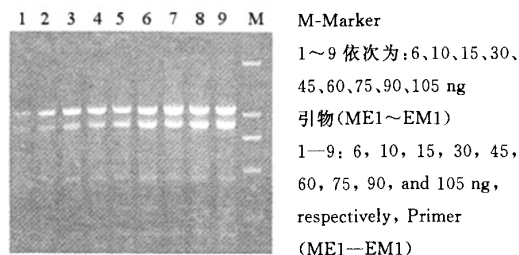


图 1 模板 DNA 量对 SRAP 反应的影响

Fig. 1 Effects of DNA concentration on SRAP patterns

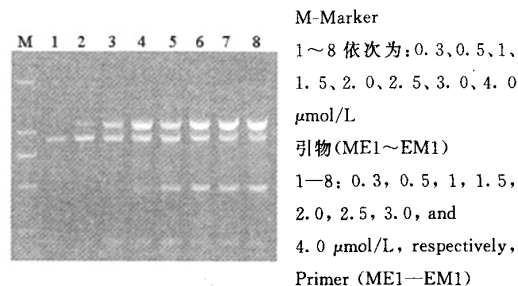


图 2 引物浓度对 SRAP 反应的影响

Fig. 2 Effects of primer concentration on SRAP patterns

2.3 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增的影响:dNTPs 浓度直接影响 PCR 扩增产物的生成。dNTPs 浓度不足时,扩增产物减少,浓度过高时,会从两方面影响 PCR 扩增:一方面错误率大大增加;另一方面同 TaqDNA 聚合酶竞争 Mg²⁺,使反应体系中的 Mg²⁺总量下降,TaqDNA 聚合酶活性受到影响。dNTPs 浓度低于 0.15 mmol/L 时扩增强度较低;在 0.15~0.25 mmol/L 时条带多且清晰,大于 0.3 mmol/L 时扩增产物明显减少(图 3)。比较后选择 dNTPs 的最佳浓度为 0.25 mmol/L。

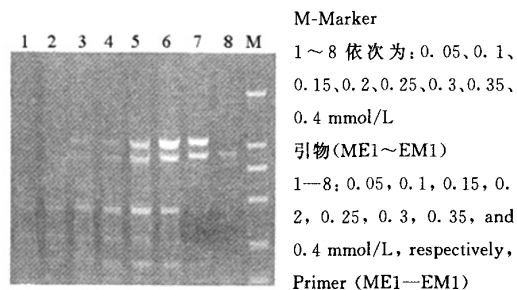


图 3 dNTPs 浓度对 SRAP 反应的影响

Fig. 3 Effects of dNTPs concentration on SRAP patterns

2.4 Mg²⁺浓度对 ISSR 扩增的影响:反应混和物中

的离子强度,尤其是 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 反应的特异性和扩增效率均有影响,浓度过高会使非特异扩增产物增加或导致扩增失败,浓度过低会使扩增产物减少或导致扩增反应失败。 Mg^{2+} 是 *Taq* 酶的激活剂, Mg^{2+} 不足时,*Taq* 酶的作用效率降低,且 dNTP 竞争 Mg^{2+} , Mg^{2+} 受 dNTP 总量的影响。 Mg^{2+} 浓度小于 1.5 mmol/L 时无扩增;2.0 mmol/L 时条带清晰稳定,大于 2.5 mmol/L 时条带弥散变弱(图 4)。因此, Mg^{2+} 适宜浓度为 2.0 mmol/L。

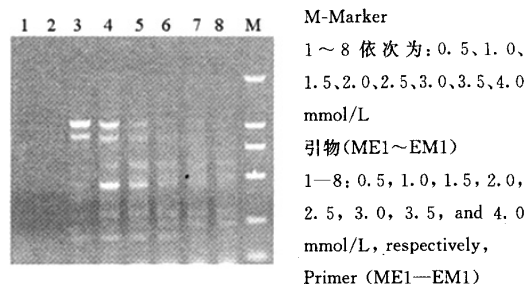


图 4 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 反应的影响

Fig. 4 Effects of Mg^{2+} concentration on SRAP patterns

2.5 *Taq* DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响:*Taq* 聚合酶用量的多少直接影响 PCR 反应的成败,酶用量过低导致扩增失败;酶量过高,使非特异性产物增加。当酶用量小于 0.5 U 时无扩增产物,在 1.0 时扩增条带清晰稳定;当酶用量大于 1.5 U 时产物弥散(图 5)。因此,*Taq* 聚合酶的用量为 1.0 U 最佳。

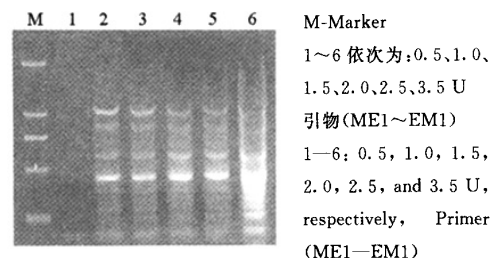


图 5 *Taq* DNA 聚合酶量对 SRAP 反应的影响

Fig. 5 Effects of *Taq* DNA polymerase concentration on SRAP patterns

2.6 预变性时间和延伸时间:用引物 ME3-EM4 考察了预变性和延伸时间对 SRAP 反应的影响,结果表明预变性时间和延伸时间对扩增结果无太大影响,延伸时间在 1~10 min,变性时间在 1~5 min 扩增条带无太大差异。比较后选择预变性时间 3 min,延伸时间为 7 min。见图 6、7。

3 讨论

以黄花蒿 DNA 为材料,建立了重复性好,分辨率高的 SRAP 反应体系,即在 25 μ L 反应体系中,模板 DNA 为 30~105 ng,2.5 μ L 的 10 倍 Buffer

(Mg^{2+} free) 缓冲液,2.0 mmol/L $MgCl_2$,0.25 mmol/L dNTPs,1.0 U *Taq* 酶,2.0 μ mol/L 引物;扩增程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,35 $^{\circ}C$ 复性 1 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,5 个循环;94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,50 $^{\circ}C$ 复性 1 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。

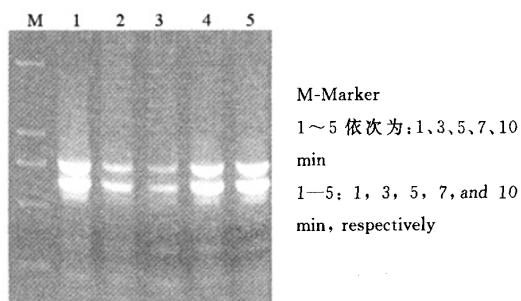


图 6 延伸时间对 SRAP 反应的影响

Fig. 6 Effects of amplification time on SRAP patterns

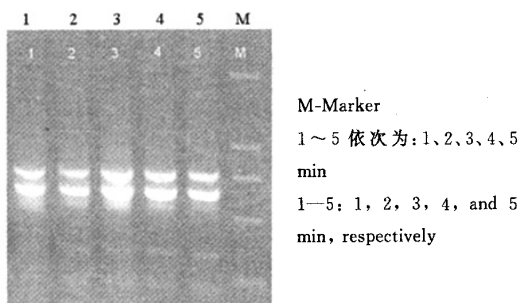


图 7 预变性时间对 SRAP 反应的影响

Fig. 7 Effects of initially denaturing time on SRAP patterns

对黄花蒿 SRAP 扩增影响最大的是 dNTPs、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶浓度,引物的适宜浓度范围比较宽,对 DNA 质量浓度要求不高,这与任羽等^[7]对辣椒和武志朴等^[10]对小麦的研究是相同的;预变性时间和延伸时间没有太大影响,这与武志朴等^[10]对小麦的研究不同,原因可能是植物基因组大小或所用仪器、试剂不同所致。黄花蒿的 SRAP 扩增程序中开始 5 个循环退火温度为 35 $^{\circ}C$,确保两引物与靶 DNA 上位点的结合,后 35 个循环的退火温度上升到 50 $^{\circ}C$,从而保证了反应稳定可重复性,如果退火温度在 40 个循环中始终保持 35 $^{\circ}C$,则扩增的重复性会很差。

SRAP 是对 ORFs 开放阅读框进行扩增,对基因相对较少的着丝粒附近及端粒的扩增较少,如结合可扩增这些区域的 SSR 标记,可获得覆盖整个基因组的连锁图。在遗传多样性研究中,SRAP 比

AFLP 更能反映表型的多样性及进化史^[5]。由于省去了酶切,连接等的步骤,整个方法比 AFLP 操作简单,相比之下,具有更广泛的应用前景。

References:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [2] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107 (1): 168-180.
- [3] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oilseed brassica napu inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(5): 411-415.
- [4] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48(19): 2063-2067.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F, et al. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.
- [6] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48(19): 2063-2067.
- [7] Ren Y, Wang D Y, Zhang Y D, et al. Optimization of SRAP-PCR in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2004, 2(5): 689-693.
- [8] Wu W H, Wang L, Cheng G Z, et al. Studies on molecular genetics of rice blast fungus population-comparison of genetic and pathotypic structures of two rice blast fungus populations derived from Guangdong and Yunnan provinces of China [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2004, 37(5): 675-680.
- [9] Zhang L, Ye H C, Li G F. Related factors of artemisinin biosynthesis in clone strain of *Artemisia annua* L. [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, 10(3): 277-280.
- [10] Wu Z P, Yang W X, Liu D Q, et al. Establishment of SRAP technique system in wheat genome [J]. *J Agric Hebei* (河北农业大学学报), 2005, 28(3): 66-69.

前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究

王梦亮,任振兴,刘滇生

(山西大学现代化学研究所,山西 太原 030006)

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科植物的干燥根,性寒、味苦,具有清热燥湿、泻火解毒等功效^[1],含数种黄酮苷。黄芩苷(baicalin)是其主要有效成分,药理作用最强,具有抑菌抗炎^[2]、抗 HIV-1 活性^[3,4]、抗氧化^[5]、抗变态反应^[6]和清除自由基^[7]等药理作用。因此近年来,临床上对黄芩药材的需求量大增,黄芩野生资源破坏严重,产量日趋下降,有的产区种群已濒临灭绝^[8],因此利用植物组织培养技术对黄芩进行组织培养来生产其有效成分是目前供需矛盾的有效途径之一。

在植物细胞培养中,向培养基中加入目的化合物生物合成的前体及应用诱导子是提高有用次生代谢产物产量的有效途径。目前在黄芩愈伤组织培养研究中,尚未见相关的报道。本实验研究了3种前体和3种诱导子对黄芩愈伤组织合成黄芩苷的影响,旨在为黄芩苷的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:黄芩愈伤组织由本实验室从黄芩试管苗

幼茎诱导而来。培养基为 MS 培养基(附加 0.2 mg/L IAA 和 2 mg/L 6-BA),蔗糖 4%,琼脂 0.8%,pH 5.8,暗培养,(25±1)℃培养周期为 40 d。

1.2 添加前体和诱导子实验设计:前体物为乙酸钠、L-苯丙氨酸和酪氨酸;浓度梯度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L。诱导子为硝酸铈铵、水杨酸和硝酸银;浓度梯度分别为 0.01、0.1、0.5 mmol/L;0.1、1.0、10 mmol/L;0.01、0.05、0.1 mmol/L。

将新鲜黄芩愈伤组织接种于添加各种前体和诱导子的固体培养基中并立即置于培养箱中暗培养,处理时间为 40 d。对照为不添加任何前体或者诱导子。

1.3 干、鲜质量测定方法:将培养完成的愈伤组织用滤纸将表面的水吸去,放在天平上,称其鲜质量,随后放入烘箱(60℃)烘烤至恒重,再称其干质量,并可得到细胞的干质量比。

1.4 HPLC 法测定黄芩苷

1.4.1 色谱条件^[1]:ODS 色谱柱(150 mm×4.6