

(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Shimadzu VP-ODS (250 mm×4.6 mm), Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 结果显示 Shimadzu VP-ODS (250 mm×4.6 mm) 柱能够将药材各组峰很好地分开, 达到比较理想的效果。

3.5 由生成指纹图谱可以看出, 14 批防己药材指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致。同时相似度评价结果表明, 同一基地和不同产地的相似度计算结果均在 0.9 以上, 相似度较高, 说明地域性差异不明显。利用药典委员会颁布的指纹图谱软件, 能

够很好地对防己药材指纹图谱进行相似度评价。

References:

- [1] Li J P, Di L Z, Xu H. Extract and isolation of non-hydroxybenzene alkaloid in *Stephania tetrandra* S. Moore [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 407.
- [2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1995.
- [3] Sheng M Z, Zheng W G. Statement of the reasonable application of *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *J Pract Tradit Chin Med* (实用中医药杂志), 2004, 20(6): 326.
- [4] *Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂色谱指纹图谱实验研究的技术要求(试行)) [S]. 2000.

青牛胆 SRAP 标记反应体系的建立与优化

杨 兵, 王天志*, 罗 禹, 陈 璐

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘 要:目的 为青牛胆的物种鉴定和遗传图谱的构建寻找一种新的途径。方法 采用序列相关扩增多态性(Sequence related amplified polymorphism, SRAP)技术对青牛胆 DNA 进行 PCR 扩增, 逐级优化反应参数。结果 优化得到稳定重复性好的青牛胆 SRAP 反应体系。结论 SRAP 技术在分子水平上对青牛胆进行鉴定是一种行之有效的手段, 为今后进一步的青牛胆物种鉴定、遗传图谱的构建等研究奠定基础。

关键词: 青牛胆; SRAP; 分子标记

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0272-04

Establishment and optimization of SRAP reaction system in *Tinospora sagittata*

YANG Bing, WANG Tian-zhi, LUO Yu, CHEN Lu

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To develop a new method for *Tinospora sagittata* species identification and genetic map construction. **Methods** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was applied for *T. sagittata* to carry on PCR amplification of its DNA and optimize the reaction parameter grade by grade. **Results** The stable and reproducible SRAP reaction system of *T. sagittata* has been developed. **Conclusion** SRAP is an effective method for *T. sagittata* identification in molecular degree and it has set up a foundation for the further species identification and genetic map construction of *T. sagittata*.

Key words: *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); molecular marker

青牛胆 *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep 是防己科青牛胆属植物, 药用其块根, 又称金果榄, 为《中国药典》历版所收载。有清热解毒、利咽止痛等功效。目前药用青牛胆为野生, 复杂的野外环境造成其植株的形态变异。本课题材料采自四川巴中地区, 其植株形态差异极大。因此, 从分子水平对青牛胆进行

物种鉴定以控制其药材质量变得日益重要。SRAP (sequence related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是由 Li 等^[1]提出的一种新的分子标记技术。SRAP 标记是针对基因外显子中 GC 丰富而启动子、内含子里 AT 丰富的特点来设计引物进行 PCR 扩增, 因不同个体的内含子、启动子与间隔

收稿日期: 2006-08-08

作者简介: 杨 兵 (1981-), 男, 四川遂宁人, 生药学研究生在读, 主要从事天然药物品质评价与化学成分研究。

E-mail: only-miracle@tom.com

* 通讯作者 王天志 Tel: (028) 85503639

区长度不等而产生多态性。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]。目前已应用于棉花^[3]、小麦^[4]、辣椒^[5]等作物,而在药用植物中的应用研究较少。本实验以青牛胆为材料,对反应程序、模板、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶浓度,预变性,延伸时间等的最佳反应条件进行探索,力求建立适用于青牛胆的 SRAP 反应体系,从而为利用 SRAP 标记技术进行物种遗传变异分析和构建遗传图谱奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:青牛胆采自四川巴中地区,经四川大学华西药学院王天志教授鉴定。新鲜嫩叶经变色硅胶快速干燥冰冻保存备用。

加拿大哥伦比亚大学提供的 SRAP 引物序列在 TaKaRa 公司合成,10 倍 Buffer (Mg^{2+} free, 即不含 Mg^{2+})、 Mg^{2+} 、dNTP 和 *Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司,Rnase (RNA 裂解酶,购自 Sigma 公司)。

高速离心机 (BIOFUGE, Heraeus), PCR 仪 (BIO-RAD, icycler), DYY-III 12B 型三恒多用电泳仪 (北京六一仪器厂),凝胶成像分析系统 (BIO-RAD)。

正向引物 ME2, 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'; ME5, 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'。反向引物 EM3, 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'; EM4, 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'; EM6, 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'。

1.2 青牛胆总 DNA 的提取及定量:CTAB 法提取总 DNA,取约 100 mg 冷冻的青牛胆嫩叶快速研成细粉,转移至 1.5 mL 离心管中加入 700 μ L CTAB 液,振荡混匀,放置在 65 $^{\circ}$ C 金属浴保温 20 min,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,将上层水相转移至另一洁净离心管中,加入等体积的无水乙醇混匀,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min,取出样品在室温下 8 000 r/min 离心 5 min,使 DNA 附于管底,去上清液,空气干燥,加入 100 μ L ddH₂O、2 μ L Rnase,36 $^{\circ}$ 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,紫外下凝胶成像,并用荧光定量分析软件 totallab v2.01 测定所提 DNA 的质量浓度约为 10 ng/ μ L。

1.3 SRAP-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,且参考本实验室的条件:终浓度为 0.2 mmol/L 的 10 倍 Buffer (Mg^{2+} free) 2.5 μ L,2 mmol/L 的 Mg^{2+} 2 μ L,0.2 mmol/L 的 dNTP 2 μ L,1 μ mol/L 的引物各 1 μ L,2.0 U *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L,模板 1 μ L,ddH₂O 补足 25 μ L 反应体系在 Bio-RAD 基因扩增仪上进行反应程序优化。

1.3.1 引物筛选:用本实验室现有的引物组合 ME2-EM3、ME2-EM4、E2-EM6、ME5-EM4、ME5-EM6 在上述条件下进行引物筛选,结果见图 1,选择组合 ME2-EM4 进行反应体系优化。以上述体系为基础,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。

1.3.2 模板浓度优化:每反应含模板 DNA 量分别为 5、10、20、30、50、70 ng (图 2)。

1.3.3 Mg^{2+} 浓度优化:每反应 Mg^{2+} 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、5.0 mmol/L (图 3)。

1.3.4 dNTP 浓度优化:每反应 dNTP 终浓度分别

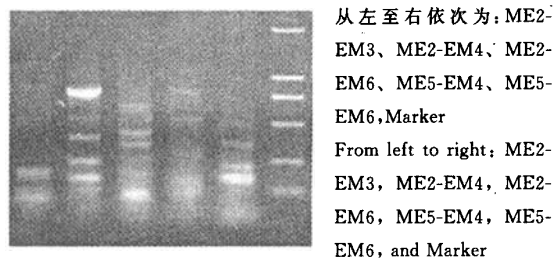


图 1 引物筛选

Fig. 1 Primer sieving

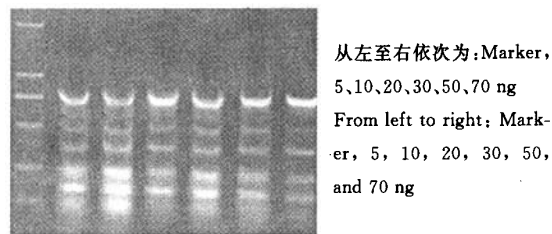


图 2 模板浓度的影响

Fig. 2 Template concentration's impact

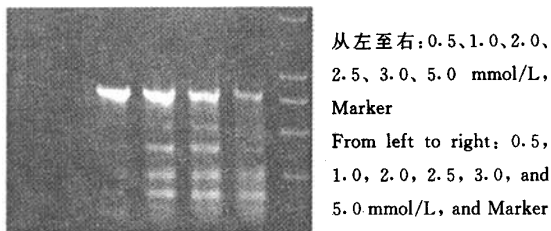


图 3 Mg^{2+} 浓度的影响

Fig. 3 Mg^{2+} Concentration's impact

为 0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.5 mmol/L(图 4)。

1.3.5 引物浓度优化:每反应引物终浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ (图 5)。

1.3.6 *Taq* 聚合酶浓度优化:每反应酶终浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 U(图 6)。

1.3.7 预变性时间及延伸时间的考察:预变性时间分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 min(图 7);延伸时间分别为 1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 min(图 8)。

1.4 扩增产物电泳分析:在 1.4% 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成像。

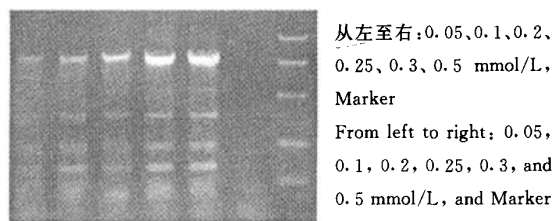


图 4 dNTP 浓度的影响

Fig. 4 dNTP Concentration's impact

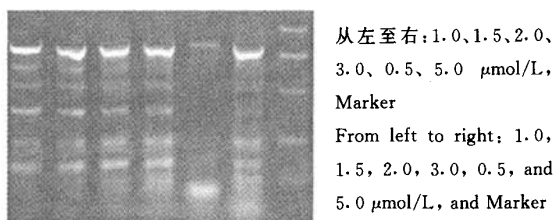


图 5 引物浓度的影响

Fig. 5 Primer concentration's impact

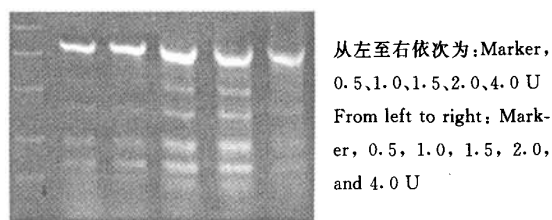


图 6 *Taq* 聚合酶浓度的影响

Fig. 6 *Taq* Polymerase concentration's impact

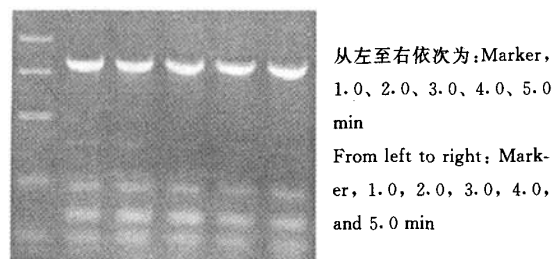


图 7 预变性时间的影响

Fig. 7 Initial denaturation time's impact

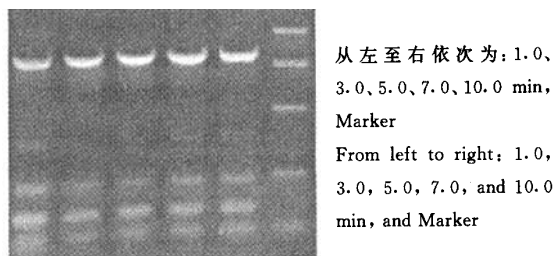


图 8 延伸时间的影响

Fig. 8 Prolongation time's impact

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 DNA 小于 5 ng 时产物少,条带模糊,在 5~70 ng 时扩增条带稳定且几乎无差异(图 2),因此青牛胆 DNA 的浓度范围在 5~70 ng,考虑节约模板与实验操作的准确性,本实验采用模板浓度为每 25 μL 反应体系 10 ng。

2.2 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增的影响:反应混合物中 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 反应的特异性和扩增效率均有影响,浓度过高或过低都会导致扩增反应失败。 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。对于青牛胆 DNA, Mg^{2+} 浓度小于 2.0 mmol/L 时无扩增;2.5~3.0 mmol/L 时条带清晰稳定,大于 3.0 mmol/L 时条带弥散变弱(图 3)。因此, Mg^{2+} 适宜浓度为 2.5 mmol/L。

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,dNTPs 浓度过高时,会从两方面影响 PCR 扩增,一方面错配率大大增加,另一方面同 *Taq* DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} ,使反应体系中的 Mg^{2+} 总量下降,*Taq* DNA 聚合酶活性受到影响。dNTPs 浓度低于 0.10 mmol/L 时扩增产物强度较低;在 0.25~0.30 mmol/L 时条带多且清晰,达到 0.5 mmol/L 时几乎无扩增产物(图 4)。因此,dNTPs 的最佳浓度为 0.25 mmol/L。

2.4 引物浓度对 SRAP 扩增的影响:用 ME2-EM4 引物,比较了引物浓度差异对扩增结果的影响。引物浓度在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时条带很少,在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时条带清晰且条带较多,在 3.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时逐渐出现弥散状(图 5)。引物适宜浓度范围为 1.0~3.0 $\mu\text{mol/L}$,从节约成本考虑,本实验选择引物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5 *Taq* DNA 聚合酶对 SRAP 扩增的影响:*Taq* 聚合酶用量的多少直接影响 PCR 反应的成败,酶量过

低,导致无扩增;酶量过高,使非特异性产物增加。当酶用量为0.5 U时扩增产物较少,在1.0~2.0 U时扩增条带逐渐清晰稳定;当酶用量达4.0 U时产物弥散(图6)。因此,*Taq*聚合酶的用量为1.5 U最佳。

2.6 预变性时间及延伸时间 SRAP 扩增的影响:本实验预变性和延伸时间对 SRAP 反应的影响进行了考察,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。从缩短实验周期和节约成本考虑,最终选择预变性2 min,延伸5 min(图7、8)。

3 讨论

本实验最终以青牛胆 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 质量浓度为10 ng/ μ L,2.5 μ L 的10倍 Buffer (Mg^{2+} free) 缓冲液, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L,dNTPs 为0.25 mmol/L,引物1.0 μ mol/L,*Taq* 酶1.5 U;扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性2 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5 min、35个循环。

对青牛胆 SRAP 扩增最为敏感的因素是 Mg^{2+} ,dNTPs,*Taq* DNA 聚合酶浓度,而模板适宜浓度范围较宽,5~70 ng 均有良好扩增,引物浓度要求也不高,这与武志朴等对小麦^[4]及任羽等^[5]对辣椒的研究结果是一致的。扩增前5个循环退火温度为50 $^{\circ}$ C,保证反应稳定可重现性。

SRAP 是对 ORFs 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^[6],且比 AFLP 操作简单,省去了酶切,连接等烦琐的步骤,在药用植物种质资源评价等方面具有广泛的应用前景。

SRAP 技术是基于 PCR 的一种分子标记方法,是针对生物体基因组进行分析,亲缘关系越近的生物基因相似性越大,故推断本实验优化所得的反应条件对防己科青牛胆属及亲缘关系相近的其他植物同样适用。

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] 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 Breed*, 2001, 120(5): 411-415.
- [3] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Formation SRAP genetic linkage map of cotton [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48(5): 1676-1679.
- [4] Wu Z P, Yang W X, Liu D Q, et al. Establishment of SRAP technique system in wheat genome [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 2005, 28(3): 66-69.
- [5] Ren Y, Wang D Y, Zhang Y D, et al. Optimization of SRAP-PCR in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2004, 2(5): 689-693.
- [6] Ferriol M, Pico B. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.

柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的研究

姚 智¹,高文远^{1*},李克峰¹,PAEK Kee-yoeup²

(1. 天津大学药物科学与技术学院,天津 300072; 2. Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea)

摘 要:目的 探讨柴胡愈伤组织生长和其不定根诱导的适宜培养条件。方法 以无菌苗为外植体诱导获得愈伤组织后,对不同种类和不同质量浓度的生长素进行实验,并对光和温度对柴胡愈伤组织生长和其不定根诱导的影响进行了研究。结果 柴胡的愈伤组织适宜于在 MS+NAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基或 MS+NAA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基上继代培养。诱导其不定根时宜采用的培养基为 MS+IBA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L。25 $^{\circ}$ C 条件下,黑暗培养既有利于柴胡愈伤组织的生长又有利于其不定根的诱导。结论 比较适宜于柴胡愈伤组织生长的生长素为 NAA,而有利于不定根诱导的生长素为 IBA。温度对愈伤组织的生长影响非常明显,光照是其发根的限制因素。

收稿日期:2006-04-10

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05ZP10)

* 通讯作者 高文远 Tel:(022)87401895