

氮素同化上存在着一定差异。紫外吸收物主要是酚类化合物如类黄酮、黄酮醇、花色苷以及烯萜类化合物等,其中类黄酮是最主要的组分。本研究结果显示所有雌性栝楼植株的紫外吸收物的量均高于雄性植株,且其间差异达显著性水平。与李国梁等^[11]对杨梅、猕猴桃等树种中水溶性酚类物质的结果一致。推测此现象的形成原因是与类黄酮合成有关的基因在雌性栝楼植株内的表达水平高于雄性,从而使合成紫外吸收物酶的活性增高。

3.2 雌雄栝楼性别鉴定:对大多数雌雄异体的植物而言,性别分化和性别表现较迟给植株性别的早期鉴定带来很大困难,如何通过鉴定幼苗的雌雄性别而决定取舍,有助于提高经济效益。国内外学者从不同方面进行了探索,主要包括外部形态、生理生化差异、同工酶图谱、特异蛋白、染色体组型、核酸的量等方面^[12]。在本研究中,光合色素、紫外吸收物的量及 POD活性在雌雄植株间均呈显著性水平差异,但仅紫外吸收物的量在所有栝楼雌株中均高于雄株,如采用更多已知性别的植株作进一步验证,紫外吸收物可作为鉴定栝楼植株性别的有效指标。HPLC分析结果显示在相同色谱条件下,雌雄植株样品的出峰时间、出峰数目、峰高等均存在差异,说明雌雄植株所含的化学物质组分及量存在较大差别。进一步检测更多的样品,确定图谱差异与性别的相关性并

寻找最具代表性的性别相关峰,该方法亦有望成为鉴定栝楼性别的有效途径。

致谢:本实验材料的收集工作得到浙江省农业科学院萧山棉麻研究所金关荣高级实验师的大力支持。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [2] 王英典, 刘宁. 植物生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [3] 李合生. 植物生理生化实验原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 韩榕, 岳明, 王勋陵. He-Ne激光对小麦幼苗增强 UV-B 辐射损伤的修复效应 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(2): 263-269.
- [5] 李珊, 钱增强, 蔡宇良, 等. 金钱槭和云南金钱槭遗传多样性比较研究 [J]. 植物生态学报, 2005, 29(5): 785-792.
- [6] 王双明, 李琼芳, 李庆. 雌雄银杏植株叶片生理生化特性的比较研究 [J]. 农业现代化研究, 2003, 24(6): 470-472.
- [7] 赵林森, 程向阳, 徐锡增, 等. 复叶槭雌雄株叶片中水溶性酚类物质的比较分析 [J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(3): 229-232.
- [8] 温伟庆, 陈友吾. 银杏雌雄株过氧化物酶和过氧化氢酶活性差异研究 [J]. 福建林业科技, 2002, 29(2): 34-39.
- [9] 吴少华, 史锋, 沈德绪. 超氧化物歧化酶在猕猴桃植物中的分布 [J]. 果树科学, 1996, 13(3): 181-182.
- [10] 何长征, 艾辛, 匡逢春. 不同性型黄瓜植株保护酶类活性的差异 [J]. 湖南农业大学学报, 2001, 27(4): 289-291.
- [11] 李国梁, 林伯年, 沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄植物中的应用研究 [J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 397-398.
- [12] 李瑞丽, 卢龙斗, 高武军, 等. 雌雄异株植物性别鉴定的研究进展 [J]. 广西植物, 2006, 26(4): 387-391.

青箱 SRAP体系的建立和优化^①

郭庆华, 郭美丽*, 薛芊, 冯娜, 张汉明

(第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 探讨影响青箱 SRAP(sequence-related amplified polymorphism)扩增的各种因素,建立并优化青箱 SRAP反应体系,为分子水平鉴定青箱子及其伪品,探讨青箱不同种质间的亲缘关系奠定基础。方法 用 CTAB法提取青箱 DNA,设计 Taq 酶浓度(0.02 0.04 0.06 U/μL)、dNTP浓度(0.10 0.20 0.30 mmol/L)、Primer浓度(0.15 0.30 0.45 μmol/L)3水平 3因素试验和 Mg²⁺浓度(0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 mmol/L)8水平单因素试验。在 25 μL体系中加入模板 DNA 20 ng,对体系进行优化,用琼脂糖进行检测。结果 建立了适合青箱的 SRAP体系,在 25 μL体系中, DNA 为 20 ng, Taq 酶浓度为 0.04 U/μL, dNTP浓度为 0.30 mmol/L, Primer浓度为 0.30 μmol/L, Mg²⁺浓度为 2.5 mmol/L,优化后的体系目标条带增多,且比较稳定,重现性好,得到了较好的扩增效果。结论 本研究建立的反应体系适合青箱 SRAP的研究。为从分子水平鉴定青箱子正品与伪品以及鉴定青箱不同种质资源奠定了基础。

关键词:青箱; SRAP; 反应体系

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)02-0263-04

① 收稿日期: 2007-06-08

作者简介: 郭庆华(1976-),女,山东潍坊人,药师,在读硕士研究生。E-mail: lily_gqh@126.com

* 通讯作者: 郭美丽 Tel: (021) 25074576 E-mail: mlguo@smmu.edu.cn

Establishment and optimization of sequence-related amplified polymorphism system for *Celosia argentea*

GUO Qing-hua, GUO Mei-li, XUE Qian, FENG Na, ZHANG Han-ming

(Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective To study the factors of influencing the amplification of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) system in *Celosia argentea*, and to develop and optimize the SRAP reaction system, laying a foundation for identifying spurious breed at molecular level and researching genetic relationships between different germplasms of *C. argentea*. **Methods** Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) method was used to extract the genomic DNA of *C. argentea*. The tests with three factors at three levels were designed, including *Taq* polymerase concentrations (0.02, 0.04, and 0.06 U μ L), dNTP concentrations (0.10, 0.20, and 0.30 mmol/L), and Primer concentrations (0.15, 0.30, and 0.45 μ mol/L). Furthermore, eight tests were designed based on the single factor of Mg²⁺ concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 mmol/L). DNA Template (20 ng) was added into 25 μ L SRAP reaction system, which was optimized. Agarose electrophoresis was used for detection. **Results** An efficient SRAP reaction system for *C. argentea* was developed. The optimum system was as follows: DNA (20 ng) *Taq* polymerase 0.04 U μ L, dNTP 0.30 mmol/L, Primer 0.30 μ mol/L, and Mg²⁺ 2.5 mmol/L. The total volume for reaction was 25 μ L. Target bands were stable with good reproducibility after optimization and the amplification results were satisfactory. **Conclusion** The SRAP reaction system in this study is suitable for analysis of *C. argentea*, laying a foundation for identification of false from genuineness at the molecular level and genetic research among different germplasms of *C. argentea*.

Key words *Celosia argentea* L.; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); reaction system

序列相关扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是由 Li和 Quiros发展的一种新型分子标记技术^[1]。该标记通过独特的引物设计对开放式阅读框 (open reading frames, ORFs)进行扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。与常用的分子标记 AFLP RFLP ISSR SSR和 RAPD比较, SRAP具有其他分子标记所不具有的优点。AFLP操作步骤繁琐,不易对每一步骤进行优化,虽然借助于 AFLP试剂盒可取得比较好的效果,但研究费用高; RFLP实验过程复杂,不易实现自动化,对 DNA的需要量大; RAPD重复性低,产率低。SRAP标记将 AFLP和 RAPD两者的优点相结合,具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段等特点,适用于基因定位、基因克隆、生物多样性研究、遗传图谱构建、cDNA指纹图谱构建、预测杂种优势、比较基因组学等诸多研究方面^[1-5]。目前, SRAP标记已经在马铃薯、水稻、苹果、柑橘类果树、樱桃、梅子、油菜、大蒜、莴苣、芹菜^[1]、棉花^[6]、辣椒^[7]等植物中研究应用。

青箱子为苋科一年生草本植物青箱 *Celosia argentea* L. 的干燥成熟种子,始载于《神农本草经》,疗唇口青,列为下品,具有清肝、明目、退翳之功

效^[8]。青箱子具有保肝^[9]、抗肿瘤^[10]、抗糖尿病^[11]等作用,并且对化学性肝损伤具有较好的防治作用。青箱子在我国分布广泛,同属植物鸡冠花子 *Celosia cristata* L. 和苋属多种植物的干燥成熟种子与青箱子在性状上均非常相似,种子细小且难以区分,并且由于各地用药习惯的影响而误收误用,造成了目前青箱子药材品种混乱,质量低劣等问题。所以快速特异性的鉴别品种间的差异对于青箱子及伪品的区分具有很重要的意义。本研究采用 SRAP新型分子标记技术,建立并优化了青箱子 SRAP技术分析体系,为从分子水平鉴定青箱子正品与伪品以及鉴定青箱子不同种质资源提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料:青箱子采集于福建福州,将青箱子的种子种在软塑料钵中,放在昼夜 30℃ 的恒温培养箱内生长约 10 d,取其幼苗嫩叶。

1.2 试剂:所需 PCR试剂: dNTP Mixture 10 \times PCR buffer *Taq* 酶及无菌超纯水均购自天根生化科技有限公司, DNA Marker DL 2000购自博光公司,琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司,引物由上海生工生物公司合成。

1.3 主要仪器: PCR仪 (Biometra公司),高速离心

机 (Eppendorf公司), ELITE300型电泳仪 GES型电泳槽、Dolphin-DOC凝胶成像系统均为美国 Wealtec 公司产品, PL3002型电子天平 (Mettler Toledo 公司), QL-901涡旋器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), P270型摇床 (中国科学院武汉科学仪器厂), DK-S12型电热恒温水浴锅 (上海华连医疗器械有限公司), 紫外分光光度计 (Thermo公司)。

1.4 方法

1.4.1 DNA的提取: 取 1.0 g叶片在液氮中研磨成粉末, 青箱叶片基因组 DNA提取参照 CTAB法^[12]。

1.4.2 DNA浓度与质量测定: 用 Thermo紫外分光光度计测定样品 DNA浓度与纯度质量, 测定吸光度值在 1.75~ 1.90; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA质量: 5 μ L DNA样品+ 2 μ L溴酚蓝上样缓冲液, 加样于含溴化乙锭 (EB)凝胶上, 于 4 V/cm 电压下电泳 0.5 h后, 紫外灯下观察 拍照。

1.4.3 SRAP反应体系的优化: PCR反应程序采用 Li^[11]应用于蔬菜上的反应程度: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 反应前 5个循环在 94 $^{\circ}$ C、1 min, 35 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、2 min条件下运行; 随后的 30个循环复性温度提高到 50 $^{\circ}$ C, 最后 72 $^{\circ}$ C延伸 5 min 反应体积 25 μ L, 设计 Taq 酶 dNTP 引物浓度的 3因素 3水平实验 (表 1), 和 Mg²⁺ 浓度 8水平单因素试验, 在 25 μ L体系中加入模板 DNA 20 ng, 用 Me2 (TGA GTC CAA ACC GGA GC) 和 Em3 (GAC TGC GTA CGA ATT GAC) 引物组合进行 PCR扩增以确定最佳反应体系, 扩增产物用 1.6%的琼脂糖凝胶检测。

2 结果与分析

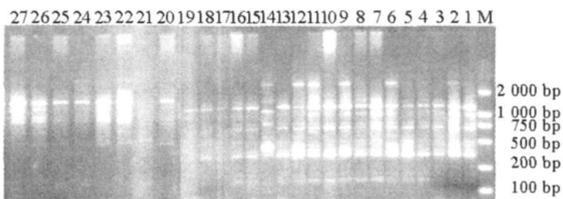
DNA浓度对青箱 SRAP扩增影响不是很大, 为了节省 DNA和方便取样, 本研究使用在 25 μ L体系中加入模板 DNA 20 ng 根据扩增主带的稳定性和均匀程度以及经济性原则, 选定第 11泳道为最佳组合: dNTP的浓度为 0.30 mmol/L, 引物的浓度为 0.30 μ mol/L, 酶的用量为 0.04 U μ L (图 1)。扩增产物经琼脂糖电泳检测表明, Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L时, 条带清晰, 无弥散现象, 而且特异性高; 同时反应体系具有较好稳定性和可重复性, 因此确定 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L最佳 (图 2)。利用优化后的反应体系能够有效地对青箱基因组进行 SRAP 扩增, 该反应体系实用性强。

Taq 酶、dNTP Mg²⁺ 及引物浓度均影响 PCR 扩增的结果。Taq DNA聚合酶是 PCR反应中不可

表 1 Taq 酶、dNTP和引物浓度的 3因素 3水平试验

Table 1 Three factor-test of three concentrations of Taq polymerase, dNTP, and primer

编号	Taq 酶 / (U μ L ⁻¹)	dNTP / (mmol μ L ⁻¹)	引物浓度 / (μ mol μ L ⁻¹)
1	0.02	0.20	0.30
2	0.02	0.20	0.45
3	0.02	0.20	0.15
4	0.02	0.10	0.15
5	0.02	0.10	0.30
6	0.02	0.10	0.45
7	0.02	0.30	0.45
8	0.02	0.30	0.15
9	0.02	0.30	0.30
10	0.04	0.30	0.45
11	0.04	0.30	0.30
12	0.04	0.30	0.15
13	0.04	0.20	0.15
14	0.04	0.20	0.30
15	0.04	0.20	0.45
16	0.04	0.10	0.15
17	0.04	0.10	0.45
18	0.04	0.10	0.30
19	0.06	0.10	0.45
20	0.06	0.10	0.15
21	0.06	0.10	0.30
22	0.06	0.30	0.45
23	0.06	0.30	0.15
24	0.06	0.20	0.15
25	0.06	0.20	0.45
26	0.06	0.20	0.30
27	0.06	0.30	0.30

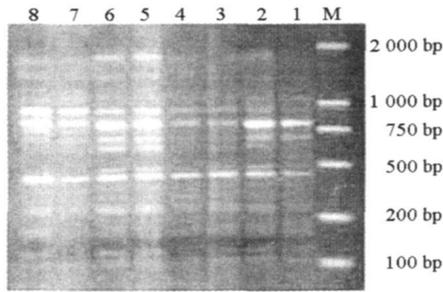


编号 1- 27为与表 1对应的琼脂糖泳道编号
No. 1- 27, corresponding to 1- 27 agarose electrophoresis lanes in Table 1

图 1 Taq 酶、dNTP 引物 3因素对 SRAP 扩增结果的影响

Fig. 1 Influence of Taq polymerase, dNTP, and primer on SRAP amplification results

缺少的, 浓度过高可引起非特异性扩增, 浓度过低则合成产物量减少, 试验当中 Taq DNA聚合酶为 0.04 U μ L时效果较好。Mg²⁺ 为 Taq DNA聚合酶的激活剂, 扩增体系中不同 Mg²⁺ 浓度对青箱子 SRAP的影响见图 2, 当 Mg²⁺ 浓度为 0.5~ 2.0 mmol/L时, 条带较少且不清晰, 说明 Mg²⁺ 浓度过低对 Taq DNA聚合酶的活化不够, 影响扩增效果。当 Mg²⁺ 浓度增加到 2.5 mmol/L时, 所有条带基本



1- 8 Mg^{2+} 浓度分别为: 0.5 1.0 1.5 2.0
2.5 3.0 3.5 4.0 mmol/L

1- 8 Mg^{2+} concentration 0.5, 1.0, 1.5, 2.0,
2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 mmol/L, respectively

图 2 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Fig. 2 Influence of Mg^{2+} on SRAP
amplification results

可见,条带的明亮度明显增加,且条带清晰。随着 Mg^{2+} 浓度的进一步提高,条带明亮度增加,但弱带不能分辨,条带数显著减少,说明 Mg^{2+} 浓度过高会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,并增加错配率。因此 2.5 mmol/L Mg^{2+} 是进行青箱 SRAP 扩增的最适浓度。dNTP 是 PCR 反应的原料,浓度过低会降低 PCR 产物的产量,同时,dNTP 能与 Mg^{2+} 结合,浓度过高将使游离的 Mg^{2+} 浓度降低,因此试验中选择 dNTP 浓度为 0.30 mmol/L 引物的浓度为 0.30 μ mol/L,浓度过低时扩增的带较少,浓度过高,会引起错配和非特异性扩增,且会增加引物之间形成二聚体的机会。

3 讨论

SRAP 扩增体系中,各因素间互相影响,所以,必须搞清各因素间的互作效应,才能建立最优化的反应体系。本实验优化了适应青箱的反应体系,结果表明,SRAP 标记实验操作过程简单,扩增条带清晰,结果稳定,是一种兼有 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 标记的优点,同时又克服了它们的一些缺点的新型 DNA 分子标记。研究发现,SRAP 对青箱 DNA 浓度的要求不高,有一个较宽的浓度适宜范围,但浓度太低时无扩增带,太高时特异性条带又很难出现。在 25 μ L 体系中,20~80 ng DNA 均能扩增出完整的条带,针对这一特点,在本试验中加入模板 DNA 20 ng,但基因组 DNA 质量好、纯度高是保证扩增效果佳、重复性好的先决条件。实验中还发现不同厂家的 *Taq* 酶对青箱 SRAP 扩增影响较大,本实验采用天根公司的 *Taq* 酶,取得较好的扩增效果。PCR 反应程序按照 Li 和 Quiros^[1] 的反应程序对青箱 DNA 进行扩增,扩增产物稳定性好,产率

高,谱带清晰。最终,本实验通过优化比较得出了适合青箱的反应体系,即:dNTP 浓度为 0.30 mmol/L 引物浓度为 0.30 μ mol/L 酶的用量为 0.04 U/ μ L Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时最佳,经过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测发现小片段条带明显增多,且条带比较稳定,重复性好,从而获得了适合青箱这一物种基因组的 SRAP 扩增体系。

青箱子为《中国药典》记载品种,是常用的清肝明目中药,但是由于青箱子与其同属植物鸡冠花的种子和同科植物反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 的种子在形态上难以鉴别以及各地用药习惯的差异,造成了目前药材市场上青箱子品种混乱,掺伪现象严重,药材的品质参差不齐等问题。因此,快速特异性地鉴别青箱子药材对于确保青箱子药材的质量具有重要意义。本研究将 SRAP 新型分子标记技术引入青箱子分子鉴定研究,通过优化比较得出了适应青箱这一物种的 SRAP 反应体系,为从分子水平鉴定青箱子正品与伪品以及探讨青箱不同种质资源的亲缘关系提供参考。

参考文献:

- [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 trans-cryptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168-180.
- [3] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oil seed Brassica napus inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(5): 411-415.
- [4] Ferriol M, Hco B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.
- [5] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.基于 SRAP 技术的棉花遗传连锁图谱的构建 [J]. *科学通报*, 2003, 48(19): 2063-2067.
- [6] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.新型标记 SRAP 在棉花 F2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622-626.
- [7] 任羽,王得元,张银东,等.辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(5): 689-693.
- [8] 中国药典 [S]. Vol I. 2005.
- [9] Tadao A. *Amino Acids* [M]. Tokyo: The Japan Essential Amino Acids Association, Incorporated, 1987.
- [10] Hase K, Basnet P, Kadota S, et al. Immuno stimulating activity of celosian, an anti-hepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(3): 216-219.
- [11] Hayakawa Y, Fujii H, Hase K, et al. Anti-metastatic and immunomodulating properties of the water extract from *Celosia argentea* seeds [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(11): 1154-1159.
- [12] Sambrook J, Russell D W. *分子克隆实验指南* [M]. 北京: 科学出版社, 2002.