

另外,通过这3种成分及糖碱比的测定可以粗略估计枸杞的总体品质,这可以大大简化检测工作,无疑是对枸杞品质进行粗略检测时的科学、高效、经济的方法。

4.2 土壤是生态系统中物质和能量交换的重要场所,枸杞生命活动所需的水分和营养物质绝大部分是通过根系从土壤中吸收的,土壤中各营养物质将直接或间接影响枸杞的生长发育和品质表现,尤其是变化较大的各种肥力因子。本研究通过枸杞各品质指标与土壤中各肥力因子的两种相关性分析可以看出,各品质指标大小分别受土壤中各种肥力因子的共同影响,而非单一作用,只是作用大小与方向不同。所以在做相关性分析时,应改变以往只做的简单相关性分析,而采用控制土壤其他肥力因子的偏相关分析,尤其是对于那些在两种分析下差异较大的指标。因此在施肥时应该综合考虑各种肥力因子对枸杞每一活性成分的协同作用,不要只片面考虑其单一的相关性,尤其是对枸杞总糖、甜菜碱和类胡萝卜

素的综合作用。该研究可以为枸杞的合理施肥提供参考。但枸杞品质除土壤肥力外还受其他环境因素的影响,尤其是它们的综合作用,有关这一方面还有待于进一步深入系统研究。

参考文献:

- [1] 张自萍, 黄文波, 廖国玲, 等. 枸杞子提取液抗氧化活性的研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(5): 943-946.
- [2] 许兴, 郑国琦. 宁夏枸杞耐盐性与生理生化特性研究 [J]. 中国生态农业学报, 2001, 10(3): 56-59.
- [3] 中华人民共和国国家标准 [S]. T 18672. 2002.
- [4] 张自萍, 黄文波. 枸杞总黄酮和多糖的超声提取及含量测定 [J]. 农业科学研究, 2006, 27(1): 22-24.
- [5] 张自萍, 郭荣, 史晓文, 等. 不同采摘期枸杞品质变化研究 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 126-130.
- [6] 白寿宁. 宁夏枸杞研究(上册) [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998.
- [7] 李忠, 彭光华, 张声华. 非水反相高效液相色谱法分离测定枸杞子中的类胡萝卜素 [J]. 色谱, 1998, 16(4): 341-343.
- [8] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1978.
- [9] 高业新, 李新虎. 宁夏枸杞的道地性研究 [J]. 地球学报, 2003, 4, 24(2): 193-196.

红花 cDNA-AFLP 反应体系的优化研究

冯娜, 郭美丽*, 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 为构建红花的遗传连锁图谱和功能基因的研究,探讨影响红花 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA amplified fragment length polymorphism, cDNA-AFLP)的各种因素,建立并优化红花 cDNA-AFLP 反应体系。方法 以红花新鲜花瓣为材料,针对其内含物特殊性对 Trizol 法加以改进提取 RNA,采用无 RNase H 活性的鼠源反转录酶(M-MLV RTase)结合置换合成法反转录双链 cDNA;两步法酶切与连接,优化酶切时间;连接产物和预扩产物分别设置不同稀释倍数扩增并对选扩反应体系略微调整后,用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离,银染检测。结果 改进 Trizol 法得到的红花总 RNA 样品较为完整,纯度较高,可直接用于双链的合成;经无 RNase H 活性反转录酶结合置换合成法得到高质量的 cDNA 模板。建立优化后的红花 cDNA-AFLP 体系为:250 ng cDNA 37℃ 6h 经限制性内切酶 MseI 和 EcoRI 完全酶切,16℃ 连接 12h;连接产物最佳稀释倍数为 10 倍;预扩产物稀释为 150 倍;PAGE 电泳得到清晰、稳定、分辨率较高的多态性条带。结论 本研究建立的反应体系适用于红花功能基因的 cDNA-AFLP 研究。

关键词:红花; cDNA-AFLP; 优化

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)08-1242-05

Optimization of cDNA-AFLP reaction system for *Carthamus tinctorius*

FENG Na, GUO Mei-li, ZHANG Han-ming

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

Abstract: Objective To construct for the heredity linkage map and to study the functional gene research of *Carthamus tinctorius*, the factors affecting cDNA amplified fragment length polymorphism

收稿日期:2007-12-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772734);上海市基础研究重点项目(043919313)

作者简介:冯娜(1981—),女,辽宁沈阳人,硕士,方向为药用植物功能基因研究。E-mail: fn_lwf@hotmail.com

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

(cDNA-AFLP) of *C. tinctorius* were investigated with developing and optimizing the cDNA-AFLP reaction system. **Methods** Improved Trizol method was used to extract RNA from compounds in new petals specific to safflower. With the help of M-MLV RTase without RNase activity combined with replacement synthesis method, double-stranded cDNA was synthesized from total RNA; cDNA was digested by restriction enzyme *MseI*/*EcoRI* and ligated by two steps. Then the products were provided for pre-amplification and selected amplification of different concentration gradients. After tiny modifications of system concentration, finally PAGE electrophoresis and silver-staining were performed. **Results** High purity and integrated total RNA for later cDNA synthesis were obtained and high quality cDNA was synthesized with the help of M-MLV RTase without RNase activity combined with replacement synthesis method. The cDNA-AFLP reaction system in *C. tinctorius* was as follows: 250 ng integrity cDNA was digested thoroughly at 37 °C for 6 h, and ligated 12 h at 16 °C. Furthermore, the sample dilution multiplication was 10 fold for pre-amplification and 150 fold for selected amplification under the proper system concentration. According to the above reaction system, the polymorphous strips with high resolution power in PAGE electrophoresis were clear and stable. **Conclusion** The cDNA-AFLP reaction system established and optimized in this experiment is suitable for the functional gene analysis of *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; cDNA-AFLP; optimization

红花 *Carthamus tinctorius* L. 为菊科植物红花的干燥管状花^[1],具有扩张冠状动脉、抗凝、降血压、抗炎镇痛等多种药理作用^[2],临床应用广泛。长期的自然、人工选择的结果,使红花有效成分量产生了明显的变化^[3]。有效成分的量是影响红花品质的主要因素,因此对红花品质相关功能基因进行研究,对提高红花的产量和质量具有重要意义。

cDNA-AFLP 技术,是 Bachem 等^[4]将 AFLP 技术应用于 mRNA 表达差异分析的 mRNA 指纹图谱技术,其保留了 AFLP 技术的可靠性与高效性,广泛应用于植物生长发育过程基因分离与表达特性的研究^[5,6]。本研究建立并优化了红花 cDNA-AFLP 体系,为从表达水平分离红花的功能基因并为实现红花品质性状的定向调控奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料:红花 2 个品种 (No. 0016、No. 0025) 的鲜花采自第二军医大学药学院药圃;限制性内切酶 *EcoRI*、*MseI* 购自 NEB 公司, T₄ DNA 连接酶、*Taq* 酶购自 MBI 公司;丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED 购自上海华舜生物公司;尿素 (Urea) 购自 Sigma 公司;硝酸银、剥离硅烷、亲和硅烷购自北京鼎国生物工程公司;引物、接头由上海生工生物公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器: DYCZ—20A 型电泳槽、DYY—12 型电泳仪电源 (北京六一仪器厂), 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), PL3002 型电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

1.3 接头与引物:由上海生工生物公司合成。

2 方法

2.1 模板 RNA 提取:以 0.2 g 红花新鲜花瓣为材料,参照 Trizol 方法^[7],针对红花叶片内含物特殊性加入无 RNase 的 DNaseI 和 RNase Inhibitor,得到总 RNA 存于 -70 °C 超低温冰箱中待用。

2.2 cDNA 双链合成:参照 TaKaRa M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 方法说明以 20 g 总 RNA 为材料,采用无 RNase H 活性的鼠源反转录酶 (M-MLV RTase) 结合置换合成法反转录双链 cDNA,并加入精制。测定质量浓度,保存于 -20 °C。

2.3 限制性消化与接头连接:采用 *MseI* 和 *EcoRI* 两种限制性内切酶对 cDNA 双酶切,酶切时间分别为 37 °C 3、4、6、8、10 h 5 个处理;然后用 T₄ DNA 连接酶将 *MseI* 和 *EcoRI* 接头 (表 1) 与酶切片断连接, 16 °C 12 h。酶切连接体系 (见表 2)。

表 1 cDNA-AFLP 接头和引物核苷酸序列

Table 1 cDNA-AFLP Adapters and primer nucleotide sequences

名称	核苷酸序列
<i>EcoRI</i> 接头	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i> 接头	5'-GACGATGAGTCTCGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增引物 <i>E</i> ₀₀	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
预扩增引物 <i>M</i> ₀₀	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
选择性扩增引物 <i>E</i> ₊₂	5'-GACTGCGTACCAATTCNN*-3'
选择性扩增引物 <i>M</i> ₊₂	5'-GATGAGTCCTGAGTAANN*-3'

*N 代表 ACGT 任意一种, E1~E16、M1~M16 共 16 条引物

*N represents anyone of ACGT, 16 primers altogether E1—

E16, M1—M16

表 2 cDNA-AFLP 反应体系
Table 2 cDNA-AFLP Reaction system

酶切体系	用量/ μL	连接体系	用量/ μL	预扩增体系	用量/ μL	选择性扩增体系	用量/ μL
cDNA ($100\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2.5	酶切产物	5	连接产物 $\times 10$	2.0	预扩产物 $\times 150$	2.0
<i>Mse</i> I ($12\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.25	MA ($50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.5	<i>M</i> ₀₀ ($50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.6	<i>M</i> sel+2 ($50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.6
<i>Eco</i> RI ($10\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.25	EA ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.25	<i>E</i> ₀₀ ($50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.6	<i>Eco</i> RI+2 ($10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	1.2
Buffer	4	T ₄ 连接酶 ($4\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.25	10 $\times$ PCR Buffer	2.5	10 $\times$ PCR Buffer	2.5
BSA	0.2	Buffer	1.0	Taq 酶 ($2.5\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.4	Taq 酶 ($2.5\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.4
ddH ₂ O	12.7	ddH ₂ O	1.0	dNTP ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.5	dNTPs ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.5
				ddH ₂ O	18.4	ddH ₂ O	17.8

2.4 片段的预扩增:本研究用连接产物做模板,采用预扩增引物组合 *E*₀₀/*M*₀₀,序列见(表1)建立预扩增反应体系(表2)。对连接产物设置不同的稀释倍数(5、10、15、20 倍)进行对比研究,在 Biometra PTC—200 型 PCR 仪上按以下程序扩增:72 ℃、3 min,94 ℃、30 s,56 ℃、30 s,72 ℃、1 min,30 个循环;72 ℃、5 min;4 ℃ 保温。预扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上检测,—20 ℃ 保存备用。

2.5 选择性扩增:将预扩增产物稀释 150 倍作模板,采用选择性扩增引物组合 *E*₊₂/*M*₊₂,序列见表 1,建立选择性扩增体系(表2),对预扩增产物设置不同稀释倍数(25、50、75、100、150、200 倍)对比实验,选扩反应体系根据 Bachem 等^[2]体系作略微调整。扩增程序:94 ℃、1 min,94 ℃、30 s,65 ℃、30 s 每循环降低 0.7 ℃,72 ℃、1 min 12 个循环,94 ℃、30 s,56 ℃、30 s,72 ℃、1 min 25 个循环,72 ℃、10 min;4 ℃ 保温。扩增产物在 1.5% 琼脂糖检测,—20 ℃ 保存备用。

2.6 cDNA-AFLP 扩增产物的电泳:按 30 V/cm 的电压进行 30 min 预电泳。扩增产物:溴酚兰 8:3 混合,95 ℃ 变性 8 min,立即冰浴。去除在预电泳时扩散出来的尿素后加样,采用不同的电压(1 500、2 000、2 500 V)进行电泳实验,并保持恒压状态。

2.7 银染检测:①固定胶:将胶浸在固定液中振荡 20 min 至电泳染料颜色消失。②洗胶:用超纯水洗胶 3 次,每次 8 min。③染色:将黏着胶的玻璃板移至染色液中,在摇床上摇动 30 min。④洗胶:将胶浸入超纯水中、取出沥水、立即放入盛有预冷显色液的塑料盘中。从超纯水中取出胶到放入反应液中的时间不能超过 5~10 s。⑤显色:胶在摇床上摇动至出现模板带或可见第 1 条带。将胶转至剩余的 1 升预冷的显色液中,继续显色 3~5 min 或至全部条带显现出来。⑥终止显色反应:加入 1 L 固定/终止溶液,在摇床上反应 2~3 min,终止显色反应。⑦洗胶:用超纯水漂洗聚丙烯酰胺凝胶两次,每次 5 min,室温放置干胶。

3 结果与分析

3.1 模板的制备

3.1.1 总 RNA 的提取:高纯度与浓度模板的制备是 AFLP 成功的关键,本研究针对红花花瓣内含物特殊性对 Trizol 法加以改进提取的 RNA,根据 RNA 极易降解而 RNA 酶却很稳定的情况,在加入 DNase I 消化残留植物 DNA 时,同时加入 RNase Inhibitor,可有效保证 RNA 不降解。条带清晰,可见 28S、18S、5S rRNA 3 条电泳条带,28S 的亮度是 18S 的 2 倍,没有拖带现象,基本无降解,图 1 所示;紫外分光光度检测,*A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 均在 1.8~2.0,*A*₂₆₀/*A*₂₃₀ 均在 2.0~2.3,表明所提取的 RNA 样品较为完整,纯度较高,可直接用于双链的合成。

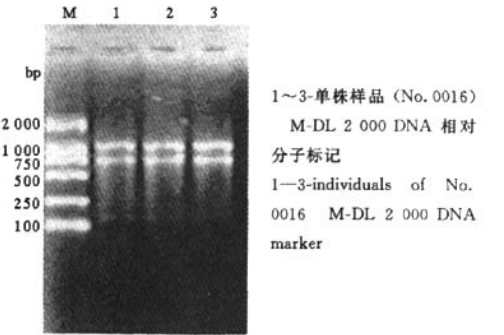


图 1 红花新鲜花瓣总 RNA

Fig. 1 Total RNA from fresh petals of *C. tinctorius*

3.1.2 双链的合成:目前,商品化反转录酶有禽源反转录酶 (AMV) 和鼠源反转录酶 (M-MLV) 两种。AMV 具有 DNA 内切活性和 RNase H 活性,对 cDNA 合成的长度和产量都有抑制,因此本研究采用了无 RNase H 活性的 M-MLV 酶。cDNA 第 2 链的合成有置换合成法和寡核苷酸引发合成法两种。笔者采用的是由 Gubler^[8]改进的置换合成法,此法既不需要对第 1 链合成产物进行纯化处理,也不用 S1 核酸酶切割双链 cDNA 的单链发夹环,合成效率很高。另外实验发现,双链 cDNA 的合成试前,先将 RNA 溶于 65 ℃ 加热 5 min 后迅速置于冰中,

可减弱二级结构的影响,提高逆转录反应效率。精制后 cDNA 无 RNA 残留,在琼脂糖上检测呈弥散状分散均匀(图2)满足后续试验的需要。

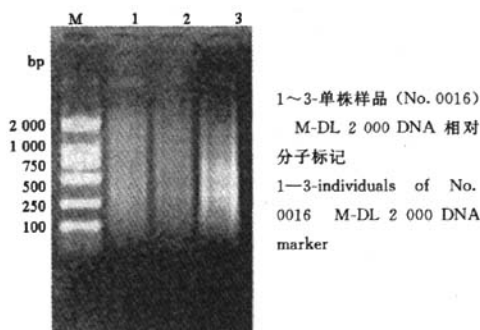


图2 红花双链 cDNA

Fig. 2 Double-stranded cDNA of *C. tinctorius*

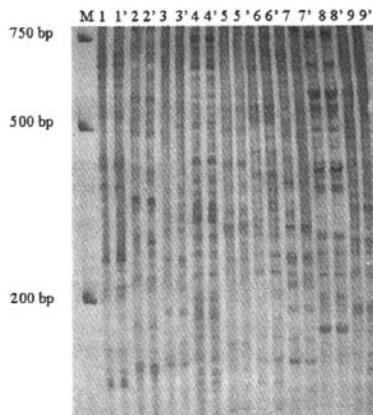
3.2 限制性消化与接头连接:酶切是否充分直接影响试验的成败,为建立适合红花的酶切时间和酶切体系,本试验做了不同酶切时间的处理。结果发现:在6~10 h,酶切时间对结果影响不大,但是时间过短酶切不充分,时间过长又会降低效率,因此选择37℃ 6 h。对比试验发现酶切连接分开的“两步法”要比“一步法”扩增的后续效果好,“一步法”效率不及“两步法”。

3.3 预扩增反应:预扩增反应起着承上启下的作用,既反映酶切和连接效果的好坏,又直接影响着选择性扩增的电泳结果。电泳结果表明,稀释倍数为10倍的相对分子质量区域未见条带,说明消化完全,连接效率较高,可进行后续实验。

3.4 选择性扩增反应:选择性扩增的条带,是从扩增产物中筛选出能被合适引物组合选择性碱基识别的片段,其结果需要用高分辨的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,引物中选择性碱基的数目影响着反应的特异性,一般 DNA-AFLP 选择性碱基数为 P_{+3} ^[9],在红花的 cDNA-AFLP 中,根据红花功能基因组的特点,本实验选择在2条引物的3'末端分别加上2个选择性碱基 E_{+2}/M_{+2} 的引物组合,每对引物平均可扩增出50~70条清晰稳定的多态性条带。对预扩产物设置不同稀释倍数对比实验,发现稀释150倍的扩增效果最好,cDNA-AFLP 扩增反应体系经略微调整优化后如表2所示。

3.5 电泳及银染:银染的操作方便、灵敏度高、具有无须使用放射性元素的优势。银染后胶板经干燥可长期保存,对于特异性条带可直接从胶板上准确切出,有利于后续的研究和分析。实验用6.0%的聚

丙烯酰胺胶2 kV 恒压电泳,玻璃板无气泡,不撕胶,分辨率高。显影溶液在温度低的环境中进行以减小背景杂色。红花2个品种(No. 0016、No. 0025)的扩增结果见图3。



1~9-红花品种 No. 0016 1'-9'红花品种 No. 0025 引物组合:

1,1'-E+AA/M+AG 2,2'-E+AT/M+TC 3,3'-E+TG/M+GA 4,4'-E+AT/M+TT 5,5'-E+TA/M+TC 6,6'-E+CA/M+GA 7,7'-E+TT/M+TC 8,8'-E+GC/M+TC 9,9'-E+TT/M+AT M-DL 2 000 DNA 相对分子标记

1—9-individuals of No. 0016 1'—9'-individuals of No. 0025

Primer combinations: 1,1'-E+AA/M+AG 2,2'-E+AT/M+TC 3,3'-E+TG/M+GA 4,4'-E+AT/M+TT 5,5'-E+TA/M+TC 6,6'-E+CA/M+GA 7,7'-E+TT/M+TC 8,8'-E+GC/M+TC 9,9'-E+TT/M+AT M-DL 2 000 DNA marker

图3 9对不同引物组合扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶银染后电泳图

Fig. 3 Silver-stained cDNA-AFLP PAGE gel by nine different primer combinations

4 讨论

到目前为止,有关药用植物红花功能基因组的研究尚未见报道,笔者曾研究了红花品种结构基因组的随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和 AFLP 分子鉴定技术^[10,11],但研究与红花重要性状的功能基因,一定要从基因表达水平入手。本研究建立的 cDNA-AFLP 体系,可快速筛选出与目的基因相连锁的标记。

cDNA-AFLP 操作步骤复杂,流程长,影响因素多,需要针对不同植物品种进行系统研究,并优化每一步反应条件,建立相应的反应体系。模板的质量直接影响 cDNA-AFLP 成功,本研究建立的 RNA 提取方法适用于红花叶片内含物特殊性,提取的 RNA 纯度在1.8~2.0,采用无 RNase H 活性的鼠

源反转录酶 (M-MLV RTase) 并应用高效置换合成法反转录双链 cDNA, 预先将 RNA 溶于 65 °C 加热 5 min, 有效地提高了逆转录的反应效率, 得到完整 cDNA 满足红花 cDNA-AFLP 的需要。根据实验结果, “两步法”在连接时可不用担心酶的过度消化, 提高了连接效率, 分别在限制性内切酶和 T₄ 连接酶的最佳温度下, 完成酶切和连接反应。采用 E₊₂/M₊₂ 的引物组合, 在 cDNA-AFLP 两次的扩增中, 产物稀释 10 倍进行预扩增, 再稀释 150 倍进行选择扩增, 扩增效果较好。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测是非常关键的一步, 也是较难操作的步骤, 染色后的洗涤时间需要根据不同的物种摸索合适的洗涤时间, 如果凝胶洗涤时间太长, 银颗粒会脱离 DNA, 产生很少或没有序列信号, 如果洗涤时间过长, 染色步骤需要重新进行。本研究的银染检测系统一次可扩增均分辨出 50~70 条扩增带。在建立 cDNA-AFLP 体系的 PCR 扩增中, 除扩增程序相对稳定不需要对其进行较大变动外, 聚合酶的特异性, Mg²⁺ 引物的浓度对结果的影响都很大, 某一个试剂用量的偏差都有可能整个实验的失败, 因此保证每一个试剂的质量和在工作液浓度的准确也至关重要。

本研究获得了高质量的红花 cDNA 模板, 建立了红花的 cDNA-AFLP 特异性反应体系, 为筛选与红花重要性状相关的功能基因乃至直接的调控基因

奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [2] 樊兰英. 近十年来红花的临床应用进展 [J]. 江西医学院学报, 2002, 42(6): 185-188.
- [3] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明等. 不同产地红花药材的质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(8): 5-7.
- [4] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *J Plant*, 1996, 9(5): 745-753.
- [5] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 1997, 234: 516-521.
- [6] Huang J, Bachem C, Jacobsen E, et al. Molecular analysis of differentially expressed genes during postharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuberous roots [J]. *Euphytica*, 2001, 120: 85-93.
- [7] Jaakola L, Pirttilä A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 19: 201-203.
- [8] Gubler U. A one tube reaction for the synthesis of blunt-ended-double-stranded cDNA [J]. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16: 2726.
- [9] Vos P, Hoger R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acid Res*, 1995, 23(21): 4407.
- [10] 郭美丽, 姜伟, 张志珍, 等. 红花种质的 RAPD 分子鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(10): 1116-1119.
- [11] 张阵阵, 郭美丽, 张军东. 红花基因组扩增片段长度多态性反应体系的建立和优化 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 327-330.

菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究

周艳林^{1,2}, 严海², 钟小清², 王力生², 邹节明^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要: 目的 建立菝葜药材的脂溶性成分的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法 采用 Phenomenex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1% 的磷酸溶液梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 303 nm。结果 不同产地菝葜药材的指纹图谱有较好的相似度, 通过比较对应了山龙眼苷 A、落新妇苷、白藜芦醇及黄杞苷 4 个对照品。结论 建立的方法能较好地反映了菝葜中二氢黄酮醇苷及二苯乙烯两类主要成分。

关键词: 菝葜; 脂溶性成分; 指纹图谱; 梯度洗脱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)08-1246-03

Fingerprint of hydrophobic components in *Smilax china*

ZHOU Yan-lin^{1,2}, YAN Hai², ZHONG Xiao-qing², WANG Li-sheng², ZOU Jie-ming^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China)

收稿日期: 2008-01-06

基金项目: 广西优势中草药产业化资助项目 (桂科产 0444002-1)

作者简介: 周艳林 (1972—), 男, 江西资溪人, 在读博士, 研究方向为中药化学与质量控制。E-mail: zhouyanlinzhou@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 邹节明, 男, 教授级高工, 博士生导师。Tel: (0773) 5842588 E-mail: Sanjin@gl.gx.cninfo.net

红花cDNA-AFLP反应体系的优化研究

作者：[冯娜](#)，[郭美丽](#)，[张汉明](#)
作者单位：[第二军医大学药学院生药学教研室, 上海, 200433](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39 (8)
被引用次数：2次

参考文献(11条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [樊兰英](#) [近十年来红花的临床应用进展](#)[期刊论文]-[江西医学院学报](#) 2002 (06)
3. [郭美丽](#); [张芝玉](#); [张汉明](#) [不同产地红花药材的质量评价](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2000 (08)
4. [Bachem C W B](#); [Van der Hoeven R S](#); [de Bruijn S M](#) [Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development](#) 1996 (05)
5. [Habu Y](#); [Fukada-Tanaka S](#); [Hisatomi Y](#) [Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence](#)[外文期刊] 1997 (2)
6. [Huang J](#); [Bachem C](#); [Jacobsen E](#) [Molecular analysis of differentially expressed genes during postharvest deterioration in cassava \(Manihot esculenta Crantz\) tuberous roots](#)[外文期刊] 2001 (1)
7. [Jaakola L](#); [Pirttila A M](#); [Halonen M](#) [Isolation of high quality RNA from bilberry \(Vaccinium myrtillus L.\) fruit](#)[外文期刊] 2001 (2)
8. [Gubler U](#) [A one tube reaction for the synthesis of bluntended-double-stranded cDNA](#) 1988
9. [Vos P](#); [Hoger R](#); [Blecker M](#) [AFLP: a new technique for DNA fingerprinting](#) 1995 (21)
10. [郭美丽](#); [姜伟](#); [张志珍](#) [红花种质的RAPD分子鉴定](#)[期刊论文]-[第二军医大学学报](#) 2003 (10)
11. [张阵阵](#); [郭美丽](#); [张军东](#) [红花基因组扩增片段长度多态性反应体系的建立和优化](#)[期刊论文]-[第二军医大学学报](#) 2006 (03)

本文读者也读过(10条)

1. [桑燕](#), [汤青林](#), [王志敏](#), [宋明](#), [任雪松](#), [SANG Yan](#), [TANG Qing-lin](#), [WANG Zhi-min](#), [SONG Ming](#), [REN Xue-song](#) [芥菜cDNA-AFLP反应体系的优化](#)[期刊论文]-[西南大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 30 (4)
2. [吴敏生](#), [高志环](#), [戴景瑞](#) [利用cDNA-AFLP技术研究玉米基因的差异表达](#)[期刊论文]-[作物学报](#) 2001, 27 (3)
3. [赵锦](#), [李庄](#), [宋蓓](#), [刘孟军](#), [ZHAO Jin](#), [LI Zhuang](#), [SONG Bei](#), [LIU Meng-jun](#) [枣cDNA-AFLP技术体系建立与优化](#)[期刊论文]-[河北农业大学学报](#) 2010, 33 (3)
4. [刘卫国](#), [易干军](#), [张秋明](#), [刘岩](#), [LIU Wei-guo](#), [YI Gan-jun](#), [ZHANG Qiu-ming](#), [LIU Yan](#) [菠萝DNA的提取及AFLP反应体系的建立](#)[期刊论文]-[果树学报](#) 2006, 23 (1)
5. [程丽莉](#), [苏淑钗](#), [秦岭](#), [尹伟伦](#), [CHENG Li-li](#), [SU Shu-chai](#), [QIN Ling](#), [YIN Wei-lun](#) [板栗叶片DNA的提取及AFLP反应体系的建立](#)[期刊论文]-[北京农学院学报](#) 2005, 20 (2)
6. [邢磊](#), [刘雪梅](#), [宋福南](#), [Xing Lei](#), [Liu Xuemei](#), [Song Funan](#) [白桦cDNA-AFLP体系的优化和建立](#)[期刊论文]-[东北林业大学学报](#) 2010, 38 (10)
7. [吴智明](#), [曾晶](#), [胡开林](#), [乔爱民](#), [Wu Zhiming](#), [Zeng Jing](#), [Hu Kailin](#), [Qiao Aimin](#) [辣椒cDNA-AFLP体系的优化与应用](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2010, 26 (12)
8. [李剑峰](#), [张跃强](#), [樊哲儒](#), [王岩军](#), [王浩](#), [曲延英](#), [范玲](#), [LI Jian-feng](#), [ZHANG Yue-qiang](#), [FAN Zhe-ru](#), [WANG Yan-jun](#)

- . [WANG Hao](#), [QU Yan-ying](#), [FAN Ling](#) 小麦叶片cDNA-AFLP扩增反应体系的优化[期刊论文]-[新疆农业科学](#)2010, 47 (3)
9. [黄文坤](#), [郭建英](#), [万方浩](#), [高必达](#), [谢丙炎](#), [HUANG Wen-Kun](#), [GUO Jian-Ying](#), [WAN Fang-Hao](#), [GAO Bi-Da](#), [XIE Bing-Yan](#) 紫茎泽兰DNA的提取及AFLP反应体系的建立[期刊论文]-[武汉植物学研究](#)2006, 24 (6)
10. [文亚峰](#), [何钢](#), [WEN Ya-feng](#), [HE Gang](#) 枣叶片DNA的提取以及AFLP反应体系的建立[期刊论文]-[中南林业科技大学学报](#)2007, 27 (3)

引证文献(2条)

1. [李剑峰](#), [张跃强](#), [樊哲儒](#), [王岩军](#), [王浩](#), [曲延英](#), [范玲](#) 小麦叶片cDNA-AFLP扩增反应体系的优化[期刊论文]-[新疆农业科学](#) 2010 (3)
2. [邢磊](#), [刘雪梅](#), [宋福南](#) 白桦cDNA-AFLP体系的优化和建立[期刊论文]-[东北林业大学学报](#) 2010 (10)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200808041.aspx