

• 药材与资源 •

金钗石斛相关序列扩增多态性反应体系的正交优化研究

赵红燕, 冯尚国, 沈波, 王慧中*

(杭州师范大学 生物化学与分子生物学杭州市重点实验室, 浙江 杭州 310036)

摘要:目的 建立金钗石斛 *Dendrobium nobile* 相关序列扩增多态性 (SRAP) 反应体系, 为金钗石斛分子生物学研究提供技术支持。方法 运用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计对影响金钗石斛 SRAP 反应的 5 个因素: 模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶、引物在 5 个水平上进行优化试验, 对 PCR 结果进行极差分析。结果 金钗石斛 SRAP 反应最佳体系为: 25 μ L PCR 体系中含有 20 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U *Taq* 酶, 0.6 μ mol/L 引物。各因素对 SRAP 反应的影响依次为: *Taq* 酶 > Mg^{2+} > dNTPs > 模板 DNA > 引物。结论 所建立的金钗石斛 SRAP 反应体系具有标记位点清晰、多态性丰富、稳定性好等特点, 可用于金钗石斛分子生物学的研究。

关键词: 金钗石斛; SRAP; 优化; 正交设计

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1353-06

Optimization of sequence related amplified polymorphism system in *Dendrobium nobile* based on orthogonal design

ZHAO Hong-yan, FENG Shang-guo, SHEN Bo, WANG Hui-zhong

(Key Laboratory of Hangzhou City for Biochemistry and Molecular Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: Objective To establish the optimal sequence related amplified polymorphism (SRAP) reaction system for molecular biology research in *Dendrobium nobile*. **Methods** The $L_{25}(5^6)$ orthogonal design was used to optimize SRAP-PCR amplification system of *D. nobile* on five levels, the experiment was performed on five factors: template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, and primer. The data generated by SRAP-PCR were analyzed. **Results** The optimal condition of the five important factors, template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, and primer in the 25 μ L SRAP-PCR reaction system were 20 ng, 2.0 mmol/L, 0.2 mmol/L, 1 U, and 0.6 μ mol/L, respectively. The effective degree of the factors on the SRAP reaction was in the order: *Taq* DNA polymerase > Mg^{2+} > dNTPs > template DNA > primer. **Conclusion** The present reaction system could provide clear bands, abundant polymorphisms, and reliable reaction. It is proved to be suitable for molecular biology research of *D. nobile*.

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl.; sequence related amplified polymorphism (SRAP); optimization; orthogonal design

相关序列扩增多态性 (sequence related amplified polymorphism, SRAP) 是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年在芸薹属植物中开发出来的^[1], 又名基于序列扩增多态性 (sequence based amplified polymorphism, SBAP)^[2]。SRAP 技术的基本原理是通过设计的引物对 ORFs (open reading frames) 进行扩增, 上游引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列, 紧接着是 CCGG, 组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对外显

子进行特异扩增, 下游引物长 18 bp, 5' 端的前 11 bp 是一段填充序列, 紧接着是 AATT, 组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对内含子区域、启动子区域进行特异扩增, 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。SRAP 技术具有简便、稳定、产率高和便于克隆目的片段的特点。该标记在植物遗传多样性分析及种质资源鉴定^[3-6]、遗传图谱构建^[7]、重要性状基因定位^[8]等方面已经得到了广泛的应用。

* 收稿日期: 2009-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670199, 30770185, 30870180); 浙江省自然科学基金资助项目 (X305692, X301406); 浙江省科技计划资助项目 (2008C12081); 杭州市重点实验室项目 (20080432T06); 钱江人才计划资助项目

作者简介: 赵红燕 (1985-), 女, 河南平顶山人, 主要从事植物遗传研究。E-mail: zhaohy1000@163.com

* 通讯作者 王慧中 E-mail: whz62@163.com

金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 又称石斛、金钗、扁金钗、金斗、扁金斗、扁黄草, 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 植物, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, “主伤中、除痹、下气, 补五脏虚劳羸瘦, 强阴, 久服厚肠胃”。现代药理研究表明, 石斛还具有治疗眼病、抗衰老及免疫调节、收缩肠管、抗肿瘤等功效^[9]。近年来, 我国学者对金钗石斛的生物学特性、药用价值、人工栽培、化学成分、药理、毒理等方面进行了广泛的研究^[10], 而有关遗传多样性等分子水平方面的研究甚少。本研究利用正交试验设计, 从模板 DNA、Mg²⁺、dNTPs、*Taq* 酶、引物 5 种因素 5 个水平, 对金钗石斛 SRAP 反应体系进行优化分析, 建立了多态性丰富、稳定性好的金钗石斛 SRAP 反应体系, 为进一步研究金钗石斛的遗传多样性、开发利用这一珍稀药用资源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料: 金钗石斛采自云南思茅, 由杭州师范大学王慧中教授鉴定, 用于 SRAP-PCR 反应的 *Taq* 酶 (2 U/μL)、dNTPs (10 mmol/L)、Mg²⁺ (20 mmol/L)、10 × PCR buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L KCl, 1% Triton X-100, pH 8.8) 订购于北京鼎国公司、标准相对分子质量 (Marker) DL2000 购自 TaKaRa 公司, SRAP 引物由上海生工合成。

1.2 总 DNA 的提取: DNA 提取采用改良的 CTAB 法。取 0.3 g 左右新鲜叶片, 研磨至粉末状, 迅速转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 不含 CTAB 的抽提缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCl; 50 mmol/L EDTA; 250 mmol/L NaCl; 2% β-巯基乙醇), 混匀后冰上静置 15 min, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。去上清 (若上清比较黏稠, 则按上述方法再次离心, 直到上清变清澈) 加入 500 μL 预热 (65 °C) 的抽提缓冲液 (3% CTAB; 100 mmol/L Tris-HCl; 25 mmol/L EDTA; 1.5 mol/L NaCl; 1% β-巯基乙醇), 混匀后 65 °C 水浴 40 min 至 1 h。冷却至室温, 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24: 1) 轻轻颠倒混匀 1~2 min, 直至没有明显的分层。室温静置 5 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min。取上清液至一新的离心管, 用酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1) 重复抽提一次。取上清至另一新的离心管中, 加入 0.5 倍体积的 5 mol/L NaCl, 2 倍体积的无水乙醇, 轻微上下颠倒, 室温静置 20~30 min。取白色沉淀至新的离心管中 (若沉淀物很少, 4 °C、12 000

r/min 离心 2 min 获得沉淀)。用 70% 乙醇洗涤 2 次, 去乙醇, 自然风干, 用 500 μL TE 缓冲液溶解。加入 1 μL 10 ng/mL RNase, 37 °C 水浴 10 min, 降解 RNA。用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 1 次, 方法同上, 最后将沉淀溶解于适量的 TE 缓冲液中。

提取的总 DNA, 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及完整性。用紫外分光光度计检测其在 260 nm 的吸光度, 并将 DNA 浓度稀释到 20 ng/μL 备用。

1.3 SRAP-PCR 反应体系正交设计: 随机选用引物组合 m8 (TGAGTCCAAACCGGTGC)/em10 (GACTGCGTACGAATT CAG), 采用 L₂₅(5⁶) 正交表, 选取影响反应体系的 5 个主要因素 (Mg²⁺、dNTPs、引物、模板 DNA 和 *Taq* 酶) 在 5 水平上进行优化试验, 见表 1 (阴性对照中不加 *Taq* 酶)。反应总体积为 25 μL, 其中含 10 × PCR buffer 2.5 μL, 不足部分双蒸水补足, 每个处理重复两次。

表 1 SRAP PCR 反应因素水平正交试验设计表 L₂₅(5⁶)

Table 1 L₂₅(5⁶) Orthogonal design for factors and levels of SRAP PCR reaction

试验号	Mg ²⁺ / (mmol · L ⁻¹)	<i>Taq</i> 酶 / (U · 25 μL ⁻¹)	dNTPs / (mmol · L ⁻¹)	引物 / (μmol · L ⁻¹)	模板 DNA / (ng · 25 μL ⁻¹)
1	1.0	0	0.1	0.2	20
2	1.0	0.5	0.2	0.4	30
3	1.0	1.0	0.3	0.6	40
4	1.0	1.5	0.4	0.8	50
5	1.0	2.0	0.5	1.0	60
6	1.5	0	0.3	0.8	60
7	1.5	0.5	0.4	1.0	20
8	1.5	1.0	0.5	0.2	30
9	1.5	1.5	0.1	0.4	40
10	1.5	2.0	0.2	0.6	50
11	2.0	0	0.5	0.4	50
12	2.0	0.5	0.1	0.6	60
13	2.0	1.0	0.2	0.8	20
14	2.0	1.5	0.3	1.0	30
15	2.0	2.0	0.4	0.2	40
16	2.5	0	0.2	1.0	40
17	2.5	0.5	0.3	0.2	50
18	2.5	1.0	0.4	0.4	60
19	2.5	1.5	0.5	0.6	20
20	2.5	2.0	0.1	0.8	30
21	3.0	0	0.4	0.6	30
22	3.0	0.5	0.5	0.8	40
23	3.0	1.0	0.1	1.0	50
24	3.0	1.5	0.2	0.2	60
25	3.0	2.0	0.3	0.4	20

1.4 SRAP-PCR 扩增及检测: 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、35 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 随后 35 个循环为:

94 °C 变性 1 min, 50 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。扩增产物加 1~ 2 μL 6 × loading buffer (40% 蔗糖, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF) 混匀后, 取 8 μL 用于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 电泳缓冲液为 1 × TBE。200 V 电压电泳约 2 h, 二甲苯青 FF 至胶板 2/3 处, 银染拍照。

1.5 SRAP 最佳反应体系的验证: 随机选用引物对组合 m8 (TGAGTCCAAACCGGTGC)/ em11 (GAGTGCGTACGAATTCCA) 和 m2 (TGAGTCCAACCGGAGC)/ em1 (GACTGCGTACGAATTAAT), 采用 8 个不同地域来源的金钗石斛居群, 对优化建立的金钗石斛 SRAP-PCR 反应体系及反应参数的稳定性进行验证。

2 结果与分析

2.1 金钗石斛基因组 DNA 的提取: 利用改良 CTAB 方法提取金钗石斛基因组 DNA, 紫外分光光度计检测, 其纯度和产量均较高。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带清晰且没有降解, 说明提取的 DNA 质量高, 完整性好, 可用于 SRAP-PCR 反应 (图 1)。

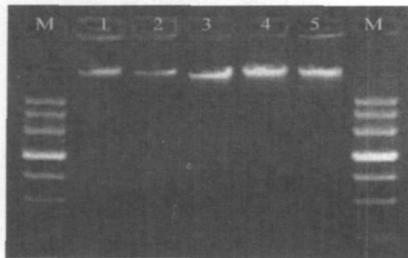
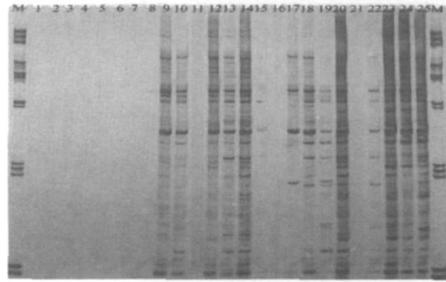


图 1 改良 CTAB 法提取 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of DNA with modified CTAB

2.2 电泳结果评分: 按表 1 设计的 25 个处理进行 PCR 试验, 电泳检测结果如图 2 所示, 根据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色进行打分 (0~ 5 分)。对两次重复分别单独进行统计, 得分依次为: 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 3, 0, 4, 5, 4, 1, 0, 2, 4, 2, 3, 0, 2, 3, 3, 3; 0, 1, 1, 0, 1, 0, 2, 1, 2, 3, 0, 4, 5, 4, 2, 0, 2, 4, 3, 3, 0, 3, 3, 2, 3。从两次重复的得分来看, 结果的一致性较好。取两次得分的平均值, 在假设不存在交互作用的情况下进行直观分析, 求各列各水平的和 T₁、T₂、T₃、T₄、T₅; 由于各列各水平均重复了 5 次, 故可求出各水平的均值 K₁、K₂、K₃、K₄、K₅; 用各列最大平均值减去最小平均值得各列的极值 R。显然 R 越大, 说明该因素对指标影响越大。分析极差 R 可知, Taq 酶的量对反应结果影响最大, 引物浓度影响

最小, 各因素水平的变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为: Taq 酶、Mg²⁺、dNTPs、模板 DNA、引物 (表 2)。



1~ 25 处理代号见表 1 M-DL 2000

1—25 treatment number and treatment as showed in Table 1

M-DL 2000 Marker

图 2 SRAP PCR 正交试验电泳结果图

Fig. 2 Electrophoretogram of SRAP PCR orthogonal design

表 2 SRAP PCR 反应各因素间极差分析表

Table 2 Analysis for factors of SRAP PCR reaction

水平	Mg ²⁺	Taq 酶	dNTPs	引物	模板 DNA
T ₁	1.5	0	11.5	7	11.5
T ₂	7	10	12	9.5	8.5
T ₃	14.5	13.5	9.5	10	6.5
T ₄	11.5	11	9.5	10	8
T ₅	11	11	6.5	8	11
K ₁	0.3	0	2.3	1.4	2.3
K ₂	1.4	2	2.4	1.9	1.7
K ₃	2.9	2.7	1.9	2	1.3
K ₄	2.3	2.2	1.9	2	1.6
K ₅	2.2	2.2	1.3	1.6	2.2
R	2.6	2.7	1.1	0.6	1

2.3 Taq 酶浓度对 PCR 结果的影响: 由关系曲线的波动幅度可知, Taq 酶浓度对 PCR 结果的影响较大。Taq 酶浓度过低, PCR 产物信号弱, 背景浅, 浓度过高时, 产生大量的杂带, 并且背景较深, 不利于遗传多样性的分析。从图 3 可知, 1.0 U 为 Taq 酶最佳反应水平。

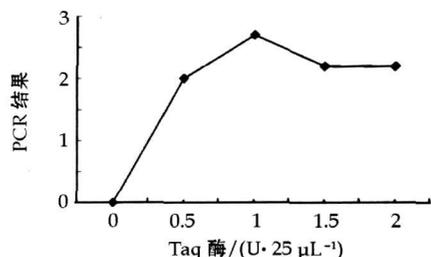


图 3 Taq 酶量与结果均值的关系图

Fig. 3 Relationship between quantity of Taq DNA polymerase and mean of result

2.4 Mg²⁺ 浓度对 PCR 结果的影响: Mg²⁺ 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响, 浓度过高, 反应特异性降低, 出现非特异性扩增, 浓度过低会降低

Taq DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。从图 4 可知,2.0 mmol/L 为 Mg^{2+} 浓度最佳反应水平。

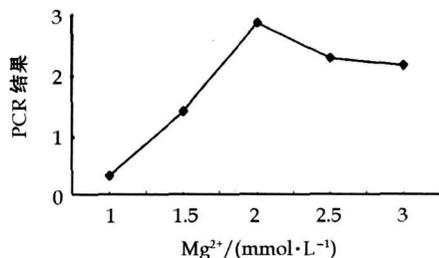


图 4 Mg^{2+} 浓度与结果均值的关系图

Fig. 4 Relationship between quantity of Mg^{2+} concentration and mean of result

2.5 dNTPs 浓度对 PCR 结果的影响:如图 5 所示 dNTPs 浓度在 0.1~0.4 mmol/L 无明显差异,但与 0.5 mmol/L 差异显著。0.5 mmol/L 浓度过高,错误掺入率大大增加,且 dNTPs 能与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度降低,降低 PCR 扩增效果,浓度过低时,降低 PCR 产物的产量,导致无扩增产物或扩增产物不稳定或扩增出来的条带模糊不清。因此,选择峰值 0.2 mmol/L 为反应的最佳水平。

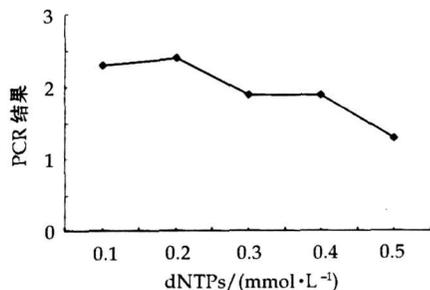


图 5 dNTPs 浓度与结果均值的关系图

Fig. 5 Relationship between quantity of dNTPs concentration and mean of result

2.6 模板 DNA 浓度对 PCR 结果的影响:如图 6,模板 DNA 在 20 ng/25 μ L 与 60 ng/25 μ L 时均达到理想的扩增效果。但为降低 TE 缓冲液中 EDTA 对反应中 Mg^{2+} 的不良影响程度,在保证扩增效果的前提下,应尽量降低模板 DNA 的用量。因此,最终选定 20 ng/25 μ L 作为最佳反应水平。

2.7 引物浓度对 PCR 结果的影响:由关系曲线的波动幅度可知,引物在本研究所选梯度范围内对 PCR 反应结果影响较小,但是引物浓度变化对 PCR 产物电泳信号强弱的影响有关,浓度增加信号增强,同时浓度过大导致条带背景的加深,影响了多态性的鉴别分析。可能由于试验材料的不同以及反应各因素的综合作用等原因而使得本研究结论有所不同,在 0.6 μ mol/L 与 0.8 μ mol/L 水平均达到了反

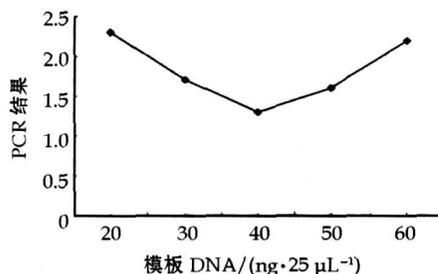


图 6 模板 DNA 浓度与结果均值的关系图

Fig. 6 Relationship between quantity of DNA template concentration and mean of result

应体系的最佳效果,从经济角度考虑选择 0.6 μ mol/L 为最佳反应水平。结果见图 7。

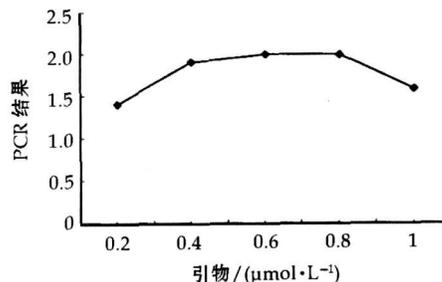


图 7 引物浓度与结果均值的关系图

Fig. 7 Relationship between quantity of primer concentration and mean of result

2.8 体系稳定性检测:采用优化所建立的反应体系,引物对组合 m8/em11 和 m2/em1 对 8 个不同来源地的金钗石斛居群进行 SRAP-PCR 扩增,均能扩增出清晰谱带,而且不同个体间存在一定的差异(图 8 和图 9)。这说明优化的金钗石斛 SRAP-PCR

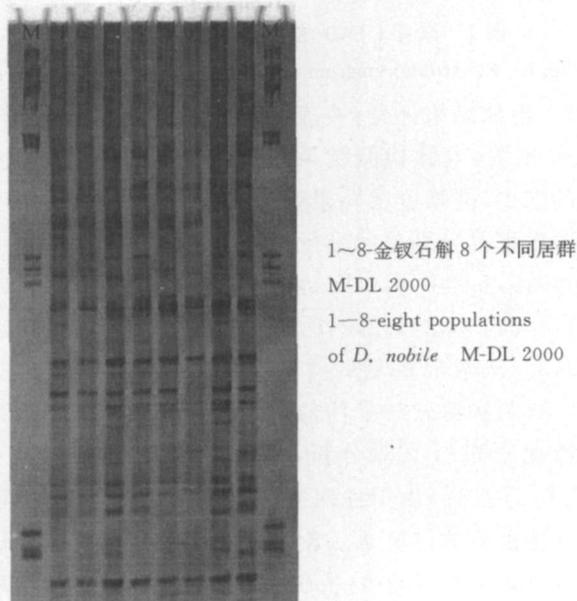


图 8 引物对组合 m8/em11 的检测结果

Fig. 8 Testing result of primer pair m8/em11

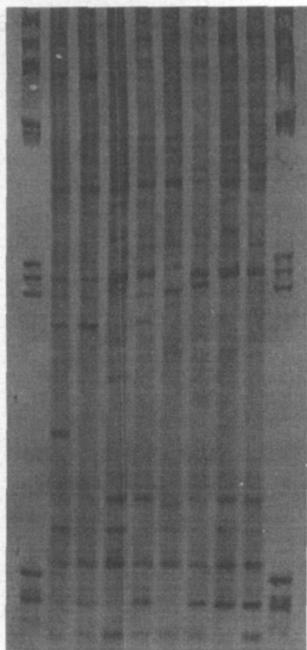


图 9 引物对组合 m2/em1 的检测结果

Fig. 9 Testing result of primer pair m2/em1

反应体系是可行的, 可用于金钗石斛遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种等分子生物学的研究。

3 讨论

金钗石斛叶片中含有大量的多糖物质, 多糖易与 DNA 形成黏稠的胶状物, 给 DNA 的分离和纯化带来困难, 从而影响 PCR 扩增反应, 因此选择适宜的 DNA 提取法非常重要。CTAB 法是最为常用的植物 DNA 提取方法, 经过改良, 以满足不同植物和不同实验的要求。实验采用改良的 CTAB 法对金钗石斛 DNA 进行提取, 从电泳检测结果来看, 得到的 DNA 质量较高, 可用于后期研究。

传统的体系优化方法一般采用单因素试验, 不仅试验处理繁多, 而且会忽视因素间的互作效应, 而本研究所采用的正交试验设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特性, 可了解各因素之间的内在规律, 较快地找到最优的水平组合, 使实验结果更科学、完善和简便^[11]。试验中各因素间及因素内水平间的相关性分析结合图表, 其规律变化一目了然, 具有一定的客观准确性。但该方法也存在一定的局限性, 如对实验结果本身优劣的判断依据带有主观上的成分, 不能很好地估计试验误差, 说明各个实验条件之间的互作等。如果能够对 PCR 扩增条件及结果建立客观的标准, 无疑将极大地促进 PCR 技术的发展。

樊洪泓等^[12]采用单因素试验, 以霍山石斛总

DNA 为模板, 对石斛属 SRAP 反应体系的重要参数进行优化。王燕燕等^[13]采用单因素试验, 优化了金钗石斛 RAPD-PCR 反应体系。目前有关采用正交设计法优化金钗石斛 SRAP 反应体系的研究还未见报道。本研究通过对影响金钗石斛 SRAP 反应的各因子进行正交设计试验, 最终确定的适合于金钗石斛的 SRAP 体系, 在模板 DNA、 Mg^{2+} 以及引物浓度上与樊洪泓等^[12]对石斛属研究中的用量有一定差别, 从电泳分析的结果上看, 本研究所建立的体系 PCR 扩增效果更理想, 而且节省了实验的成本。同时, 本研究结果与樊洪泓等^[12]研究结果相比, 也客观地体现了正交设计试验的优越性。

SRAP 分子标记技术基于 PCR 反应, 试验材料及反应体系中各影响因子浓度的不同都会对反应结果产生影响。本研究结果证明, 采用不同的体系组合对金钗石斛的 SRAP-PCR 扩增效果影响很大。综合考虑各种因素, 本研究最终建立的金钗石斛 SRAP 反应最佳体系为: 在 25 μ L 反应体系中含有 20 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.6 μ mol/L 引物。同时, 本研究对得到的最佳反应体系进行了验证, 采用不同的引物组合、在不同来源地的金钗石斛居群之间均得到了清晰、重复性好的条带, 这也表明所建立的体系在金钗石斛中具有一般的通用性, 为今后金钗石斛遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、分子标记辅助育种等分子生物学研究奠定了良好的基础。

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] Ferriol M, Pico M B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers [J]. *Genet Resources Crop Evolut*, 2003, 50: 227-238.
- [3] Budak H, Shearman R C. Molecular characterization of Buffalo grass germplasm using sequence related amplified polymorphism markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 328-334.
- [4] Ding G, Zhang D Z, Ding X Y, et al. Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Derobium officinale* based on SRAP analysis [J]. *Plant Syst Evol*, 2008, 276: 149-156.
- [5] 陈大霞, 李隆云, 瞿显友, 等. 栽培黄连群体遗传关系的 SRAP 分析 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1552-1556.
- [6] 郭庆华, 郭美丽, 薛 芊, 等. 青箱 SRAP 体系的建立和优化 [J]. *中草药*, 2008, 39(2): 263-266.
- [7] Lin Z X, Zhang Y X, Zhang X L, et al. A high density integrative linkage map for *Gossypium hirsutum* [J]. *Euphytica*, 2009, 166: 35-45.
- [8] Rahman M, McVetty P B E, Li G Y. Development of

- SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 110F-1107.
- [9] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75
- [10] 郑晓珂, 曹新伟, 冯卫生, 等. 金钗石斛的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 836-839
- [11] 杨水云, 李续娥, 吴明宇, 等. 正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用 [J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 202-206
- [12] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 石斛属植物 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 153-156
- [13] 王燕燕, 徐红, 魏丹红, 等. 金钗石斛遗传多样性研究的随机扩增多态性 DNA-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2827-2830

黄花蒿悬浮培养细胞对二氢青蒿酸的生物转化研究

唐煜, 朱建华, 于荣敏*
(暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

摘要:目的 采用黄花蒿悬浮培养细胞研究二氢青蒿酸(I)的生物转化。方法 向预培养 14 d 的黄花蒿细胞悬浮培养体系中加入底物二氢青蒿酸, 培养 2 d 后终止转化。通过 TLC 和 HPLC 检测转化产物, 利用硅胶、Sephadex LH-20 以及 ODS 柱色谱分离纯化转化产物, 并根据理化数据和波谱技术鉴定转化产物的化学结构, 最后利用 HPLC 考察共培养时间对转化率的影响。结果 二氢青蒿酸在黄花蒿培养体系中成功地进行了转化并分离得到两个转化产物: 3- α 羟基二氢青蒿酸(IIa)和 3- β 羟基二氢青蒿酸(IIb)。两个转化产物的最佳共培养时间均为 1 d, 总的摩尔转化率分别为 2.6% (IIa) 和 15.7% (IIb)。结论 本研究首次利用黄花蒿培养细胞生物转化二氢青蒿酸, 且得到一对区域特异性的羟基化转化产物。

关键词: 黄花蒿; 悬浮培养细胞; 二氢青蒿酸; 生物转化

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1358-04

Biotransformation of dihydroartemisinic acid by suspension culture cell of *Artemisia annua*

TANG Yu, ZHU Jiannhua, YU Rongmin
(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective To investigate the biotransformation of dihydroartemisinic acid (I) by cultured cells of *Artemisia annua*. **Methods** Dihydroartemisinic acid was added to the suspension cells of *A. annua* which had been pre-cultured for 14 d and co-cultured for another 2 d. The biotransformed products were detected with TLC and HPLC, and isolated by various chromatographic methods. **Results** The chemical structures of biotransformed products were elucidated on the basis of spectroscopic data. 3- α -Hydroxy-dihydroartemisinic acid (IIa) and 3- β -hydroxy-dihydroartemisinic acid (IIb) were obtained after 2 d administration of dihydroartemisinic acid to the suspension cells of *A. annua*. IIa and IIb yields could reach a maximum mole ratio of 2.6% and 15.7% after 1 d incubation, respectively. **Conclusion** It is the first time for the biotransformation of dihydroartemisinic acid to epimeric 3-hydroxyartemisinic acid by using suspension culture cell of *A. annua*. The results indicate that cells of *A. annua* have the ability to hydroxylate dihydroartemisinic acid region selectively.

Key words: *Artemisia annua* L.; suspension culture cell; dihydroartemisinic acid; biotransformation

生物转化是利用生物活性的酶体系对外源性底物进行结构修饰的一种生物学方法^[1,2]。它作为化学修饰的重要补充, 在活性分子或药物分子结构修饰方面, 具有独特的优势, 已经得到了广泛的应用^[3,6]。天然产物的结构通常比较复杂, 分子中多含有手性中心, 采用化学方法对其进行结构修饰常会

遇到很多困难。而利用生物转化反应, 由于其具有区域专一性和立体选择等特点, 则有可能获得具有新颖取代方式的衍生物^[7]。

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 是菊科艾属植物, 含有多种药用活性成分, 如青蒿素等是传统中药治疗疟疾的主要有效药物^[8]。然而由于青蒿素在黄花

* 收稿日期: 2009-12-18

作者简介: 唐煜(1984—), 男, 湖南永州人, 硕士, 研究方向为活性成分的生物转化与生物合成。

* 通讯作者: 于荣敏 Tel: (020) 85220386 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn