

黄花白及的 SCAR 分子标记转化研究

赵 爽¹, 黄春球², 杨耀文¹, 周 敏², 钱子刚^{1*}, 李明静²

1. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南植物药业有限公司, 云南 昆明 650111

摘要:目的 建立黄花白及的 SCAR 标记, 为黄花白及的分子鉴定提供科学依据。方法 用随机引物进行随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记筛选, 获得特异的 RAPD 标记条带, 经回收、克隆、测序后, 根据 RAPD 标记条带的两端序列设计特异引物进行常规 PCR 反应, 以获得序列特征化扩增区 (sequence characterized amplified region, SCAR) 标记。结果 利用 50 对随机引物筛选得到黄花白及的一条 896 bp 的特异片段, 可以区别于小白及、独叶白及和白及。该序列设计特异引物后, 经过多次重复试验, 该 RAPD 标记的特异片段已成功转化为 SCAR 标记。结论 建立的 SCAR 标记条带清晰明亮, 结果稳定, 可作为黄花白及分子鉴定的依据。

关键词: 黄花白及; RAPD 标记; SCAR 标记; 分子鉴定; 特异片段

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2036-04

Research on SCAR molecular marker transformation of *Bletilla ochracea*

ZHAO Shuang¹, HUANG Chun-qiu², YANG Yao-wen¹, ZHOU Min², QIAN Zi-gang¹, LI Ming-jing²

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Yunan Phytopharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650111, China

Abstract: Objective In order to provide a scientific basis for molecular identification of *Bletilla ochracea*, the sequence characterized amplified region (SCAR) marker of *B. ochracea* was established. **Methods** The random primer was used for random amplified polymorphic DNA (RAPD) screening to obtain specific marker bands. Through separating, extracting, cloning, and sequencing, the specific primers were designed for normal PCR reaction based on the sequences of both ends of RAPD marker bands to obtain SCAR marker. **Results** A specific segment with 896 bp of *B. ochracea* was obtained by random screening of 50 pairs of primers, which was different from *B. formosana*, *Pleione yunnanensis*, and *B. striata*. A pair of specific primers was based on the sequence of RAPD marker bands and then the RAPD marker was successfully transformed into SCAR marker after repeated tests. **Conclusion** The established SCAR marker could make the band clear and bright and be used as the basis for molecular identification of *B. ochracea* with the stable results.

Key words: *Bletilla ochracea* Schltr.; RAPD marker; SCAR marker; molecular identification; specific segment

黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr. 为兰科白及属多年生草本植物^[1], 以其假鳞茎入药, 用于肺结核出血、支气管扩张咯血、胃溃疡吐血、尿血、便血, 外用于外伤出血、烧烫伤等^[2]。黄花白及花色鲜黄靓丽, 不仅具有药用价值, 还具有较高的观赏价值。近年来随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分子标记广泛应用于药用植物的遗传多样性研究^[3-5], 但其重复性和稳定性较差; 而利用序列特征化扩增区 (sequence characterized amplified region, SCAR) 分子标记技术可以解决 RAPD 标记的以上缺点^[6]。目前运用 SCAR 标记已对黄芪^[7]、甘草^[8]、杜仲^[9]

等多种药用植物的分子鉴定进行研究。本研究利用 RAPD 技术在黄花白及基因组中扩增到某一特异条带, 并将其转化为 SCAR 标记, 为黄花白及种质资源的引种栽培、资源保护和选种育种提供一定的理论依据。

1 材料与仪器

黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr.、小白及 *Bletilla formosana* Schltr.、云南独蒜兰 (又名独叶白及) *Pleione yunnanensis* (Rolfe) Rolfe 和白及 *Bletilla striata* Rchb. f. 共 4 个种, 每个种分别有 10 株新鲜植株个体, 云南植物药业有限责任公司提供, 经云南中医学院钱子刚教授鉴定。

收稿日期: 2012-02-06

作者简介: 赵 爽 (1980—) 女, 山东汶上人, 博士, 助理研究员, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: 15911633836 E-mail: zm_zs@126.com

*通讯作者 钱子刚 Tel: (0871)5919769 E-mail: qianzig@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-09-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120906.1614.003.html>

2 方法

2.1 DNA 提取

取植株嫩叶, 采用改良 CTAB 法提取白及基因组 DNA^[10], 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量, 最后将质量浓度调至 20 ng/μL。

2.2 RAPD 分析

采用分离群体分组分析 (bulked segregate analysis, BSA) 法^[11], 分别将每一个白及种 10 个个体的 DNA 等量混合, 建立基因池。

PCR 反应体系: 30 ng/μL 模板 DNA 1.0 μL, 10×PCR 缓冲液 (不含 Mg²⁺) 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 5 μmol/L RAPD 引物 2 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.2 μL, 加 ddH₂O 17.3 μL, 总体系达到 25 μL。

PCR 扩增反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 34 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

扩增完毕后, 在 3~5 V/cm 条件下用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 凝胶成像系统检测目的片段是否存在。

2.3 RAPD 特异片段的回收和克隆测序

利用 TransGen 快速凝胶回收试剂盒, 参照相关说明书对目的片段进行回收; 将回收到的目的片段与博迈德生产的快速克隆载体 pBM19-T 进行连接, 15 min 后转化大肠杆菌感受态细胞 Top10, 涂布于涂有 IPTG 和 X-gal 的 LB 加 Amp 的固体培养基上, 过夜培养。将生长出的白色克隆进行菌落 PCR, 所用引物为载体上的通用引物 M13F 和 M13R, 将扩增出的目的条带克隆测序。

2.4 SCAR 引物设计和 PCR 验证

根据测序结果, 在 RAPD 引物的基础上向内再延长 10~18 bp, 设计特异引物, 并用软件 primer5 进行引物分析, 用其对模板 DNA 进行扩增。只对退火温度和循环次数进行优化, 其他 PCR 反应条件、体系和 RAPD 筛选时的反应条件、体系相同。

3 结果与分析

3.1 黄花白及总 DNA 的提取

黄花白及叶片 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1, 所提取的 DNA 整齐, 说明 DNA 纯度较高, 可以用于后续 RAPD 引物筛选和 SCAR 标记的优化试验。

3.2 RAPD 引物筛选及特异片段的获得

以黄花白及、小白及、独叶白及和白及的 DNA

基因池为模板, 共筛选 RAPD 随机引物 50 条。其中利用 RAPD 随机引物 OP J5 (CTCCATGGGG) 筛选出黄花白及的特异片段 (图 2)。

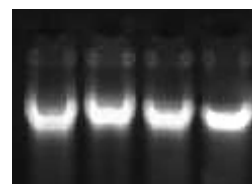
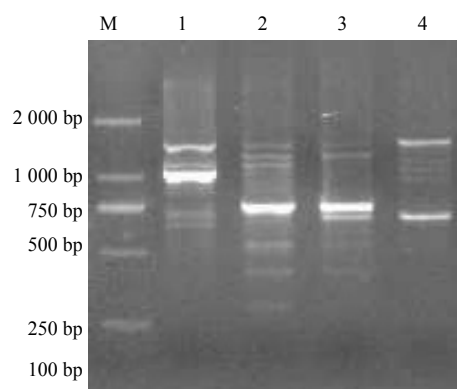


图 1 黄花白及 DNA

Fig. 1 DNA of *B. ochracea*



1-黄花白及 2-小白及 3-独叶白及 4-白及 M-marker
1-*B. ochracea* 2-*B. formosana* 3-*P. yunnanensis* 4-*B. striata* M-marker

图 2 随机引物 J5 筛选出黄花白及的特异片段

Fig. 2 Specific segments of *B. ochracea* screened by random primer J5

3.3 特异片段的回收、克隆和测序

利用凝胶回收试剂盒对上述特异片段进行回收后, 将目的片段进行克隆后测序。黄花白及的特异片段序列为 896 bp (图 3)。

3.4 SCAR 标记特异引物的设计及验证

利用 primer 5 软件对上述黄花白及的特异片段设计 SCAR 标记的特异引物: BJ1J5 上游: 5'-CTCCA-TGGGGTATACAAAGAC-3'; BJ1 J5 下游: 5'-CTC-CATGGGGCCTTGACCTAGG-3'。

利用合成好的特异引物, 对模板 DNA 进行特异性扩增, 其中对退火温度和循环次数进行优化处理。在 30 个循环, 退火温度为 59.5 °C 时, 其他 PCR 反应条件、体系和 RAPD 筛选时间相同, 特异片段只在黄花白及中出现, 在小白及、独叶白及和白及 3 个种中未出现; 而且在黄花白及的随机个体中出现, 证明黄花白及的 SCAR 标记转化成功 (图 4)。

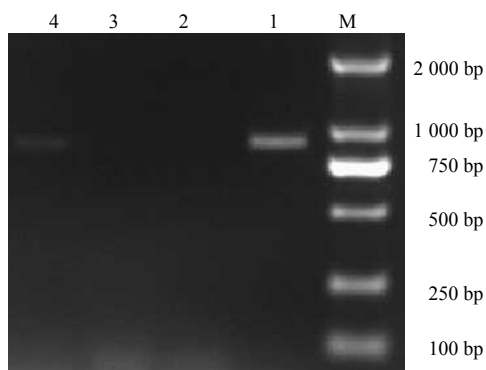
CTCCATGGGGTATACAAAGACTACACAACCTACCAGGTATATGGAGATTACTCAACTCCATCAAGTATATAGA
AATTGCCCAACTCCACCAATTTTATGGAGACTACCCAACCTCCATTAAGTATATAGAGACTACCCAACCTATTT
AGTTTATAAAGACTACCTCACTCCGTCGAAACTGTGATGCGAAACTATAATTCTATTCCATGAATGTCAACATT
CCCTCTTGACGACCTTATGGAACATCAGTTGGTAAGAACTTCCTCTTTAAGATAGAAGCCTCATTATCGACCA
CTTTTGTTATAATGCATGTTAATCACATGATTTTCATATCACATATTCAAAAGATTAAAGAGGGGGAGGGGGGG
TAGCCCAATCCACATCCCCAAACCTTTCTATTAGTATGGATAGAAATTATGGTTGCTAAGTCATTAGCCTATGC
CAAAAGGTGCCATGGAAACTTCTCCTTCAGTATTAATAAATGCTATGGTCATTGAGGCATTAGCCCTGAACAT
GACCCAAAGGAAACTCCTCCTTTAATAGTGATTGAAGTTATGGTCGGTGAAGCATTAGCTCTAGCCATGACCC
CAAGAAAACCTTCTCCCTTCCTTCAGCATGACTAGAGTTATGGTTTCTAGGGCATAACTATAATGACTCTCCCC
ATCTTTAAAATTTTACTCCAACACATCAAGAATCTTCTAGAGAGATAGTCCCCATGAGGGCTAGCCAGTTA
GAAAGCCTTATAGGGAACCTAGTTTGGATAGGGTCTTCTATGAAAGTCATTATCACGGAGGCATTAGCCCAG
TCCACATCCTCAAGTAAACCTTTATTTTAGTATGGACATAAATTACAATTGCCAAGTCATTATCCTAGGTCAA
GGCCCCATGGAG

下划线部分为 RAPD 随机引物 J5 序列

Underline part was the sequence of the random primer J5

图 3 黄花白及特异片段的序列

Fig. 3 Sequence of specific segment of *B. ochracea*



1-黄花白及 2-小白及 3-独叶白及 4-白及 M-marker
1-*B. ochracea* 2-*B. formosana* 3-*P. yunnanensis* 4-*B. striata* M-marker

图 4 黄花白及的 SCAR 分子标记

Fig. 4 SCAR molecular marker of *B. ochracea*

4 讨论

自从 1990 年 RAPD 标记技术诞生以来,以其操作简便、快速、DNA 用量少等优点在各种研究领域中发展迅速,但是该技术由于其稳定性差、重复性差等缺点又限制了其进一步发展。与 RAPD 相比,用 SCAR 引物扩增的 DNA 条带清晰明显,对反应条件的敏感程度较低,而且特异性和重复性较好,可以解决 RAPD 标记的不稳定性和 AFLP 标记的繁琐、高成本的问题,这也进一步证实了 SCAR 标记的优越性^[12]。虽然目前已有不少 RAPD 标记成功转化成 SCAR 标记的例子^[13-15],但通常情况下 SCAR 标记转换的成功率是很低的,可能是由于引物设计

不合适、序列相似或多拷贝、DNA 甲基化和回收的 DNA 片段污染等原因所导致的^[16]。因此一般会选择适当的引物长度、适当提高 PCR 扩增时的退火温度、多次纯化回收的 DNA 片段等多方面进行优化处理^[17],以获得成功的 SCAR 标记。

本研究在 SCAR 标记验证的过程中,对退火温度和循环次数进行优化处理,得到一条清晰明显的条带,表明黄花白及的 SCAR 标记已经转化成功。由于 SCAR 标记克服了 RAPD 重复性欠佳的弱点,并且有可能将 RAPD 标记由显性转化为共显性,从而可以成为黄花白及种质鉴别的可靠依据。

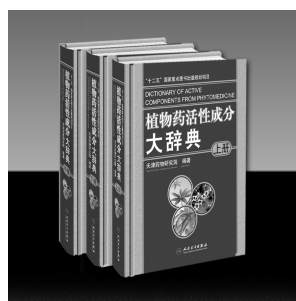
参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 18 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志 (第 14 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 等. 我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 980-984.
- [5] 李 勇, 应益昕, 赵东岳, 等. 人参及西洋参栽培土壤微生物种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1871-1875.
- [6] Zijlstra C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits [J]. *Eur J Plant*

- Pathol*, 2000, 106(3): 283-290.
- [7] 吴松权, 祖元刚, 吴基日. 膜荚黄芪 SCAR 标记的建立 [J]. 植物研究, 2008, 28(5): 560-563.
- [8] 祁建军, 李先恩, 李学禹, 等. 甘草种子 SCAR 标记的建立 [J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(5): 101-104.
- [9] Xu W J, Wang B W, Cut K M. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Euphytica*, 2004, 136(3): 233-238.
- [10] 吴乃虎. 基因工程原理 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 闫乃红, 陈 静, 马欣荣, 等. 小麦抗禾谷类根线虫基因 Rkn2mnl 的 SCAR 标记 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 250-253.
- [13] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 85(8): 985-993.
- [14] 丁 洲, 江昌俊, 叶爱华, 等. 茶树的 RAPD 标记向 SCAR 标记转化的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(3): 315-318.
- [15] 王 英, 庄南生, 黄东益, 等. 甘蔗祖亲种 RAPD 标记的序列特征片段扩增区域 (SCAR) 转化分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 713-721.
- [16] 孙保娟, 李植良, 黎振兴, 等. SCAR 标记转化失败的原因和对策 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 589-594.
- [17] 赵静媛, 陈素梅, 陈发棣. 与地被菊株型匍匐性连锁 RAPD 标记的 SCAR 转化 [J]. 林业科学, 2009, 45(9): 147-150.

“十二五”国家重点图书出版规划项目

《植物药活性成分大辞典》(上、中、下册)



植物中的活性成分是植物药发挥疗效的物质基础,植物活性成分研究是阐释植物药的生物活性、临床疗效和毒性的必要手段,也是新药发现和创制的可行途径,更是中药药效物质基础研究、质量控制以及配伍合理性及作用规律研究的前提和基础。近些年来,随着国际上植物化学以及天然药物化学学科的迅速发展,大量的植物活性成分被研究和报道,形成大量、丰富的植物活性成分研究的信息源。但是,这些资料作为原始文献散在于成千上万的中外学术期刊上,不能满足读者对植物活性成分的系统了解、方便查阅和迅速掌握的需要。

天津药物研究院在国家科技部和原国家医药管理局新药管理办公室支持下,在建立“植物活性成分数据库”的基础上,组织科研人员经过几年的艰苦努力编纂了大型工具书《植物药活性成分大辞典》。本套书分上、中、下共三册,共收载植物活性成分 8 719 个,共约 700 万字。正文中每个活性成分包含英文正名、中文正名、异名(异名之间用分号隔开)、化学名、结构式、分子式和分子量、理化性状(晶型、熔点、溶解性、旋光、紫外、红外、质谱、氢谱和碳谱)、植物来源、生物活性等内容。并于下册正文后附有三种索引——植物药活性成分中文名、植物药活性成分英文名和植物拉丁名索引。全书涵盖大量国内外专业期刊的翔实数据,内容丰富、信息量大,具有反映和体现信息趋时、简便实用的特色;作者在注重数据科学性、系统性的同时,着眼于全球药物研发前沿需求与我国市场实际应用的结合,为新药研究人员选题、立项、准确评价成果提供快速、简便、有效的检索途径,为植物药的开发、利用提供疗效优异、结构独特的活性分子或先导化合物。

本套书的出版必将为我国“十二五”医药事业发展和天然药物产业发展提供翔实而可靠的科学数据和技术支撑,为促进植物药资源的利用,重大创新药物的研究以及促进特色产业的可持续发展提供趋时的数据资源和检索途径。

该书已批准列入“十二五”国家重点图书出版规划项目,于 2011 年 11 月由人民卫生出版社出版发行,大 16 开精装本,每套定价 588 元。