

• 药材与资源 •

采用巢式 PCR-直接测序法分析人参达玛烯二醇合成酶基因单核苷酸多态性

吴文如^{1,2}, 刘良¹, 黄宝明¹, 程春松¹, 罗培¹, 周华^{1*}

1. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 中国澳门特别行政区 000853

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 建立人参皂苷生物合成通路中的关键酶——人参达玛烯二醇合成酶 (DS) 基因 cDNA 序列的单核苷酸多态性 (SNP) 检测方法, 为人参属植物 DS 基因的 SNP 研究以及人参类药材的品种鉴定提供参考。方法 采集不同产地、不同品种和生长年限的人参样品, 提取 RNA, 逆转录为 cDNA。采用巢式 PCR 进行扩增, 根据人参 DS 基因 cDNA 保守序列设计 1 组引物用于第 1 轮 PCR, 2 组 DS 基因上下游分段引物用于第 2 轮 PCR, 扩增产物直接测序。测序结果经 BLAST 同源比较后, 采用 DNAMAN 软件进行多重比对分析, 以发掘不同样品间 DS 基因差异位点作为候选 SNP。结果 57 份人参样本共获得 111 个符合测序要求的 DS 基因上下游分段 PCR 产物, 其中测序成功 103 个, 序列经 BLAST 判定为人参 DS 基因, 经多重比对, 发现 6 个样品存在 7 个 SNP 位点。结论 建立了巢式 PCR-直接测序法发掘人参 DS 基因 cDNA 序列的 SNP, 方法具有特异性好、操作简单、结果准确等优点。可用于检测人参样品的 DS 基因是否含有 SNP 及其类型, 这可为人参及其相关药材和产品的质量评价新方法研究提供有价值的遗传研究工具和分子标记资源。

关键词: 人参; 达玛烯二醇合成酶; 单核苷酸多态性; 巢式 PCR; RNA; cDNA

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)14-2127-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.019

Application of nested PCR and direct sequencing to discover single nucleotide polymorphisms in cDNA sequence of dammaranediol synthase gene of *Panax ginseng*WU Wen-ru^{1,2}, LIU Liang¹, HUANG Bao-ming¹, CHENG Chun-song¹, LUO Pei¹, ZHOU Hua¹

1. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine (Macau University of Science and Technology), SAR Macau 000853, China

2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To establish a method for discovering single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cDNA sequence of dammaranediol synthase (DS) gene, a key enzyme in the ginsenoside biosynthesis pathway of *Panax ginseng*, thus to provide reference for the SNP analysis of DS gene and authentication of ginseng medicinal materials. **Methods** *P. ginseng* samples from various cultivars, production regions, and growth years were collected. Total RNA was extracted and reversely transcribed into cDNA. The cDNA was amplified by nested PCR method to prepare the products for directly sequencing. The sequences were analyzed by BLAST for homology alignment and then by DNAMAN for multiple sequence alignment to explore different loci among different samples, which was regarded as candidate SNP. **Results** One hundred and eleven amplicons of the upper or lower half part of DS gene were obtained from 57 samples after nested PCR, and 103 amplicons were successfully sequenced. All of these sequences were confirmed to be the *P. ginseng* DS gene by BLAST analysis. Seven SNPs from six samples were discovered by multiple sequence alignment analysis. **Conclusion** We have developed a method to discover the unknown SNPs from the cDNA sequence of DS gene in *P. ginseng* with the advantages of good specificity, simple operation, and accurate result. This method can be used to detect if *P. ginseng* samples contain SNP and its type, and it also provides a valuable tool for the genetic research and molecular markers resources for establishing a new quality evaluation method for *P. ginseng* and related Chinese materia medica and its products.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; dammaranediol synthase; single nucleotide polymorphisms; nested PCR; RNA; cDNA

收稿日期: 2015-01-16

基金项目: 澳门科学技术发展基金 (071/2011/A3); 澳门基金会 (0206)

作者简介: 吴文如 (1976—), 男, 博士, 副教授, 从事中药鉴定和分子生药学研究。E-mail: wuwenru@gzucm.edu.cn

*通信作者 周华 (1972—), 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事中药质量研究。Tel: (0853)88972458 E-mail: huazhou2009@gmail.com

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指基因组中由于单个碱基的替换、插入或缺失所引起的多态性^[1], 广泛存于基因序列中, 参与了基因的表达水平高低以及表达产物活性强弱的调控^[2]。在药用植物体内调控活性成分生物合成过程的关键酶基因表达水平或表达产物活性强弱如果受 SNP 的影响而发生变化, 就会引起这些成分在中药材的量出现变化, 进而影响药效, 从而对中药材的质量产生显著影响。已有研究证实 SNP 可以影响甘草的活性成分甘草酸的量高低^[3-4]。因此, 选择中药材活性成分生物合成的关键酶基因, 研究其 SNP 与活性分量及药效的关系, 可为研究中药材的种质资源以及建立评价中药材真伪优劣的新方法提供有益的参考。由于绝大多数中药材尚缺乏基因组序列数据, 对中药材单个基因的研究也不多, 这就很难找到中药材关键酶基因 SNP 的信息, 也就无从研究 SNP 与活性分量及药效的关系。

人参来源于五加科 (Araliaceae) 植物 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根^[5], 是最重要的中药材之一, 具有滋补强壮、补气养血等多种功效, 被誉为“百药之王”, 在我国已有 2 000 多年的栽培和应用历史。我国人参栽培地域广阔, 生态条件千差万别, 加上长期的人工选择, 形成了种类繁多的农家类型^[6]。人参的临床疗效、药理活性、人参皂苷量与其产地、栽培品种、生长年限等关联紧密^[7-9]。人参皂苷是人参中公认的主要活性成分, 其

生物合成过程较为清楚, 其中一个关键酶为达玛烯二醇合成酶 (dammaradiol synthase, DS)^[10], 研究该基因的 SNP 对于评价人参种质资源的遗传多样性, 建立更加有效的人参质量评价新方法, 合理开发利用人参种质资源具有重要意义, 目前还未见其相关 SNP 研究报道。因此, 本研究选择 DS 基因为研究对象, 采用巢式 PCR-直接测序法, 通过对不同样品的序列比对, 以发现人参的 DS 基因序列是否存在 SNP 及其类型。

1 仪器与材料

1.1 主要试剂及仪器

EasyPure Plant RNA 试剂盒、5K DNA Ladder 购自北京全氏金生物技术有限公司, 2×PCR PrimeSTAR HS (Premix) 购自 Taraka 生物公司, Thermo Maxima 1st strand cDNA synthesis Kit 逆转录试剂盒购自 Thermo Scientific 生物公司。Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (美国 Applied Biosystems 公司), TissueLyserII 组织研磨机 (德国 Qiagen 公司), Eppendorf 5424R 台式冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), Gel Doc XR⁺ 凝胶成像仪 (美国 Biorad 公司)。

1.2 材料

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 样品采自我国吉林、辽宁等人参主产区的种植基地, 并记录 GPS 位置信息, 清洗干净后, 置 -80 °C 保存于澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室, 由广州中医药大学吴文如副教授鉴定, 样品信息见表 1。

表 1 序列分析所用的样品

Table 1 Samples used in sequence analysis

品种	编号	采集地	年限	数量	成功测序	
					DS 上	DS 下
边条园参	YSbt6-1~6	集安康美新开河药业有限责任公司参场	6	6	5	6
大马芽园参	DMYJY5-1~6	吉林长白县加一土产有限公司参场	5	6	4	5
大马芽园参	DMYHJ5-1~6	吉林抚松县宏久参业有限公司参场	5	6	5	6
福星一号园参	FX1-6-1~4	吉林抚松人参种源基地参场	6	4	4	4
大马芽林下参	DMYLX6-1~6	吉林抚松新屯子镇林下参场	6	6	5	6
大马芽林下参	DMYLX10-1~3	吉林抚松新屯子镇林下参场	10	3	3	3
大马芽林下参	DMYLX15-1~3	吉林抚松新屯子镇林下参场	15	3	3	3
石柱参	SZ6-1~6	宽甸长白山石柱野山参发展有限公司参场	6	6	5	6
石柱参	SZ10-1~3	宽甸长白山石柱野山参发展有限公司参场	10	3	3	3
石柱参	SZ15-1~3	宽甸长白山石柱野山参发展有限公司参场	15	3	3	3
韩国延丰园参	YF5-1~5	吉林集安大地参业有限公司参场	5	5	3	5
韩国天丰园参	TF5-1~6	吉林集安大地参业有限公司参场	5	6	4	6
合计				57	47	56
测序成功率					82.5%	98.2%

2 方法

2.1 人参总 RNA 提取和逆转录

根据 Easy Pure Plant RNA 试剂盒使用指南进行总 RNA 的提取。步骤：将存储于-80 °C 的人参取出，切取 0.2 g 组织，用无菌水冲洗干净，置于 2 mL EP 管中，加入 1 mL BB6（含 20 μL β-巯基乙醇）以及 1 粒 5 mm 瓷珠，于 TissueLyser II 组织研磨机中研磨至无组织块，室温孵育 3 min。12 000×g 离心 2~5 min，小心吸取上清至 RNase-free 的离心管中。向上清中加入 0.5 倍体积无水乙醇，涡旋彻底混匀，分散沉淀。将得到的溶液和沉淀一起加入离心柱中，12 000×g 离心 30 s，弃掉流出液。加 500 μL CB6，室温，12 000×g 离心 30 s，弃掉流出液。向离心柱中央加入 80 μL 的 DNase I 工作液（70 μL 缓冲液+10 μL DNase I），室温放置 15 min，加 500 μL CB6，室温 12 000×g 离心 30 s，弃掉流出液。加 500 μL WB6，12 000×g 离心 30 s，弃掉流出液，并重复此步骤 1 次。室温 12 000×g 离心 2 min，彻底去除残留的乙醇，在室温静置数分钟彻底晾干离心柱。加 50 μL RNase-free H₂O 在离心柱的中央，室温静置 1 min。室温 12 000×g 离心 2 min，洗脱 RNA。将 RNA 置于-80 °C 保存。

逆转录反应按 Thermo Maxima 1st strand cDNA synthesis Kit 逆转录试剂盒操作指南进行，20 μL 的反应体系包括人参总 RNA 约 100 ng，5×Reaction Mix 4 μL，Maxima Enzyme mix 2 μL，离心混匀。反应程序：25 °C、10 min，50 °C、15 min，85 °C、5 min。产物于-20 °C 保存。

2.2 人参 DS 基因巢式扩增引物的设计与合成

在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) 检索到人参 DS 基因记录 5 条，其中包含有 mRNA 的编码区（长度 2 310 bp）序列 3 条（GenBank 登录号 GU183405.1、AB265170.1、JN596111.1），利用在线工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析，相似度为 99%。根据 DS 基因保守序列，采用引物设计软件 Primer 5.0，选择巢式 PCR 的方式扩增，设计了一对外侧引物 F1 和 R1，以获得包括编码区序列的基因模板；同时设计了 2 对上下游分段内侧引物 F2、R2 以及 F3、R3，其中包括大于 100 bp 的序列重叠，以便覆盖包含 DS 基因编码区的完整序列。引物交由北京六合华大基因科技股份有限公司合成，采用 MOP 方式纯化。引物序列见表 2，引物设计示意图见图 1。

表 2 人参 DS 基因巢式 PCR 引物序列

Table 2 Nested PCR primers in DS gene of *P. ginseng* used

代号	序列	引物长度/bp	产物长度/bp	退火温度/°C
F1	GACACCACATACCAACAAGAAGA	23	2 470	61
R1	ACTGAAGCCAGAAGCTGGAA	20		
F2	AGACTTAAGAATGTGGAAGCTGAAG	25	1 204	62
R2	AGCAAGGTGATGTTTAACTCATCA	25		
F3	ACAGGAAATGGGGAAAAAGCT	21	1 280	63
R3	ATTTGGAGACGATACTAGTGTGGAA	25		

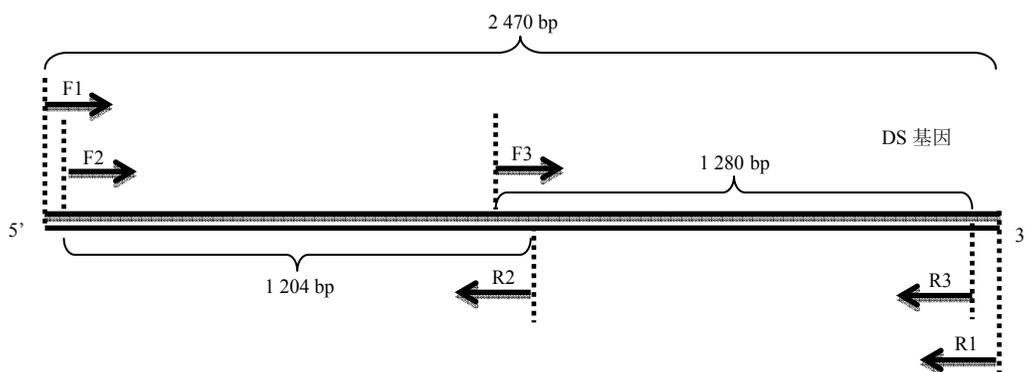


图 1 DS 基因巢式 PCR 引物设计示意图

Fig. 1 Amplified region by nested PCR primers in DS gene

2.3 人参 DS 基因的 PCR 扩增

采用巢式 PCR 的方式, 选择引物 F1、R1 进行第 1 轮扩增, 取其产物 2 μL 作为第 2 轮扩增的模板, 至 2 个 PCR 管中, 分别选择引物 F2、R2 和 F3、R3 进行第 2 轮扩增。反应体系: Premix PrimeSTAR HS 25 μL, 模板 2 μL, 引物 (20 μmol/L) 各 0.7 μL, 加水至 50 μL。反应程序: 预变性 94 °C、2 min, 98 °C 变性 10 s, 61~63 °C (根据引物不同) 退火 10 s, 72 °C 延伸, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min, 产物于 4 °C 保存。

2.4 人参 DS 基因 PCR 产物电泳检测和测序

PCR 产物的电泳检测选择 1.5% 琼脂糖凝胶, 电压 100 V, 时间 30 min。PCR 产物和 DNA Marker 各上样 3 μL。电泳结束后, 取出凝胶, 于 Gel Doc XR⁺ 凝胶成像仪中拍照记录。

选择含有预期片段大小的 PCR 产物原液, 按 Sanger 法进行测序, 双向测序, 利用 CodonCode Aligner 4.24 软件进行拼接。测序工作由深圳华大基因公司广州测序部进行。

2.5 人参 DS 基因序列的比对分析

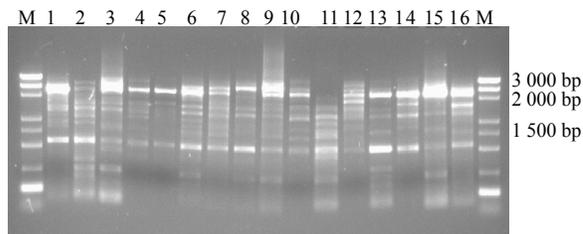
各样品的测序结果通过在线工具 BLAST 进行序列的查询和同源性比较, 搜索参数: 数据库选择 Nucleotide collection (nr/nt), 方法使用 Highly similar sequences (megablast)。利用 DNAMAN 7.0 生物统计软件分析各样品序列间的相似度, 同时生成典型序列, 并将得到的典型序列与 GenBank 中收录的人参 (登录号: GU183405.1、AB265170.1、JN596111.1、BD420539.1)、西洋参 (登录号: GU997679.1、KC316048.1、KC524472.1)、三七 (登录号: GU997680.1、KC422652.1、KC953035.1)、越南人参 (登录号: KF306328.1) 等物种的 DS 基因进行同源性比较, 并以越南人参为外类群, 构建进化树。由于 DNA 序列是具有离散特征状态的数据, 因此采用最大似然法对多序列比对后的数据进行聚类分析^[11]。利用 DNAMAN 软件计算样品间的遗传距离并发现 SNP。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增产物电泳结果

巢式 PCR 第 1 轮扩增产物电泳凝胶图显示有约为 2 470 bp 的扩增条带, 与设计的 DS 基因目的条带相符, 但也出现较多杂带, 仅极少量样品未见 2 470 bp 目的条带 (图 2)。

巢式 PCR 第 2 轮扩增产物电泳凝胶图显示,



M-Marker 1~6-DMYHJ5 7~12-SZ6 13~15-SZ10 16-SZ15, 下同
M-Marker 1—6-DMYHJ5 7—12-SZ6 13—15-SZ10 16-SZ15, same as below

图 2 巢式 PCR 第 1 轮引物 F1、R1 扩增部分产物电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis of amplification partial products F1 and R1 of 1st round of nested PCR

F2、R2 和 F3、R3 产物分别出现了约为 1 204 bp 和 1 280 bp 的扩增条带, 与设计目的条带相符, 且亮度极高, 背景清晰, 符合测序要求 (图 3、4)。57 份人参样品中, 仅 3 份样品的 DS 基因片段未成功扩增, 共获得 113 个符合测序要求的 DS 基因上下游分段 PCR 产物, 其中成功测序并拼接序列 103 条, DS 上段测序成功率为 82.5%, 下段为 98.2% (表 1), 表明扩增成功率和测序成功率较高。

3.2 cDNA 序列同源性比较

成功测序并拼接的 DS 基因上下游分段序列共 103 条, 其典型序列如图 5 和 6, 序列间的相似度达

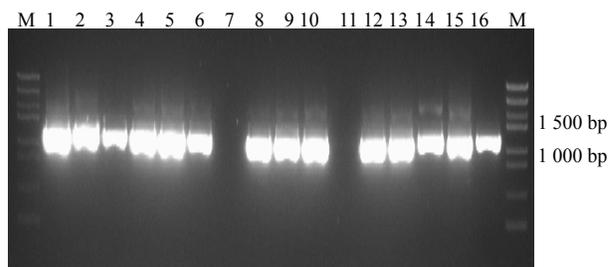


图 3 巢式 PCR 第 2 轮引物 F2、R2 扩增部分产物电泳结果
Fig. 3 Electrophoresis of amplification partial products F2 and R2 of 2nd round of nested PCR

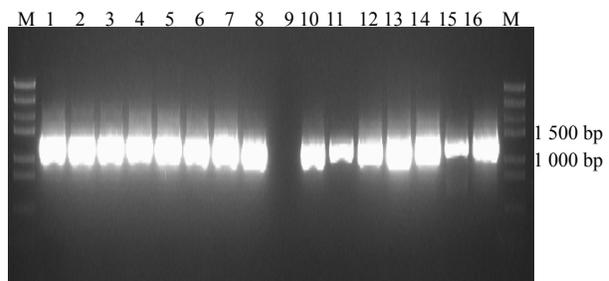


图 4 巢式 PCR 第 2 轮引物 F3、R3 扩增部分产物电泳结果
Fig. 4 Electrophoresis of amplification partial products F3 and R3 of 2nd round of nested PCR

```

1 GAGTTTCAGC CCGATGCTGG TACTCCAGAA GAGAGGGAAG AGGTTGAAAA
51 AGCACGCAAG GATTATGTAA ACAATAAGAA GCTACATGGA ATTCATCCAT
101 GCAGTGATAT GCTGATGCGC AGGCAGCTTA TTAAGAAAAG TGGAAATCGAT
151 CTCCTAAGCA TACCGCCGTT GAGATTAGAT GAAAACGAAC AAGTGAACATA
201 CGATGCAGTT ACAACCGCTG TGAAGAAAAG TCTTCGATTG AACCGGGCAA
251 TTCAAGCACA CGATGGTCAC TGGCCAGCTG AAAATGCAGG CTCTTTACTT
301 TATACACCTC CCCTTATCAT TGCCCTATAT ATCAGCGGAA CGATTGACAC
351 TATTCTGACA AAACAACACA AGAAGGAACT GATTTCGCTT GTTTACAACC
401 ATCAAAATGA GGATGGTGA TGGGGATCCT ATATTGAGGG GCACAGCAGC
451 ATGATTGGGT CAGTACTTAG CTACGTGATG TTACGTTTGC TAGGAGAAGG
501 ATTAGCTGAA TCTGATGATG GAAATGGTGC AGTTGAGAGA GGCCGGAAGT
551 GGATACTTGA TCATGGAGGT GCAGCCGCA TACCCTCTTG GGGAAAGACT
601 TATCTAGCGG TGCTTGAGT ATATGAGTGG GAAGGTGCA ACCCGCTGCC
651 CCCAGAATTC TGGCTTTTCC CTTCAAGTTT TCCTTTTCAT CCAGCAAAAA
701 TGTGGATCTA CTGCCGTGC ACTTACATGC CAATGTCGTA TTTGTATGGG
751 AAGAGATATC ATGGACCAAT AACCGATCTT GTTTTATCTT TGAGGCAAGA
801 AATTTACAAC ATTCCTTATG AGCAGATAAA GTGGAATCAA CAGCGCCATA
851 ACTGTTGCAA GGAGGATCTC TACTACCCTC ATACCCTTGT ACAAGACCTG
901 GTTTGGGATG GTCTTACTA CTTTAGTGAA CCATTCTCA AACGTTGGCC
951 CTTCAACAAA CTGCGAAAAA GAGGTCTAAA AAGAGTTGTT GAACAAATGC
1 001 GCTATGGTGC CACCGAGACC AGATTCATAA CCACAGGAAA TGGGGAAAAA
1 051 GCTTTACAAA TA
    
```

图5 DS基因上游分段典型序列 (DMYHJ5-3)

Fig. 5 Typical sequence of DMYHJ5-3 amplified from upstream of DS gene

```

1 AATGGTGATG AGTTTAAACA TCACCTTGCT AGAATTCCTG ATTTCTTATG
51 GATTGCTGAG GATGGAATGA CAGTACAGAG TTTTGGTAGT CAACTATGGG
101 ACTGTATTCT TGCTACTCAA GCAATTATCG CCACCAATAT GGTGAAGAA
151 TACGGAGATT CTCTTAAGAA GGCGCATTTC TTCATCAAAG AATCGCAGAT
201 AAAAGAAAAT CCAAGAGGAG ACTTCCTAAA AATGTGTCGA CAGTTTACCA
251 AAGGTGCGTG GACTTTCTCT GATCAAGATC ATGGTTGCGT TGTCTCGGAC
301 TGCACAGCTG AAGCACTAAA GTGCCTACTG TTACTTTCAC AAATGCCACA
351 GGATATTGTC GGAGAAAAAC CTGAGGTGTA GCGATTATAT GAGGCTGTGA
401 ATGTTCTTCT CTATTTGCAG AGTCGTGTAA GTGGTGGTTT CGCAGTTTGG
451 GAGCCTCCAG TTCCAAAACC ATATTGGAG ATGTTGAATC CTTCAGAAAT
501 TTTTGCAGAC ATTGTTGTTG AGAGAGAGCA CATTGAATGC ACTGCATCTG
551 TAATCAAAGG TCTGATGGCA TTTAAATGCT TGCATCCTGG GCATCGTCAG
601 AAAGAGATAG AGGATTCTGT GGCGAAAGCC ATCCGTTATC TTGAAAGAAA
651 CCAAATGCCT GATGGTTCAT GGTATGGCTT TTGGGGAATT TGTTCCTCT
701 ATGGGACATT TTTTACCCTA TCTGGGTTG CTTCTGCTGG GAGGACTTAT
751 GACAACAGTG AAGCAGTTCG TAAGGGTGT AAATTTTCC TTCAACACA
801 AAATGAAGAA GGTGGTTGGG GGGAGAGTCT TGAATCATGC CCAAGCGAAA
851 AATTTACACC ACTCAAGGGA AACAGAACAA ATCTAGTACA AACATCATGG
901 GCTATGCTAG GTCTTATGTT TGGTGGACAG GCCGAGAGAG ATCCGACACC
951 TCTGCATAGA GCAGCAAAGT TGTGATCAA TGCGCAAATG GATAATGGAG
1 001 ATTTCCCTCA ACAGGAAATT ACTGGAGTAT ACTGTA AAAA TAGTATGTTA
1 051 CATTATGCGG AGTACAGAAA TATATTTCT CTTTGGGCAC TCGGAGAATA
1 101 TCGGAAACGT GTTTGGTTGC CTAAGCACCA GCAGCTCAA ATTTAAGTTA
1 151 CATTCTTA
    
```

图6 DS基因下游分段典型序列 (DMYXL6-6)

Fig. 6 Typical sequence of DMYXL6-6 amplified from downstream of DS gene

99%以上。得到的典型序列 (DS consensus sequence) 与 GenBank 中收录的人参等物种的 DS 基因同源性比较, 结果与人参 DS 基因序列 (登录号: GU183405.1、AB265170.1、JN596111.1、BD420539.1) 相似度高达 100%, 判断扩增所得到的序列为 DS 基因。遗传聚类分析结果表明, 越南人参为一类; 三七单独为一类, 人参和西洋参聚类在一起, 但与三七遗传距离差异不大, 结果见图 7。

3.3 碱基突变位点统计

利用 DNAMAN 软件, 以人参 DS 基因 (AB265170.1) 序列为参照, 对所得的 103 条序列进行了 SNP 位点分析和比对, 发现了 6 个样品共有 7 个 SNP, 结果见图 8。本研究获得的 DNA 序列已在美国国立生物信息中心基因库 (GenBank,

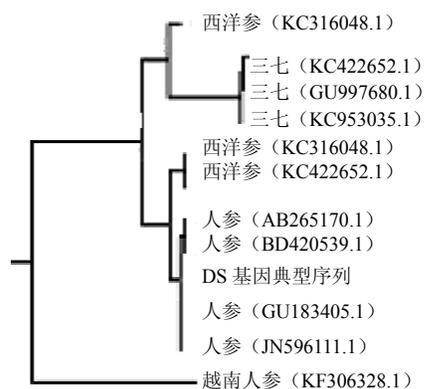


图 7 人参样品 DS 基因典型序列同源性比对结果
Fig. 7 Homologous alignment comparison of typical sequence in DS gene of *P. ginseng* samples

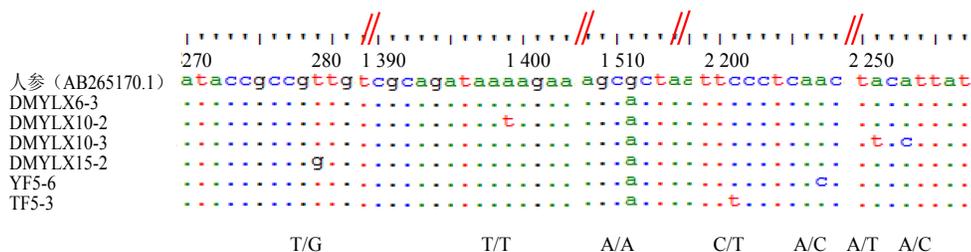


图 8 人参样品 DS 基因片段 SNP 位点
Fig. 8 SNP locus in DS gene of *P. ginseng* samples

National Center for Biotechnology Information)注册, Accession No.: KM232663、KM232664、KM232665、KM232666、KM232667、KM232668。

4 讨论

检测未知 SNP 有许多种方法, 如温度梯度凝胶电泳 (TGGE)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、单链构象多态性 (SSCP)、变性的高效液相色谱检测 (DHPLC)、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD) 等, 但这些方法只能发现样品是否含有 SNP, 不能确知 SNP 的位置和碱基类别。要想发现新的 SNP, 必须对那些含有 SNP 的 DNA 进行测序以直接获取目的片段的碱基序列, 再通过序列间的比较, 就可以直观而有效地找出 SNP, 对于一些比较小的基因, 其检出率高达 100%^[12]。因此, 本研究采用了对扩增产物进行直接测序方法以发现人参 DS 基因中的 SNP。

DNA 片段的直接测序中, 引物的合理设计是保证成功扩增和测序的前提。引物最好在模板 cDNA 的保守区域内设计, 这可通过物种间相似序

列的比较而确定。在 NCBI 上搜索不同物种的同一基因, 通过序列分析软件, 各基因相同的序列就是该基因的保守区。为保证引物的特异性, 通常引物设计完成后, 应对其进行 BLAST 检测, 如果与其他基因不具有互补性, 就可以进行下一步的实验。但由于目前缺乏药用植物的基因组序列, 因此难以判断本研究中所设计的引物的特异性。为解决这个问题, 研究中采用了特异性强和扩增效率高的巢式 PCR 技术进行 DS 序列的扩增, 结果产物质量好, 测序成功率高。巢式 PCR 利用 2 套 PCR 引物对进行 2 轮 PCR 扩增反应。在第 1 轮扩增中, 以植物基因为模板, 利用外侧引物扩增产生目的基因片段, 再以此基因片段产物为模板, 利用内侧引物进行第 2 轮扩增。因为与 2 套引物都互补的模板很少, 通过 2 次扩增, 降低了扩增多个靶位点的可能性, 从而增加了检测的特异性和可靠性。

采用 Sanger 法 1 次单向测序, 一般只能保证 800 bp 左右的碱基结果是比较可靠的。然而人参 DS 基因 mRNA 的编码区序列长度为 2 310 bp, 因此难以

通过1次PCR产物的测序获得全长测序。研究中将DS基因分为上下游2段,采用分段引物,并设计了其产物包括大于100 bp的序列重叠,以便于进行序列的拼接。为充分保证测序结果的真实性,研究中还结合采用双向测序,再通过CodonCode Aligner软件进行序列对比修正和拼接,以消除测序误差。由于对序列两端约50 bp误差部分进行的剪切,使得DS上、下2段序列之间仍存在约24 bp的序列未覆盖,未能拼接包含DS基因编码区的完整序列。有待针对中间部分序列再设计第3对引物,以实现DS基因编码区的完整测序。

在SNP检测诸多方法中,假阳性是造成多种人工精心设计的方法无法进入临床应用的障碍^[13]。实验中采用了兼具高保真性和高扩增效率的PCR用DNA聚合酶。因其具有极强的3'→5'外切酶活性而显示出超群的校正功能,可以实现对靶序列的高保真性、高灵敏度、高特异性、高成功率的扩增,从而保证测序结果真实可信。

本研究发现的DS基因SNP标记来源于DNA的转录区域。由于选择压力,SNP在单个基因、整个基因组中以及种群间的分布是不均匀的。SNP在非编码区中要多于编码区,而且在编码区也是非同义突变(有氨基酸序列的改变)的频率比其他方式突变的频率低得多^[14]。与现在常用的其他DNA分子标记,如ITS、SSR等相比较,虽然DS基因其多态性较低,但该基因来源于表达功能基因,其SNP可成为一种反映功能变化的分子标记。DS基因是调控中药人参的主要活性成分人参皂苷生物合成过程的一个关键酶,其SNP可以影响人参皂苷的生物合成,例如引起人参皂苷种类和量上的差异,从而导致药效的变化。本研究初步建立了发现人参DS基因SNP的方法,也可用于建立检测人参样品的DS基因是否含有SNP及其类型的方法,还可用于分析SNP与药效、活性成分量的关系,从而建立反映人参药效的质量评价新方法。本研究也为大多数中药缺乏基因组序列数据的情况下,进行中药材基因SNP的研

究提供了一个可行方法,有望为人参种质资源研究,人参属药材的品种分类、鉴定、遗传研究,以及建立反映人参药效的质量评价新方法研究提供有价值遗传研究工具和分子标记资源,也可供同类药材研究参考。

参考文献

- [1] Brooker A J. The essence of SNPs [J]. *Gene*, 1999, 2344(2): 177-186.
- [2] 张必弦,朱延明,来永才,等. 单核苷酸多态性(SNP)的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(21): 10755-10756.
- [3] 沈湛云. 甘草 β -AS基因多态性和 β -香树酯醇合成的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [4] 张宁. 甘草鲨烯合酶编码基因多态性及其对鲨烯积累的影响研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 宿武林,吕学明,宿艳霞. 论长白山人参主要品种类型栽种方式及其商品分类 [J]. *人参研究*, 2008, 20(4): 34-39.
- [7] 侯双利,韩梅,刘翠晶,等. 人参 β -actin基因实时荧光定量PCR方法的建立 [J]. *中草药*, 2014, 45(17): 2530-2533.
- [8] 陈文学. 不同农家类型人参质量评价 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [9] 姬庆,郜玉钢,赵岩,等. 酶法转化制备人参皂苷单体的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(22): 3356-3360.
- [10] Liang Y, Zhao S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis [J]. *Plant Biol*, 2008, 10(4): 415-421.
- [11] 常青,周开亚. 分子进化研究中系统发生树的重建 [J]. *生物多样性*, 1998, 6(1): 55-62.
- [12] 高秀丽,景奉香,杨剑波,等. 单核苷酸多态性检测分析技术 [J]. *遗传*, 2005, 27(1): 110-122.
- [13] 陈琳玲,张佳,彭翠英,等. DNA聚合酶高保真机理的新发现及其在SNP分析中的应用 [J]. *遗传*, 2005, 27(2): 279-283.
- [14] Zhao Z M, Fu Y X, Hewett-Emmett D, et al. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution [J]. *Gene*, 2003, 312: 207-213.