

药用植物草珊瑚 RAPD 扩增条件优化

张志勇¹, 何平^{2,3}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303; 2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 3. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 采用 CTAB-DNA 提取方法, 从草珊瑚植物的嫩叶中提取总 DNA。以此 DNA 为模板, 优化了草珊瑚 RAPD-PCR 的反应条件。结果表明, PCR 扩增体系最适宜的条件为: 反应体积 25 μ L, 内含 2.5 mmol/L Mg^{2+} 、1.0U DNA 聚合酶、0.4 μ mol/L 引物、60 ng 模板 DNA 和 0.16 mmol/L dNTP。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存 10 min。

关键词: 草珊瑚; RAPD; 条件优化

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)04-0455-04

Optimization of RAPD amplified conditions in medicinal plant *Sarcandra glabra*ZHANG Zhi-Yong¹, HE Ping^{2,3}

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China; 2. College of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Key Laboratory of Eco-Environment in Three-Gorges Reservoir Area, Chongqing 400715, China)

Abstract: The method CTAB-DNA isolation was optimized and used to extract genomic DNA from the tender leaves of *Sarcandra glabra*. Based on the genomic DNA, some essential factors that affect the result of RAPD were compared and the optimal RAPD system for *S. glabra* was established. The results showed that the optimal concentration of five important components such as Mg^{2+} , Taq DNA polymerase, primer, template DNA, and dNTP in 25 μ L RAPD reaction system were 2.5 mmol/L, 1.0U, 0.4 μ mol/L, 60 ng, 0.16 mmol/L respectively. Modified thermal profile consisted of an initial denaturation step at 94 $^{\circ}$ C for 2 mins, followed by 40 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 30s, 37 $^{\circ}$ C for 30 s, 72 $^{\circ}$ C for 80 s, and a final exposure to 72 $^{\circ}$ C for 10mins. Then stored in 4 $^{\circ}$ C for 10 mins.

Key words: *Sarcandra glabra*; RAPD; optimization

草珊瑚(*Sarcandra glabra*), 又名九节茶、接骨金粟兰等, 隶属于金粟兰科(Chloranthaceae)草珊瑚属(*Sarcandra*)。其全草药用, 具活血祛瘀、消肿止痛、接骨续筋功效, 民间常用来治疗跌打损伤, 风湿痹症等(江苏新医学院, 1997; 中国药典委员会, 2005)。现代医学研究表明草珊瑚全草含黄酮甙、内酯、香豆素、挥发油、有机酸及酚类等。黄酮类化合物为其最主要的活性成分, 含量最多(王浴生等,

2000), 是一类纯天然化合物, 它的提取工艺仍是研究热点(罗显华等, 2007)。

目前国内外对草珊瑚的研究很多, 化学成分方面, Luo 等(2005)从草珊瑚中分离得到两种三萜皂苷, Li 等(2006)年得到 glabraoside A 和 dihydrochalcone, 并用光谱分析法阐明了二者结构, 郁建生等(2007)探讨草珊瑚总黄酮提取工艺及其含量动态变化; 药理方面, 用动物实验观察表明草珊瑚有明显的

收稿日期: 2007-11-16 修回日期: 2008-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(30070080)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070080)]

作者简介: 张志勇(1980-), 男, 山西左权人, 研究实习员, 硕士, 主要从事植物保护生物学与植物分类研究, (E-mail) zzy@xtbg.org.cn.

抗菌、抗炎和镇痛效果(蒋伟哲等,2000)和抗肿瘤作用(孙文娟等,2003);群落学方面,对其群落植物物种多样性(张志勇等,2007)、群落特征及其主要种群生态位等进行研究(张益锋等,2007a;2007b)。分子方面的研究报道极少。

Williams 等 1990 年创立的 RAPD 技术是 DNA 分子标记技术的一项创新。它可直接反应染色体组 DNA 多态性,不受环境限制,具操作简单快捷、成本低、通用性好、灵敏度高,且无需预知基因组的相关分子生物学信息等优点而广泛应用于遗传多样性(邓传良等,2007;张仁波等,2007;Dawson 等,1993)、生物种群划分(沈曦等,1999;Brauner 等,1992;Buren 等,1994)、遗传图谱构建(魏伟等,1999)、基因定位(林菲等,2002)等方面的研究。在用 RAPD 技术进行植物种的遗传多样性分析时,首先要建立稳定的反应体系,以确保其结果的可靠性、重复性(孙丽娜等,2007)。为此,本实验就草珊瑚 RAPD 反应中的模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq 酶用量等因素进行实验,初步建立稳定性好、重复性高的 RAPD 反应体系,为深入分析草珊瑚遗传多样性提供了基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

所用草珊瑚的幼叶采自重庆北碚缙云山杉木园(冰壶中保存)。

1.2 主要试剂及仪器

TaqDNA 聚合酶 5 U/ μ L、40 个随机引物(Sangon 公司) 10 \times Buffer、MgCl₂、2.5 mmol/L dNTP、8000bp DNA Ladder Marker、琼脂糖(西班牙分装)、CTAB、PVP、EDTA、Tris 碱、核酸染料-GoldView。2%CTAB 提取缓冲液,TE(pH8.0)缓冲液灭菌保存,备用等。

仪器:MyCyclerTM PCR 仪(BIO-RAD),凝胶成像系统(Universal Hood II, BIO-RAD),台式高速冷冻离心机(TGL-16M), Smart SpecTM plus Spectrophoto-Meter (BIO-RAD, USA), MDF-U4086S 型三洋超低温冰箱,电泳仪(PowerPac300, BIO-RAD)及各种规格电泳槽。

1.3 总 DNA 提取及浓度测定

总 DNA 提取方法为 CTAB 法。取 1 g 左右的幼嫩叶片,吸干水分放入预冷的研钵(研钵置于冰

上),加入 PVP 及石英砂,再加入液氮反复研磨至冻粉状。迅速转入 5 mL 离心管中,加入 4 mL CTAB (65 $^{\circ}$ C 预热)及 100 μ L 2-巯基乙醇,混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h(期间轻摇数次)。

吸上清液,加入等体积的抽提液(氯仿:异戊醇=24:1),10 000 g 离心 10 min,再吸上清液再加入抽提液反复离心,直至上清液较为透亮。在上清液中加入 1/10 体积的乙酸钠,2 倍体积的 4 $^{\circ}$ C 无水乙醇,立即有白色絮状物出现。

用吸头将絮状物吸到 1 mL 离心管中,加入 4 $^{\circ}$ C 无水乙醇离心漂洗 2 次,倒掉乙醇,置于室温下风干至半透明。加入 100 μ L TE 溶解 DNA。取 1 μ L DNA 样品稀释 25 倍,在 Smart SpecTM plus Spectrophoto-Meter 上测定浓度、260 及 280 nm 处的吸收值以及 OD260/280 的比值。

1.4 RAPD 反应体系的初步优化

1.4.1 RAPD 主要成分用量的优化 参照汪小全等(1996)的方法,RAPD 反应体系的 5 种主要成分 Mg²⁺、TaqDNA 聚合酶、引物、DNA 模板、dNTP 的用量设置 7 个浓度梯度(表 1)。以筛选得到的 S13 号(5'-TTCCCCCGCT-3')为随机引物,以草珊瑚基因组 DNA 为模板进行 RAPD 反应体系的单因优化实验。当进行某一因素水平实验时,其他因素均固定在第 3 个浓度梯度。所有反应体系均为 25 μ L。

表 1 RAPD 反应体系中 5 种成分用量
Table 1 Different amounts of five important components used in RAPD reaction

浓度梯度 Concentration gradient	MgCl ₂ (mmol /L)	Taq DNA polymerase (U)	Primer (μ mol /L)	Template DNA (ng)	dNTP (mmol /L)
1	1.0	0.50	0.08	40	0.08
2	1.5	1.00	0.16	50	0.12
3	2.0	1.50	0.24	60	0.16
4	2.5	1.75	0.32	70	0.20
5	3.0	2.00	0.40	80	0.24
6	3.5	2.50	0.48	90	0.28
7	4.0	3.00	0.56	100	0.32

1.4.2 扩增程序的优化 筛选出各因素的最佳水平组合后,在基本扩增程序的基础上,主要针对主循环的变性时间、复性温度、延伸时间设置 6 种程序(表 2),其他参数不变。

1.4.3 扩增产物检测 RAPD 产物经 1.0%琼脂糖凝胶(含 GoldView)电泳(10 V/cm,50 mins)分离,每块凝胶加一个 230~8 000 bp 已知分子量的 DNA

Marker, 在凝胶成像系统 (Universal Hood II, BIO-RAD) 中拍照。

表 2 6 种不同的扩增程序
Table 2 Six different amplification programs

编号 No.	变性时间 Denaturation time (min)	复性温度(°C) Renaturation temperature	延伸时间 Extension time (min)
1	1.0	35	4/3
2	1.0	35	2
3	0.5	35	2
4	0.5	37	2
5	1.0	37	4/3
6	0.5	37	4/3

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系主要成分的优化

从图 1:A 可看出, Mg^{2+} 在 1.0 mmol/L 是无扩

增条带, 在 1.5~2.0 mmol/L 时扩增产物条带较模糊, 在 3.5~4.0 mmol/L 时个别扩增产物消失, 所以选择 2.5~3.0 mmol/L, 相比之下 2.5 mmol/L 时扩增产物效果要好些。引物的用量对 RAPD 体系有一定的影响(图 1:B), 在 0.40 μ mol/L 时, 扩增的条带最清晰。TaqDNA 聚合酶(图 1:C)对 RAPD 体系有较大的影响, 在 1.00U 时条带最亮, 这也是从经济角度和实验效果综合考虑。在实验设置的范围内, 模板 DNA 的用量(图 1:D)和 dNTP 的用量(图 1:E)对 RAPD 体系影响不大, 40~80 ng 的模板 DNA 用量、0.12~0.32 mmol/L dNTP 均可扩增出稳定的条带, 从扩增效果和经济角度综合考虑, 选用的模板 DNA 用量为 60 ng、dNTP 浓度为 0.16 mmol/L。因此, 优化的 RAPD 反应体系为: 在 25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 5 种主要成分的适宜浓度或用量分别为 2.5 mmol/L、1.0U、0.4 μ mol/L、60 ng 模板

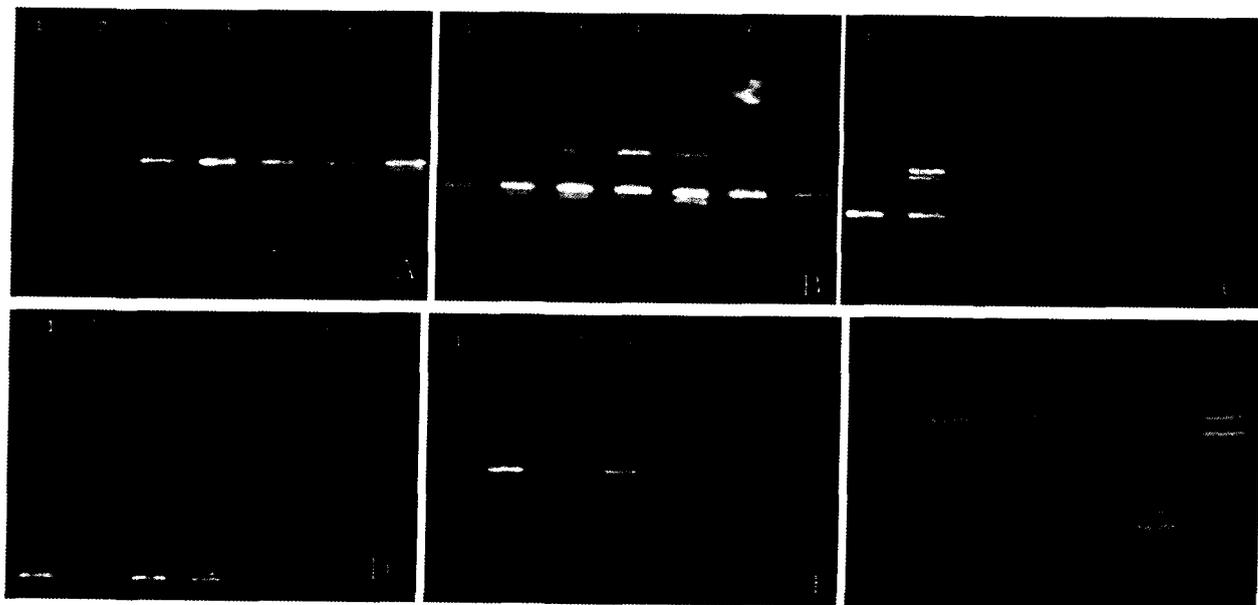


图 1 5 种主要成分和 6 种扩增程序对 RAPD 反应体系的影响 (A、B、C、D、E 中的 1-7 见表 1; F 中的 1-6 见表 2)

Fig. 1 Effects of five components and six amplified programmes on RAPD reaction (1-7 in A、B、C、D and E represent concentration gradients indicated in Table 1; 1-6 in F are the same as that in Table 2. A. Mg^{2+} ; B. Primer; C. Taq DNA polymerase; D. Template DNA; E. dNTP; F. Different thermal programmes)

DNA 和 0.16 mmol/L dNTP。

2.2 RAPD 扩增程序的优化

在优化的反应体系基础上, 用 6 种程序(表 2)进行扩增, 以程序 5 和 6 的效果最好, 扩增的条带多且清晰, 但程序 6 比 5 的特异性有所提高; 程序 3 次之, 扩增条带较多但模糊; 程序 1 和 2 扩增的条带都

很模糊; 程序 4 最差, 扩增效率较低, 条带少且弱(图 1:F)。可能是程序 5 与 6 扩增时间较短, 对酶活性的保持相对会好些。由于程序 6 比 5 的特异性好, 故确定程序 6 为优化的程序。

2.3 RAPD 扩增产物图

用 2.1 中所得到的优化体系和 2.2 中的第 6 种

扩增程序进行扩增反应。图 2 为引物 S13 对部分草珊瑚单株总 DNA 的扩增结果图。从图 2 可以看出,扩增效果好。

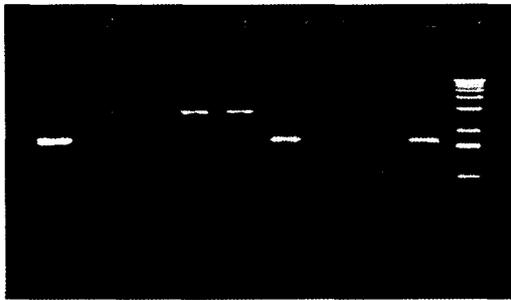


图 2 引物 S13 对部分单株总 DNA 的扩增结果
Fig. 2 Amplification results of the total DNA templates of a part of plants by S13

M: 已知大小的标准核酸(230~8 000 bp); sm: 杉木园居群, 阿拉伯数字表示不同的草珊瑚个体。

M: DNA marker(230~8 000 bp); sm: indicates the name of Fir garden population, Arabic numbers represent the different *Sarcandra glabra* individuals.

3 讨论

RAPD 反应条件严格, 由实验结果可知, Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、引物、模板 DNA、dNTP、反应缓冲液及反应程序等因素的变化都会对 RAPD 图谱产生一定的影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性。RAPD 标记进行遗传多样性分析的前提条件就是首先要保证 RAPD 带谱的准确性和稳定性。为获得重复性和稳定性较高的 RAPD 带谱, 在进行某一物种的 RAPD 分析前, 花适当时间与精力筛选最适宜的 RAPD 条件是很必要的(李钧敏等, 2002)。虽然 RAPD 反应涉及到诸多因子, 但通过严格的控制反应条件, 尽量保证所有反应在同一反应体系下完成, 如使用同一厂家相同批号的 TaqDNA 聚合酶, 采用相同的扩增程序, 就能获得重复性好、稳定性高的结果(邹喻莘等, 2001)。

通过扩增条件优化实验, 建立了药用植物草珊瑚 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件, 即反应体积 25 μ L, 内含 2.5 mmol/L Mg^{2+} 、1.0U DNA 聚合酶、0.4 μ mol/L 引物、60 ng 模板 DNA 和 0.16 mmol/L dNTP。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 mins; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 mins; 4 $^{\circ}$ C 保存 10

mins。为进一步进行草珊瑚种质资源的 RAPD 分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供了可靠的实验方法。

参考文献:

- 江苏新医学院. 1997. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 42
- 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 2000. 中药药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 714
- 邹喻莘, 葛颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 30-50
- 中国药典委员会. 2005. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社出版, 533
- Brauner S, Crawford DJ, Stuessy TF. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae[J]. *Amer J Bot*, **79**: 1 436-1 439
- Buren RV, Andersen WR, Harper KT, et al. 1994. Evaluation the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acriformis* var. *vestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA[J]. *Amer J Bot*, **81**: 514-519
- Dawson IK, Chalmers KJ, Waugh R, et al. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* population from Israel using RAPD markers[J]. *Mol Ecol*, **2**: 151-159
- Deng CL(邓传良), Liu J(刘建), Zhou J(周坚). 2007. Analysis of population genetic diversity of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD(长筒石蒜居群遗传多样性 RAPD 分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(3): 401-405
- Jiang WZ(蒋伟哲), Kong XL(孔晓龙), Huang RB(黄仁彬), et al. 2000. Studies on anti-inflammatory and antibacterial effects of tabellae *Sarcandrae*(肿节风片的抗菌和抗炎作用研究)[J]. *J Guangxi Trad Chin Med Univ*(广西中医学院学报), **3**: 50-52
- Li JM(李钧敏), Jin ZX(金则新), Ke SX(柯世省), et al. 2002. Optimal choice for compositions in RAPD analysis of *Heptacodium miconioides* (濒危植物七子花 RAPD 条件的优化)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **19**(4): 452-456
- Li Y, Zhang DM, Yu SS, et al. 2006. A novel phenylpropanoid-substituted catechin glycoside and a new dihydrochalcone from *Sarcandra glabra*[J]. *Chinese Chemical Letters*, **17**(2): 207-210
- Lin F(林菲), Li JB(李进斌), Li CY(李成云), et al. 2002. Identification of two avirulence genes in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* using random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers(利用 RAPD 分子标记定位 2 个水稻稻瘟病菌非致病性基因)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **35**(9): 1 079-1 084
- Luo XH(罗显华), Yu JS(郁建生). 2007. Separation and purification of the flavonoids from *Sarcandrae glabra* with macroporous resin(大孔吸附树脂分离纯化草珊瑚总黄酮的工艺研究)[J]. *Lishizhen Med and Mat Med Res*(时珍国医国药), **18**(11): 2703-2706
- Luo YM, Liu AH, Zhang DM, et al. 2005. Two new triterpenoid saponins from *Sarcandra glabra*[J]. *J Asian Nat Pro Res*, **7**(6): 829-834
- Shen X(沈曦), Zhou KY(周开亚), Wang YQ(王义权), et al. 1999. RAPD analysis of the genus *Agkistrodon* in China(中国(下转第 513 页 Continue on page 513))

参考文献:

- Bao SW(鲍思伟). 2005. The adaptation of rhododendron fortunei semi lethal temperature to natural temperature falling(云锦杜鹃低温半致死温度对自然降温的适应)[J]. *J Southwest Univ Nationalities*(西南民族大学学报),31(1):99-102
- Chen CL(陈长兰),Jia JX(贾敬贤),Gong X(龚欣). 1991. The initial study on the identification of coldness on Pear(*Pyrus*)(梨属植物抗寒性鉴定初报)[J]. *Northern Hort*(北方园艺),1:1-3
- Feng ML(冯美利),Liu LY(刘立云),Li J(李杰). 2008. Investigation and analysis of coldness on dehiscent fruit and fruit-dropping of coconut in Hainan(海南椰子寒害落(裂)果调查初报)[J]. *South China Fruits*(中国南方果树),37(5):49-51
- Guo HL(郭海林),Liu JX(刘建秀),Zhu XH(朱雪花), et al. 2006. Evaluation of cold resistance of *Zoysia hybrids*(结缕草属杂交后代抗寒性评价)[J]. *Acta Agrestia Sin*(草地学报),14(1):24-28
- Gao HQ(高和琼),Zhuang NS(庄南生),Wang Y(王英). 2007. Research survey of coconut breeding(椰子及其育种研究概况)[J]. *China Trop Agric*(中国热带农业),1:24-25
- Han LJ(韩联健),Xu YF(徐月发). 2006. Investigation and Analysis of situation dehiscent fruit and fruit-dropping of coconut under coldness in Hainan(海南岛椰子寒害落裂果情况的调查与分析)[J]. *Chin J Trop Agric*(热带农业科学),6:1-2
- Li JC(李俊才),Liu C(刘成),Wang JZ(王家珍). 2007. Study on the semi-lethal temperatures for European pear cultivars(洋梨枝条的低温半致死温度)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报),24(4):529-532
- Sun CX(孙程旭),Cao HX(曹红星),Chen ST(陈思婷), et al. 2009. Study on cold resistance of snake fruit by application of electrical conductivity and Logistic Equation(应用电导率法及 Logistic 方程测试蛇皮果抗寒性研究)[J]. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报),21(4):33-35
- Wang CY. 1986. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress[J]. *Hortscience*,21(1):172-175
- Wang GH(王国洪). 1990. The present condition and potential of coconut production in our country(我国的椰子生产现状与潜力)[J]. *J Trop Crops Tech*(热带作物科技),6:39-40
- Xu Y(许瑛),Chen FD(陈发棣). 2008. The LT₅₀ and cold tolerance adaptability of *Chrysanthemum* during a natural drop in temperature(菊花 8 个品种的低温半致死温度及其抗寒适应性)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报),35(4):559-564
- Zhu GH(朱根海),Zhu PR(朱培仁). 1984. Seasonal variations of cold hardiness under natural conditions and the effects of temperature on dehardening in wheat(小麦抗冻性的季节变化以及温度对脱锻炼的效应)[J]. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报),2(2):9-16
-
- (上接第 458 页 Continue from page 458)
- 蝮属蛇类的 RAPD 分析[J]. *Acta Zoologica Sin*(动物学报),45(1):40-48
- Sun LN(孙丽娜),Yan YZ(严一字),Wu JR(吴基日), et al. 2007. Optimization of RAPD conditions of *Platycodon grandiflorus*(桔梗 RAPD 反应体系的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(5):410-413
- Sun WJ(孙文娟),Li J(李晶),Lan FY(兰凤英), et al. 2003. Antitumor effect of Zhongjiefeng injection on mice liver cancer Hep-A-22 and its toxicity(肿节风注射液抗小鼠肝癌 Hep-A-22 的作用及毒性)[J]. *Chin Trad Patent Med*(中成药),25(4):313-315
- Wang XQ(汪小全),Zou YP(邹喻苹),Zhang DM(张大明), et al. 1996. Problems in the use of RAPD the study of genetic diversity and systematics(RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),38(12):954-962
- Wei W(魏伟),Wang HX(王洪新),Hu ZA(胡志昂), et al. 1999. Primary studies on molecular ecology of *Caragana* spp. populations distribution over Maowusu sandy grassland: from RAPD data(毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: DAPD 证据)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报),19(1):16-22
- Yu JS(郁建生),Yu JP(郁建平). 2007. Study on extraction tech-
- tics and variety trends of the flavonoids in *Sarcandra glabra*(珊瑚总黄酮提取工艺及其含量动态变化)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志),32(4):307-309
- Zhang RB(张仁波),Dou QL(窦全丽),He P(何平), et al. 2007. Analysis of genetic diversity in *Thuja sutchuenensis* populations as revealed by morphological and molecular data(濒危植物崖柏遗传多样性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(5):687-691
- Zhang YF(张益锋),He P(何平),Wang F(王芳), et al. 2007. Study on the community characteristics of *Sarcandra glabra* in Mt. Jinyun(缙云山草珊瑚群落特征研究)[J]. *J Southwest Univ*(*Nat Sci Edi*)(西南大学学报·自然科学版),29(10):87-91
- Zhang YF(张益锋),He P(何平),Wang F(王芳), et al. 2007. A study of the niches of main species in communities with *Sarcandra glabra* populated in Mt. Jinyun(缙云山草珊瑚群落主要种群生态位研究)[J]. *J Southwest Univ*(*Nat Sci Edi*)(西南大学学报·自然科学版),29(8):102-106
- Zhang ZY(张志勇),He P(何平),Ji HC(冀花存), et al. 2007. A study of plant species diversity of *Sarcandra glabra* communities in the Jinyun Mountains(缙云山草珊瑚群落植物物种多样性研究)[J]. *J Southwest Univ*(*Nat Sci Edi*)(西南大学学报·自然科学版),29(2):86-90