文章编号:1001-7380(2017)02-0001-05

南苍术与苍术素相关的ISSR-SCAR分子标记筛选

王明强[1],方 彦[2],杭悦宇[1],汤诗杰[1*],薛佳宇[1*]

(1. 江苏省中国科学院植物研究所,江苏 南京 210014;2. 南京森林警察学院,江苏 南京 210023)

摘要:为了探索鉴别茅山地区野生南苍术中高苍术素含量植株的分子学方法,为快速筛选高苍术素含量的植株提供理论依据,在茅山地区野外采集30株南苍术,提取根茎中挥发油,根据液相色谱法测定的挥发油中苍术素含量,筛选出5个高含量和5个低含量的单株,分别构建高含量和低含量植株DNA混合池,用于南苍术与苍术素相关的ISSR-SCAR标记研究。结果显示,在所选的29条ISSR引物中,引物ISSR-846(5'-CACACACACACACACART-3')可以在苍术素含量高的南苍术中扩增出片段长度为948 bp的特异性条带。针对该特异性条带的序列,设计了正向引物(5'-AAGAGATCATTGGTATTAAAATTAAGTGTTATTAGTAG-3')和反向引物(5'-CATAGATTCAATGGCAATCCTCACATCAACTTCAGATTCA-3'),验证发现,设计的ISSR-SCAR引物仅能在茅山南苍术高苍术素含量个体中扩增出条带,其他含量个体均未扩增出条带。认为本研究筛选的位点特异性引物,可用来快速鉴别高苍术素含量的南苍术植株。

关键词:南苍术;苍术素;ISSR-SCAR;位点特异性PCR

中图分类号:Q946-33 **文献标志码**:A **doi**:10.3969/j.issn.1001-7380.2017.02.001

Screening of ISSR-SCAR Molecular Markers associated with atractylodin in *Atractylodes lancea*

WANG Ming-qiang[1], FANG Yan[2], HANG Yue-yu[1], TANG Shi-jie[1*], XUE Jia-yu[1*]

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Forest Police College, Nanjing 210023, China)

Abstract: To explore the molecular methods for the identification of Maoshan wild *Atractylodes lancea* with high atractylodin and to provide a theoretical basis for rapid screening of the plants with high atractylodin, thirty *Atractylodes lancea* individuals were collected in Maoshan area and their essential oil was extracted to measure the content of atractylodin. Five individuals with higher atractylodin as well as another five with lower atractylodin, were got to use for exploring the ISSR-SCAR markers associated with atractylodin content. Among 29 primers used, ISSR-846 (5'-CACACACACACACACART-3') could be used to amplify a specific band in higher atractylodin individuals. The SCAR primers (F-primer: 5'-AAGAGATCATTGGTATTAAAATTAAGTGTTATTAGTAG-3') and (R-primer: 5'-CATAGATTCAATGGCAATCCTCACATCAACTTCAGATTCA-3'), designed according to the sequence of the specific bands, could be only used to amplify bands in higher atractylodin individuals while could not be used in others. Therefore, the above-mentioned site-specific primers could be used to identify *Atractylodes lancea* individuals with higher atractylodin.

Key words: *Atractylodes lancea*; Atractylodin; ISSR-SCAR; Site-specific PCR

收稿日期:2017-03-17;**修回日期**:2017-03-26

基金项目:江苏省林业三新工程项目"江苏野生道地药材茅苍术保护技术创新与应用"(LYSX[2015]22)

作者简介:王明强(1992-),男,安徽阜阳人,硕士研究生。主要从事植物系统与演化研究。

* **通信作者**:汤诗杰(1969-),男,安徽东至人,副研究员。主要从事园林植物与植物多样性保护研究。E-mail: tsj@cnbg.net。

薛佳宇(1982-),男,江苏宜兴人,副研究员。主要从事植物分子演化研究。E-mail:xuejy@cnbg.net。

药材苍术的主要活性成分挥发油,主要由苍术酮、南术醇、β-桉叶醇、苍术素等成分组成[1],其中苍术素含量被药典作为评价药材苍术质量优劣的重要指标之一[2]。江苏茅山地区分布的道地药材南苍术[*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.],其苍术素含量比其他地区南苍术的平均值高约20倍[3],但在居群、个体间存在较大的变异[4]。

据报道,南苍术根茎中苍术素含量测定的方法有薄层层析、气相色谱、液相色谱和分子标记等。其中,薄层层析图谱较为直观,但准确度不够[1];而液相和气相色谱法测定准确,但费用昂贵,且操作流程较为繁琐[5-7]。近年来,一些相关于植物成分含量的分子标记研究,如苍术挥发油中苍术素等组分的含量变化与遗传背景差异相关联[8],和利用南苍术2条RAPD随机引物,可分别标记高含量苍术素个体和低含量苍术素个体[9]等,为植株的鉴定提供了新的思路;但利用RAPD法,仍然要通过仔细辨认指纹图谱来识别,需要分子生物学的专业背景,在实际应用中比较困难;而SCAR标记是通过PCR扩增条带的有无来判断,更为简洁、直观,非专业人员也能容易地进行检测,更具有应用潜力[10-11]。

选择茅山地区的南苍术30株,通过构建高苍术素含量和低苍术素含量的ISSR分子标记筛选体系,进一步开发与苍术素高含量相关的特异性分子标记,以期为筛选苍术素高含量的南苍术资源提供一种特异、专一、快速的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

选择江苏句容茅山地区射乌山,采集同一生境的南苍术单株30个。经杭悦宇研究员鉴定,标本凭证存放于江苏省中国科学院植物研究所标本馆(NAS)。单株根茎清洗干净,于烘箱中30 ℃烘干并粉碎,用于苍术素含量的测定。另对应取单株新鲜叶片数片,以酒精清洗后存于-80 ℃冰箱中,用于南苍术植株总DNA的提取。

1.2 方法

1.2.1 南苍术植株根茎中苍术素的测定 精密称取1 g南苍术根茎粉末置于25 mL锥形瓶中,加入10 mL甲醛,封口膜封口后,20 ℃超声波提取30 min。取上清液1.2 mL,加入1.5 mL离心管中,15 000 r/min离心5 min,取1 mL上清液备用[5-6]。标准品为苍术素(购于上海中药标准化研究中心),称取0.1 g溶于100 mL甲醇中,配制成1 mg/mL的苍术素溶液备用。

高效液相色谱条件:色谱柱Agilent TC-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温为20 ℃,流动相为乙腈(A)-水(B)(49:51),检测波长为203 nm,流速1 mL/min,进样量20 μL。洗脱程序为0—18 min, 70%A→100%A;18—28 min, 100%A→100%A。

分别测定30株南苍术根茎苍术素含量,选择5个苍术素高含量个体及5个苍术素低含量个体(选择标准:高含量个体苍术素含量须高于所有个体苍术素含量平均值的2倍,低含量个体苍术素含量须低于所有个体苍术素含量平均值的1/2)。

1.2.2 南苍术植株叶片总DNA的提取 称取单株0.1 g叶片,用Easy Pure Plant Genomic DNA Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取总DNA,溶于200 μL灭菌超纯水中,-20 ℃保存备用。对5个苍术素高含量个体及5个苍术素低含量个体各取20 μL总DNA,分别构建高含量植株DNA混合池和低含量植株DNA混合池,作为ISSR引物筛选的模版。

1.2.3 ISSR引物的筛选 ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)是Zietkeiwitcz等于1994年发展起来的一种微卫星基础上的分子标记,其基本原理是用锚定的微卫星DNA为引物,即在SSR序列的3′端或5′端加上2—4个随机核苷酸,适合于种下水平遗传多样性的分析[12]。本研究所用的29条ISSR引物(见表1)在多个相关研究中均被使用[13-15],由南京锐真生物技术有限公司合成。在PCR仪(型号BioMetra T1)进行PCR反应,反应体积为20 μL。各组分及终浓度如下:DNA模板1.0 μL,2×Reaction Mix(含20 m MT ris-HCl,100 mM KCl,3 mM $MgCl_2$,400 μM的dNTPs,溴酚蓝)10.0 μL,引物(10 mM)1.5 μL,Taq DNA聚合酶(2.5 U/μL)0.4 μL,用灭菌超纯水补齐至20 μL。

ISSR引物筛选的PCR扩增程序为95 ℃预变性5 min;95 ℃变性1 min,53 ℃(各引物的退火温度略有差异)退火45 s,72 ℃延伸1.5 min,35个循环;最后72 ℃延伸10 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,2 000 bp的DNA Marker(广州东盛生物科技有限公司)作为分子量标记,溴化乙锭(EB)染色。在电压60 V,电泳1.5 h后,用凝胶成像系统观察、拍照。

表 1　ISSR 引物

引物	5'-3'序列	引物	5'-3'序列	引物	5'-3'序列
ISSR-808	(AG)8T	ISSR-819	(AG)8YT	ISSR-846	(CA)8RT
ISSR-809	(AG)8G	ISSR-821	(GA)8YC	ISSR-853	(TC)8RT
ISSR-810	(AC)8CA	ISSR-822	(TC)8A	ISSR-855	(AC)8YT
ISSR-812	(AG)8YA	ISSR-823	(YC)8A	ISSR-856	(AC)8YA
ISSR-813	(CT)8T	ISSR-824	(TC)8G	ISSR-858	(TG)8RT
ISSR-814	(AG)8YC	ISSR-826	(TG)8A	ISSR-866	(CTC)6
ISSR-815	(CT)8A	ISSR-828	(GT)8YA	ISSR-873	(GACA)4
ISSR-816	(GA)8T	ISSR-834	(GA)8YT	ISSR-873	(GGAT)4
ISSR-817	(CA)8T	ISSR-835	(CT)8RA	ISSR-881	(GGGGT)4
ISSR-818	(CA)8G	ISSR-836	(CT)8RG		

1.2.4　ISSR 特异性条带的克隆、测序及 SCAR 引物设计　选择高含量苍术素植株混合样扩增出的特异性条带,进行切胶回收,将回收的目的 DNA 片段连接到 pMD19-T 载体(大连宝生物工程有限公司出品),并将连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(大连宝生物工程有限公司出品),在含有氨苄(100 mg/mL)的大肠杆菌培养基上 37 ℃培养 12 h,挑取单菌落进行菌落 PCR 检验,将含有正确条带的克隆在含有氨苄(100 mg/mL)LB 液体培养基培养 6 h 后,交由上海华大基因科技有限公司进行双向测序。根据 DNA 序列分析结果,设计一对特异性引物用于后续 SCAR 反应。

1.2.5　ISSR-SCAR 标记的验证　用合成的 SCAR 引物对所有个体进行验证。反应体系为 20 μL,各组分及终浓度除了引物(10 mM)为 0.7 μL 外,其余同上所述。扩增程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 45 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,用 2 000 bp 的 DNA Marker 作为标记,溴化乙锭(EB)染色,电压 100 V,电泳 0.5 h 后用凝胶成像系统观察、拍照。

2　结果与分析

2.1　南苍术的苍术素含量测定结果

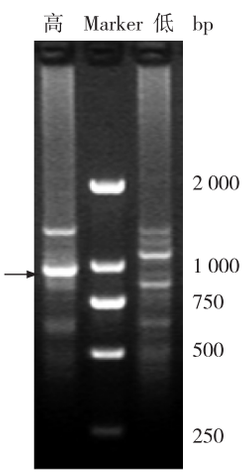
南苍术 30 个单株的苍术素含量平均值为 11.351 47 mg/g。5 个单株苍术素含量较高为 27.119 11—19.461 46 mg/g(以> 19 mg/g 为高含量的标准);5 个单株苍术素含量较低为 4.790 915—0.573 508 mg/g(以<5 mg/g 为低含量的标准)(见表 2)。前 5 个单株较后 5 个单株的平均值高出约 10 倍。

表 2　30 株茅山南苍术苍术素含量　　mg/g

编号	含量	编号	含量	编号	含量
1	27.119 11	11	11.570 25	21	9.422 682
2	23.797 27	12	11.061 14	22	9.263 75
3	22.401 35	13	10.981 41	23	9.083 116
4	20.029 68	14	10.760 69	24	8.271 143
5	19.461 46	15	10.681 96	25	8.242 534
6	13.086 49	16	10.500 81	26	4.790 915
7	12.981 41	17	10.297 37	27	3.887 379
8	12.698 54	18	10.173 22	28	3.075 628
9	12.108 21	19	10.063 92	29	2.520 48
10	11.984 67	20	9.653 959	30	0.573 508

2.2　南苍术与高苍术素相关的 ISSR 分子标记筛选

利用 ISSR 引物对构建的 2 个 DNA 混合样进行 PCR 扩增,对扩增的指纹图谱进行分析。结果发现,29 条引物中的 28 条引物的扩增的指纹图谱在高苍术素和低苍术素个体间都无差异,仅有引物 ISSR-846(5'-CACACACACACACACART-3')的扩增产物在 950 bp 处显示出高含量苍术素个体混合样的扩增图谱中有一条特有带(见图 1 箭头所示),而低苍术素个体混合样的图谱无此条带。



高为高含量的混合样,低为低含量的混合样,Marker 为 DNA Marker

图 1　引物 846 对高、低苍术素含量体系的 PCR 扩增图谱

2.3 与苍术素高含量相关的 SCAR 引物设计

对上述筛选到的特异性条带进行切胶回收、纯化、克隆和测序，结果表明片段长度为 948 bp，核苷酸序列如下：

5’-CACACACACACAGTTAGTTGTTAGATGTTAGCACCCCAAGTTAGACGCCCATACCAGGGATTGAACCCTGAACCTCCTAGGAAGGCAATGCCTTCCCCCTCCCTCTTGACCATTAGGCCAAGAGATCATTGGTATTAAAATTAAGTGTTATTAGTAGCAAATATTAATTATTAGTTTTTAATATCAAAAGAAAAACCAAAAGTTAAAATTTATAAATTAATCATTTAAAACATTTATAAAATATTTAGATGGAGAAGTGAGAAAGTTTTAAGGCCCCAAATTTTCGTCTCATGAGTTATAATGAAAACACATTTAAGTAACTTGGACGTTATGTATTAAGACTTGTACAATATATGTTAAGAGTCGTATACTTGAAATATATGCTTAAAGTAGCTTGTACCATGTATTTAAAAACATGTACCTTGGACTTAATATTTAATATTAATCCTGATGAGGGGCCAAACCTGGTCATTTGTAAGCTGAAATTATACTTAGAATGTAATAGGTTTGCTGGATAGGGTAAAAAGTGTAAAATCAGGAACTGCAGGACTATCTGTGACAACAGACCCAAACTTTAATTAAAAGCTGATAAATGAATTAAAACTCTATTTTTCCTTCATTCTAAAATCTGTAAATAAGAACACAAGAGAGAGGGAAGAGATGTTCTTGTCAGAGAAGTCAATAAACTGAGATTTTAGGGAGATTTTGTGGATGAAATTCACATGCAATCGAAGAATCAAGATCACCAACTCATAGGTAATGTTCCTACACCCTTGAATCTGAAGTTGATGTGAGGATTGCCATTGAATCTATGTAATTTCGTGGTCATAGGGCTGGAATCTCGAATTGACCCAAGAATCCACAAGATTGATGTTGTTAGAACACTTTTGGTAAGGATTTCTTTCATGCAAGCTTATTTTTAGTTAGTTTATGGATTGTGTGTGTGTG-3’

上述序列为高苍术素含量个体所特有，所以理论上任意一段序列都可作为特异性的 SCAR 分子标记；但引物设计的基本规则决定了并非所有区域都适合作为特异性分子标记的引物：引物 GC 含量应在 40%—60%之间，自结合能应低于 6 kcal/mole，长度应在 20—40 个碱基之间[16]。经过筛选，序列中具下划线的区域最适合作为引物。

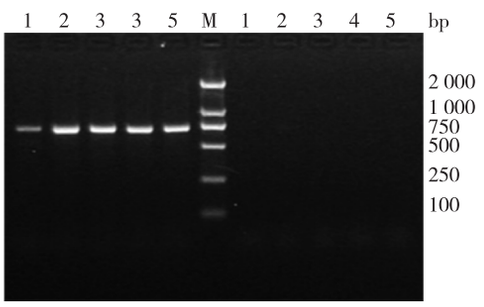
正向引物：5’-AAGAGATCATTGGTATTAAAATTAAGTGTTATTAGTAG-3’

反向引物：5’-CATAGATTCAATGGCAATCCTCACATCAACTTCAGATTCA-3’

2.4 ISSR-SCAR 标记验证

用设计的 SCAR 引物对 5 个苍术素高含量个体和 5 个苍术素低含量个体进行验证。结果表明，前者每个个体均能扩增出条带，而后者每个个体均未扩增出条带（见图 2）。

进一步，用设计的 SCAR 引物对其余 20 个个体也分别进行验证。结果表明，均未扩增出条带。筛选得到的 ISSR-SCAR 引物仅能够在苍术素含量较高的个体中扩增出条带，而苍术素含量较低的个体中无法扩增出条带。



左侧为高含量苍术素的 5 个个体，右侧为低含量苍术素的 5 个个体，M 为 DNA Marker。

图 2 ISSR-SCAR 标记在个体中的验证

3 讨论

3.1 南苍术中苍术素相关的 ISSR-SCAR 特异性分子标记开发的意义

在南苍术根茎苍术素含量测定的方法中，薄层层析、气相色谱、液相色谱等化学方法或者准确度不够[1]，或者方法价格昂贵、操作流程繁琐[5-7]。但分子标记利用的是生物基因组 DNA 的遗传信息，十分稳定可靠，再加上操作简便、快速，且结果容易分辨等优点，相比于传统的化学方法，具有明显的优势。本试验筛选到了 ISSR-846 引物，并成功设计出仅在高含量苍术个体扩增出条带的 SCAR 引物，可为快速筛选优质茅山南苍术提供切实可行的技术平台，也有望成为市场上苍术药品优劣的检测手段。

3.2 茅苍术高苍术素分子标记的效率评价及局限性

随机扩增多态性 DNA（RAPD）易于开发和简单的分子标记，但缺乏可重复性。SCAR 标记的开发，可以弥补其重复性较低的不足。本试验基于 ISSR

标记开发了鉴别茅山茅南苍术中高苍术素个体的特异性位点 SCAR 标记,该标记可将高苍术素含量的个体同低苍术素含量的个体区分开来,鉴定效率为 100%。这种基于 PCR 技术的鉴定技术具有准确性高、重复性好的优点。

本试验中的 ISSR-SCAR 分子标记,是建立在茅山地区南苍术的基础上开发的,由于不同居群遗传背景的差异,筛选得到的 ISSR-SCAR 分子标记是否适用于更大范围的个体筛选,还有待于进一步的验证。

参考文献:

[1] 朱晓琴, 贺善安. 不同产地苍术药材化学成分的比较[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(4): 18-22.

[2] 国家药典委员会. 中国人民共和国药典:第 1 部[M]. 北京:化工工业出版社, 2005:111.

[3] 郭兰萍, 刘俊英, 吉　力, 等. 茅苍术道地药材挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 814-819.

[4] 吴宝成, 韦阳连, 高　兴, 等. 茅山苍术挥发油组分特征及与根茎鲜质量相关性研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 84-88.

[5] 张贝贝, 付红梅, 徐海玉, 等. HPLC 测定道地产地和主产地茅苍术中 β-桉叶醇及其他成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(8):116-118.

[6] 张晓兰, 李　锦, 李遇伯, 等. 高效液相色谱法测定茅苍术药材中 β-桉叶醇与苍术素的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2051-2054.

[7] 刘利利, 刘颖新, 毛群芳, 等. HPLC 法同时测定苍术-玄参药对中 4 种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1): 81-85.

[8] TAKEDA O, MIKI E,HE S A, et al. A Comparative study on essential oil components of wild and cultivated *Atractylodes lancea* and *A. chinensis*[J]. Planta Medica, 1996, 62(5): 444-449.

[9] 韦阳连, 吴宝成, 周义峰. 茅山苍术与苍术素相关的 RAPD 标记研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10368-10370.

[10] 任冰如, 贺善安,於　虹, 等. 用 RAPD 技术评估苍术居群间的亲缘关系[J]. 中草药, 2000, 21(6): 458-461.

[11] 李隆云, 钟国跃, 卫莹芳, 等. DNA 分子标记及其在中药中的应用[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(5): 315-320.

[12] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.

[13] 孙　靓, 郑玉光, 陈　敏, 等. 白术遗传多样性 ISSR 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3381-3385.

[14] 郑建树, 陈　莉, 陈秉初, 等. 大盘山自然保护区白术种质资源遗传特征研究[J]. 中草药, 2011, 42(11): 2300-2304.

[15] 许梦云, 吴沿友, 赵玉国, 等. 道地药材茅苍术的 ISSR 分析[J]. 河南农业科学, 2009,38(7): 90-93.

[16] WEAVER R F. Molecular Biology,4th Edition[M]. New York: The McGraw-Hill Companies Inc, 2007.

·征订启事·

欢迎订阅 2017 年度《江苏林业科技》

《江苏林业科技》为国内外公开发行的综合性林业科学技术刊物。1974 年创刊。为《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、全国优秀期刊、江苏省优秀期刊、全国优秀农业期刊、华东地区优秀期刊。加入“万方数据——数字化期刊群”和中国期刊网等。

《江苏林业科技》主要刊登良种选育、育苗造林、园林绿化、林副特产、森林经营、森林保护、调查设计、野生动物等方面的学术论文、科研报告、经验总结,以及林业新成果、新技术,有较强的指导性、技术性、实用性,是林业科研、教学工作者、管理部门及广大林业生产者不可少的参考资料。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告,宣传产品等。

《江苏林业科技》为双月刊,大 16 开本,国内外公开发行。国内统一刊号:CN 32-1236/S,国际标准刊号:ISSN 1001-7380,每期定价 6.00 元,全年订费 36.00 元。全年办理订阅手续,需订阅者请到当地邮局订阅或将订款汇至南京市江宁区东善桥江苏省林业科学研究院本刊编辑部,邮政编码 211153。电话(025)52745438,83602820,83602060。由银行或邮局汇寄均可。开户银行:南京市农业银行金鹰支行,户名:江苏省林业科学研究院,帐号:10105101040000010。邮发代号:28-303。