

甘草种子 SCAR 标记的建立

祁建军¹, 李先恩¹, 李学禹², 周丽莉¹, 马小军¹

(1. 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 石河子大学, 新疆 石河子 832003)

摘要:甘草是一种常用中药材, 药典记载的甘草药材来源植物有三种, 即: 乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草。目前人工栽培用的甘草种子有些来自人工培育, 有些来自野生收集, 因此容易造成种子的混杂。通过将收集到的 5 种甘草种子进行 RAPD(随机扩增多态性 DNA)PCR 扩增, 对 RAPD 电泳图谱上具有差异性的条带进行克隆测序, 根据序列信息设计序列特异的引物, 建立甘草种子的 SCAR(序列特异的扩增区域)标记。初步建立了几种甘草种子的 SCAR 标记: GC1F/GC1R, GC2F/GC2R, 和 GC3F/GC3R。

关键词:甘草; 种子; RAPD; SCAR

中图分类号: S567.7⁺1, Q78

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2007)05-0101-04

Establishment of Sequence Characteristic Amplified Region Markers of *Glycyrrhiza* Seeds

QI Jian-jun¹, LI Xian-en¹, LI Xue-yu², ZHOU Li-li¹, MA Xiao-jun¹

(1. Institute of Medicinal Plants Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100094; 2. Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832003, China)

Abstract: *Glycyrrhiza* is a common used traditional Chinese medicine. There are *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza inflata* and *Glycyrrhiza glabra* three plants, according to codex. The manual cultivation of *Glycyrrhiza* is a main resource of medicinal materials, and the seeds of these plants come from cultivation or collection from wild plants. Therefore, it is very easy to mix the seeds. In this research, RAPD PCR were carried out on the collected 5 species of *Glycyrrhiza* seed. Cloning and sequencing were used for the specific bands on the random amplified polymorphism DNA PCR profiles, and then according to the sequences specific primers were designed for sequence characteristic amplified region (SCAR) marker. The result showed that three primers pairs combination, GC1F/GC1R, GC2F/GC2R, and GC3F/GC3R, could successfully applied for *Glycyrrhiza* seed identification.

Key words: *Glycyrrhiza*; seed; RAPD; SCAR

甘草属 (*Glycyrrhiza*) 植物为干旱、半干旱地区重要的药用植物资源, 全世界大约有 22 个种, 我国有 11 个种, 主要分布在北纬 30~55 度, 特别是北纬 40 度的干旱区为甘草优势群分布带。《中国药典》(2005 版) 记载的药用甘草为乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat) 和光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.)。目前, 甘草资源在“先开发后保护”观念的指导下, 造成野生资源的极大破坏, 资源极其匮乏, 甘草药材来源只能依靠人工栽培为主。乌拉尔甘草在我国的新疆、内蒙等地已经大面积栽培生产, 胀

果甘草和光果甘草在新疆的栽培面积也在逐步扩大。在甘草的人工栽培生产中, 种子主要来源于野生收集及少量的人工制种, 因此, 容易造成种子的严重混杂, 影响药材的质量和品质的稳定, 这是甘草药材生产中存在的主要问题之一。

苗新生等^[1]用显微外观方法观察了几种甘草种子的微形态特征, 发现甘草属植物种子形态极为相似, 乌拉尔甘草和黄甘草的种子表面纹饰相似, 胀果甘草和光果甘草的种子表面纹饰均为不规则的脑纹状, 几种甘草的种皮显微特征也无明显区别, 因此, 在人工栽培时依靠外观形态鉴别

收稿日期: 2007-07-25; 修回日期: 2007-09-06

基金项目: 国家科技基础平台项目(2004DKA30401)资助。

作者简介: 祁建军, 博士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: 010-62810019; E-mail: jjq_8@hotmail.com。通讯作者: 李先恩, 研究员, 研究方向为药用植物栽培及种子学。Tel: 010-62810019; E-mail: xeli@implad.ac.cn

甘草种类有一定难度。本研究试图利用 RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 分子标记技术, 通过克隆测序建立甘草种子的特异性 SCAR (Sequence characteristic amplified region, 序列特异扩增区域) 标记, 为甘草药材生产提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

分别从新疆、内蒙、宁夏、甘肃和陕西等省区收集到乌拉尔甘草、胀果甘草、光果甘草、黄甘草等甘草种子(经新疆石河子大学李学禹教授鉴定)。另外, 以刺果甘草、苦豆子(野生状况下的苦豆子常和甘草混生, 而且种子外型 and 甘草相似)作为对照材料(见表 1)。

表 1 收集到的甘草种子

Table 1 *Glycyrrhiza* seeds used in this work.

编号 Number	名称 Name	来源 Origin	份数 Quantity
1	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	新疆石河子、内蒙伊 Shihezi in Xinjiang, Erie in Inner Mongolia	5
2	胀果甘草 <i>G. inflata</i>	新疆石河子、内蒙伊 Shihezi in Xinjiang, Erie in Inner Mongolia	3
3	光果甘草 <i>G. glabra</i>	新疆石河子 Shihezi in Xinjiang	2
4	黄甘草 <i>G. aurycarpa</i>	新疆石河子 Shihezi in Xinjiang	2
5	刺果甘草 <i>G. pailidiflora</i>	北京药用植物园 Medicinal Plants Garden in Beijing	1
6	苦豆子 <i>Sophora. alopecuroides</i>	新疆石河子 Shihezi in Xinjiang	1

1.2 方 法

1.2.1 甘草种子发芽 将收集到的甘草种子用浓硫酸浸泡 30 min 后, 用自来水冲洗, 再在湿的滤纸上于 25℃ 培养。取生长 2 周的幼苗提取 DNA。

1.2.2 DNA 的提取 DNA 提取参考 Scott 等^[2]的 CTAB 法稍作修改。约 1~2 g 甘草幼苗在研钵内加入液氮研磨成粉, 迅速倒入 10 mL 离心管中, 管内事先放入 3 mL 65℃ 预热的 CTAB 提取液

(2% CTAB, 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol · L⁻¹ NaCl, 2% 2-巯基乙醇, 2% PVP); 迅速混匀后置 65℃ 水浴中放 30~60 min, 并不断摇动(轻轻上下颠倒)离心管; 然后冰浴条件下, 加入等体积的氯仿: 苯酚: 异戊醇(25: 24: 1), 充分混匀 10 min。8 000 rpm, 离心 10 min, 离心后小心吸取上清液到新的离心管中; 重复上一步; 上清液中加入 1/10 体积 3 mol · L⁻¹ NaAc 混匀, 再加入等体积冷的异丙醇静置, 若无沉淀, 可放置 -20℃ 20 min, 离心后小心取出沉淀, 用 70% 乙醇洗涤沉淀多次, 无水乙醇洗 1 次后室温干燥; 沉淀 DNA 溶解于适量的 TE 溶液中; 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检验并定量 DNA。

1.2.3 RAPD-PCR 反应体系 25 μL, 包含: 引物 0.2 μmol · L⁻¹ (引物由上海生工生物工程公司合成), 模板 DNA 50 ng, dNTPs 0.2 mmol · L⁻¹, MgCl₂ 1.5 mmol · L⁻¹, 1 × PCR Buffer (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3, 5 mmol · L⁻¹ KCl), 1U TaqE (北京欣经科公司)。PCR 反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 45 次; 72℃ 10 min。在 Tgradient 型 PCR 仪 (Biometra 公司) 上完成。

1.2.4 特异性片段的回收克隆测序 使用 PCR 扩增带型清晰、且具有差异带型的 RAPD 引物对所有甘草样品进行 RAPD-PCR 扩增, 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。从凝胶上选取大小在 200 bp~600 bp 的差异条带, 切下放入 1.5 mL 离心管中, 用 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒 (上海 Sangon 公司) 回收。回收条带连接到 pUC m-T 载体, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 (上海 Sangon 公司, 按照试剂盒操作说明进行), 在 LB 培养基上的挑取白斑提取质粒, 送上海生工生物工程公司进行序列测定。

1.2.5 序列分析、特异引物设计及 SCAR 标记扩增 在 DNAMAN 软件上分析得到的序列, 并设计特异性引物。以甘草种子发芽的幼苗提取 DNA 为模板, 对设计的 SCAR 引物进行特异性 PCR 扩增, 筛选合适的 PCR 条件及引物。

2 结果与分析

2.1 甘草 DNA 的提取

甘草种子属于硬实性种子, 透水性差, 一般生产中需使用机器磨破种皮。本实验为小量发芽, 使用浓硫酸腐蚀种皮后, 用水冲洗剩余硫酸, 在滤纸

上发芽,取发芽后一周的幼苗提取基因组 DNA。用 CTAB 法提取 DNA,在研磨材料时加少量

PVP40。图 1 为部分甘草样品的 DNA 检测。本实验提取的 DNA 质量能够满足 RAPD-PCR 要求。

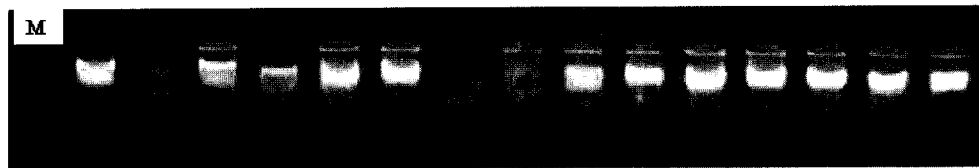


图 1 甘草总 DNA 电泳检查

Fig. 1 Electrophoresis analysis of *Glycyrrhiza* total DNA.

0.8% 琼脂糖凝胶电泳;M:Lambda DNA

0.8% agarose gel electrophoresis;M:lambda DNA

2.2 引物筛选及特异性片段的克隆测序

从 30 条 RAPD 引物中筛选出 10 条引物(上海生工商品编号: S22, S53, S128, S130, S246, S265, S281, S278, S425, S460)用于特异性扩增实验。由于 RAPD-PCR 产物一般大小在 200 bp 到 2.5 kb 之间,且大多数引物扩增带大于 600 bp,所以本实验选取大小在 200 bp ~ 1 000 bp 之间的差异带进行了克隆测序。

将 RAPD-PCR 电泳凝胶上特异性片段切下回收,连接到载体 pUCm-T 上,再转化大肠杆菌。本实验共进行了 20 个连接反应,通过对转化菌株 *E coli* DH5 中 β -半乳糖苷酶的插入突变产生蓝白斑进行筛选,共挑选了 20 个白斑,经培养后测定转化子的序列。

2.3 特异性引物的设计及甘草种子 SCAR 标记的建立

根据测得序列,应用 DNAMAN 软件共设计 7 对特异引物。经 55℃ ~ 65℃ 退火选择,确定 3 对特异性引物: GC1F/GC1R (5'-ACTGAACGCCTAC-TAGATAG-3' / 5'-ACTGAACGCCCTTGTGACG -3'), GC2F/GC2R (5'-TTCAGGGCACACACACGAGT-3' / 5'-TTCAGGGCACGTAGATAGAT-3'), GC3F/GC3R (5'-CGGATAAGGAAGTGGTGGAGG-3' / 5'-CGTAAAGCGTTGTGAAAGCC-3');PCR 反应程序确定为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 5 min。

PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上检查。由图 2 可见,使用引物 GC1F/GC1R,所有的甘草种子都有一个特别明显的 570 bp 大小的特征带(图 2-A),而和甘草种子外观大小极其相似的苦豆子以及收集来的野生甘草种子中混杂的杂草种子在此处带型模糊,无显著特征带;引物 GC2F/GC2R 是根据 RAPD 引物 S278(TTCAGGGCAC)扩增的差异

带设计的 SCAR,如图 2-B 所示,使用该引物在乌拉尔甘草、刺果甘草中扩增出了一个 760 bp 的特征带,而胀果甘草和光果甘草中无此特征带,刺果甘草的带型大小不同。除 760 bp 特征带,引物 GC2F/GC2R 在乌拉尔甘草、黄甘草和刺果甘草还扩增出了大于 760 bp 的带型(图 2-B);引物 GC3F/GC3R 在乌拉尔甘草和黄甘草中扩增出一条 442 bp 的特征带,而其他均无此特征带(图 2-C)。由此,利用以上 3 个引物组合可建立乌拉尔甘草、刺果甘草、胀果甘草和光果甘草种子的 SCAR 标记。

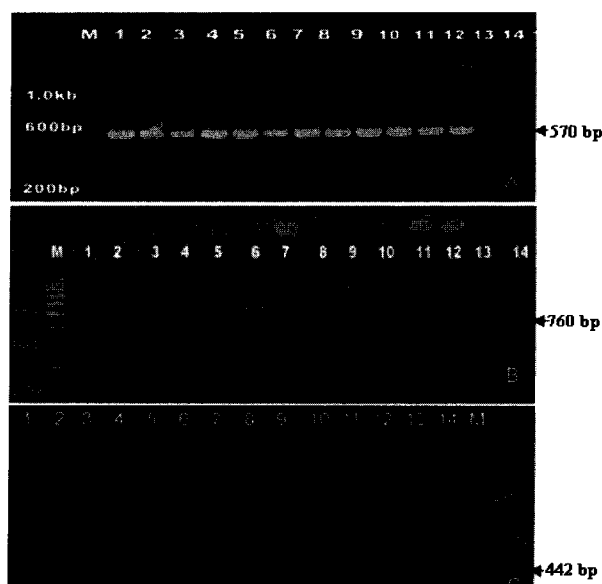


图 2 引物 GC1F/GC1R(A)、GC2F/GC2R(B)、GC3F/GC3R(C)的扩增结果

Fig. 2 The profiles of primer GC1F/GC1R(A)、GC2F/GC2R(B)、GC3F/GC3R(C) by PCR.

1,2:光果甘草;3,4,8:胀果甘草;5,6,7:乌拉尔甘草;9,10:黄甘草;11,12:刺果甘草;13:苦豆子;14:未知草种子;M: DNA ladder(C图中M:Lambda DNA /EcoRI + Hind III)
1, 2: *G. glabra*; 3, 4, 8: *G. inflata*; 5, 6, 7: *G. uralensis*; 9, 10: *G. alycarpa*; 11, 12: *G. pailidiflora*; 13: *S. alopecuroids*; 14: other seed; M: DNA ladder (Fig. 2-C, M: Lambda DNA /EcoRI + Hind III)

3 讨论

乌拉尔甘草、胀果甘草和光果甘草是药典规定的甘草药材来源,而黄甘草常常也用做药材(称为黄皮甘草),刺果甘草被认为没有药用价值而被当作伪品。研究表明,光果甘草与乌拉尔甘草的药理活性存在不同,它们清除活性氧的能力有差别^[3]。在应用上,3种药典规定的甘草基本无差别,但是根据用药习惯,乌拉尔甘草多做中药饮片,而胀果甘草和光果甘草多用于提取甘草酸。因此,种子的混杂必然影响药材的质量和品质。目前,甘草的药材来源既有人工栽培,也有野生采挖,而人工栽培所需要的种子往来源不同,常有品种混杂的情况。本实验建立了序列特异的PCR分析方法,可以快速区分几种甘草植物,将为大规模种子生产服务。

从几种甘草种子的外形来看,种子形状有肾形、卵圆形、扁圆形或者椭圆形,种子外皮颜色有黄褐色、褐色和深褐色,种子的千粒重在7~12g之间^[4]。由于植物的外观形态受土壤营养状况和生态气候条件的影响较大,仅从外观形态特征很难区分这几种甘草的种子^[5]。RAPD是一种简单快速的鉴定生物遗传变异的分子标记,由RAPD演变来的RAPD-SCAR,具有RAPD所不具备的优势。RAPD结果的电泳带数量多,而且RAPD-PCR的稳定性差,容易受实验条件的影响。SCAR标记一般是由RAPD、AFLP等分子标记发展而来,其PCR产物带型单一,图谱简单明了,只需一步PCR反应就可完成。目前SCAR标记已经在很多领域得到应用,例如:抗性基因的标记^[6,7]、细胞质不育^[8]及种质鉴定^[9]等。

Williams等建立的RAPD分子标记可以显示物种的遗传差异,广泛应用于物种的遗传多样性分析等^[10,11]。将RAPD中显示的差异带经过克隆测序,根据所得序列重新设计新的PCR引物即可建立基于特异DNA序列的SCAR标记。但是由于RAPD分子标记本身存在差异性位点少,扩增产物片段大等缺点,特别是在寻找物种内变异时就需要进行大量的引物筛选。本研究建立的甘草种子SCAR标记可以鉴别乌拉尔甘草、胀果甘草、光果甘草、刺果甘草及易混杂植物苦豆子等,

但是对于胀果甘草和光果甘草的正确鉴别还需要做进一步的工作。SCAR标记的PCR扩增结果一般为单一的带型,但是在杂合体中,由于等位基因的大小不同,也有可能出现2条以上的带型^[12]。本实验中,使用引物GC2F/GC2R在乌拉尔甘草、黄甘草和刺果甘草中均扩增出了2条明显带型。在生产实践中,分子标记技术只是鉴别手段之一,特异性的分子标记技术必须和种子的来源地区、外观形态等证据配合,加上有经验的从业人员进行鉴定,才能正确区分不同甘草种子。比如,光果甘草的自然分布主要在新疆,其主要栽培生产也在新疆的少数地区。

参 考 文 献

- [1] 苗新生,马 骥. 甘草及其近缘种种子微形态特征的研究[J]. 中药材,2005,28(4):274-277.
- [2] Scott O R, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. Plant Mol. Biol. Manual, 1988, A6:1-10.
- [3] 谢毛成,丁家宜,李 刚. 光果甘草与乌拉尔甘草清除活性氧能力的比较[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1):29-31.
- [4] 陈 英. 实用中药种子技术手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1999,261.
- [5] 张富民,李学禹. 中国甘草属植物的形态变异与生态环境的关系[J]. 新疆环境保护,1997,19(1):33-37.
- [6] Julio E, Verrier J L, Dorlhac de Borne F. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L[J]. Theor. Appl. Genet., 2006, 112(2):335-346.
- [7] Gupta S K, Charpe A, Koul S, et al. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat[J]. Genome, 2005, 48(5):823-830.
- [8] Stojalowski S, Lapinski M, Szklarczyk M. Identification of sterility-inducing cytoplasm in rye using the plasmotype-genotype interaction test and newly developed SCAR markers[J]. Theor. Appl. Genet., 2006, 112(4):627-633.
- [9] Lee M Y, Doh E J, Park C H, et al. Development of SCAR marker for discrimination of *Artemisia princeps* and *A. argyi* from other *Artemisia* herbs[J]. Biol. Pharm. Bull., 2006, 29(4):629-633.
- [10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res., 1990, 18:6531-6535.
- [11] Mienie C M, Liebenberg M M, Pretorius Z A, et al. SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene *Ur-13*[J]. Theor. Appl. Genet., 2005, 111(5):972-979.
- [12] Boukar O, Kong L, Singh B, et al. AFLP and AFLP-derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea[J]. Crop Sci., 2004, 44:1259-1264.