

- [9]俞振良. 免疫抑制剂子囊霉素及其衍生物[J]. 国外医药, 2001, 22(4): 231-233.
- [10]Schwecke T, Aparicio J F, Molnar I, et al. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1995, 92(17): 7839-7843.
- [11]Wu K, Chung L, Revill W P, et al. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units [J]. **Gene**, 2000, 251(1): 81-90.
- [12]Mo S J, Kim D H, Lee J H, et al. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2010, 133(4): 976-985.
- [13]Kim D H, Ryu J H, Lee K S, et al. Mutational biosynthesis of tacrolimus analogues by fkbO deletion mutant of *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(13): 5881-5892.
- [14]Huang D, Li S, Xia M, et al. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement [J]. **Microbial Cell Factories**, 2013, 12(1): 52.
- [15]Lechner A, Wilson M C, Ban Y H, et al. Designed biosynthesis of 36-methyl-FK506 by polyketide precursor pathway engineering [J]. **ACS Synthetic Biology**, 2012, 2(7): 379-383.
- [16]Chung L, Liu L, Patel S, et al. Deletion of rapQONML from the rapamycin gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* gives production of the 16-O-Desmethyl-27-desmethoxy analog [J]. **J Antibiot**, 2011, 54(3): 250-256.
- [17]Reeves CDI, Chung LM, Liu Y et al. A new substrate specificity for acyl transferase domains of the ascomycin polyketide synthase in *Streptomyces hygroscopicus* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(11): 9155-9159.
- [18]Motamedi H, Shafiee A, Cai SJ, et al. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520 [J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, 178(17): 5243-5248.
- [19]Tobias K, Bibb M J, Mark J B, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. **Norwich: The John Innes Foundation**, 2000.
- [20]贺祖宏. 城链霉菌属间接转移体系及南昌霉素中断菌株的构建[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [21]杨旻, 陶美凤. 雷帕霉素产生菌吸水链霉菌 NRRL5491 接合转移系统的建立[J]. 华中农业大学学报, 2007, 5(26): 637-641.

## 血满草 RAPD-PCR 反应体系的建立与 DNA 指纹图谱研究

杨青松<sup>1</sup>, 熊勇<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2\*</sup>, 卢志敏<sup>1</sup>, 范汝艳<sup>1,3</sup>

(1. 云南民族大学 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500;

2. 云南农业大学 基础与信息工程学院, 云南 昆明 650201; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

**摘要:** 目的: 获得稳定性、重复性好的 RAPD-PCR 反应体系, 并构建血满草 DNA 指纹图谱和进行遗传多样性分析。方法: 以血满草 3 个居群 11 个个体的幼叶为材料, CTAB 法提取基因组 DNA, 从模板浓度、引物浓度、dNTPs 浓度和 Taq DNA 聚合酶用量, 构建最佳的 RAPD-PCR 反应体系, 通过扩增带型的差异构建其 DNA 指纹图谱, 利用 Popgen32、NTSYS2 进行遗传多样性分析。结果: 3 个 RAPD 引物扩增血满草 3 个居群 11 个样品共获得 27 条可靠、清晰和重复性高的条带, 其中 17 条是多态条带。引物 SBSA5 和 SBSA11 扩增条带组合可以构建 11 个样品的个体特异 DNA 指纹图谱。供试血满草居群间遗传距离在 0.1493~0.2312 之间; 居群内的遗传多样性分别为 0.1102、0.0153、0.2294。遗传距离和相似性聚类分析表明, 样品间的遗传距离与居群的地理分布关系不明显。结论: RAPD 分子标记在构建血满草 DNA 指纹图谱是可行的, 由其构建的指纹图谱可以将供试个体相互区分鉴别出来。无论是居群间还是居群内, 供试血满草的遗传多样性均较低, 居群间的遗传分化较小, 可能还在属于同一个大的居群。

**关键词:** 接骨木属; 民族药; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q811.4 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2014.05.0111-4

## Establishment Optimum Reaction System and Construction DNA Fingerprinting with RAPD for *Sambucus adnata* L.

YANG Qing-song<sup>1</sup>, XIONG Yong<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2\*</sup>, LU Zhi-min<sup>1</sup>, FAN Ru-yan<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China; 2. College of Basic Science and Information Engineering, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**Abstract: Objective:** To obtain stability and reproducibility RAPD-PCR reaction system, and build DNA fingerprinting and analyze genetic diversity of *Sambucus adnata* L. Basing on RAPD markers. **Method:** Genomic DNA was extracted by CTAB from three populations, 11 individual leaves, and the optimal RAPD-PCR was constated from four factors, i. e. DNA template, primer, dNTPs and Taq DNA polymerase concentration. Using optimal reaction system, the DNA fingerprinting was constructed by different types and genetic diversity was analyzed by Popgene32 and NTSYS2. **Result:** Three RAPD primers with high polymorphism and repeatability were successfully screened out from 20 candidate primers. 27 reliable, clear and reproducible bands with 17 polymorphic ones were amplified from three populations, 11 samples using three RAPD primers. And individual-special DNA fingerprinting was constructed by amplified bands using primer SB-

SA05 and SBSA11. The genetic diversity within *S. adnata* samples was low and genetic distance among populations was 0.1493–0.2312, and genetic diversity within populations were 0.1102, 0.0153, and 0.2294, respectively. Genetic distance and similarity cluster analysis showed that the relationship between genetic distance and geographic distribution of samples was not obvious. **Conclusion:** RAPD molecular markers to build DNA fingerprinting in *S. adnata* is feasible and building its fingerprint can be distinguished from each individual identified. Whether among or within populations genetic diversity of *S. adnata* samples for the test were low and smaller genetic differentiation was among samples, it indicated that all samples for the test may belong to the same larger populations.

**Key words:** *Sambucus* L.; Ethnic medicine; Genetic diversity; Cluster analysis

## 0 引言

血满草(*Sambucus adnata* Wall.) 是五福花科接骨木属的多年生草本植物,又名接骨药、接骨丹等。我国接骨木属约6种,南北均产,是广泛使用、具有药用、食用及饲用价值的民族植物<sup>[1]</sup>。血满草广布于我国云南、宁夏、西藏、青海、贵州、甘肃、陕西、四川等地,生长于海拔1 600~3 600m的山谷斜坡湿地、灌丛中、林下、沟边和高山草地,目前尚未由人工引种栽培<sup>[2]</sup>。血满草在云南分布广泛,有极为丰富的自然资源,在傣族和各民族有广泛药用历史<sup>[3]</sup>。研究发现血满草水提物及醇提物均明显抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀,对醋酸致小鼠扭体有明显对抗作用,具有较好抗炎镇痛作用<sup>[4]</sup>。

指纹图谱技术非常适合于品种资源(包括杂交亲本、自交系)的鉴定工作,具有快速、准确等优点<sup>[5]</sup>。该技术已在各种作物品种资源和纯度鉴定研究中得到应用<sup>[6]</sup>。DNA指纹图谱是指能够鉴别生物个体之间差异的DNA电泳图谱,RAPD技术凭借其自身独特的优势成为这一领域的重要研究手段<sup>[7]</sup>。马小军等<sup>[8]</sup>讨论了用毛细管PCR方法扩增RAPD指纹在中药材鉴别上的应用前景,建立并优化了人参RAPD指纹的反应体系。王培训等<sup>[9]</sup>运用RAPD技术构建了不同产地的西洋参样品的DNA指纹图,并进行多态性分析。总之,RAPD技术是中药材鉴定的有效工具,同时还表现出高度的个体特异性,是DNA指纹图谱构建的简单、有效手段。

目前有关血满草遗传多样性的研究非常少,有关DNA指纹图谱的研究也未见报道。所以本研究根据温度梯度筛选的实验结果,对反应体系中模板浓度、引物浓度、dNTPs浓度和Taq DNA聚合酶的用量进行了反复多次筛选,构建效果最佳的反应体系和退火温度。并对血满草3个野生居群11个个体进行DNA指纹图谱的构建和遗传多样性分析,以期为今后血满草种质资源的种质鉴定和遗传多样性分析等提供科学手段。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

供试的血满草采自云南省香格里拉县。采集血满草的嫩叶,用变色硅胶干燥,储存备用。

收稿日期:2014-06-11;修回日期:2014-07-08

基金项目:国家自然科学基金项目“壳斗科栎属川滇高山栎分子谱系地理学研究”(No.31060031);云南民族大学民族药资源化学国家民委-教育部共建重点实验室开放基金项目“罗平布依族药用植物资源的民族植物学调查”(No.MZY1301)资助

作者简介:杨青松(1980-),男,云南香格里拉人,博士,副教授,从事植物分子生态学和资源植物学研究,Email: yangqskm@163.com; \*通讯作者:赵艳(1982-),女,云南昆明人,实验师,从事生物化学研究,Email: zhaoyankm@126.com。

表1 样品来源

Table 1 The samples information of *S. adnata*

居群代码 Population ID	海拔(m) Elevation(m)	个体 Individuals
Pop1	3 343	4(1~4)
Pop2	3 445	2(5~6)
Pop3	3 545	5(7~11)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总DNA的提取与检测

采用改良的CTAB法提取血满草总DNA<sup>[10]</sup>,用0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并将DNA浓度调整至40ng/ $\mu$ l,置于-20℃冰箱保存备用。

#### 1.2.2 RAPD引物的筛选和退火温度的确定

先通过查阅文献设置获取一个初步反应体系和一个PCR反应程序<sup>[11]</sup>对20个引物(赛百威公司生产的SBSA随机引物)进行筛选,挑选出有产物的引物。

再以筛选出的引物的理论退火温度( $T_m$ 值)为中心,使用梯度PCR仪设置12个温度梯度进行扩增,以确定所筛选引物的最适退火温度。同时还可以根据引物筛选的条带多样性原则再一次对引物进行筛选,提高效率 and 减少后续工作量,综合对体系进行优化之后得出本实验反应最佳体系条件。

#### 1.2.3 最佳反应体系的验证

通过3个居群11个个体的血满草资源和不同RAPD引物多次调整和验证最佳体系及其反应程序,以确定RAPD引物扩增的稳定性。1.5%琼脂糖凝胶电泳分离扩增后的PCR产物,电泳后照相。

#### 1.2.4 数据分析

应用Excel软件统计RAPD引物扩增的0、1数据库,以PopGene3.2软件中假定哈迪-温伯格平衡条件下计算平均遗传相似系数,用NTSYS2软件进行聚类分析<sup>[5]</sup>。

根据RAPD引物扩增的电泳图,按每条引物扩增片段分子量大小排列,并根据条带的有无构建血满草DNA指纹图谱<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 血满草RAPD扩增最佳反应体系

通过引物筛选和梯度PCR扩增后,在20个候选RAPD引物中获得3个引物,根据最佳反应体系获得清晰条带,且重复性好。具体反应体系和退火温度见表2。

3个引物的反应条件为:94℃、5min;94℃、1min,56℃、1min,35cycle;退火温度2min;72℃ 5min,hold 4℃。

### 2.2 RAPD标记多态性分析

根据所筛选的3个RAPD引物分别对3个居群11个血满

草样品进行扩增,共得到可靠、清晰和重复性高的条带27条,其中有17条是多态条带,总的多态条带比率为63.0%,每个引物平均多态位点数为5.7,3个引物在11个血满草样品中得到的平均多态条带率为33.3%~76.9%。

表2 血满草3个候选引物最佳RAPD反应体系及退火温度  
Table 2 The best reaction system and Tm of three selected RAPD primers for *S. adnata*

引物	反应体系(μl)					最佳退火温度(℃)
	Primer	dNTP	Buffer	TaqE	ddH <sub>2</sub> O	
SBSA05	2	1	2	0.8	13.7	42
SBSA11	2	1.5	2	0.8	13.2	45
SBSA19	2	1.5	2	0.8	13.2	45

表3 血满草3个RAPD引物扩增条带多态性  
Table 3 Amplified bands and polymorphic bands by three RAPD primers of *S. adnata*

引物名称	扩增条带数	多态性条带数	多态百分率(%)
SBSA05	6	2	33.3
SBSA11	8	5	62.5
SBSA19	13	10	76.9

2.3 血满草野生居群遗传多样性

根据[0,1]矩阵用PopGene3.2软件分析计算,血满草样品居群间的遗传距离在0.1493~0.2312之间;居群1与居群3的遗传距离较小,而居群2与居群3的遗传距离较大(表4)。

表4 血满草居群间的RAPD遗传距离(左下)与遗传相似度(右上)  
Table 4 The genetic identify (above diagonal) and genetic distance (low diagonal) of *S. adnata* (Nei's)

Pop ID	1	2	3
1	****	0.8116	0.8613
2	0.2087	****	0.7936
3	0.1493	0.2312	****

居群1内的遗传多样性指数为0.1102+0.1952;居群2内的遗传多样性指数为0.0153+0.0797;居群3内的遗传多样性指数为0.2294+0.2296(表5)。无论居群内还是居群间,供试血满草样品的遗传多样性均较小,表明各个居群的分化不明显。

表5 血满草3个居群内的遗传多样性  
Table 5 Genetic diversity within three populations of *S. adnata*

	Pop1	Pop2	Pop3
遗传多样性指数	0.1102+0.1952	0.0153+0.0797	0.2294+0.2296

根据RAPD标记遗传相似性建立的11个个体遗传关系聚类图(图1)表明,在相似系数为0.01处,11个血满草样品被分为三个类群,其中第一个类群有1、2、3、9号四个样品;第二个类群只有4号一个样品,表明它与其他样品间的亲缘关系较远。第三个类群包括5、6、7、8、10、11号六个样品,分为两个亚类。用于分析的11个样品中,1、2、3、4属于Pop1;5、6属于Pop2;7、8、9、10、11属于Pop3,聚类分析结果显示个体间亲缘关系与地理分布关系不大。

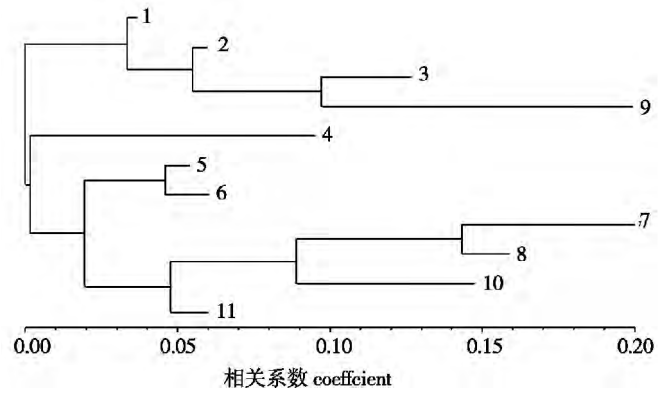


图1 血满草居群个体遗传关系聚类图(NJ法)  
Fig.1 Cluster dendrogram of genetic similarity for *S. adnata* populations by NJ

同样,基于遗传距离和相应的遗传相似性系数的主成份分析也表明,个体间亲缘关系与地理分布关系不大。从主成份分析结果直观的可以看出,样品1、2、3聚集在同一个区域内,4、5、6聚集在同一个区域内,7、9聚集在同一个区域内,而8、10、11聚集在同一个区域内,说明同一区域中各自在遗传上的相似性高,与个体地理分布没有关系。

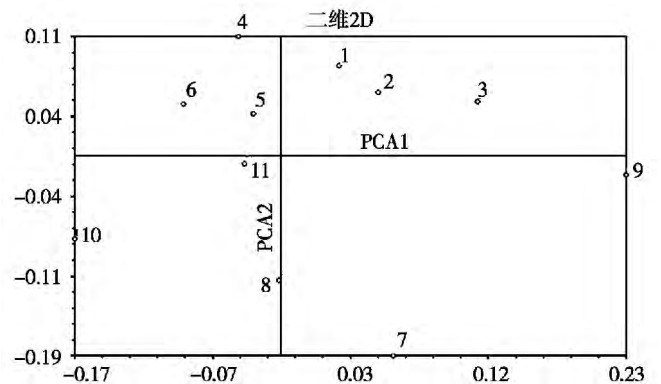


图2 血满草居群个体遗传关系主成分分析散点图  
Fig.2 The scatter plot of genetic similarity for *S. adnata* populations by PCA

2.4 基于RAPD标记血满草DNA指纹图谱

在筛选出来的3个引物中,单个引物不能构建个体特异的指纹图谱,两个引物组合中OPA5和OPA11的组合可构建个体特异的指纹图谱;而3个引物组合也能构建个体特异的指纹图谱。基于可操作性和成本考虑,建议用OPA5和OPA11组合构建血满草DNA指纹图谱。

3 讨论

RAPD分子标记技术易受多种因素的影响,大量文献报道RAPD技术不稳定,结果重复性差<sup>[12]</sup>。任何一种分子标记方法无论在理论上还是在实际研究中都有各自的优缺点,目前还找不到一种完全能相互替代的技术<sup>[13]</sup>,RAPD技术也如此。虽然有不稳定、重复性差等缺点,但在应用过程中,只要操作人员努力摸索最优的反应条件,优化反应体系和程序设计,还是可以得到重复性好、令人满意的结果。

运用不同RAPD引物组合扩增DNA来构建指纹图谱区分鉴别血满草个体是可行的,本实验筛选出来的三个引物中,

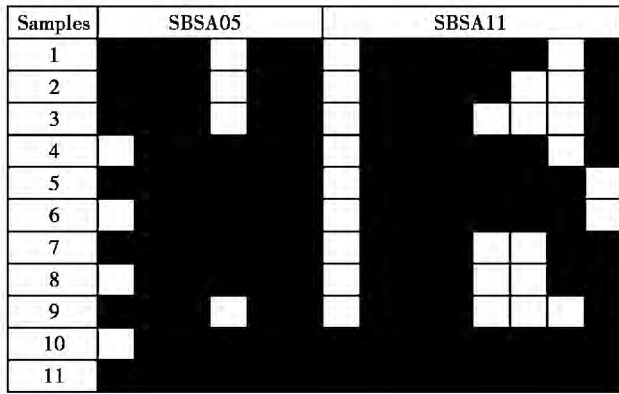


图3 基于 RAPD 标记血满草 DNA 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprinting of *S. adnata* by RAPD markers

SBSA5 和 SBSA11 的组合可构建个体特异的指纹图谱。为了简便快捷,建议在构建血满草指纹图谱时使用 SBSA5 和 SBSA11 组合使用。在对其他物种遗传多样性分析研究中要用到指纹图谱时,为避免盲目,可先任选两个引物组合,若选用的两个引物不能构建指纹图谱,再依次增加引物个数。

本研究的遗传多样性分析表明,供试血满草的遗传多样性较低,遗传距离与地理分布关系不明显,由此可推测所有样品可能还属于同一个大居群。但由于所选的材料不多,可能无法全面了解血满草的遗传差异。我们还需要进一步收集材料,深入开展工作。同时,也表明血满草对不同的地理环境具有较高适应性,从而造成不同种群和不同个体间的遗传差异不明显。基于遗传背景,作为一种大宗的民族药,其后续引种、开发的可行性较高。

#### 4 结论

3 个 RAPD 引物扩增血满草 3 个居群 11 个样品共获得可靠、清晰和重复性高的条带 27 条,其中 17 条是多态条带。遗传多样性分析表明供试血满草居群间遗传距离在 0.1493 ~ 0.2312 之间;居群内的遗传多样性分别为 0.1102 ~ 0.2294。居群间和居群内遗传多样性均较低,遗传距离与居群的地理

分布关系不明显,可能还在属于同一个大的居群。引物 SBSA5 和 SBSA11 扩增条带组合可以构建 11 个样品的个体特异 DNA 指纹图谱,RAPD 分子标记在构建血满草 DNA 指纹图谱是可行的,由其构建的指纹图谱可以将供试个体相互区分鉴别出来。

#### 参考文献:

- [1]徐亮,陈功锡,张代贵,等.接骨木属植物研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(5):1-5.
- [2]徐炳生.中国植物志第72卷[M].北京:科学出版社,1988:10.
- [3]杨增明,杨树娟.傣药血满草研究综述[J].中国民族医药杂志,2009,(10):57-59.
- [4]王文静,王军,张森,等.血满草提取物抗炎镇痛作用研究[J].中药药理与临床,2010,26(5):82-84.
- [5]熊勇,杜荣花,马金林.栽培灯盏花 DNA 指纹图谱研究及遗传多样性分析[J].生物技术,2012,22(5):45-48.
- [6]易延彦,陈志良,邓虹珠.中药指纹图谱的研究评析[J].中成药,2006,28(8):1192-1197.
- [7]张晓峰,刘福艳.DNA 指纹图谱技术在中药研究中的应用进展[J].齐鲁药事,2012,31(12):322-326.
- [8]马小军,汪小全,邹喻苹,等.人参 RAPD 指纹鉴定的毛细管 PCR 方法[J].中草药,1998,29(3):191-194.
- [9]王培训,黄丰,周联,等.商品西洋参 DNA 指纹图谱鉴别[J].中药新药与临床药理,1999,10(6):367-383.
- [10]Porebski S, Bailey L G, Bernand R. Modification of a CT AB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15(1): 8.
- [11]杨飞,张敏,彭兴扬,等.金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立[J].武汉植物学研究,2007,(3):235-238.
- [12]周鹤峰,邹敏,吴惠兴,等.应用 RAPD 技术探讨木兰科 10 属 17 种植物的遗传多样性[J].生物技术,2011,21(6):46-47.
- [13]Schaal B A, Leverich W J, Rogstad S H. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology [M]. In: Falk D A, Holsinger K E. (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991:123-134.

## 白粉病胁迫下甜瓜叶片 *Hsp70* 差异表达分析

巴雪丽,刘婷婷,钟俐\*

(新疆大学 生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**目的:研究甜瓜叶片 *Hsp70* 基因在白粉病胁迫下的表达差异。方法:采用对白粉病抗性不同的 2 个甜瓜品种,Trizol 法提取叶片总 RNA,PCR 技术克隆 *Hsp70* 基因核心片段,采用 Semi-Q-RT-PCR 技术,以 *Actin* 基因为内参基因,对白粉病胁迫下不同处理、不同品种的甜瓜叶片 *Hsp70* 基因的表达进行差异分析。结果:抗病品种 MR-1 与感病品种伽师瓜叶片中的 *Hsp70* 基因表达量均随着接种时间的延长逐渐减少,但 MR-1 接种白粉病 1d 后表达量稍有增加;且伽师瓜中 *Hsp70* 基因的表达差异较 MR-1 明显。结论:两种甜瓜叶片感染白粉病后 *Hsp70* 表达量均减少。

**关键词:**白粉病;甜瓜;*Hsp70*;基因克隆;差异表达分析

中图分类号:S652 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1004-311X.2014.05.0112-4

## Expression Analysis of *Hsp70* Gene from the Leaves of the Muskmelon under the Powdery Mildew Stress

BA Xue-li, LIU Ting-ting, ZHONG Li\*

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract: Objective:** The expression of *Hsp70* gene under the powdery was studied. **Method:** The intact seedlings of susceptible varieties