

· 分子生药 ·

基于 β -AS 基因的甘草道地性形成机制研究

席培宇, 刘颖, 陈宏昊, 刘春生*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:对甘草道地性形成机制进行探索。方法:在 GenBank 中检索 β -香树酯醇合成酶(β -AS)基因,进行序列比对并找出序列保守区,用 primer premier 5.0 软件设计引物,对 3 个不同产地甘草材料的 β -AS 基因进行扩增、测序,用 MegAlign 软件进行序列分析并构建系统树。在表达差异实验中,对来自 3 个产地的 9 份甘草材料进行总 RNA 提取,逆转录得到 cDNA,以甘草 18S 基因为内参,PCR 扩增后进行相对表达量分析。结果:在序列多态性实验中,9 个样品的 β -AS 序列经比对分析共发现 108 处变异位点,内含子变异位点数高于外显子变异位点数两倍。在表达差异实验中内蒙组、甘肃组和宁夏组的甘草 β -AS 基因平均相对表达量有显著性差异。结论:不同产地甘草 β -AS 基因多态性的差异以及表达量的差异,可能是导致甘草道地性形成的原因之一。

[关键词] 甘草; β -AS 基因; 序列多态性; 表达差异; 道地性

[中图分类号] R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0153-06

[doi] 10.11653/syjf2013080153

Researches on Formation Mechanism of Genuineness of *Glycyrrhiza uralensis* Based on β -AS Gene

XI Pei-yu, LIU Ying, CHEN Hong-hao, LIU Chun-sheng*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the formation mechanism of genuineness of *Glycyrrhiza uralensis*. **Method:** Searching for beta-amyrin synthase (β -AS) gene in Genbank and finding out the conserved region by sequence alignment, then primers were designed by primer premier 5.0 software. β -AS genes of *G. uralensis* from 3 different origins were amplified and sequenced, which were analysed by MegAlign software. In the differential expression experiment, the total RNA of *G. uralensis* from 3 different origins were extracted, then cDNA were obtained by reverse transcription. Using 18S gene of *G. uralensis* as internal reference, relative expression of β -AS genes of *G. uralensis* from 3 different origins were detected and analysed. **Result:** The gene polymorphism experiment showed that 108 variable sites were present in the nine samples, and the quantity of variable sites of intron was twice than that of exon. The differential expression experiment showed that the average relative expression of β -AS gene of *G. uralensis* from different origins was significantly different. **Conclusion:** The differences of gene polymorphism and expression of β -AS gene in *G. uralensis* from different origins may be one of the important reasons to result in the genuineness of *G. uralensis*.

[Key words] *Glycyrrhiza uralensis*; β -AS gene; gene polymorphism; differential expression; genuineness

[收稿日期] 20121108(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072988)

[第一作者] 席培宇,在读研究生,从事药用植物和分子生药学研究, E-mail: xipeiyuzh@163.com

[通讯作者] *刘春生,从事分子生药学研究, Tel: 010-84738624, Fax: 010-84738611, E-mail: max_liucs@263.net

甘草是中药中常用的大宗药材,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效,在方剂配伍中占有重要地位^[1-2]。内蒙古、甘肃、宁夏等地区是甘草药材的道地产区,所产的优质甘草被称为“西草”。由道地药材形成模式假说^[3]可知,“道地药材”的形成应是基因型与环境之间相互作用

用的结果。因此,对不同产地甘草基因变异展开研究,对揭示道地甘草药材形成的机制及道地甘草药材的质量评价具有重要意义^[4-6]。

由“基因-mRNA-酶”的分子生物学中心法则可知,功能基因的多态性可导致其相应氨基酸的多态性,从而影响其翻译形成的酶的结构,进而对酶的活性产生影响,并最终影响酶的催化效率。酶催化调控产物的形成,当酶的活性发生变化时,能使调控产物的数量产生差异。酶的调控产物通常是指药材中的有效成分或其前体化合物,因此调控产物数量发生上的变异可在一定程度上影响药材的道地性。

β -香树酯醇合成酶(β -amyrin synthase, β -AS)催化 2,3-氧化鲨烯环化生成 β -香树酯醇^[7-8]。它处在甘草酸类化合物(齐墩果烷型)或是白桦酯酸类化合物(羽扇豆烷型)的重要分支点,是甘草酸生物合成途径中重要的关键酶。因此, β -AS 基因是甘草酸生物合成途径中的关键功能基因。目前,国内外有关功能基因多态性对其调控产物的影响已有许多报道^[9-11],均证明功能基因的微小变异就可对调控产物在数量或质量上产生影响,但有关甘草 β -AS 基因多态性的研究尚鲜见报道。

本文将不同产地甘草的 β -AS 基因作为研究对象,通过比较其在不同产地甘草中的序列多态性及其表达差异,试图从基因层面探索甘草道地性的形成机制。

1 材料

1.1 植物材料 在序列多态性分析实验中从内蒙、宁夏、甘肃各采集 3 株野生甘草,其中采自内蒙古杭锦旗的 3 株甘草材料分别编号为 S1, S2, S3, 采自甘肃民勤的 3 株甘草材料分别编号为 W1, W2, W3, 采自宁夏盐池的 3 株甘草材料分别编号为 G1, G2, G3。

在基因表达差异实验中所采样品情况为 N1:内蒙古赛因台格; N2:内蒙古五嗑头; N3:内蒙古杭锦旗; X1:宁夏盐池; X2:宁夏高沙窝; X3:宁夏南良; G1:甘肃义良滩; G2:甘肃新华村; G3:甘肃龙王庙。以上材料经北京中医药大学刘春生教授鉴定为豆科植物乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.。

1.2 菌株与克隆载体 感受态细胞 DH5 α 购自北京博迈德科技发展有限公司;克隆载体 pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara)。

1.3 试剂 LB 培养基所需试剂、X-gal、IPTG、DEPC 和氨苄青霉素均为 BBI 公司产品,购自上海生工生物工程公司;广谱植物基因组 DNA 快速提取

试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、小型质粒提取试剂盒、DL2000 核酸相对分子质量标准样购自北京博迈德科技发展有限公司;Mylab 通用型 RNA 快速提取试剂盒,购自北京美莱博医学科技公司;异丙醇、氯仿、乙醇等试剂均为分析纯,购自北京汇海科仪有限公司。

1.4 仪器 Thermo Cell 型恒温金属浴(Bioer 公司),Sigma 3K-15 型低温高速离心机(德国 Sigma 有限公司),JS-680 型全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),Anke TGL-16G 型离心机,水平电泳槽(北京六一仪器厂),SANYO-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱,TECHNE TC-3000 PCR 扩增仪,Bio-Rad 型电泳仪,QILINBEIER TS-1 脱色摇床,GRANT 型制冰机,超纯水制备系统,HD-1360 型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 技术路线 本研究的技术路线见图 1。

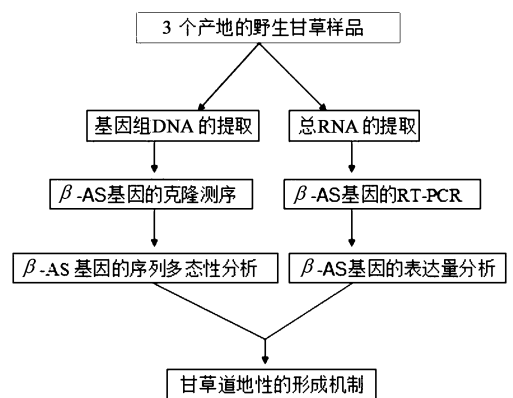


图 1 实验技术流程

2.2 β -AS 基因序列多态性实验

2.2.1 DNA 样品的制备 将采集的植物材料叶片经硅胶快速干燥处理,作为 DNA 提取材料。按照广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒操作步骤提取样品 DNA,电泳检查 DNA 纯度及完整性,用凝胶图像分析系统照像。

2.2.2 β -AS 基因的扩增与克隆 引物设计及合成:在 GenBank 中检索所有物种的 β -AS 基因,进行序列比对,找出序列保守区,用 primer premier 5.0 软件分段设计引物,由上海生工生物技术有限公司合成。

引物序列及优化后各对引物的退火温度见表 1。

PCR 扩增体系:20.0 μ L 的反应体系中包括 10 \times PCR buffer 2.0 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol \cdot L⁻¹) 2.8 μ L, dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Sense Primer (5 μ mol \cdot L⁻¹) 2.0 μ L, Reverse Primer (5 μ mol \cdot L⁻¹) 2.0

表1 引物及其优化后的退火温度

引物	引物序列 5'~3'	退火温度/℃
F1	ACATTACAGGACATCTTGATTCCG	56
R1	GAGTCAGAAGTGGCTCACTGAATAA	
F2	GCTAAAATGTGGTGTATTGCCCAT	
R2	TGGAGGCAACATTGATAAAAAGTAG	58
F3	CAGGTTAGGGACAACCCTTCAGGA	
R3	TGCCAACCAAGAACCCTAAGTGA	62
F4	ACTGGATCAGCAATTCAGGCACT	
R4	AACTGGAGTGAAGGCAATGGAA	62

μL , *Taq* DNA polymerase ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $3.0 \mu\text{L}$, Template ($150 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$, Formamide deionized (10%) $2.0 \mu\text{L}$, ddH_2O $4.7 \mu\text{L}$ 。

PCR产物用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒进行回收,连入pMD19-T载体中进行TA克隆,获得重组质粒,转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的LB平板上筛选阳性克隆。挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的LB液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养过夜,进行菌液PCR。PCR检测为阳性的菌液取至少3个直接送样,测序由上海生工生物工程有限公司完成,同时留 $500 \mu\text{L}$ 菌液加等体积30%的甘油, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 长期保存。

2.3 β -AS合酶基因表达差异实验

2.3.1 总RNA提取 将采到的每株甘草的根部作为RNA提取的材料。采用北京美莱博医学科技公司的Mylab通用型RNA快速提取试剂盒操作步骤提取样品总RNA。

2.3.2 逆转录 DNase处理去除基因组DNA污染,逆转录过程如下:首先在 $200 \mu\text{L}$ 离心管中配制如下体系:模板RNA $2.0 \mu\text{L}$, dNTP Mixture $1.0 \mu\text{L}$, Oligo dT $1.0 \mu\text{L}$, DEPC ddH_2O $6.0 \mu\text{L}$, 总量为 $10 \mu\text{L}$, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 min ,置于冰上 2 min ,瞬时离心。然后在以上体系中加入总量为 $20 \mu\text{L}$ 的如下混合反应液:模板RNA/引物的变性溶液 $10.0 \mu\text{L}$, $5 \times \text{M-MLV Buffer}$ $4.0 \mu\text{L}$, RNase inhibitor ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, M-MLV (RNase H-) ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$, RNase free dH_2O $4.5 \mu\text{L}$ 。 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 10 min 。 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 1 h , $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min ,之后立即置于冰上冷却。产物于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用或立即进行PCR扩增。

2.3.3 cDNA扩增 引物设计:根据乌拉尔甘草 β -AS基因,用软件Primer Premier 5.0设计引物。以甘草18S基因为内参,根据甘草18S基因,用相同软

件设计引物,见表2。

表2 β -AS基因及18S基因引物

引物	引物序列 5'~3'
TF	TCACTTACGGTCTCTGGTTCGC
TR	TACTCCCGTGATTTCTCTGTGG
18SF	CGCCGACAGAAGGGACGAGACGA
18SR	GGTGGTGACGGGTGACGGAGAAT

PCR反应体系: $50.0 \mu\text{L}$ 的反应体系中,包含:cDNA $3.0 \mu\text{L}$; $10 \times \text{PCR buffer}$ $5.0 \mu\text{L}$; MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $6.0 \mu\text{L}$; dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $8.0 \mu\text{L}$; forward primer ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4.0 \mu\text{L}$; reverse primer ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4.0 \mu\text{L}$; LA *Taq* ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$; ddH_2O $19.5 \mu\text{L}$ 。

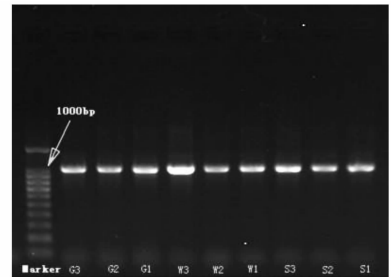
最佳循环数的确定:为找出18S基因及 β -AS基因扩增的最佳循环数,须保证两基因扩增在线性期内。将两基因在扩增循环数为20,22,24,26,28,30,32,34,36,38,40时分别扩增,用GELpro软件分析,确定其线性期的最佳循环数。

3 结果与讨论

3.1 β -AS基因序列多态性实验

3.1.1 DNA提取结果 样品DNA完整性好,杂质少,得率高,可满足后续研究的要求。

3.1.2 PCR扩增结果 以引物F4、R4扩增所得片段为例,9个样品PCR扩增结果如图2所示。

图2 不同产地甘草 β -AS基因PCR扩增

由图可知,PCR扩增所得片段特异性好,条带清晰明亮,可用于后续胶回收。

3.1.3 序列分析 经克隆得到长 3662 bp 的 β -AS基因部分序列,用MegAlign序列分析软件与本实验室已扩得甘草 β -AS cDNA比对,分析有14个外显子,长 1840 bp ;13个内含子,长 1796 bp ,其剪切模式均为GT-AG,所含A,T碱基含量远远大于G,C碱基含量,符合一般内含子的规则。

3.1.4 多态性位点统计及分析 9个样品的 β -AS序列经Meg Align软件比对,共发现108处变异位点,变异位点如表3所示。

表 3 9 个样品的 108 处变异位点

No.	位置	S1	S2	S3	W1	W2	W3	G1	G2	G3
1	1in	G	G	G	G	A	G	G	G	G
2	2ex	T	T	T	T	T	T	T	T	G
3	2in	T	A	T	T	T	A	T	T	T
4	4ex	C	C	C	C	C	C	C	C	T
5	4in	T	T	T	T	T	C	T	T	T
6	4in	T	T	T	T	T	A	T	T	T
7	4in	A	A	A	A	A	G	A	A	A
8	5ex	G	G	G	G	G	G	T	G	G
9	5in	T	T	T	T	T	T	T	T	
10	5in	A	A	A	A	A	A	A	A	
11	5in	A	A	A	A	A	A	A	A	
12	5in	T	T	T	T	T	T	T	T	
13	5in		A		A	A	A			
14	5in		T		T	T	T			
15	6ex	T	T	T	T	G	T	T	T	T
16	6in			T						
17	7ex	A	A	A	A	A	G	A	A	A
18	7ex	T	T	T	T	T	C	T	T	T
19	7ex	T	T	T	T	T	T	T	T	C
20	7in	A					A	A	A	A
21	7in	T					T	T	T	T
22	7in	A					A	A	A	A
23	7in	T					T	T	T	T
24	7in	T					T	T	T	T
25	7in	G					G	G	G	G
26	7in	A					A	A	A	A
27	7in	C					C	C	C	C
28	7in	T					T	T	T	T
29	7in	T					T	T	T	T
30	7in	A					A	A	A	A
31	7in	A					A	A	A	A
32	7in	G	T	T	T	T	T	T	G	T
33	7in	A	A	G	A	A	A	A	A	A
34	7in	A	A	A	A	A	A	A	A	G
35	7in	C	C	C	C	C	C	T	C	C
36	8ex	A	A	A	A	A	A	A	A	G
37	8ex	T	T	T	T	T	T	C	T	T
38	8in	T	C	T	T	T	T	T	T	A
39	8in	A	A	T	A	A	A	A	A	A
40	9ex	A	A	A	A	A	G	A	A	A
41	9ex	C	T	T	T	T	T	T	T	T

续表 3

No.	位置	S1	S2	S3	W1	W2	W3	G1	G2	G3
42	9ex	G	G	G	G	G	G	A	G	G
43	9in	C	T	C	C	C	C	C	C	C
44	9in	T	T	T	T	T	T	C	T	T
45	9in	T	T	T	T	T	T	T	T	C
46	10ex	A	A	G	A	A	A	A	A	A
47	10ex	A	A	A	A	A	A	G	A	A
48	10ex	G	G	G	G	G	G	G	G	A
49	10in	G	G	G	G	G	G	G	G	A
50	10in	C	T	T	T	T	T	T	T	T
51	10in	A	A	A	A	G	A	A	A	A
52	10in		A		A	A			A	
53	11ex	A	G	A	A	A	A	A	A	A
54	11ex	T	T	T	T	T	T	C	T	T
55	11ex	A	A	A	A	A	G	A	A	A
56	11ex	A	A	A	A	A	A	G	A	A
57	11ex	C	C	T	C	C	C	C	C	C
58	11ex	A	A	A	A	A	A	A	A	G
59	11ex	A	A	A	T	A	A	A	A	A
60	11ex	A	A	A	A	G	A	A	A	A
61	11ex	G	G	A	G	G	G	G	G	G
62	11ex	G	G	G	G	G	G	G		G
63	11ex	G	G	G	G	G	G	G		G
64	11ex	A	A	G	A	A	A	A	A	A
65	11in	A	A	A	A	A	A	A	A	A
66	11in	A	A	G	A	A	A	A	A	A
67	11in	T	T	T	T	T	T	T	T	A
68	11in	T	T	T	T	T	T	C	T	T
69	11in	A	A	A	A	A	A	A	A	G
70	11in	C	T	T	T	T	T	T	T	T
71	11in			G	G	G	G	G	G	
72	11in			A	A	A	A	A	A	
73	11in			T	T	T	T	T	T	
74	11in	T	T	T	G	T	T	T	T	T
75	11in	C	T	T	T	T	T	T	T	T
76	11in	A	A	T	A	A	A	A	A	A
77	12ex	A	A	A	A	A	A	T	A	A
78	12ex	C	C	C	C	C	C	C	C	T
79	12in		T		T	T	T	T	T	
80	12in		G		G	G	G	G	G	
81	12in	A	A	A	T	A	A	A	A	A
82	12in	T		T						T

续表 3

No.	位置	S1	S2	S3	W1	W2	W3	G1	G2	G3
83	12in	C	T	T	T	T	T	T	T	T
84	12in	T	T	T	T	T	T	C	T	T
85	12in	T	T	T	T	C	T	T	T	T
86	13ex	A	A	A	A	A	A	A	A	G
87	13ex	T	T	T	T	T	C	T	T	T
88	13ex	A	A	A	A	A	A	T	A	A
89	13ex	G	G	G	G	G	G	G	T	G
90	13in	T	T	T	T	T	T	T	T	C
91	13in							A		
92	13in							A		
93	13in							T		
94	13in							A		
95	13in							A		
96	13in	A	A	A	A	A	A	A	G	A
97	13in		A	A		A	A	A	A	A
98	13in		T			T		T		
99	13in		A			A		A		
100	13in		A			A		C		
101	13in		T	A		T	T	T	T	T
102	13in		A	A		A	A	A	A	A
103	13in	A	A	A	A	G	A	A	A	A
104	13in	C	T	T	T	T	T	T	T	T
105	13in	A	A	A	G	A	A	A	A	A
106	13in	G	C	G	C		C	C	C	G
107	13in	T	T	T	T	A	T	T	T	T
108	14ex	G	G	G	G	G	G	A	G	G

由表 3 可知,来自不同产地的 9 株甘草在 β -AS 基因序列上的确存在变异,且在 108 处变异中 74 处为内含子变异,34 处为外显子变异,内含子变异位点数高于外显子变异位点数 2 倍。

3.1.5 β -AS 基因全序列、外显子、内含子聚类分析

根据 3 个产地甘草的 β -AS 部分基因序列、外显子序列以及内含子序列,利用 MegAlign 软件构建系统树如图 3~5 所示。

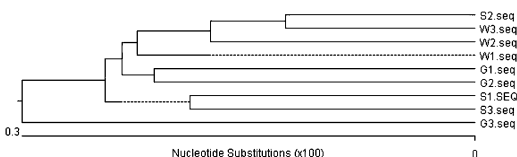


图 3 全序列聚类

全序列聚类图与内含子聚类图的结果一致,即

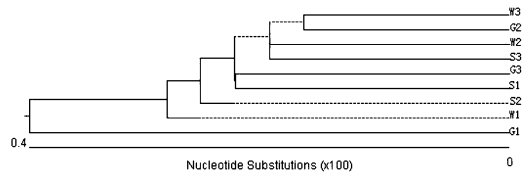


图 4 外显子聚类

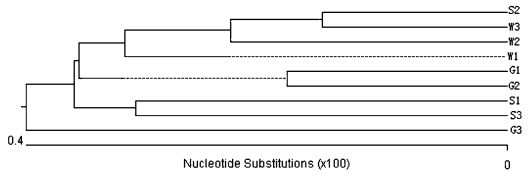


图 5 内含子聚类

同一产地的样品序列相似性高,内蒙 2 个样品(S1, S3)单独聚为一组,甘肃 3 个样品(W1, W2, W3)单独聚为一组,宁夏 2 个样品(G1, G2)单独聚为一组。

根据 3 个样品采集地的卫星图标记可发现:地理距离相聚越远,序列相似性越低,遗传距离越大。3 个样品采集地中,甘肃民勤与内蒙杭锦旗地理位置相距最远,在聚类图上也表现为样品间遗传距离相距最远。

由外显子聚类图可发现,相同产地的样品并未聚在一起,可得出结论,外显子的序列变异与地理分布无相关性。

综上,可推断不同产地的 β -AS 基因的序列差异,特别是内含子的序列差异是导致甘草道地性形成的原因之一,可对内含子进行深入研究。

3.2 β -AS 合酶基因表达差异实验

3.2.1 cDNA 扩增 优化后的 PCR 扩增条件如下: 95 °C 5 min;95 °C 变性 45 s,62 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,扩增 30 个循环;72 °C 延伸 7 min。

3.2.2 不同产地甘草 β -AS 基因表达差异分析 对 9 个样品 18S 与 β -AS 基因扩增后的条带进行吸光度(A)分析,结果见表 4。

由表 4 可知,内蒙组的甘草 β -AS 基因平均相对表达量高于甘肃组和宁夏组,有显著性差异。而宁夏组甘草 β -AS 基因的平均相对表达量低于内蒙组和甘肃组,有显著性差异。由于基因的表达量可以影响到其调控产物的合成水平,因此作为甘草酸合成代谢途径上重要的功能基因, β -AS 表达水平的差异会进一步影响到其下游途径的产物,从而对终产物甘草酸的合成产生影响。因此,可进一步检测甘草酸的含量,研究二者间的相关性,从而为道地甘草的综合评价提供依据。

在本实验中个别样品出现不表达现象,可能是由于某些阻遏蛋白的作用,导致基因沉默现象。也

表 4 β -AS 基因相对表达量分析(A)

指标	N1	N2	N3	X1	X2	X3	G1	G2	G3
β -AS	38 073	1. 25E +05	1. 39E +05	2. 49E +05	28 583	8 971	0	428	65 014
18S	1. 16E +05	1. 59E +05	1. 48E +05	1. 27E +05	1. 39E +05	99603	1. 31E +05	1. 61E +05	1. 36E +05
相对表达量	3. 28E -01	7. 86E -01	9. 39E -01	1. 96E +00	2. 06E -01	9. 01E -01	0. 00E +00	3. 00E -03	4. 78E -01

可能是由于突变引起的转录提前终止,造成不表达,可从基因序列方面深入研究。

4 讨论

在 β -AS 合酶基因序列多态性实验中,9 个样品的 β -AS 基因序列经比对,共发现 108 处变异位点,且内含子变异位点数远远高于外显子变异位点数。由于内含子主要参与基因的表达调控,因此不同产地甘草样品中内含子的差异有可能导致基因功能差异,从而对下游产物的合成产生影响。在本研究中同一产地的甘草样品其 β -AS 基因的序列相似程度高,而地理距离相距越远, β -AS 基因序列相似程度越低,差异度越大,因此可推断不同产地甘草的 β -AS 基因多态性的差异,可能是导致甘草道地性形成的原因之一。

在 β -AS 基因表达差异实验中内蒙组、甘肃组和宁夏组甘草 β -AS 基因平均相对表达量有显著性差异,其中内蒙组的甘草 β -AS 基因平均相对表达量最高,其次为甘肃组,而宁夏组甘草 β -AS 基因平均相对表达量最低。基因表达水平的高低会影响到调控产物的合成水平,因此推断 β -AS 基因表达量的差异也可能是导致甘草道地性形成的原因之一。

对于不同居群间的研究方法,前人主要用多基因研究(RAPD^[12-13], AFLP^[14-15], ISSR^[16]),单基因也仅限于 ITS 系列、5SRNA 基因区间等进行了此方面的研究,而关于功能基因多态性的研究相对较少。本文通过对不同甘草材料同一基因的系统进化分析,可以为单个基因变异在甘草中的功能变化及表达上的差异作出预测,为其功能研究提供一定的线索。除此之外,实践中明确的 DNA 序列也可以作为甘草品种鉴定的重要依据之一。

[参考文献]

[1] 刘颖,刘东吉,刘春生,等. 基于 HMGR,SQS1, β -AS 基因 CNVs 的甘草道地性机制研究[J]. 药学学报, 2012,47(2):250.

[2] 罗裕兴,毛淑敏,陈建萍,等. 从仲景方中生姜、大枣、甘草的使用看佐药在方剂配伍中的作用与意义[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(1):65.

[3] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说[J]. 中国中药杂志,2004,29

(6):494.

[4] Yamamoto Yutaka, Majima Takami, Saiki Ikuo. Pharmaceutical evaluation of glycyrrhiza uralen-sis roots cultivated in eastern nei-Meng-Gu of China [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(8): 1144.

[5] 孙群,佟汉文,吴波,等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2007, 8(1):56.

[6] 刘春生,段天璇,王文全,等. 栽培甘草不同部位甘草酸含量的单株分析[J]. 中国中药杂志,2007,32(24):2660.

[7] 刘东吉. 甘草 HMGR,SQS, β -AS 合酶基因 CNVs 与产地、形态的相关性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011.

[8] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A. Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(8): 912.

[9] 向光大,曾魁枚,何玉生,等. 2 型糖尿病患者脂蛋白酯酶、血管紧张素转换酶及载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的关系[J]. 中国综合临床,2005,21(1):13.

[10] 宋书娟,刘英芝,从日昌,等. PAX6 基因突变能够引起人脑结构异常[J]. 北京大学学报:医学版,2005, 37(1):48.

[11] 王芳,赵辉,王燕,等. 小麦 Wx-B1 基因酶切片段长度多态性及其与直链淀粉的含量[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(3):269.

[12] 王鸣刚,葛运生,陈亮,等. 甘草亲缘关系的 RAPD 鉴定[J]. 武汉植物学研究,2004,22(4): 289.

[13] 陆嘉惠. 国产甘草属植物的 RAPD 分析及其分类学研究[J]. 西北植物学报,2006, 26(3): 0527.

[14] 葛淑俊,李广敏,马峙英,等. 甘草野生种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学,2009,42(1): 47.

[15] 周成明,许彬,张金龙,等. 乌拉尔甘草优良品系选育研究-4 个来源甘草遗传基础的 AFLP 分析[J]. 中草药,2007, 38(7): 1078.

[16] 李贝宁,南博,刘春生,等. 道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,12(16):90.

[责任编辑 邹晓翠]