

应用 cDNA-SRAP 研究大黄不同功效组分型特异表达基因

刘娟, 魏胜利*, 刘春生*, 程小丽, 张晓芹, 郭争争
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 探讨生态环境和遗传背景相同条件下 3 种不同化学变异类型大黄在基因表达水平上的差异, 揭示大黄种内变异的分子机制。**方法:** 采用 cDNA-SRAP 生物信息学方法, 对不同化学变异类型大黄地下组织特异表达的基因进行分析和功能预测。**结果:** 共获得 5 条差异表达基因片段和 4 条表达量有明显差异的公共条带, 其中 4 条功能已知, 分别与植物生长发育及光信号转导、植物抗病性及水分运输相关, 5 条功能未知。**结论:** 克隆了不同化学变异类型大黄特异表达的基因, 为筛选优良变异类型、品种选育、功能基因组的研究提供参考。

[关键词] 大黄; 变异类型; cDNA-SRAP; 差异表达基因

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0140-04

[doi] 10.11653/syfy2013110140

Identification of Differentially Expressed Genes in Different Anomalies of Rhubarb by cDNA-SRAP Method

LIU Juan, WEI Sheng-li*, LIU Chun-sheng*, CHENG Xiao-li, ZHANG Xiao-qin, GUO Zheng-zheng
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To understand the molecular mechanism in genetic variation within species, and identify the differentially expressed genes among 3 anomalies of rhubarb under the same genetic background and cultivated environment. **Method:** The differentially expressed genes of different anomalies of rhubarb in vigorous growing stage were identified by cDNA-SRAP. Their functions were inferred through bioinformatics method. **Result:** Five different gene fragments and 4 common gene fragments but differentially expressed were identified, among which, the function of 5 were unknown, and the rest were involved in plant growth, light signal transmitting, disease-resistance, and water transporting. **Conclusion:** For the first time, the differentially expressed genes were cloned from the different anomalies of rhubarb. This provided the basis of the screening of fine anomalies and varieties, and the research of functional genomics.

[Key words] rhubarb; anomalies; cDNA-SRAP; differentially expressed genes

中药材是一个“多功效、多组分”的复杂体系^[1], 受生物多样性的影响, 即便是同种药用植物, 其所含各类功效组分的含量和比例也往往存在变异, 定义这些种内的变异类型为“功效组分型”。实质上“功效组分型”属于“化学型”^[2]的范畴, 差别只

是在于功效组分型关注的变异成分是与中药材传统功效相关的“功效组分”。功效组分是中药材药用功效发生的物质基础, 由于“功效组分型”分化而导致的不同功效组分含量和比例的差异, 势必造成同种药材在不同药用功效上产生差异, 导致中药疗效

[收稿日期] 20121013(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973880, 31170307); 教育部留学回国人员科研启动基金(2009); 科技基础性工作专项重点项目(2007FY110600)

[第一作者] 刘娟, 硕士, 从事分子生药学研究, Tel: 010-57833359, E-mail: moonriver24@yahoo.cn

[通讯作者] * 魏胜利, 博士, 副教授, 从事中药资源学与分子生药学方面的研究, Tel: 13683336930, E-mail: wsl7491@126.com;

* 刘春生, 博士, 教授, 从事药用植物与分子生药学方面的研究, Tel: 010-84738624, E-mail: max_liucs@263.net

的不稳定。因此,功效组分型分化很可能是导致药材质量不稳定的重要因素。基于中药材的各类“功效组分”,开展“功效组分型”研究,更复合中医药发展需求,其研究结果对于指导优质中药材的定向培育生产具有重要意义。

大黄是为数不多的功效组分相对明确的中药材。《中国药典》(2010年版)规定的正品大黄有掌叶大黄唐古特大黄和药用大黄^[3]。其中,唐古特大黄又名鸡爪大黄,分布于西藏东部、青海、甘肃,生于海拔为1 700~4 300 m的山坡林缘、灌丛及半阴坡石堆中,是我国特有种^[4]。唐古特大黄的研究主要集中于化学成分^[5-9]及药理活性^[10-19],而分子生物学的研究则主要集中于对3种正品大黄分子鉴定方面^[20],关于种内不同化学变异类型的分子研究尚未见报道。

SRAP 标记(sequence-related amplified polymorphism,序列相关扩增多态性)一种新型的基于PCR的分子标记技术,其原理是利用独特的引物设计对ORFs(open reading frames,开放阅读框架)进行扩增,具有简便、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀的特点^[21-24]。SRAP技术中模板多为DNA,亦有使用cDNA。cDNA-SRAP技术开发以来,已在水稻、甘蓝、甜瓜等植物得到应用^[25-27],其差异片段可以看成是潜在的功能基因^[28]。因此,应用该技术对唐古特大黄遗传图谱构建、基因克隆、优良品种选育具有重要意义,而相关研究尚未见报道。本实验采用cDNA-SRAP技术,对生态环境、遗传背景一致的不同变异类型大黄在基因表达水平上的差异,为筛选优良变异类型,品种选育及唐古特大黄功能基因组的研究积累数据。

1 材料

唐古特大黄新鲜的根与根茎采自四川省若尔盖,洗净切制成块后用液氮处理后放于-70℃冰箱保存,原植物由北京中医药大学中药学院魏胜利副教授鉴定,鉴定结果为唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)。前期实验已将样品进行含量测定,并利用主成分分析将唐古特大黄分为3种类型:第I型为游离蒽醌型大黄、第II型为儿茶素型大黄、第III型为番泻苷型大黄(图1)。选定这3类大黄共6个样品:第I型选择5,27号样品,第II型选择12,25号样品,第III型选择9,13号样品(图2)。从440对引物中筛选出扩增效率较高的6对SRAP引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成(表1)。Taq DNA聚合酶,dNTP,MgCl₂,

2 000 bp DNA Ladder Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

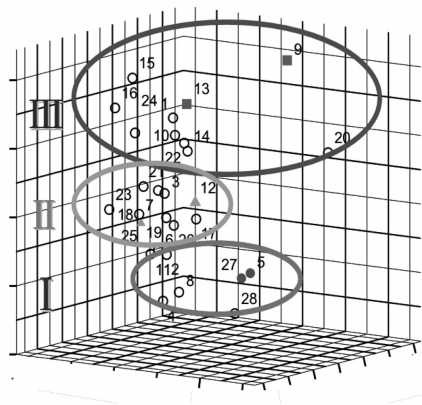


图1 若尔盖唐古特大黄样品主成分分析三维示意

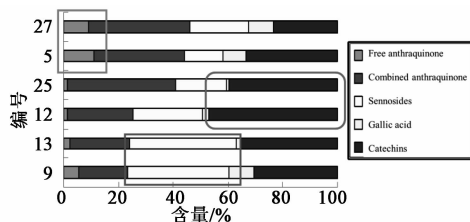


图2 选定的大黄样品各组分条形示意

表1 筛选的SRAP引物及其序列

Forward primer (5'~3')	Reverse primer (5'~3')
ME2 TGAGTCCAAACCGGAGC	EM7 GACTGCGTACGAATTCAA
ME18 TGAGTCCAAACCGGTAA	EM19 GACTGCGTACGAATTCGG
ME9 TGAGTCCAAACCGGTAG	EM4 GACTGCGTACGAATTTGA
ME11 TGAGTCCAAACCGGTGT	EM13 GACTGCGTACGAATTAGC
ME5 TGAGTCCAAACCGGAAG	EM18 GACTGCGTACGAATTGGT
ME12 TGAGTCCAAACCGGTGA	EM4 GACTGCGTACGAATTGA

2 方法

2.1 大黄总RNA提取及cDNA第一链的合成 采用CTAB-LiCl法^[29]。提取出来的RNA稀释5倍进行1%琼脂糖凝胶电泳,观察28 S与18 S的比值以确定RNA的完整性,紫外检测A₂₆₀和A₂₈₀,检查RNA的纯度及浓度。采用TaKaRa公司的DNase I去除总RNA中的基因组DNA,并按说明书中步骤进行纯化。用核酸定量仪对RNA进行定量,并将样品调为相同浓度进行下游逆转录。cDNA的合成按TaKaRa的cDNA synthesis kit (M-MLV version)操作说明进行,合成的cDNA作为下游反应的模板。

2.2 PCR反应与产物检测 采用上述筛选出的大黄SRAP引物及稳定的体系和条件,对3个类型6个样本cDNA的扩增,每个样本设2个重复。PCR反应总体积为20 μL,每个反应体系含1×PCR

Buffer, MgCl₂ 3.0 mmol·L⁻¹, dNTPs 200 μmol·L⁻¹, 引物各 0.2 μmol·L⁻¹, TaqDNA 聚合酶 1 U, 模板 50 ng, ddH₂O 补足。SRAP 扩增程序采用复性变温法, 共 35 个循环, 即 94 °C 预变性 10 min; 前 5 个循环: 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min; 后 35 个循环: 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min; 循环结束后 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。本研究采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳来进行观测分析。

2.3 差异性条带的扩增与测序 差异性条带采用博迈德琼脂糖胶回收试剂盒回收特异条带, 并以其为模板进行克隆测序, 测序由上海生工生物工程服务有限公司完成。

2.4 测序结果同源性分析 基因序列通过美国国家生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 网站的 GenBank 进行 DNA 差异片段的同源性分析和功能预测。

3 结果与分析

3.1 变异类型大黄特异基因表达 cDNA-SRAP 分析 采用 CTAB-LiCl 法^[29] 提取总 RNA 条带清晰, 28S rRNA 条带亮度大于 18 S rRNA, RNA 样品的 A_{260/280} 在 1.8 ~ 2.1, 质量较好 (图 3)。采用 6 对引物, 对不同变异类型大黄进行 SRAP 分析, 扩增片段主要集中在 100 ~ 1 000 bp, 大多数基因表达没有明显变化, 只有少数基因特异表达 (图 4), 同时还有

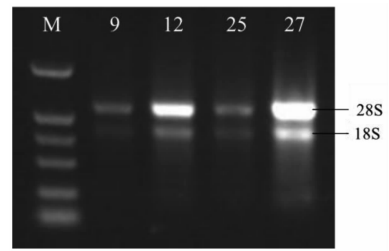


图 3 部分材料总 RNA 电泳

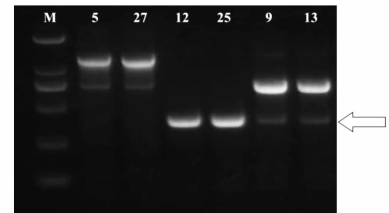


图 4 EM18-ME5 引物组合的扩增结果

一些基因存在较明显的表达量差异, 提示其可能与一些特殊作用的调控因子密切相关。

3.2 cDNA-SRAP 差异片段的克隆测序与同源性分析 从 440 对引物中筛选出扩增效果较好, 条带清晰的 6 对引物, 从中筛选出 6 个差异表达条带和 3 个表达量有明显差异的公共条带进行测序。所得片段测序结果采用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行查询。其中 5 条功能未知, 4 条功能已知, 一个与植物生长发育及光信号转导相关, 2 个与植物抗病性相关, 1 个与水分运输相关 (表 2)。

表 2 样品特异条带的比对

No.	比对结果		序列长 /bp	样品号	相似度 /%	功能
	GenBank 登录号	注释				
EM4-ME9	XM002322478.1	毛果杨 GRAS 家族转录因子	305	27, 12, 25	71	生长发育及光信号转导
EM13-ME11	CU013515.2	蒺藜苜蓿第五染色体部分克隆序列 mth2-106f22	397	公共条带	88	功能未知
EM18-ME5	XM002271329.2	葡萄未知功能蛋白 LOC100242170	371	9, 12, 13, 25	79	功能未知
EM7-ME2	XM002513160.1	蓖麻保守序列的抗体蛋白部分序列	362	公共条带	78	植物抗性
EM4-ME12	AB293445.1	酿酒酵母水通道蛋白	1 063	公共条带	98	水分运输
EM19-ME18 a	XM002284127.2	葡萄预测蛋白 LOC100243579	304	27	82	功能未知
EM19-ME18 b	XM002319239.1	毛果杨 cc-nbs-lrr 的抗性蛋白	100	27	96	植物抗病性
EM19-ME18 c	AC148481.9	苜蓿属未知功能 mth2-36d21	119	12	80	功能未知
EM19-ME18 d	XM002308905.1	毛果杨的预测蛋白	294	25	79	功能未知

4 讨论

基因在时空中有序的表达, 贯穿了植物体的整个生长发育过程, 而植物的种质差异势必会影响基因的差异表达。表达基因根据功能不同可以分为 7 类: 信号转导、细胞生长/凋亡、抗逆/机体防御、物质转运、转录调控、代谢及功能待定。本实验中这些表达差异的基因主要与植物信号转导、物质转运与抗

逆性相关。从以上实验结果分析中可以看出, 27 号样品差异片段较多, 经查阅发现 27 号样品的种质来源为甘肃, 后移栽于若尔盖。这个结果暗示, 不同产地的大黄可能因为地理隔离使得基因表达出现一定差异。本实验发现的 5 个基因片段没有直接与功能基因相联系, 但这些基因片段有可能是相关功能基因连锁的标记基因, 也可能对相应的代谢通路及酶

具有调节互作的作用,同时尚有 4 个未知功能片段还需要进一步探索。

目前,对大黄基因组的研究尚少,本研究有利于探索不同变异类型大黄与功能基因的相关性,了解大黄分子生物学背景,为进一步从分子水平育种特异功效方向的大黄提供基础。由于分子标记技术存在一定盲目性,筛选与代谢途径相关的功能基因具有一定难度,因此,在今后的研究中可以直接从功能基因同源克隆入手,解释功效组分型形成的机制。

[参考文献]

- [1] 肖小河,肖培根,王永炎. 基于道地药材和生物效价检测的中药质量控制与评价模式的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2007,27(4):5.
- [2] 郭兰萍,黄璐琦,华永丽,等. 从表型可塑性、生态型到药用植物化学型的研究[J]. 资源科学,2008,30(5):744.
- [3] 中国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:22.
- [4] 胡延萍,谢小龙,王莉,唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化[J]. 广西植物,2010,30(1):112.
- [5] Gao Xiao-yan, Lub Jian-qiu, Tua Peng-fei, et al. One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection[J]. J Chrom A,2009,1216:2118.
- [6] Jin Wei, Tu Peng-fei. Preparative isolation and purification of trans-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-O- β -D-glucopyranoside and (+) catechin from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. using high-speed counter-current chromatography by stepwise elution and stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase[J]. J Chrom A,2005,1092:241.
- [7] 张丹,蒋心惠. 反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌类衍生物的含量[J]. 成都中医药大学学报——分析化学,2003,31(4):459.
- [8] 李曼玲,李铁林,冯伟红,等. 含大黄复方制剂中没食子酸的定性定量方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2000,6(6):12.
- [9] 孙佩,李敏,杨小多,等. HPLC 法测定大黄药材和饮片中番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量[J]. 成都中医药大学学报,2008,31(3):51.
- [10] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医,2009,11(5):931.
- [11] 刘娟,刘春生,魏胜利. 大黄药效成分及其药理活性研究进展[C]. 长沙:中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议论文集,2007:374.
- [12] 郑雨,向群,万幸. 大黄及大黄素干预全身性炎症反应作用的研究进展[J]. 中药材,2004,27(9):694.
- [13] 魏凤玲,常明,原国强. 大黄中结合蒽醌的致泻作用

- 及药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(6):53
- [14] 闫美娟,隋峰,林娜. 大黄调节胃肠功能的作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):181.
- [15] 田萌,刘克武. 大黄三种有效成分对胰蛋白酶活性及结构的影响[J]. 四川大学学报:自然科学版,2010,46(1):192.
- [16] Gu Jian-wen, Hiroshi Hasuo, Mitsue Takeya, et al. Effects of emodin on synaptic transmission in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro* [J]. Neuropharmacology,2005,49:103.
- [17] 林永成. 大黄治热结便秘的机理研究[J]. 中山大学学报,1996,35(2):75.
- [18] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医,2009,11(5):931.
- [19] Kosuge T, Ishida H. Studies on active substances in the herbs used for oketsu ('stagnant blood') in Chinese medicine. IV. On the anticoagulative principle in Rhei Rhizoma[J]. Chem Pharm Bull, 1985,33:1503.
- [20] 陈大霞,李隆云,钟国跃,等. 用 SRAP 标记分析正品大黄的遗传关系[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2309.
- [21] Yang D Y, Fushimi H, Cai S Q, et al. Molecular analysis of *Rheum* species used as Rhei Rhizoma based on the chloroplast matk gene sequence and its application for identification[J]. Biol Pharm Bull,2004,27(3):375.
- [22] 王爱兰. 大黄属的系统发育与生物地理学研究[D]. 兰州:兰州大学,2009.
- [23] 姬可平,李啸红,李应东,等. 应用 rRNA 基因间隔区碱基测序对中药(大黄)进行鉴定[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2002,4(4):44.
- [24] 李沛清,张帆,金建文,等. 不同产地大黄 ITS 序列分析[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(1):136.
- [25] 卢泳全,吴为人. ACGM 标记在小麦属中的通用性[J]. 作物学报,2006,32(5):511.
- [26] 马爱芬,李加纳,谌利,等. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示[J]. 作物学报,2008,34(3):526.
- [27] 吴建明,李杨瑞,杨柳,等. cDNA-AFLP 和 cDNA-SRAP 技术在植物基因差异表达上的应用及其分析比较[J]. 生物技术通报,2009(11):52.
- [28] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107:168.
- [29] 王学勇. 丹参毛状根基因诱导表达分析及其有效成分生物合成基因的克隆研究[D]. 北京:中国中医科学院,2007.

[责任编辑 邹晓翠]