

分子标记技术及其在药用植物中的应用

张阵阵¹, 郭美丽^{1*}, 张军东² (1. 第二军医大学药学院生药学教研室; 2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

摘要 目的: 介绍现代分子生物技术——分子标记技术及其分析方法在药用植物中的应用和意义。方法: 查阅国内外相关文献, 进行归纳分析。结果和结论: 分析了分子标记技术的特点、适用范围和局限性, 以及在药用植物学的研究成果和进展。分子标记技术作为一种现代分子生物技术在药用植物学中具有广阔的应用前景。

关键词 DNA 分子标记; 药用植物; 聚合酶链式反应

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0111(2007)03-0137-04

DNA 分子标记 (DNA molecular markers) 指受基因控制并且能够稳定遗传的, 能代表个体或群体的遗传特征, 并可被用作遗传分析的物质。分子标记技术, 即分子诊断技术, 是指通过直接分析遗传物质的多态性来诊断生物内在基因排布规律及其外在性状表现规律的技术。DNA 分子信息量大, 不受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响, 这就使其在生物鉴定方面具备了准确性高、重现性好等特点, 在药用植物中具有很大的应用前景^[1-3]。

1 DNA 分子标记技术的特点

1.1 遗传稳定性 DNA 分子作为遗传信息的直接载体, 不受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响, 每一个体的任一细胞均含有相同的遗传信息。用 DNA 分子特征进行物种鉴别准确可靠。

1.2 多态性丰富 DNA 分子是由 G, A, C, T 四种碱基构成, 生物体特定的遗传信息便包含在特定的碱基序列顺序中, 不同物质遗传上的差异表现在这四种碱基排列顺序的变化, DNA 分子标记所检测多态性存在于丰富的等位变异中, 多态性数量丰富^[4]。

1.3 化学稳定性 DNA 分子作为遗传信息的载体, 比蛋白质、同工酶等具有较高的稳定性。在生物体的标本中所保存下来的 DNA 仍能够用于 DNA 分子标记的研究。

2 常用分子标记技术及其基本原理

目前, 分子标记技术已有几十种, 依据多态性检测手段, 可将分子标记分为 3 大类: 基于传统 Southern 杂交技术的分子标记如 RFLP; 基于 PCR 反应的分子标记如 RAPD、DAF; PCR-RFLP 的结合即

AFLP 技术。另外还有以重复顺序为基础的 SSR、TRS 等, 以及以 mRNA 为基础的 RT-PCR、RDA 等。

2.1 限制性多态性碎片长度 (RFLP, restriction fragment length polymorphism) 标记 Botstein 等^[5] 提出了 DNA 限制性片段长度多态性概念后, 该技术在植物遗传研究中被广泛应用。它是利用限制性内切酶识别特定的核苷酸顺序并切割 DNA 后, 由于酶识别序列的点突变或部分 DNA 片段的缺失、插入、倒位而引起酶切位点缺失或获得, 使切割 DNA 所得的片段发生变化, 从而导致限制性片段的多态性。RFLP 标记的特点是: 具有共显性特点, 可以区别基因型纯合与杂合, 能提供单个位点上较完整的资料; 标记无表型效应, 不受环境条件和发育条件影响; 而且稳定重复性强。但是由于 RFLP 标记对 DNA 需要量较大 (5~10 μ g), 操作繁琐, 费用昂贵, 使其应用受到一定程度的限制, 主要用于作为遗传连锁图的绘制和目标基因的标记^[6]。

2.2 随机扩增多态性 (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNAs) 标记 随机扩增多态性 DNA 技术是由 Williams^[7] 发展起来的。Williams 等在发现 RAPD 多态性并证明 RAPD 标记分离符合孟德尔遗传规律, 是一种有效的遗传标记。该标记技术是以人工合成的随机寡聚核苷酸序列为引物, 通常为 10 个碱基, 利用 PCR 技术随机扩增基因组 DNA 模板的不同位点, 得到一系列多态性 DNA 片段。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色后, 即可进行多态性分析。RAPD 的特点是: 无需知道有关模板 DNA 的结构信息; 没有种属特异性, 一套引物可适用于不同的基因组分析; 模板 DNA 用量少 (15~25 ng), 纯度要求不高。但 RAPD 标记是显性标记, 不能区分纯合型和杂合型; 扩增产物对反应条件非常敏感, 实验结果重复性较差。为了提高某一理想 RAPD 标记的稳定性, 可首先将其克隆并对其末

作者简介: 张阵阵 (1979-), 女, 硕士。E-mail: zz_jan@163.com

通讯作者: 郭美丽, E-mail: m_lguo@snnu.edu.cn

端测序,在原来 RAPD 所用的 10 个碱基引物上增加合成上述末端序列的 14 个碱基的核苷酸,以此为引物对基因组 DNA 再进行扩增分析,即 SCARs (Sequenced Characterized Amplified Regions) 标记^[8]。

2.3 简单重复序列 (SSR, Simple sequence repeats) 标记 简单重复序列又称微卫星序列,指 DNA 分子中 2~4 个核苷酸串连重复序列分布于人类和动植物整个基因组的不同位置上,不同品种间其重复长度有高度的变异性,但微卫星 DNA 两端的序列多是保守的单拷贝序列,根据两端的序列设计一对特异引物,经 PCR 扩增, PAGE 电泳及放射自显影,可以得到因简单序列重复单位数不同而引起的扩增片段的多态性^[9]。该标记多态性丰富,信息量大。但要获得 SSR 引物需要进行大量克隆、测序和杂交验证,这是难度较大且代价昂贵的工作。一旦开发出一套适用于某个物种的引物,就可以推广使用。

2.4 扩增片段长度多态性 (AFLP, amplified fragment length polymorphism) 标记 扩增片段长度多态性是 Zabeau 等于 1992 年发明的一项专利技术^[10]。

它是以 PCR 为基础的 RFLP 技术,植物基因组 DNA 经 2 个限制性内切酶酶切后 (通常一个酶切点数多,另一个酶切点数较少),与特定接头相连接,根据接头的核苷酸序列和酶切位点设计引物,进行特异性 PCR 扩增,最后分离扩增的 DNA 片段。具体包括 3 个步骤:① DNA 被限制性内切酶酶切,然后与 AFLP 聚合核苷酸接头连接;② 利用 PCR 的方法,通过变性、退火、延伸循环,选择性扩增限制性片段,经过多次循环,可使目的序列扩增到 0.5~1 μg;③ 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增的 DNA 片段。对于基因组较大的物种,往往需要进行预扩增和选择性扩增,两步法扩增还可以提供大量的模板,并降低模板浓度的影响。AFLP 既具有 RAPD 快速高效的特点,又具有 RFLP 稳定可靠、重复性好的特点,同时由于 AFLP 采用的专用引物 3' 端选择碱基数目和序列是随机的,故能提供比两者更多的 DNA 多态性信息,AFLP 技术是一种功能强大但是技术难度最高的分子标记。几种常用分子标记的特点见表 1。

表 1 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 分子标记的特点比较

特性	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
分布	普遍存在	普遍存在	普遍存在	普遍存在
遗传特点	共显性	多数显性	多数显性	共显性
多态性水平	低	中等	非常高	高
检测点位数	1~4	1~30	100~200	1~5
可获得的信息量	低到中等	高	非常高	高
核心技术分子	杂交技术和电泳技术	PCR 技术和电泳技术	PCR 技术和电泳技术	分子杂交和电泳技术
多态性类型	碱基突变、插入、缺失、易位、倒位	碱基突变、插入、缺失、易位、倒位	碱基突变、插入、缺失、易位、倒位	重复序列的长度与次数的差异
检测基因组的区域	单、低拷贝区	整个基因组	整个基因组	重复序列区功能基因区
DNA 质量	高	低	高	高
可靠性	高	中等	高	高
DNA 用量	5~10 μg	1~100 ng	1~100 ng	50~120 ng
费用	中等	低	高	高

3 分子标记技术在药用植物中的应用

3.1 分子标记在药用植物分类上的应用 DNA 作为植物的遗传物质,具有稳定、可靠、不受外界因素影响的特点,目前利用不同种类的分子标记开展中草药植物的种属分类工作取得了很大进展。采用的分子标记多种多样,以 RAPD 标记较多见^[11]。所涉及的中草药植物总计达到近百种之多,对于不同的中草药的不同种的分类来讲,利用分子标记技术不仅可以对分析结果进行聚类分析,而且可以获得与种有关的 DNA 带型^[12]。虞泓等^[13]采用 RAPD 技术对 3 种 6 个居群 59 个云南常见药用植物红景天样品进行了遗传关系研究。结果表明 RAPD 分子标记可很好地用于红景天物种的分子鉴定和遗传背景

研究。

3.2 近缘药用植物品种的 DNA 分子鉴定 近缘药用植物品种的鉴定往往采用传统的生药学方法,但近缘药用植物品种在外观形态、组织特征、化学成分等方面十分相似,难以准确辨认。而 DNA 分子遗传标记能够从分子水平上检测生物的遗传背景差异。Koh jyoum a M^[14]等采用 CTAB 法提取菊科苍术属五种植物茅苍术、北苍术、单叶苍术、关苍术和白苍术等新鲜叶片组织的基因组 DNA,利用 RAPD 技术获得了清晰的多态性 DNA 指纹图谱,能明显区分苍术的几个品种。任跃英等将人参属 (Ginseng) 黄果人参、红果人参、黄果西洋参及红果西洋参基因组用 RAPD 进行了分析。共采用 15 个随机引物, RAPD 及聚类分析结果与形态学和细胞学等分析结果基本

一致,证实了 RAPD 分子标记方法是人参属系统分类、品种鉴定的有效方法^[15]。

3.3 药用植物道地性分析 药材的“道地性”是中草药研究的一个重要的方面。采用 DNA 分子诊断技术并辅以形态学分析,可以从分子水平上来揭示药材的“道地性”。王凌晖利用各品种的 RAPD 指纹图谱,进行何首乌种质资源的聚类分析,通过 DNA 分子标记技术为何首乌种质资源的分类、“道地性”鉴定提供理论依据^[16]。

3.4 分子标记辅助药用植物育种 品质选育传统上主要是依据一些形态、生理生化性状选择亲本及子代。分子标记相对于形态标记具有无可比拟的优越性。在基因定位基础上,借助与有利基因紧密连锁的 DNA 标记,在群体中选择具有某些理想基因型和基因型组合的个体,结合常规手段,培育优良品种。这种将标记基因型鉴定整合于经典育种研究中的新型育种方法,称为分子标记辅助选择 (marker assisted selection, MAS)^[17]。利用分子标记技术在农作物中定位了大量的主效和微效基因,有关的分子标记辅助选择已成功展开并获得了显著的进展。在中草药植物的育种研究方面,可以利用分子标记在育种过程中进行亲本性状的鉴定、检测,辅助选择亲本及子代,加速品种的培育、缩短育种周期。张磊等^[18] AFLP 分子标记技术,对中国红花的 28 个品种进行分析,为进一步红花种质量资源选育和筛选品质相关基因奠定基础。

3.5 鉴定药用植物种子种苗纯度以及雌雄 药用植物种子的纯度和雌雄的鉴定一般多采用田间种植实验,周期长,花费大。分子水平遗传标记,能够依据基因组 DNA 多态性进行种子纯度和雌雄检测,从而取得对栽培种子纯度和雌雄及质量的准确评价,防止劣质种子的流入以及劣质药材的产生,减少经济损失。生药种子的纯度还直接影响品种的标准,利用分子标记技术检测生药种子的纯度和雌雄以及相关质量是可能的。

4 结语

目前分子标记辅助育种在农业上已经广泛地用于抗病,抗虫、雄性不育、耐药性、高产连锁基因等的选择^[18-22]。药用植物在传统的生药学和药学的基础上,应用新技术和新方法,开展植物物种、生态和遗传等多个层次范围内的药用植物资源的保护,开发与利用的研究^[23]。

分子标记技术有利于从本质上,即从生物遗传物质 DNA 分子上揭示物种遗传变异以及其变异的规律,揭示道地性可能存在的遗传变异规律,从而知

道道地性药材的科学栽培、繁育与采集。也可以利用先进的分子标记技术,科学快速的鉴别市场上的道地性药材。另外,可以探索如何将分子标记技术所揭示的大分子多态性与小分子药用成分的分布规律紧密结合起来,以指导药用成分的方便、快速、正确的寻找与开发利用。实现这一目标可能需要突破现有分子标记技术水平,在深入了解药用成分代谢途径的分子生物学基础上,找到新的标记手段,实现从大分子水平上揭示小分子药用成分的分布规律。

参考文献:

- [1] 唐克轩. 中草药生物技术 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2005 374~401
- [2] 郑俊华. DNA 分子遗传标记技术在生药学研究中的应用 [J]. 生药学, 2003, 3(3): 75.
- [3] 杨柳, 程波, 曾凡波. DNA 分子遗传标记技术及其在生药学中的应用 [J]. 中国药师, 2004, 7(7): 559.
- [4] Sanbrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2000
- [5] Bostein D R, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a Genetic linkage map in Map Using Restriction Fragment Length Polymorphism [J]. Am J Hum Genet 1980 32: 314.
- [6] Tomoko M, Mitsuo O, Tomoya A. Distribution of nuclease-specific repeated sequences isolated from citrus genomes [J]. Ann Bot 2001, 87: 845
- [7] Williams J G K, Kubelk AR, Livak K J. DNA polymorphisms Amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res 1990, 18(6): 6231
- [8] Kin DH, Kin BD. Development of SCAR markers for early identification of cytoplasmic male sterility genotype in chili pepper (*Cap siam annum L*) [J]. Mol Cells 2005 20(3): 416
- [9] Lieckfeldt E, Meyer W, Bomert T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting [J]. Basic Microbiol 1993 33: 413
- [10] Zebeau M, Vos P. 1993 Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting European Patent Application Number 91401619. 7 [P]. Publication Number EP 0534858 A 1.
- [11] 黄璐琦. 分子生药学 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 5: 228~254.
- [12] Dangi RS, Lagu MD, Choudhary LB, et al. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers [J]. BMC Plant Biol 2004 30(4): 13
- [13] 虞泓, 朱荣勋, 李永谊, 等. 云南常见药用红景天的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 96.
- [14] Kohjyoum A M, Kurihara K, Yanada K, et al. Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the tmL and thF chloroplast DNA [J]. Planta Medica 2002 68(1): 94
- [15] 任跃英, 高慰, 郭影, 等. 黄果及红果人参、西洋参基因组的 RAPD 分子标记研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(1): 39

- [16] 王凌晖, 曹福亮, 汪贵斌, 等, 何首乌野生种质资源的 RAPD 指纹图谱构建 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2005, 29(4): 37.
- [17] Christoph L, John C. Whittaker On Prediction of Genetic Values in Marker Assisted Selection [J]. Genetics, 2001, 159: 1375.
- [18] Zhang L, Huang BB, KaiGY, *et al*. Analysis of intraspecific variation of Chinese *Carthamus tinctorius* L. using AFLP markers [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41(1): 91.
- [19] N. F. Mark Plant genes and molecular manipulations [M]. Agriculture Laboratory Press, 2002: 245~250.
- [20] Orlando BH, Bart PHJ, Thamma *et al*. Identification of sugar cane genes induced in disease resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43: 1115.
- [21] Ayako A, Akemi K, Michiko M. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine zipper like protein induced to salt stress [J]. Gene, 2005, 356: 135.
- [22] Ke KA, Li G, Wei C, *et al*. Transformation and Functional Expression of the rFCA-RRM2 Gene in Rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(7): 823.
- [23] Hon CC, Chow YC, Zeng FY, *et al*. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharmacol, 2003, 4(9): 841.

收稿日期: 2006-04-06

三萜皂苷的中枢神经系统作用

王逢春¹, 张瑞麟² (1. 北京军区联勤部第一干休所, 北京 100010; 2. 空军总医院药学部摆药中心, 北京 100036)

摘要 目的: 综述三萜皂苷的中枢神经系统作用。方法: 根据三萜皂苷作用于中枢神经系统的不同方面分别阐述不同三萜皂苷的作用及其机制。结果: 三萜皂苷具有广泛的中枢神经系统作用, 它可以通过多种途径改善学习记忆功能, 并且具有明显的抗抑郁、镇静等中枢调节作用。结论: 三萜皂苷的中枢神经系统作用具有较好的应用前景, 值得深入研究。

关键词 三萜皂苷; 中枢神经系统; 作用机制

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2007)03-0140-03

三萜皂苷分为五环三萜与四环三萜两类, 主要分布在桔梗科、五加科、豆科、七叶树科、石竹科、远志科、玄参科等植物中。药理学研究表明, 三萜皂苷类化合物具有中枢神经系统作用、抗肿瘤作用、抗炎、抗菌、降胆固醇及心血管活性等。三萜皂苷在中枢神经系统方面的作用主要有改善学习记忆功能、抗抑郁、镇静催眠、镇痛等功效。本文就三萜皂苷的中枢神经系统作用作一综述。

1 镇静催眠作用

研究发现, 人参根皂苷不仅使群养小鼠戊巴比妥钠诱发的睡眠时间延长, 也能够使隔离孤独饲养小鼠戊巴比妥钠诱发的睡眠时间延长, 作者认为 Rg1 可能是人参根皂苷中延长小鼠睡眠的主要活性成分^[1]。柴胡皂苷可能影响脑内 5-HT 的浓度变化从而延长猫的睡眠时间^[2]。柴胡皂苷对最大电休克模型有明显效果, 能延缓但不能阻止戊四唑化学惊厥的发生^[3]。灌胃酸枣仁总皂苷 (20~80 mg/kg) 可减少小鼠自发活动, 显著延长阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间, 能对抗苯丙胺引起的小鼠

兴奋作用^[4]。

2 对学习记忆的影响

在 Morris 水迷宫实验中发现, 人参总皂苷有改善去卵巢所致大鼠记忆功能障碍的作用^[5]。另外, 人参皂苷能拮抗 β 淀粉样蛋白诱导的神经细胞凋亡, 对 β 淀粉样蛋白引起的神经细胞毒性有一定的保护作用, 提示人参皂苷可能有助于老年性痴呆 (AD) 和帕金森氏症等神经退行性疾病的治疗^[6]。绞股蓝总皂苷对老龄大鼠学习记忆功能也有改善作用^[7]。研究还发现, 远志皂苷^[8], 黄精总皂苷^[9] 和胡芦巴总皂苷^[10] 可改善东莨菪碱所致记忆获得障碍, 提示这些皂苷类化合物具有改善学习记忆障碍的作用。三萜皂苷改善学习记忆功能的机理可能有清除自由基, 稳定膜系统和调节中枢神经系统单胺类递质。

3 抗抑郁作用

亚活性浓度的氟西汀 (20 mg/kg) 加上柴胡皂苷能够缩短小鼠强迫游泳不动时间, 认为氟西汀与柴胡皂苷合用可以增加疗效同时减少其副作用, 因此在重症抑郁症的治疗上有一定的应用价值^[11]。绞股蓝皂苷可以通过影响中枢神经系统单胺递质的