

枸杞 rDNA ITS 测序鉴定的初步研究

石志刚, 安巍, 樊云芳, 焦恩宁, 赵建华, 王亚军 (宁夏枸杞工程技术研究中心, 宁夏银川 750002)

摘要 [目的] 对枸杞 rDNA ITS (核糖体 DNA 基因内转录间隔区) 序列进行分析, 从而在分子水平对枸杞做出鉴定。[方法] 采用改良 CTAB 法提取枸杞叶片 DNA, 利用合成的特异引物对其 DNA 中 rDNA ITS 区进行扩增、克隆, 对目的片段测序分析。[结果] 克隆到枸杞 rDNA ITS 片段并获得其碱基序列, 成功找到 3 个供试枸杞种质材料的 rDNA ITS 序列差异。[结论] 枸杞 rDNA ITS 区的扩增和测序可以在分子水平对枸杞不同种质进行鉴别。

关键词 枸杞属; ITS 序列; DNA 测序; 鉴定

中图分类号 S567.1+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06687-02

Preliminary Studies on Identification of *Lycium* Linn. Germplasm Resources by rDNA ITS Sequencing

SHI Zhi-gang et al. (Ningxia Wolfberry Engineering and Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract [Objective] The study aimed to identify wolfberry (*Lycium* Linn.) germplasm resources at molecular level by analyzing the rDNA ITS sequence. [Method] Genomic DNAs from wolfberry leaves extracted by modified CTAB method were regarded as templates for PCR amplification by specific primer, clone and sequencing. [Result] The rDNA ITS sequences were obtained and then differentiated among three tested materials. [Conclusion] PCR amplification and sequencing on rDNA ITS is a feasible approach to identify different wolfberry germplasm resources.

Key words *Lycium* L.; ITS sequence; DNA sequencing; Identification

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 是我国名贵的道地药材, 具有抗氧化、抗肿瘤、软化血管、降脂、降糖、生精、保肝、明目、增强人体免疫力等功效^[1-4]。由于道地药材与非道地药材常有相同的基原或为近缘, 使得它们在外在形态、习性、组织构造及所含化学成分等方面具有高度的相似性, 传统的鉴定方法难以作出准确鉴别。

ITS 区序列指 DNA 基因内的转录间隔区序列, 包括 ITS1、ITS2 及 5.8S 3 个区段。该序列不出现在成熟核糖体中, 自然选择压力较小, 因此能累积更多变异, 从而能更好的鉴

别亲缘关系很近的物种。ITS 区序列测定分析能够鉴别同属植物相似种及药用植物混淆种^[5-8], 但目前有关枸杞 rDNA ITS 的研究还不多见。笔者以枸杞属内不同种间 ITS 序列为切入点, 对枸杞 rDNA ITS 序列进行分析研究, 为从分子水平鉴定枸杞品种提供参考。

1 材料与方

1.1 试验材料 供试材料为收集保存在宁夏农林科学院枸杞中心枸杞种质资源圃内的枸杞种质(表1)。供试大肠杆菌菌株为 DH5, 购自北京天为时代科技有限公司。

表1 供试材料种名和来源

Table 1 Species name and source of the materials

编号 No.	种名 Species name	中文名 Chinese name	来源 Source
1	<i>Lycium barbarum</i> Linn.	宁夏枸杞(宁杞1号) Ningxia wolfberry (Ningqi No. 1)	枸杞种质资源圃 Wolfberry Germplasm Resource Garden
2	<i>Lycium chinense</i> Mill.	枸杞 Chinese wolfberry	枸杞种质资源圃 Wolfberry Germplasm Resource Garden
3	<i>Lycium chinense</i> Mill. var. <i>potaninii</i> (Pojark.) A. M. Lu	北方枸杞 Northern wolfberry	枸杞种质资源圃 Wolfberry Germplasm Resource Garden

1.2 试验仪器 PCR 仪(PTC-200™ Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc, USA); 电泳仪(DYY-12 型, 北京六一仪器厂); 电泳槽(DYQp231 型, 北京六一仪器厂); TU1900 紫外可见分光光度仪; TOMOS3-18R Refrigerated Centrifuge; Alpha Innotech 凝胶成像仪。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取。 参照文献[9]的方法进行。

1.3.2 引物设计。 依据 GenBank 数据库中已发表的茄科植物 rDNA ITS 序列, 采用测序引物设计的软件 Premier 5.0 设计如下引物: P₁: 5'-AACCTGCGGAAGGATCATTGTC-3 (J070611-0147), P₂: 5'-TGATATGCTTAACTCAGCGGGTA-3 (J070611014-8), 由英骏生物技术有限公司合成。

1.3.3 目的基因的克隆及测序。 用以上述引物对 3 个供试材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系为: 2.5 μl 10 × PCR buffer (Mg²⁺), 0.5 μl dNTPs (各 2.5 μmol/L each), P1 和 P2 (各 20 μmol/L) 各 1 μl, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 50 ng, 加双蒸水补足 25 μl。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s) 36 循环; 72 °C 7 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 胶回收试剂盒(购于北京博大生物技术有限公司)对约 650 bp 的目标条带进行回收。将回收产物连接于 T 载体(pGEMT), 转入大肠杆菌, 采用蓝白斑法筛选阳性菌落。对阳性菌落进行 PCR 检测后, 送往北京奥科公司和北京六合通经贸有限公司测序。

1.3.4 序列分析。 将所获得的 ITS 序列数据, 利用 DNAMAN 在 NCBI 数据库中与已发表的 ITS 序列进行同源性比对, 运用 Clustal X 程序对不同材料的 ITS 序列进行对位排列。

2 结果与分析

2.1 rDNA ITS 区 PCR 扩增结果 枸杞 rDNA ITS 区的 PCR 扩增电泳结果显示(图1), 目标片段长度约为 650 bp。

基金项目 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0769)。

作者简介 石志刚(1976-), 男, 宁夏贺兰人, 助理研究员, 从事枸杞种质资源与遗传改良研究。

鸣谢 中国林业科学研究院林业研究所卢孟柱研究员和王敏杰、赵树堂博士在技术及各方面的支持。

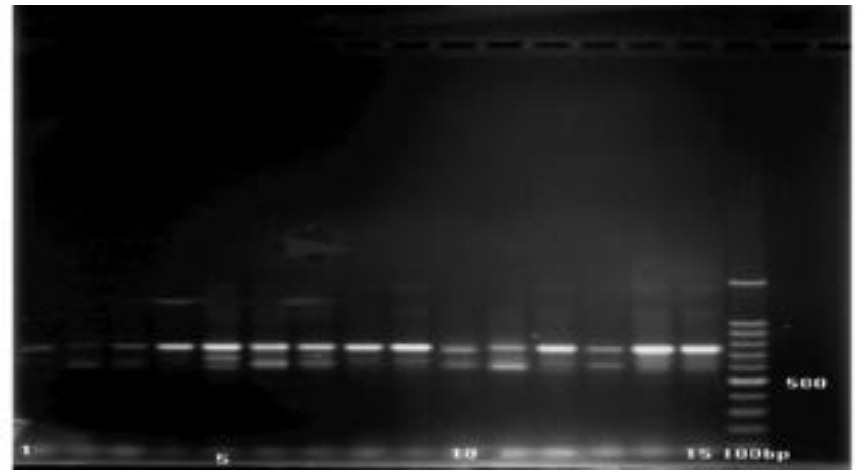
收稿日期 2008-03-24

2.2 试验测得枸杞的ITS 区序列及分析 利用DNA MAN 将试验测得的ITS 序列与NCBI 数据库中已发表的ITS 序列进行同源性比较,分别确定ITS1、5.8S 及ITS2 序列片段。运用DNAMAN 软件对所测得的序列进行对位排列,结果见图2。

3 个供试材料整个ITS 序列长度变异范围为629 ~631 bp,平均为630 bp。ITS1 序列长度变异范围为251 ~252 bp,平均为251 bp; 整个5.8 SrrDNA 序列长度变异范围都为154 bp; 整个ITS2 序列长度变异范围为224 ~225 bp,平均为225 bp。

对ITS 区和分区长度及G+C 含量分析显著的表明了3 供试材料的差异(表2)。ITS 序列特征如表3 所示。整个ITS 区排序后的总长度为631 bp,ITS1、5.8 S 和ITS2 分别为252、154 和225 bp。将gap(空位)作Missing(缺失)处理时,由于5.8SDNA 序列过于保守,一般在科以上才发生变异,因而在该研究中利用ITS1 和ITS2 区序列进行统计发育分析。整个转录间隔区(ITS1 + ITS2) 对位排列后总长度为477 bp,共有23 个变异位点,变异位点分别为14 和9 个,占4.8%;保守位点454,

占95.2%; 19 个转换位点,3 个颠换位点,其中ITS1 区的变异位点所占比例略高于ITS2 区,而ITS2 区的转换/颠换比值高于ITS1 区。



注:1~5 为宁杞1 号,6~10 为中国枸杞,11~15 为北方枸杞变种。
Note:1-5, *L. barbarum*; 6-10, *L. chinense*; 11-15, *L. chinense* var. *potarinii* (Pjark.) .

图1 ITS 区PCR 扩增电泳结果

Fig.1 The results of PCR amplification on ITS region

1	CGAAACCTGCACAGCAGAACGACCCGCGAACGCGTTTCAACACTGGGGAGCCGCGCGGGCGGGGTGCTTCGGCCC	75
2	-----t-----	75
3	-----	75
1	CCCGTGTGCGCGTCTCCCCCTCGTCCCCGGCGCGCGCCCCGCGCGCGTCCGGGTGACTAACGAACCCCGGC	150
2	---.c-----cg--t-----c-----	149
3	-----c-----a-----.	149
1	GCGAAAAGCGCCAAGGAATACTTAAATTGATAGCCTGCCTCTCGCGCCCCGTCCGCGGTGCACGCGGGAGGGCCT	225
2	---g-----g-----a---	224
3	-----c-----g-----	224
1	GTGCTTCTCTTGAAACAGAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA	300
2	-----a-----	299
3	-----ga-----	299
1	TGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTA	375
2	-----	374
3	-----	374
1	GGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCCCGCCCCGCGACCCGCGCCCATGCTCTGGGTCCGCGG	450
2	-----,--a-----t---	448
3	-----	449
1	TGGTGTCCGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTGGCCTCGCGCTCGCGGCCGGCCTAAATGCGAGTCCACGTCCGAC	525
2	-----t-----a-----	523
3	-----	524
1	GGACGTCACGGCAAGTGGTGGTTGTAACCCAACTCTCGAAGTGTGCGTGGCCATACCCCGTCCGCGGTTTGGCCTC	600
2	-----t--g-----	598
3	-----	599
1	CCGGACCCTTCTTGGCCTTAGGCGCTCCGAC	631
2	---a-----	629
3	-----c-----	630

图2 序列对位排列情况

Fig.2 Multiple sequences alignment

表2 供试材料的ITS 区序列长度和(G+Q) 含量

Table 2 Length (bp) and (G+Q) content of ITS sequence in three species of *Lycium*

名称 Name	ITS1		5.8 S		ITS2		ITS	
	长度 Length	(G+Q) 含量 % (G+Q) content	长度 Length	(G+Q) 含量 % (G+Q) content	长度 Length	(G+Q) 含量 % (G+Q) content	长度 Length	(G+Q) 含量 % (G+Q) content
宁杞1 号 <i>L. barbarum</i>	252	68.3	154	55.8	225	69.3	631	65.6
中国枸杞 <i>L. chinense</i>	251	68.5	154	55.8	224	67.0	629	64.9
北方枸杞变种 <i>L. chinense</i> var. <i>ptarinii</i>	251	69.0	154	55.8	225	69.8	630	66.0
平均Average	251	68.6	154	55.8	225	68.7	630	65.5

3 讨论

虽然DNA 分子标记技术应用于枸杞属植物鉴定等方面

已有一些报道^[10-11],但主要是应用RAPD 技术进行枸杞的鉴

(下转第6690 页)

足总量至25 μ 。

通过对反转录条件和多重PCR的变性、退火、延伸温度和时间以及循环次数等的优化,最后确定反转录的最佳条件为42 45 min,99 5 min,4 5 min。多重PCR的最佳循环条件为94 预变性3 min后,进入94 变性45 s,55 退火1 min,72 延伸1 min,循环30次,之后72 再延伸10 min,4 结束。取PCR产物5 μ ,用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳,观察扩增结果。

2 结果与分析

2.1 设计引物序列及相关信息 经过同源性分析比较,设计出扩增禽流感病毒H5及H7亚型基因的引物(表1)。

表1 多重RT-PCR引物

Table 1 Multiplex RT-PCR primers

引物名称	引物寡核苷酸序列	退火温度	产物大小 bp
Primer	Oligonucleotide sequence of primer	Tm	Product length
ZH5-1	5'-CCAATCCAGCCAATGACC-3'	56.1	
ZH5-2	5'-TCTATGGCAACCCCTICTT-3'	55.8	427
ZH7-1	5'-AGGAGTCAATGGGCTTCA-3'	54.7	
ZH7-2	5'-GTTGGTCTGCTCCCTAA-3'	53.5	228

2.2 RT-PCR扩增结果及分析 RT-PCR扩增出427和228 bp 2个条带(图2),与预期片段大小相同,初步表明扩增产物即为目标产物。

进一步对所回收的427及228 bp扩增片段进行测序,测序结果利用BLAST工具进行序列比较,发现扩增产物序列与H5亚型、H7亚型AIV基因有高度同源性,扩增产物即为H5亚型、H7亚型AIV基因。表明该方法用于快速诊断AIV病毒是可行的。

3 讨论

多重PCR对引物的要求比普通PCR更为严格,但它可

(上接第6688页)

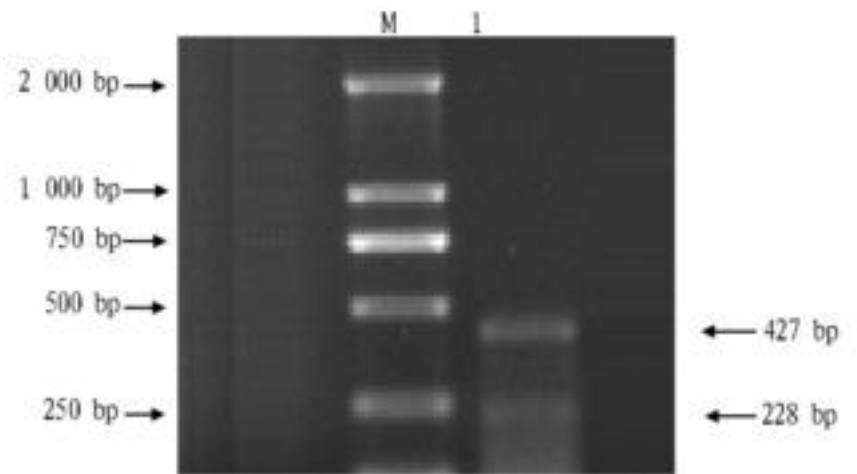
定,将分子标记特别ITS用于枸杞属植物研究十分有限。由于生物rRNA基因内转录间隔区进化极快,存在科、属、种甚至株之间的差异^[12-13],因此近年来已被国内外学者广泛用于真核生物或原核生物的物种鉴别。

表3 3种枸杞属植物ITS区序列特征

Table 3 The character of ITS sequence in three species of Lycium

序列	保守位点	变异位点	S/v
Sequence	Conserved sites %	Varied sites %	
ITS1	238/252(94.4)	14/252(5.6)	11/2
5.8S	154/154(100.0)	0/154(0)	
ITS2	216/225(96.0)	9/225(4.0)	8/1
合计Total	454/477(95.2)	23/477(4.8)	19/3

目前植物性中药材的基因组序列绝大多数没有测定,尤其是枸杞序列国内未见报道。该研究利用真核细胞中18S、5.8S、28S rDNA基因的保守区序列,自行设计引物扩增出整个ITS区,并完成了扩增产物的DNA碱基序列测定,得到3个枸杞种ITS区的完整序列,经过分析成功鉴定出供试材料之间的差异。该研究结果表明nrDNA ITS区的扩增和测序可以在分子生物学水平对枸杞进行鉴定。



注:M,DL 2 000 Marker;1为扩增结果。

Note: M, DL 2 000 Marker; 1, Amplified results.

图2 H5和H7亚型AIV多重RT-PCR扩增结果

g.2 The results of multiplex RT-PCR amplification on H5 and H7 AIV

以同时检测出多种病原微生物,具有高效性。多重PCR主要用于多种病原微生物的同时检测或鉴定,某些遗传病及癌基因的分型鉴定^[5]。笔者在进行多重PCR引物设计时,确保了2对引物具有相近的退火温度,使得所有的靶位点可用相同的PCR程序在单个的反应中得到有效扩增。且利用DNASar软件分析2对引物,确保其间不能形成稳定二聚体和发夹结构。同时控制2对引物扩增片段长度间差异在通过普通琼脂糖凝胶电泳即可分开的范围内。

参考文献

- [1] H·A·艾得希.PCR技术-DNA扩增的原理与应用[M].田丁,等.译.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1991.
- [2] 甘孟侯.禽流感[M].北京:中国农业出版社,2002:1-10.
- [3] 伍新尧,罗起权,杨英浩.基因诊断原理与临床[M].广州:中山大学出版社,1995:30.
- [4] VALLETTE F,MEGE E,REISS A,et al.Construction of mutant and genes the polymerase chain reaction[J].Nuc Acid Res,1989,17:723-733.
- [5] 姜军平.实用PCR基因诊断技术[M].北京:世界图书出版公司,1996.

参考文献

- [1] 匡可任,路安民.中国植物志(茄科)[M].北京:科学出版社,1978:8-18.
- [2] 安巍,焦恩宁,石志刚,等.枸杞规范化栽培及加工技术[M].北京:金盾出版社,2005.
- [3] 曹有龙.中宁县大果枸杞(宁杞3号)栽培技术与推广[M].宁夏:宁夏人民出版社,2006.
- [4] 李润淮.枸杞高产栽培技术[M].北京:中国盲文出版社,2000.
- [5] 蔡金娜,周开亚,徐路珊,等.不同居群蛇床的rDNA ITS序列分析[J].药学学报,2000,35(1):56.
- [6] 丁小余,王峰涛,徐路珊.F型、H型居群的铁皮石斛rDNA ITS区序列差异及SNP现象的研究[J].中国中药杂志,2002,27(2):85.
- [7] 汪小全,洪德元.植物分子系统学近五年的研究进展[J].植物分类学报,1997,35(5):465-480.
- [8] 曹晖,刘玉萍.分子标记技术在中药品种鉴别中的应用[J].中国药学杂志,1998,33(5):269.
- [9] SCOTT O R,AMLD J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbium and mummified plant tissues[J].Hart Molecular Biology,1985,5:69.
- [10] ZHANG K Y B, LEUNG H W, YEUNG H W,et al.Differentiation of Lycium barbarum from its related Lycium species using random amplified polymorphic DNA[J].Harta Med,2001,67:379.
- [11] CHENG K T, CHANG H C, HUANG H, et al. RAPD analysis of Lycium barbarum medicine in Taiwan market[J].Bot Bull Acad Sin,2000,41:11.
- [12] ANOUNCE M L, BAYER R. On the origins of the tetraploid Bromus species (section Bomus, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA[J].Genome,1997,730-743.
- [13] ALIICE L A, CAMPBELL C S. Phylogeny of Rubus (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences [J]. Amer J Bot,1999,86(1):81-97.