



# 甘肃省不同区域当归种子的 RAPD 分析

周鹤峰<sup>1</sup>, 邵敏<sup>1</sup>, 姬可平<sup>1\*</sup>, 李啸红<sup>1</sup>, 李应东<sup>2</sup>, 晋玲<sup>2</sup>

(1. 遵义医学院珠海校区, 广东珠海 519041; 2. 甘肃省中医学院, 甘肃兰州 730000)

**摘要** [目的]探讨 RAPD 技术应用于甘肃省当归 [*Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels] 品种鉴别的可行性。[方法]采用改良 CTAB 法提取甘肃省不同地区的当归种子基因组 DNA, 利用筛选的引物 S61 分别对其进行 RAPD 分析。[结果]获得了质量较高的当归种子基因组 DNA, 引物 S61 扩增的图谱显示出良好的多态性, 且比较稳定, 重复性好。[结论]该法可为从分子生物学角度鉴别当归提供科学依据。

**关键词** 当归种子; DNA 提取; 改良 CTAB 法; RAPD

**中图分类号** S567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)28-15616-02

## RAPD Analysis of Six Different Regions *Angelicae sinensis* Seed in Gansu

ZHOU He-feng et al (Department of bioengineering, Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai, Guangdong 519041)

**Abstract** [Objective] To explore the feasibility of using RAPD analysis to identify *Angelicae sinensis* in Gansu. [Methods] The genomic DNAs were extracted from *Angelicae sinensis* by modified CTAB method and analyzed by RAPD with primer S61. [Result] It had obtained high quality team genomic DNA by modified CTAB method. The RAPD map showed that high polymorphism existed in primer S61 was clear and repetitive. [Conclusion] The results obtained provided the basis for identifying *Angelicae sinensis* from the level of molecular biology.

**Key words** *Angelicae sinensis* seed; DNA extraction; modified CTAB; RAPD

当归 [*Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels] 为伞形科当归属多年生草本植物, 主产于甘肃的岷县、宕昌、武都和漳县等地。其根含蒿本内酯、正丁烯酰内酯和阿魏酸等多种有效成分, 具有补血活血、调经止痛和润肠通便之功效<sup>[1]</sup>。随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD) 是 1990 年由 Williams 等建立的新的检测基因组多态性的基因分型技术<sup>[2]</sup>, 被广泛运用于分类学、物种亲缘关系、动植物物种系鉴定、特定性状分子标记、基因定位以及遗传图谱构建等各个方面<sup>[3-5]</sup>。目前, 关于当归的 DNA 多态性及物种多样性、从 DNA 分子水平上探讨当归药材道地性的研究及甘肃省当归资源的分子生物学研究较少。为此, 笔者以甘肃当归种子为研究材料, 探讨利用 RAPD 分子标记技术鉴别当归的可行性, 以期为进一步开展种质资源保护和利用提供科学依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 研究对象。**当归种子于 2008 年 8 月采自甘肃省定西地区漳县、甘南藏族自治州临潭县和陇南地区宕昌等地的 6 个乡镇 (表 1), 所有的标本均经甘肃中医学院晋玲副教授鉴定。凭证标本存于遵义医学院珠海校区细胞生物学研究室。

表 1 试验所用当归种子来源

Table 1 Sources of *Angelicae sinensis* seeds used in experiment

编号 No.	采集地 Location	标本凭证号 Voucher specimen
1	漳县三岔乡 Sancha in Zhang County	ZX0801026
2	漳县碧峰乡 Bifeng in Zhang County	ZX0811028
3	临潭三岔乡 Sancha in Lin Tan	LT0811046
4	临潭新城 Xincheng in Lin Tan	LT0811049
5	宕昌车拉乡 Chela in Dangchang	TC0811060
6	宕昌哈达铺镇 Hadapu in Dangchang	TC0811073

**1.1.2 主要试剂。**CTAB、随机引物和 PCR 扩增试剂盒等, 购自上海生工生物工程技术有限公司; DNA 分子量参照物, 购自大连宝生物工程有限公司。

**1.1.3 主要仪器。**5810R 型冷冻高速离心机, 由 Eppendorf 公司生产; 岛津 UV-2550 型紫外分光光度计, 由日本岛津公司生产; Hema-8000 型 PCR 仪, 由珠海黑马仪器厂生产。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取。**采用改良 CTAB 法<sup>[6]</sup>。称取 200 mg 冰冻的当归种子, 用液氮研成细粉, 装入 1.5 ml 离心管中, 加入 600  $\mu$ l 65  $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取缓冲液充分混匀, 65  $^{\circ}$ C 水浴保温 1 h (期间颠倒混匀 5 次), 加入等量的氯仿: 异戊醇 (24: 1, V/V, 下同), 轻轻上下颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清液, 用等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1, V/V/V, 下同), 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 抽提 1 次。取上清液, 加入 2/3 体积异丙醇和 1/10 体积 3 mol/L KAc, 轻轻颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 风干。加入 700  $\mu$ l TE 液 (含 RNA 酶 20  $\mu$ g/ml), 37  $^{\circ}$ C 溶解 2 h 后分别用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿: 异戊醇 (24: 1), 于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 各抽提 1 次。取上清液, 加入 2 倍体积冰冷无水乙醇和 1/10 体积 KAc, 12 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液, 加入 200  $\mu$ l 75% 乙醇洗涤沉淀, 晾干, 用 100  $\mu$ l TE 溶液溶解, 4  $^{\circ}$ C 储存备用。

**1.2.2 DNA 纯度及片段大小的检测。**DNA 样品稀释 200 倍后, 用紫外分光光度计测定波长 230、260、280 nm 处的吸光度值, 根据  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 、 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$  值来判断 DNA 的浓度和纯度。DNA 浓度计算公式<sup>[7]</sup>为: DNA 浓度 (g/ml) =  $OD_{260\text{ nm}} \times$  稀释倍数 (200)  $\times$  50。

采用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测 DNA 片段大小, 观察并拍照。

**1.2.3 RAPD 扩增与产物检测**<sup>[5]</sup>。首先采用 2 个随机个体的总 DNA 为模板对 120 条随机引物进行扩增, 选取扩增条带清晰、多态性高和重复性好的引物, 用于所有样品的 RAPD 扩增。

**基金项目** 国家科技支撑计划项目 (2007BAI37B01)。  
**作者简介** 周鹤峰 (1980 -), 男, 山东莱阳人, 硕士, 副教授, 从事分子生物学研究。\* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事分子生物学技术在中草药研究中的应用研究, E-mail: jlhjxj@sina.com。

**收稿日期** 2010-07-26

PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ l:模板 25 ng,随机引物 0.3  $\mu$ mol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U,4 种 dNTP 各 0.4 mmol/L, $MgCl_2$  1.5 mmol/L。扩增程序为:94  $^{\circ}C$  预变性 8.0 min;94  $^{\circ}C$  变性 1.0 min,36  $^{\circ}C$  退火 1.0 min,72  $^{\circ}C$  延伸 1.5 min,40 个循环;72  $^{\circ}C$  延伸 6.0 min。

扩增结束后,产物经 1.8% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳检测,观察并拍照。

## 2 结果与分析

**2.1 模板 DNA 的纯度及片段大小的检测结果** 由表 2 可知,用改良 CTAB 法提取的当归种子基因组 DNA 的  $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$  在 1.8 左右,说明各样品几乎不含蛋白质,DNA 纯度和浓度均满足分子生物学试验的要求。

由图 1 可知,用改良 CTAB 法提取的当归种子基因组 DNA 片段大小均在 20 kb 左右,拖尾现象较少,DNA 降解少,完整性相对较好,能够满足 RAPD 反应对 DNA 质量的要求。

表 2 当归种子基因组 DNA 的紫外分光光度分析

Table 2 The ultraviolet spectrophotometry analysis of genomic DNA

样品编号 No. of sample	$OD_{260}$	$OD_{280}$	$OD_{260}/OD_{280}$	浓度// $\mu$ g/ml
1	0.048	0.027	1.778	0.480
2	0.039	0.022	1.773	0.390
3	0.042	0.023	1.826	0.420
4	0.035	0.019	1.842	0.350
5	0.049	0.028	1.750	0.490
6	0.034	0.019	1.789	0.340

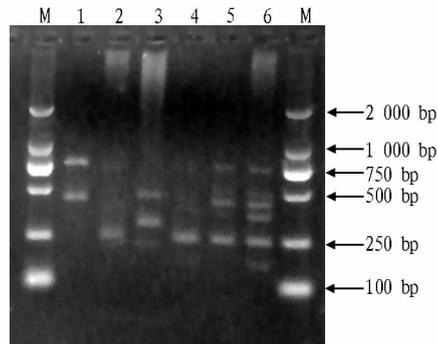


图 2 RAPD 分析电泳图谱

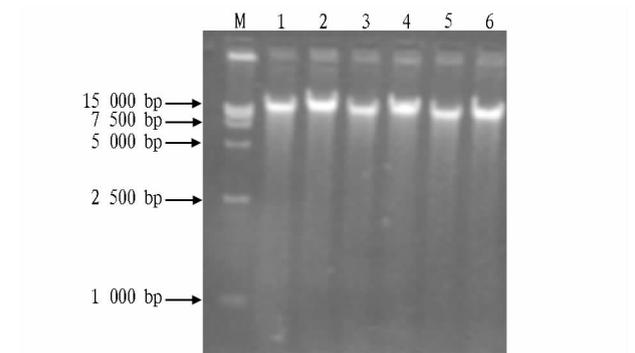
Fig. 2 The electrophoretogram of RAPD analysis

和 SSR 等诸多方面涉及到抽提基因组 DNA,因此,获取较高质量的基因组 DNA 是进行这些工作的必备前提。该研究利用改良的 CTAB 法对药用植物当归种子基因组 DNA 进行提取,经琼脂糖凝胶观察,获得的 DNA 相对较完整,扩增的条带清晰,建立了适合于当归种子基因组 DNA 的提取方法,并确定了 RAPD 扩增反应体系。

RAPD 分析具有简便、灵敏度高和不需要进行 DNA 序列的测定等优点,但不同的材料适合的引物不一样,在实际应用中,要针对具体的研究对象进行引物筛选,以便获得能提供多态性信息的具体引物<sup>[8]</sup>。该研究中,RAPD 的重复性较差,特别是图谱中某些弱带的重复性更差,影响了不同条件下结果的可比性,影响因素包括模板的浓度和质量、PCR 的循环次数、退火的温度和加样量等。为了获得可靠的试验结果,在 RAPD 多态性分析前需要筛选到合适的引物并确立最佳反应体系和条件。该研究应用筛选出的随机引物 S 61 扩增当归种子基因组 DNA,获得了清晰条带,找到了快速鉴定当归的部分遗传标记,得到的 RAPD 图谱可以对当归种内进行 DNA 分子鉴定。应用 RAPD 技术鉴定当归,不会受采摘部位、采摘季节等因素的影响,为当归种子的真伪鉴别提供了一种新的思路和方法。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:89.
- [2] 周毅,蒋舜媛,马小军,等. 当归种子资源危机和保护[J]. 中草药,2003,34(10):12-14.
- [3] 邹佳宁,宋聚先,常楚瑞. 等. 贵州天麻种质资源的 RAPD 分析[J]. 中药材,2006,29(9):881-883.
- [4] KOHJYOUMA M, IIDA O, YOSHIDA N, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Angelica acutiloba* and its varieties[J]. Natural Medicines, 1998, 52(2): 130-134.
- [5] 高文远,秦恩强,肖小河,等. 当归药材地道性的 RAPD 分析[J]. 中草药,2001,32(10):926-929.
- [6] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002:742-744.
- [7] 尹海波,韩荣春,康廷国,等. 老鹳草属植物遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中药材,2008,31(12):1788-1790.
- [8] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(6):1349.



注:M 为 DNA Marker;1~6 分别是表 1 中的 1~6 号材料。下同。

Note: M: DNA Marker; 1-6: swimming lane are 1-6 materials in table 1. The same as below.

图 1 当归种子基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 1 The electrophoretogram of genomic DNA of *Angelica sinensis* seed

**2.2 RAPD 扩增分析** 在 120 条随机引物中,S8、S61、S206 和 S421 等 12 条引物扩增出条带,其中 S61 (TTTCGAGCCAG) 的图谱显示出良好的多态性,且比较稳定,重复性较好。由图 2 可知,除了 1 号样品外,其余 5 种材料均在 250 bp 处有一特征性条带。因此 S 61 可用于当归的鉴别。

## 3 结论与讨论

随着分子生物学技术的发展,在 PCR 扩增、RAPD、AFLP