

黄芪甲基化敏感扩增多态性(MSAP)扩增引物筛选及初步应用

宗凯¹, 赵营莉², 周莉质¹, 李秀秀³, 宫鹏², 夏泉^{2*}

(1. 安徽出入境检验检疫局, 安徽合肥 230022; 2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽合肥 230022; 3. 安徽省海王医药有限公司, 安徽合肥 230022)

摘要 [目的] 建立并优化黄芪甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术扩增反应体系, 对中药材黄芪甲基化水平进行研究。[方法] 磁珠法提取黄芪DNA后, 采用Hpa II/Msp I 2种内切酶进行酶切, 将酶切产物加上连接接头序列, 经预扩增和选择性扩增反应, 最终从黄芪MSAP的256对引物中筛选出最佳分辨引物4对。应用筛选到的4对引物, 分析12种不同产地黄芪的甲基化模式, 并对甲基化水平聚类分析。[结果] 经MSAP检测12个黄芪样本半甲基化率在12.5%~26.7%, 全甲基化率在25.6%~51.1%, 总甲基化率在48.7%~73.5%, 总体上黄芪样本的全甲基化率大于半甲基化率。采用NTSYSpc软件对黄芪样品Hpa II和Msp I多态性数据进行分析, 获得UPGMA聚类图和主成分分析PCA图。[结论] MSAP技术能够很好地用于黄芪的甲基化分析, 结合NTSYSpc软件能对不同产地黄芪之间甲基化水平进行聚类分析, 且初步分析结果表明从UPGMA和PCA图上来看, 地区相近的单株聚类分析表现出了一定的地域性。

关键词 黄芪; 甲基化敏感扩增多态性; 选择性扩增; 聚类分析

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0149-04

Primer Screening and Preliminary Application of MSAP for *Radix astragali*

ZONG Kai¹, ZHAO Ying-li², ZHOU Li-zhi¹, XIA Quan^{2*} et al (1. Anhui Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hefei, Anhui 230022; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022)

Abstract [Objective] To establish and optimize the amplification system of methylation sensitive polymorphism (MSAP) to study the methylation level of *Radix astragali*. [Method] DNA of *Radix astragali* was extracted by magnetic bead method and digested with HpaII/MspI endonuclease. The digested products were connected with the linker sequence, and then pre-amplification and selectively amplification were carried out. Four pairs of primers were screened out from the 256 pairs of primers of MSAP, and were used to analyze the methylation levels for 12 different habitat samples of *R. astragali*. [Result] For 12 samples, the rate of half methylation and full methylation were 12.5%–26.7% and 25.6%–51.1%, respectively. The total methylation rate was 48.7%–73.5%. The UPGMA clustering and principal component analyses (PCA) were obtained by analyzing the HpaII and MspI polymorphism data with NTSYSpc software. [Conclusion] MSAP technology can be used for the methylation analysis of *R. astragali*. The preliminary analysis of cluster analysis showed some regional characteristics of *R. astragali* from the UPGMA and PCA plots.

Key words *Radix astragali*; MSAP; Electively amplification; Cluster analysis

黄芪(*Radix astragali*)为豆科植物蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao]或膜荚黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge.]的干燥根^[1]。黄芪属于传统的补虚药, 其化学成分主要为多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸及微量元素等, 具有抗肿瘤、增强免疫力、抗衰老、保肝、增强心肌收缩力和利尿等作用, 被广泛用于养生保健及相关疾病的临床治疗^[2]。蒙古黄芪主产于内蒙古、山西、甘肃和黑龙江, 膜荚黄芪主要分布于我国东北、华北、甘肃、四川、西藏等省区, 其化学成分存在显著差异^[3]。

DNA甲基化(DNA methylation)是表观遗传学的一种重要修饰形式, 已有大量研究证实其在植物的基因表达、生长发育过程中起着重要作用, 进而影响植物化学成分的变化^[4]。DNA甲基化水平分析是研究表观遗传学的重要内容, 目前分析植物基因组总甲基化水平主要有甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)、高效液相色谱法、5-甲基胞嘧啶免疫学抗体技术、SssI甲基转移酶分析、氯乙醛反应法等^[5]。MSAP技术是由Reyna-López等^[6]首次提出, 并成功用于检测真菌的DNA甲基化。后来MSAP技术开始应用于多种植物甲基化水平的检测, 涉及植物抗逆性研究、发育调控与基因差异表达、种质资源鉴定、组织培养材料的鉴定等方面^[7];

在中药的资源研究方面, MSAP技术也得到广泛的应用, 如白术、川牛膝、丹参和广藿香等^[8-11], 但目前国内对黄芪基因组甲基化方面的研究还较少^[12]。该研究以黄芪为材料, 利用MSAP技术筛选合适的扩增引物, 分析12组不同产地黄芪和对照药材的甲基化水平, 初步建立MSAP技术分析黄芪DNA甲基化的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 黄芪药材10个, 经河北省邯郸市药品检验所孔增科教授鉴定为蒙古黄芪和膜荚黄芪, 用前粉碎并过80目筛; 黄芪对照药材2个, 购自中国食品药品检定研究院, 分别为蒙古黄芪和膜荚黄芪(表1)。

Hpa II内切酶(ER0511)、Msp I内切酶(1ER0541)、EcoRI内切酶(ER0271)和T₄连接酶(EL0014)均购自Thermo公司。2×Taq PCR Master Mix (kt201)和DL2000 Maker (md114)均购自天根生化公司。引物和接头由南京金斯瑞科技服务有限公司合成。磁珠提取试剂盒: ME1裂解缓冲液(20160530), ME2吸附缓冲液(20160530), ME3磁珠(20160607), ME4洗涤缓冲液(20160530)。

1.2 仪器与设备 5424小型高速离心机(Eppendorf公司); Nanodrop 2000核酸蛋白分析仪(Thermo公司); veriti梯度PCR仪(ABI公司); 全自动DNA/RNA分析系统QIAxcel (QIAGEN公司); 全自动DNA磁珠提取仪(Invitrogen公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA的提取。按照磁珠提取试剂盒的方法

基金项目 国家质检总局科技计划项目(2015IK001)。

作者简介 宗凯(1985—), 男, 安徽合肥人, 工程师, 硕士, 从事中药材质量安全研究。*通讯作者, 主任药师, 副教授, 博士, 从事中药材质量评价研究。

收稿日期 2017-07-26

表1 黄芪样本信息
Table 1 Samples information of *R. astragali*

样品编号 Sample No.	来源 Source	种 Species
1	河北张家口	蒙古黄芪
2	甘肃陇西	蒙古黄芪
3	内蒙武川	蒙古黄芪
4	内蒙	蒙古黄芪
5	甘肃	蒙古黄芪
6	甘肃	蒙古黄芪
7	中国食品药品检定研究院(对照)	蒙古黄芪
8	甘肃菜子坪	蒙古黄芪
9	中国食品药品检定研究院(对照)	膜荚黄芪
10	甘肃	膜荚黄芪
11	甘肃	膜荚黄芪
12	甘肃	膜荚黄芪

对黄芪基因组 DNA 进行提取,用 Nanodrop 2000 核酸蛋白分析仪进行纯度和浓度测定。

1.3.2 酶切反应。10 μL 体系包括 50~100 ng DNA、1.5 μL *Eco*R I、1.5 μL *Hpa* II/*Msp* I、2 μL Buffer,ddH₂O 补至 10 μL。37℃ 酶切 6 h,80℃ 灭活 15 min,取酶切产物上 QIAxcel 电泳检测。

1.3.3 连接反应。连接接头引物和反应体系、条件参考文献[13]。

1.3.4 预扩增反应体系。10 μL 体系包括 1 μL 连接产物、5 μL 2×*Taq* PCR Master Mix、上下游预扩增引物各 1 μL,剩下用 ddH₂O 补至 10 μL。PCR 扩增条件:94℃ 2 min;94℃ 40 s,56℃ 45 s,72℃ 90 s(30 个循环);72℃ 5 min,25℃ 3 min,预扩增产物上 QIAxcel 电泳检测。

1.3.5 选择性扩增反应体系与引物筛选。将预扩增产物稀

释 50 倍作为模板,10 μL 体系与预扩增体系相似。选择性扩增的 PCR 程序采用 Touchdown PCR:94℃ 3 min;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 1 min(13 个循环,每个循环退火温度下降 0.7℃);94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min(22 个循环);72℃ 5 min,25℃ 2 min,选择性扩增产物上 QIAxcel 电泳检测。

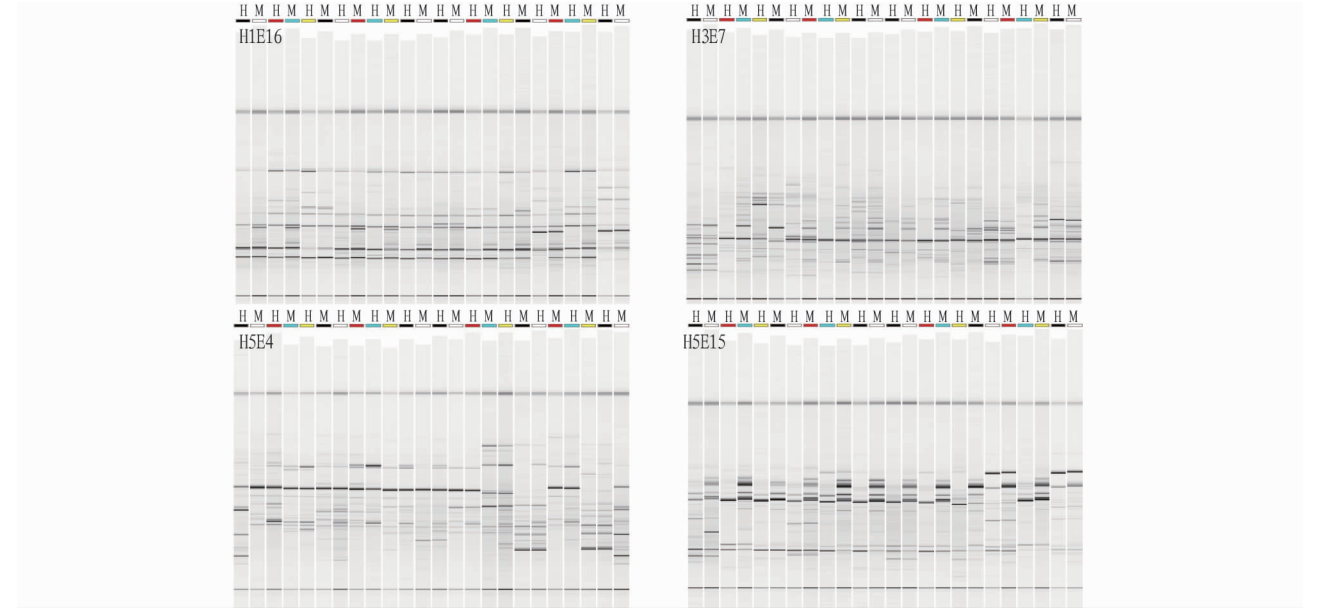
按照 16×16 共组合成 256 对引物进行筛选,引物序列参考文献[13]。用 QIAxcel 电泳检测引物筛选情况,将条带丰富、图谱清晰、多态性高的引物对保留。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取和酶切结果 试验采用磁珠法提取出黄芪基因组 DNA,经 Nanodrop 2000 核酸蛋白分析仪测定其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.7~2.1,纯度和浓度均满足后续 MSAP 试验要求。采用 10 μL 酶切体系,在 37℃ 恒温酶切 6 h 后经电泳检测,结果显示酶切完全,可进行下一步连接反应。

2.2 预扩增和选择性扩增引物筛选 优化预扩增反应体系后,将预扩增产物稀释 50 倍,取 1 μL 作为选择性扩增反应的模板,采用 10 μL 体系进行选择性扩增。选择性扩增采用 *Eco*RI 引物 16 组(E1~E16)和 *Hpa* II/*Msp* I 引物 16 组(HM1~HM16),共组合成 256 对引物进行筛选,引物序列参考文献[13]。

以 7 号黄芪样品作为引物筛选模板,对 256 对引物组合进行筛选,在 100~800 bp 选择扩增条带致密、多态性高的引物组合。从 256 对引物组合中,综合比较了 *Hpa* II 和 *Msp* I 引物筛选电泳图,筛选出 4 对条带丰富且清晰的引物组合(H1E16、H3E7、H5E4、H5E15),对 12 组黄芪样品进行 MSAP 检测(图 1)。



注:H代表 *Hpa* II 酶切,M代表 *Msp* I 酶切
Note:H stands for *Hpa* II digestion,M stands for *Msp* I digestion

图1 H1E16、H3E7、H5E4、H5E15 引物组合对 12 组黄芪样品 *Hpa* II/*Msp* I 选择性扩增电泳结果

Fig.1 The result of selective amplification of *Hpa* II/*Msp* I of 12 groups of *R. astragali* samples by H1E16,H3E7,H5E4 and H5E15 primer combinations

2.3 甲基化水平分析 通过 MSAP 分析,12 组黄芪样品的半甲基化率在 12.5% ~ 26.7%,全甲基化率在 25.6% ~ 51.1%,而总甲基化率在 48.7% ~ 73.5%。总体上黄芪样本的全甲基化率大于半甲基化率,其中 2 号黄芪全甲基化率是半甲基化率的 4 倍,5 号、7 号和 11 号黄芪全甲基化率是半甲基化率的 2 倍多(表 2)。

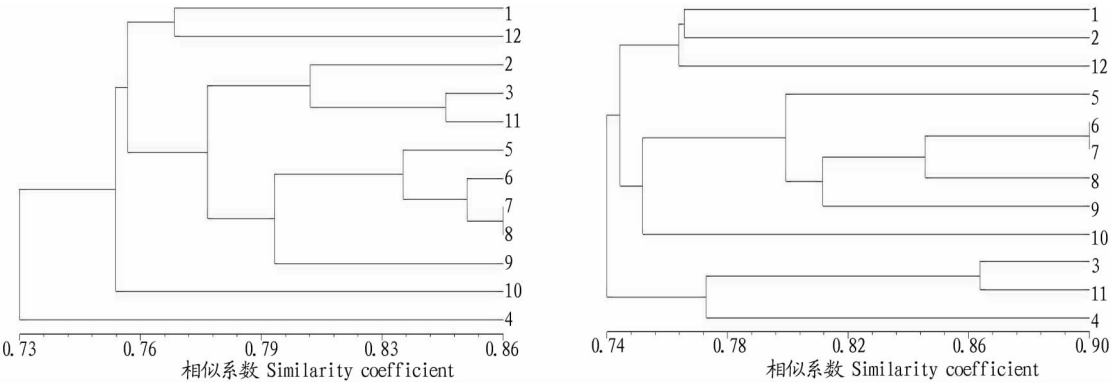
表 2 12 个黄芪样品甲基化类型和甲基化率检测结果
Table 2 The results of methylation type and methylation rate of 12 *R. astragalus* samples

样品编号 Sample No.	总条带数 Total band number	A 型带 A band %	B 型带 B band %	C 型带 C band %	总甲基化率 (B + C) Total methylation rate(B + C) // %
1	52	42.3	23.0	34.7	57.7
2	48	37.5	12.5	50.0	62.5
3	47	53.1	21.3	25.6	48.7
4	68	38.2	26.5	35.3	61.8
5	49	26.5	22.4	51.1	73.5
6	47	36.2	25.5	38.3	63.8
7	40	32.5	22.5	45.0	67.5
8	45	37.8	20.0	42.2	62.2
9	60	36.7	26.7	36.6	63.3
10	59	40.7	25.4	33.9	59.3
11	43	34.9	20.9	44.2	65.1
12	50	46.0	24.0	30.0	54.0

注:A 型带为 H 和 M 都有的条带;B 型带为仅 H 上有的条带;C 型带为仅 M 上有的条带
Note:A band means both H and M have bands;B band means the band only on H;C band means the band only on M

2.4 UPGMA 聚类 and 主成分 PCA 分析 将黄芪样品甲基化敏感多态性和甲基化不敏感多态性产生的 0 和 1 矩阵保存在 Excel 表中,采用 NTSYSpc 软件进行聚类分析,得到 12 组黄芪样品聚类分析图(图 2)。图 2A 和图 2B 分别是采用 2 种内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 分析后获得的结果。从图 2A 可以看出,当相似系数为 0.77 时,12 组黄芪样品可以分为 4 类,即 1 号和 12 号为第 1 类;2 号、3 号、5 ~ 9 号、11 号共 8 组样品为第 2 类,这类包含样品数最多,它们之间有较近的亲缘关系;10 号和 4 号样品分别为第 3 和第 4 类。从图 2B 可以看出,当相似系数为 0.80 时,12 组黄芪样品可以分为 7 类;当相似系数调整为 0.75 时,12 组黄芪样品可以分为 4 类,即 1 号、2 号和 12 号为第 1 类;5 ~ 10 号共 6 组样品为第 2 类;3 号、11 号为第 3 类;4 号为第 4 类。从产地来源上看,*Hpa* II 和 *Msp* I 多态性数据 UPGMA 图的 5 ~ 9 号样品划为同一类,而 5 ~ 9 号样品均产自甘肃地区,可见聚类分析表现出一定的地域性特点。

使用 NTSYSpc 软件分别对 *Hpa* II 和 *Msp* I 2 种酶酶切获得的数据进行主成分分析,观察不同黄芪样品在多维空间的分布状态,结果见图 3。图 3A 显示,5 ~ 9 号为一个很近群体,表明有很近的亲缘关系,与聚类分析结果相似。图 3B 中 5 ~ 10 号共 6 组样品为一个群体,也与上述聚类分析一致。从图 3A 和图 3B 中可以看出,第一维度的贡献率均大于第二维度贡献率。与聚类分析类似,5 ~ 9 号样品在 *Hpa* II 和 *Msp* I 获得主成分分析 PCA 图上都表现了一定程度的地域性特点。



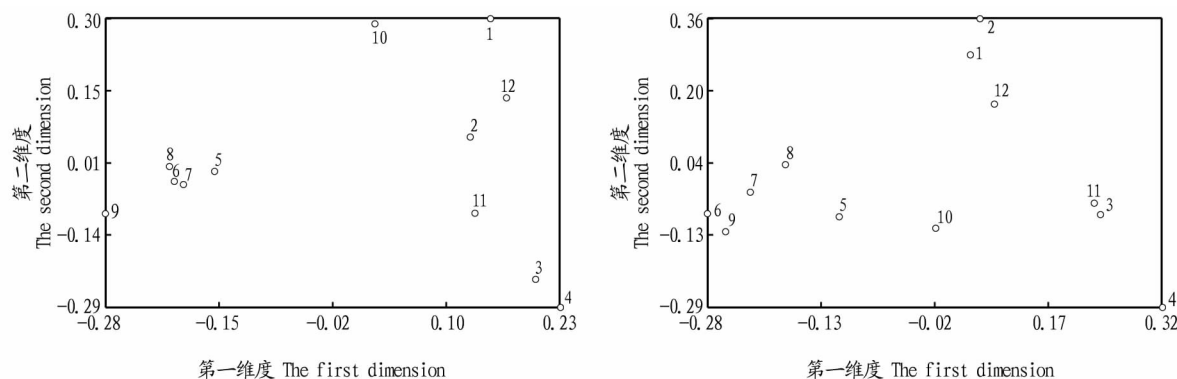
注:A. 用 *Hpa* II 多态性数据获得的 UPGMA 图;B. 用 *Msp* I 多态性数据获得的 UPGMA 图
Note: A. UPGMA diagrams obtained by *Hpa* II polymorphism data; B. UPGMA diagrams obtained by *Msp* I polymorphic data

图 2 黄芪的 UPGMA 聚类结果
Fig. 2 UPGMA clustering map of *R. astragalus*

3 结论与讨论

3.1 引物筛选的原则是条带多、清晰、多态性高 选择性扩增采用 *Eco*R I 引物 16 组和 *Hpa* II/*Msp* I 引物 16 组,共组合成 256 对引物进行筛选,筛选工作量比较大,因此采用 QIAxcel 分析系统,其能自动获得电泳结果,与普通做琼脂糖电泳相比具有全自动、高通量和电泳图谱清晰等诸多优点;QIAxcel 分析系统在获得高质量的电泳图谱同时,能自动对扩增条带进行分析,使用标准 Marker 后能对每一条带进行大小和浓度确定,特别是能够区分条带差异小的带型。该研

究通过比较后选择了 4 对条带丰富且清晰的引物组合(H1E16、H3E7、H5E4 和 H5E15),对 12 组黄芪样品进行 MSAP 检测和分析。
3.2 不同单株黄芪的聚类分析和主成分分析 采用 NTSYSpc 软件分别对 *Eco*R I/*Hpa* II 和 *Eco*R I/*Msp* I 组合获得的多态性数据进行 UPGMA 聚类分析和 PCA 主成分分析,2 种分析结果类似。来自不同地区的黄芪样品,DNA 甲基化水平和模式存在差异,但从 UPGMA 和 PCA 图上来看地区相近的单株,比如产地为甘肃黄芪有着较近的聚类,表现出一定程



注:A.用 *Hpa* II 多态性数据获得的 PCA 图;B.用 *Msp* I 多态性数据获得的 PCA 图

Note:A. PCA diagrams obtained by *Hpa* II polymorphism data; B. PCA diagrams obtained by *Msp* I polymorphic data

图3 黄芪主成分分析结果

Fig.3 Principal component analysis of *Radix astragali*

度上的地域性特点。

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:中国医药科技出版社,2015:302-303.
- [2] 袁红,张淑芳,贾绍辉,等. 黄芪生物活性及其在保健食品中的应用研究进展[J]. 食品科学,2014,35(15):330-334.
- [3] 周鹏,胡明勋,李浩飞,等. 不同品种、产地和种植方式黄芪药材中黄酮类成分的质量分析[J]. 中国药房,2016,27(18):2575-2578.
- [4] 李亚娇,郭九峰,王淑妍,等. DNA 甲基化与植物生长发育的表现遗传调控研究进展[J]. 生态科学,2016,35(4):192-198.
- [5] 代雅琪,张博洋,朱丽叶,等. DNA 甲基化检测方法研究进展[J]. 农业生物技术学报,2017,25(1):150-158.
- [6] REYNA-LÓPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRERA J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J]. Mol Gen Genet,

1997,253(6):703-710.

- [7] 张燕,陈波. DNA 甲基化敏感扩增多态性技术及其在作物遗传研究中的应用[J]. 西昌学院学报(自然科学版),2009,23(4):7-11.
- [8] 王红娟,韩盼盼,李雅婷,等. 白术二倍体及其同源四倍体的 MSAP 和 ISSR 分析[J]. 南京农业大学学报,2016,39(2):220-227.
- [9] 文静,马云桐,陈新,等. 川牛膝 MSAP 反应体系的优化及引物筛选[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(9):1860-1865.
- [10] 甘晓燕,陈新. 丹参 DNA 甲基化 MSAP 分析条件的建立和优化[J]. 内蒙古中医药,2014,33(6):127-129.
- [11] 黄洁燕,卢慧娟,熊燕,等. 广藿香 MSAP 分析技术体系的优化及引物筛选[J]. 广东药学院学报,2014,30(1):28-35.
- [12] 赵秀娟,韩雅楠,蔡禄. 氯化钠胁迫下的蒙古黄芪基因组 MSAP 分析[J]. 广东农业科学,2011,38(8):1-4.
- [13] XU M L, LI X Q, KORBAN S S. AFLP-based detection of DNA methylation[J]. Plant molecular biology reporter,2000,18(4):361-368.

(上接第 133 页)

了其中 12 种化合物。由于提取物中存在着大量结构类似的分异构体,不但分子式一样,并且有相似的裂解方式,如新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸,因此,该试验采用对照品比对,将其区分和进行进一步确认,12 种化合物分别为绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、洋蓟素、木犀草苷、东莨菪苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖(6→1)-α-L-鼠李糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷。

在羊耳菊抗炎有效组分中酚酸类化合物绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A 等为其主要化学成分。在同科植物金银花中已有文献报道,金银花中含有的大量苯丙素类化合物,其中绿原酸、异绿原酸和咖啡酸等是其主要抗炎活性成分之一,同时文献研究证明,金银花具有较强的广谱抗菌作用,且抗菌活性的强弱也与苯丙素类化合物(绿原酸、异绿原酸等)的含量显著相关^[14-16]。因此,初步推断羊耳菊的抑菌、抗炎药效与苯丙素类化合物有一定联系,该研究为羊耳菊抑菌、抗炎活性成分的发现奠定试验基础,初步阐明其药效物质基础,并为下一步质量控制研究提供了特征性的代表指标成分。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·苗药卷[M]. 贵阳:

贵州科技出版社,2005:273-274.

- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:176.
- [3] BOHLMANN F, AHMED M, JAKUPOVIC J. Inositol angelates from *I. cappa* [J]. Phytochemistry,1982,21(3):780-782.
- [4] 《中国民族药志》编委会. 中国民族药志[M]. 成都:四川民族出版社,2007:257-258.
- [5] 关焕玉,兰燕宇,廖尚高,等. 羊耳菊中咖啡酰基奎宁酸类化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(12):1948-1952.
- [6] 姚波,杨树德,梁晓原. 羊耳菊的生药学研究[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(9):39-41.
- [7] 郭启雷,杨峻山,刘建勋. 羊耳菊的化学成分研究[J]. 中成药,2007,29(6):887-889.
- [8] 谢红刚,张宏武,张江,等. 羊耳菊的化学成分[J]. 中国天然药物,2007,5(3):193-196.
- [9] 郑黎花,郝小江,苑春茂,等. 羊耳菊化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(4):672-678.
- [10] WANG M f Simon J E, Aviles I F, et al. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2003, 51(3):601-608.
- [11] 靳鑫,时圣明,张东方,等. 穿心莲化学成分的研究[J]. 中草药,2012,43(1):47-50.
- [12] 夏爱军,李玲,董昕,等. UHPLC-Q-TOF/MS 技术应用于中药旱莲草化学成分研究[J]. 解放军药学报,2012,28(5):404-407.
- [13] 陈思颖. 基于多元指纹图谱技术的天麻药材质量控制研究[D]. 贵州:贵阳医学院,2014.
- [14] 倪付勇,宋亚玲,刘露,等. 异绿原酸 A、B 和 C 的制备工艺研究[J]. 中草药,2015,46(3):369-373.
- [15] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药,2015,46(4):490-495.
- [16] 王亚丹,杨建波,戴忠,等. 中药金银花的研究进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(11):1928-1934.