

基于 cDNA-AFLP 技术分析不同种源和地域太子参基因差异表达

华愉教, 耿超, 王胜男, 刘训红*, 谷巍, 罗益远, 刘娟秀, 侯娅, 马阳

南京中医药大学, 南京 210023

摘要: 研究不同种源和地域太子参的基因差异表达, 分离并鉴定相关差异基因。采用 cDNA-AFLP 技术分析 2 个不同种源和地域太子参差异表达基因。筛选 6 个引物组合进行扩增, 从同种源不同地域及同地域不同种源太子参中分别获得 44、38 条差异表达转录衍生片段 (Trivially distributed file system, TDFs), 对差异片段进行克隆、序列测定, 分别得到 27、25 个 TDFs 核苷酸序列。经过 BLASTX 程序比对, 分别有 19、16 个 TDFs 有其对应的显著同源序列, 其中有 7、6 个 TDFs 为已知功能的蛋白, 这些蛋白主要参与植物的生长发育、抵御病虫害、提高植物抗非生物胁迫的能力。本研究为揭示太子参药材品质形成的分子机制提供基础资料。

关键词: 太子参; 种源和地域; cDNA-AFLP; 差异表达基因

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.004

Analysis of Gene Expression of *Pseudostellariae Radix* from Different Provenances and Habitats Based on cDNA-AFLP

HUA Yu-jiao, GENG Chao, WANG Sheng-nan, LIU Xun-hong*,

GU Wei, LUO Yi-yuan, LIU Juan-xiu, HOU Ya, MA Yang

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: The aim of this study was to investigate gene differential expression in *Pseudostellariae Radix* from different provenances and habitats, as well as to isolate and evaluate associated differential genes. cDNA-AFLP was applied to analyze the differential expressed genes of *Pseudostellariae Radix* from two different provenances and habitats. Six primer pairs were selected, using these primer pairs, 44 and 38 differentially expressed trivially distributed file system (TDFs), were amplified in *Pseudostellariae Radix* from same provenances and different habitats as well as same habitats and different provenances, respectively. These TDFs were cloned and sequenced, 27 and 25 nucleotide sequences were obtained, respectively. By BLASTX analysis, 19 and 16 of them were found with homologous sequences in databases, of which, 7 and 6 TDFs had their known function, respectively. These proteins were mainly involved in the growth and development of plants, resisting diseases and insect pests, improving the ability of plants to resist the abiotic stress. Our research provided the basic information for revealing the molecular mechanism of *Pseudostellariae Radix*.

Key words: *Pseudostellariae Radix*; provenances and habitats; cDNA-AFLP; differential expressed genes

太子参为大宗常用中药材, 系石竹科假繁缕属植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. 的干燥块根^[1], 具益气健脾、润肺生津之传统功效及保护心肌功能、促进免疫、抗应激、治疗糖尿病、止咳等药理作用, 临床上用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肺燥干咳等症, 是治疗小儿脾虚而食欲不佳之药, 疗效确切, 临床用量大^[2]。由于太子参野生资源日益减

少, 而原药材市场需求量又逐年加大, 全国除传统产区江苏外, 现已在福建、贵州等地建立了大规模种植基地。随着太子参栽培地域扩大, 流通品系增多, 各地区间的频繁引种, 使得太子参现有栽培群体类型多样, 由于栽培品系或产区生态环境的不同, 造成了太子参有效成分的积累差异较大, 药材品质参差不齐^[3], 难以实现商品药材标准化以及保证其临床使用的有效性。

反转录双链 DNA 扩增片段长度多态性 (cDNA-AFLP) 是在转录水平研究基因差异表达的有效技术之一, 具有灵敏度高、重复性好、假阳性率低的特点^[4]。高丰度表达的基因转录本经 cDNA-AFLP 扩

收稿日期: 2015-08-11 接受日期: 2015-12-23

基金项目: 国家自然科学基金 (81274016; 81473312); 江苏高校优势学科建设工程 (yskk-2014)

* 通讯作者 Tel: 86-25-85811511; E-mail: liuxunh1959@sohu.com

增后条带的强弱能定性地直接反映出基因表达量的差异,得到的转录衍生片段(Trivially distributed file system, TDFs)可最大限度地提供基因编码区的信息^[5]。作为一项研究基因表达差异的高通量技术,该方法已经被运用在丹参^[6]、当归^[7]等药材研究中。目前太子参药材品质形成研究主要集中在指标成分含量测定、指纹图谱评价、栽培技术等方面^[8-10],对太子参的分子生物学研究甚少^[11]。本研究以太子参传统产区江苏句容和国内最大种植基地福建柘荣的种源和地域为研究对象,采用 cDNA-AFLP 技术分析同种源不同地域及同地域不同地种源太子参的基因差异表达,分离并鉴定相关差异基因,旨在探究种质遗传和生态环境对太子参基因表达水平的影响,从而为揭示太子参药材品质形成的分子机制提供基础资料。

1 仪器与材料

表 1 用于 cDNA-AFLP 分析的接头和引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of adaptors and primers used for cDNA-AFLP analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
接头 Adapter	EcoR I CTCGTAGACTGCGTACC AATFGGTACGCAGTCTAC Mse I GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
预扩增引物 Pre-amplification primer	E00 GACTGCGTACCAATTC M00 GATGAGTCTCTGAGTAA
选择性扩增引物 Selective amplification primer	E46 GACTGCGTACCAATTCATT M48 GACTGCGTACCAATTCCTCG E33 GACTGCGTACCAATTC AAG M54 GATGAGTCTCTGAGTAACTT E44 GACTGCGTACCAATTCATC M59 GATGAGTCTCTGAGTAACTA E42 GACTGCGTACCAATTCAG M60 GATGAGTCTCTGAGTAACTC E35 GACTGCGTACCAATTCACA M61 GATGAGTCTCTGAGTAACTG E85 GACTGCGTACCAATTCCTCG M55 GATGAGTCTCTGAGTAACTGA E40 GACTGCGTACCAATTCAGC M65 GATGAGTCTCTGAGTAACTGAG E39 GACTGCGTACCAATTCAGA M56 GATGAGTCTCTGAGTAACTGC

实地收集传统产区或种植基地多年优选的太子参种苗:“JR”-句容、“ZS”-柘荣,分别在 2012 年 11 月上旬同时栽植于江苏句容(JSJR)、福建柘荣(FJZR)2 个试验基地,严格按照太子参规范化栽培操作规程(SOP)进行移栽、田间管理等,于 2013 年 6 月下旬~8 月上旬(当地传统采收期)采集样品,编号为:S1-JSJR-JR、S2-FJZR-JR、S3-JSJR-ZR、S4-FJZR-ZR,经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为石竹科太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的块根。留样保存于

1.1 仪器

Eppendorf 蛋白核酸分析仪(德国艾本德公司), Bio-Rad Gel Doc XR + 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司), BIO-RAD C1000 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),湘仪 H1650-W 高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 材料

植物总 RNA 提取试剂盒、pGM-T Cloning Kit、*E. coli* TOP10 购自天根生化试剂(北京)有限公司; M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒、内切酶 EcoR I、Mse I 购自 TaKaRa 公司; High Pure PCR Product Purification Kit、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 为 Roche 公司产品; 2 × Taq PCR Mix 购自南京博尔迪生化试剂有限公司; 其它试剂均为国产分析纯产品。EcoR I、Mse I 接头序列和引物均由南京钟鼎公司合成,见表 1。

南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 实验方法

2.1 RNA 的提取

取太子参样品 100 mg,转移至预冷的研钵中,在液氮中研成粉末;加入 1 mL 裂解液,待完全裂解成透明液体后,将液体转移至离心管内;加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡 15 s,静置 3 min,12000 rpm 离心 10 min;液体分为三层,将最上层的水相转移至新的离心管内,加入 0.5 倍体积的无水乙醇,轻柔的混

匀;将制备管放入 2 mL 离心管中,然后将液体和沉淀一起移至制备管内,12000 rpm 离心 30 s;弃滤液,加入 500 μ L 去蛋白液,室温静置 1 min,12000 rpm 离心 30 s;弃滤液,加入 500 μ L Washing Buffer,室温静置 1 min,12000 rpm 离心 30 s;弃滤液,加入 700 μ L Washing Buffer,室温静置 1 min,12000 rpm 离心 30 s;弃滤液,12000 rpm 离心 2 min;将制备管放入一个新的离心管中,加 30 μ L 双蒸水,室温静置 1 min,12000 rpm 离心 2 min,得到总 RNA。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,Bio-Rad Gel Doc XR + 凝胶成像系统观察拍照,并用 Eppendorf 蛋白核酸分析仪检测 RNA 纯度和浓度。

2.2 cDNA 的合成

双链 cDNA 合成采用 TaKaRa 公司的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒操作步骤进行。

2.3 cDNA-AFLP 分析

2.3.1 酶切和链接

采用 EcoR I/Mse I 进行双酶切,酶切与连接反应同步进行。酶切与连接体系(20 μ L)为 10 \times AFLP digest-ligation Buffer 2 μ L;AFLP digest-ligation Enzyme Mix 1.8 μ L;EcoR I Adaptor 1 μ L(10 μ mol/L);Mse I Adaptor 1 μ L(10 μ mol/L);模板 DNA 5 μ L;补 ddH₂O 至 20 μ L。酶切-连接反应条件为 25 $^{\circ}$ C 5 h,1% 琼脂糖电泳检测。

2.3.2 预扩增

在 20 μ L 反应体系中加入连接产物 4 μ L、引物 E00(20 μ mol/L)和 M00(20 μ mol/L)各 1 μ L,2 \times PCR Mix 10 μ L,再加 ddH₂O 至 20 μ L,混匀后进行预扩增。预扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;50 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环。预扩增完成后,取 20 μ L 预扩增产物和 5 μ L Loading Buffer 混合后在 0.8% agarose 胶中检测预扩增的效果。取 5 μ L 预扩增产物加入 95 μ L 0.1 \times TE,混合-20 $^{\circ}$ C 保存。余下的扩增产物保存在-20 $^{\circ}$ C。

2.3.3 选择性扩增

取稀释 20 倍的预扩增产物作为选择性扩增模板,用 8 对引物组合对预扩增产物进行选择性扩增(表 1),反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 35 s,65 $^{\circ}$ C 复性 35 s(每循环降低 0.7 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,12 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,23 个循环。扩增后的样品中加入 20 μ L Loading Buffer,混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后立刻转移到冰浴中冷却,待用。

2.3.4 PAGE 电泳检测

扩增产物加上样缓冲液,变性后通过 5% PAGE 进行电泳,分离后用银染检测。

2.4 片段的回收、克隆、测序及同源性分析

选择差异显著条带进行回收,回收按照 TIANGEN BIOTECH(BEIJING)CO,LTD 的聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行操作。用 TIANGEN BIOTECH(BEIJING)CO,LTD 的 pGM-T 连接试剂盒进行回收条带的克隆,所得阳性克隆送到南京钟鼎公司进行测序。对获得的序列利用 BLASTX 程序在 NCBI 站点(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行同源性分析。

3 结果与分析

3.1 同种源不同地域太子参基因差异表达结果

由 8 种选择性引物组合筛选 6 组扩增多态性丰富的引物(E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55)对同种源不同地域太子参进行 cDNA-AFLP 分析,共筛选到 44 个差异表达 TDFs。

根据 TDF 的有无,将同种源不同地域太子参划分为以下类型。S1(JSJR-JR)与 S2(FJZR-JR)的太子参样品中扩增出 2 种类型的差异条带(图 1)。A 型为 S1 中有而 S2 中没有条带,B 型为 S1 中没有而 S2 中有的条带。经过分析发现 A、B 型分别有 11、14 条差异带。图 2A 分别为引物 E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55 的 cDNA-AFLP 图谱。

S3(JSJR-ZR)与 S4(FJZR-ZR)的太子参样品中扩增出的差异条带主要有以下 2 种类型(图 1)。C 型为 S3 中有而 S4 中没有的条带,D 型为 S3 中没有而 S4 中有的条带。经分析发现 C、D 型分别有 11、8 条差异带。图 2B 分别为引物 E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55 的 cDNA-AFLP 图谱。

3.2 同地域不同种源太子参基因差异表达结果

由 8 种选择性引物组合筛选 6 组扩增多态性丰富的引物(E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55)对同地域不同种源太子参进行 cDNA-AFLP 分析,共筛选到 38 个差异表达 TDFs。

根据 TDF 的有无,将同地域不同种源太子参划分为以下类型。S1(JSJR-JR)与 S3(JSJR-ZR)的太子参样品中扩增出 2 种类型的差异条带(图 3)。E 型为 S1 中有而 S3 中没有条带,F 型为 S1 中没有而

S3 中有的条带。经过分析发现 E、F 型分别有 9、7 条差异带。图 4A 分别为引物 E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55 的 cDNA-AFLP 图谱。

S2 (FJZR-JR) 和 S4 (FJZR-ZR) 的太子参样品中扩增出的差异条带主要有以下 2 种类型(图 3)。G 型为 S2 中有而 S4 中没有的条带, H 型为 S2 中没有而 S4 中有的条带。经分析发现 G、H 型分别有 14、8 条差异带。图 4B 分别为引物 E46M48、E33M54、E44M59、E42M60、E35M61、E85M55 的 cDNA-AFLP 图谱。



图 1 TDFs 在同种源不同地域太子参间的差异表达类型
Fig.1 Differential patterns of TDFs among same provenances and different habitats of *Pseudostellariae Radix*

注: A、B、C、D 表示 4 种基因差异表达类型

Note: A, B, C and D indicated 4 kinds of gene patterns

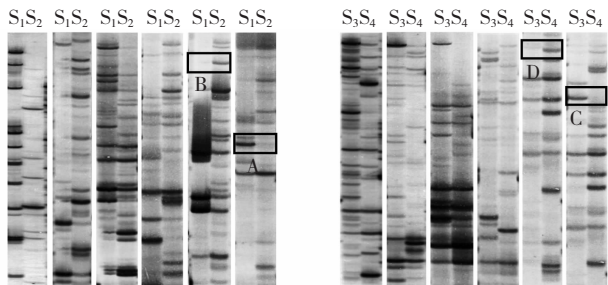


图 2 S1、S2 (A) 及 S3、S4 (B) 太子参样品 cDNA-AFLP 图谱
Fig.2 cDNA-AFLP profiles for S1, S2 (A) and S3, S4 (B)



图 3 TDFs 在同地域不同种源太子参间的差异表达类型
Fig.3 Differential patterns of TDFs among same habitats and different provenances of *Pseudostellariae Radix*

注: E、F、G、H 表示 4 种基因差异表达类型

Note: E, F, G, H indicated 4 kinds of gene patterns

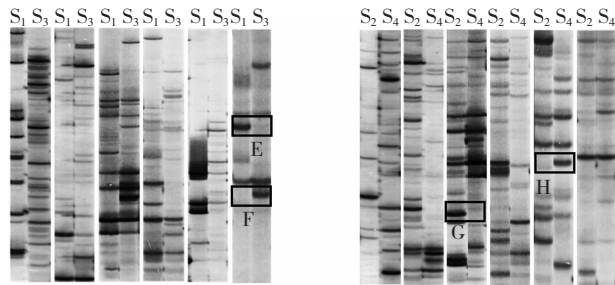


图 4 S1、S3 (A) 及 S2、S4 (B) 太子参样品 cDNA-AFLP 图谱
Fig.4 cDNA-AFLP profiles for S1, S3 (A) and S2, S4 (B)

3.3 同种源不同地域太子参差异片段的序列和功能分析

S1 (JSJR-JR) 和 S2 (FJZR-JR) 的太子参样品扩增出 25 个 TDFs, S3 (JSJR-ZR) 和 S4 (FJZR-ZR) 的太子参样品中扩增出 19 个 TDFs, 对其进行回收、克隆及测序, 分别获得 17 和 10 个可测序 TDFs。通过与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 的蛋白质序列库进行 BLASTX 序列比对, 分别发现 14 个和 5 个 TDFs 有同源序列, 见表 2。

S1 (JSJR-JR) 和 S2 (FJZR-JR) 的太子参样品中有同源序列的差异带为 No. 1 TDF-No. 14 TDF, 其中已知同源性序列功能的差异带是 No. 3 TDF、No. 7 TDF、No. 10 TDF、No. 13 TDF、No. 14 TDF。No. 3 TDF 和蒺藜蓂苜中的细胞壁水解酶 (CWH) 有 70% 的同源性, Liu SQ^[12] 称 CWH 有显著的抗菌活性。No. 7 TDF 和蓝状菌中的泛素有 100% 的同源性, 泛素能够介导植物发育和防御应激反应, 比如种子的萌发和生长以及对真菌感染、病虫害和渗透胁迫等逆境产生的应激反应。干旱、重金属、高温等非生物胁迫因素能够诱导植物泛素结合酶基因表达, 从而提高植物适应不良环境的能力^[13-15]。No. 10 TDF 和苜蓿菜亚型中的环桉树醇环异构酶 (CPI) 有 89% 的同源性, CPI 属于分子内裂合酶, 是催化植物固醇合成途径的重要酶^[16,17]。马学敏^[18] 研究到固醇合成途径很多基因参与植物抗逆调控, 因此 CPI 还参与植物的抗逆, 能提高植物的抗旱性。No. 13 TDF 和野草莓亚型中的抗坏血酸氧化酶 (ASO) 有 95% 的同源性。ASO 是一种含铜的酶, 位于细胞质或细胞壁结合, 与其它氧化还原反应偶联起到末端氧化作用, 能催化抗坏血酸的氧化, 有抗衰老作用。Felton GW^[19] 研究到在植食性昆虫的体内, 抗坏血酸在营养的供给和抗氧化的功能方面都有重要的作用, ASO 能够间接影响昆虫的抗坏血酸盐, 从而增强植物抵御昆虫的能力并且 ASO 能促进木质素生物合成和酚类氧化, 防御害虫入侵。另有研究表明 ASO 与植物的抗病性有关^[20]。No. 14 TDF 和番杏中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂有 83% 的同源性, 植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂在植物防御机制中起到重要的作用, 能够抵抗害虫和真菌并有助于抵御植物非生物压力^[21]。No. 1 TDF、No. 6 TDF、No. 8 TDF、No. 11 TDF、No. 12 TDF 的同源性大小分别为 83%、90%、43%、70%、85%, 均为假设蛋白, 功能未确定。No. 2 TDF、No. 4 TDF、No. 5 TDF、No. 9 TDF 的同源性大

表 2 TDFs 序列与 NCBI 蛋白质序列库的 BLASTX 序列比对分析

Table 2 Similarity of TDFs to known genes by BLASTX search against NCBI protein database

TDFs No.	大小 Length (bp)	同源序列蛋白质 Protein showing significant sequence similarity	物种 Species	同源序列号 Accession number of similar amino acid sequence	E 值 E-value
1	151	假设蛋白 Hypothetical protein	子囊菌 <i>Capronia epimyces</i>	XP007738810	0.000 000 3
2	192	未知蛋白 Unnamed protein product	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	CB135707	2E-29
3	304	细胞壁水解酶 Cell wall-associated hydrolase	蒺藜蓂苜 <i>Medicago truncatula</i>	XP003637074	2E-28
4	243	未知蛋白 Uncharacterized protein	鹰嘴豆 <i>Cicer arietinum</i>	XP004515588	5E-17
5	149	未知蛋白 Uncharacterized protein	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	XP00363639	3E-17
6	83	假设蛋白 Hypothetical protein	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	CAN70790	0.003
7	239	泛素 Ubiquitin	岷江百合 <i>Lilium regale</i>	AHZ94965	1E-24
8	211	假设蛋白 Hypothetical protein	蓝状菌 <i>Talaromyces islandicus</i>	CRG83145	3.50
9	211	未知蛋白 Uncharacterized protein	蕈苾菜亚型 <i>Beta vulgaris</i> subsp	XP010684364	6E-32
10	225	环桉树醇环异构酶 Cycloeucaenol cycloisomerase	蕈苾菜亚型 <i>Beta vulgaris</i> subsp	XP010678516	1E-32
11	108	假设蛋白 Hypothetical protein	蒺藜蓂苜 <i>Medicago truncatula</i>	XP003638451	0.000 6
12	221	假设蛋白 Hypothetical protein	海蠕虫 <i>Capitella teleta</i>	ELU18102	1E-33
13	121	抗坏血酸氧化酶 L-ascorbate oxidase	野草莓亚型 <i>Fragaria vesca</i> subsp	XP011468663	0.000 2
14	225	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cysteine proteinase inhibitor	番杏 <i>Tetragonia tetragonoides</i>	AFC88844	3E-34
15	286	线粒体酸性蛋白 MAM33 Mitochondrial acidic protein MAM33	蕈苾菜亚型 <i>Beta vulgaris</i> subsp	XP010694392	5E-34
16	125	未知蛋白 Uncharacterized protein	雷蒙德氏棉花 <i>Gossypium raimondii</i>	XP012440607	2.60
17	298	假设蛋白 Hypothetical protein	芽孢杆菌 <i>REN51NBacillus</i> sp. REN51N	WP040060906	8E-28
18	201	依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 RNA-dependent RNA polymerase	蚕豆枯萎病毒 2 <i>Broad bean wilt virus 2</i>	ACK86674	3E-30
19	183	假设蛋白 Hypothetical protein	高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	XP002489151	7E-27
20	136	假设蛋白 hypothetical protein	子囊菌 <i>Capronia epimyces</i>	XP007738810	0.000 000 7

小分别为 93%、87%、98%、89%，均为未知蛋白。

S3(JSJR-ZR)与 S4(FJZR-ZR)的太子参样品中有同源序列的差异带为 No. 15 TDF—No. 19 TDF,其中已知同源性序列功能的差异带是 No. 15 TDF、No. 18 TDF。No. 15 TDF 和蕈苾菜亚型中的线粒体酸性蛋白 MAM33 有 71% 的同源性,线粒体酸性蛋白 MAM33 是一种位于线粒体内的可溶性蛋白,并参与线粒体氧化磷酸化^[22],蒲友光^[23] 研究显示缺少 MAM33 基因的菌株在丙三醇培养基中生长缓慢,表明此蛋白有促进植物生长的功能。No. 18 TDF 和蚕豆枯萎病毒 2 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RDR)有 95% 的同源性,RDR 参与了多条小 RNA 合成途径,正向和反向遗传学表明,这些小 RNA 主要参与植物对病毒的防御、生长发育调节和逆境的应答^[24-26],除此之外,RDR 还影响植物其他生物学过程,包括种内竞争^[27]、食草动物的防御^[28]。No. 17 TDF、No.

19 TDF 同源性大小分别为 89%、95%,均为假设蛋白,功能未确定。No. 16 TDF 的同源性大小为 53%,为未知蛋白。

3.4 同地域不同种源太子参差异片段的序列和功能分析

S1(JSJR-JR)和 S3(JSJR-ZR)的太子参样品扩增出 16 个 TDFs, FJZR-JR(S2)和 FJZR-ZR(S4)的太子参样品中扩增出 22 个 TDFs,对其进行回收、克隆及测序,分别获得 10 和 15 个可测序 TDFs。通过与 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)的蛋白质序列库进行 BLASTX 序列比对,分别发现 6 个和 10 个 TDFs 有同源序列,见表 2。

S1(JSJR-JR)与 S3(JSJR-ZR)的太子参样品中有同源序列的差异带为 No. 1 TDF、No. 2 TDF、No. 5 TDF、No. 16 TDF、No. 20 TDF,其中已知同源性序列功能的差异带是 No. 3 TDF,前文已描述。No. 1

TDF、No. 20 TDF 同源性大小均为 83%, 为假设蛋白, 功能未确定。No. 2 TDF、No. 5 TDF、No. 16 TDF 同源性大小分别为 93%、98%、53%, 为未知蛋白。

S2(FJZR-JR)与 S4(FJZR-ZR)的太子参样品中有同源序列的差异带为 No. 7 TDF—No. 14 TDF 以及 No. 18 TDF、No. 19 TDF, 其中已知同源性序列功能的差异带是 No. 7 TDF、No. 10 TDF、No. 13 TDF、No. 14 TDF、No. 18 TDF, 前文已描述。No. 8 TDF、No. 11 TDF、No. 12 TDF、No. 19 TDF 同源性大小分别为 43%、70%、85%、95%, 为假设蛋白, 功能未确定。No. 9 TDF 的同源性大小为 89%, 为未知蛋白。

4 讨论与结论

cDNA-AFLP 技术因其具有重复性好、假阳性低、可检测低丰度的 mRNA、能准确反应基因间表达量的差别和能全面获取转录组的表达信息等突出优点, 已成为目前分离差异表达基因最有效的技术方法之一^[4]。该技术从出现至今已经广泛应用于植物、动物、微生物在各种条件影响下的基因差异表达研究。

本实验采用 6 组扩增多态性丰富的引物对不同种源和地域太子参的基因差异表达进行 cDNA-AFLP 分析。实验结果表明, 种质遗传和生态环境对太子参基因表达水平有一定影响。同种源不同地域太子参样品 S1 和 S2 扩增出 25 条差异带, 其中 17 条可测序, 14 条可找到同源序列; S3 和 S4 扩增出 19 条差异带, 其中 10 条可测序, 5 条可找到同源序列。同地域不同种源太子参样品 S1 和 S3 扩增出 16 条差异带, 其中 10 条可测序, 6 条可找到同源序列; S2 和 S4 扩增出 22 条差异带, 其中 15 条可测序, 10 条可找到同源序列。对这些差异带功能进行鉴定, 结果显示不同种源和地域太子参差异带的功能主要为促进植物生长发育、抵御病虫害、提高植物抗非生物胁迫的能力(高温、重金属、干旱等)和适应环境的能力。本研究为揭示太子参药材品质形成的分子机制提供基础资料。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I;62.
- 2 Fu XS(傅兴圣), Liu XH(刘训红), Xu H(许虎), et al.

- Research status and trends of pseudostellariae radix. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志) 2012, 21:757-760.
- 3 Liu XH(刘训红), Tan XH(谈献和), Zeng YP(曾艳萍), et al. Comparison of quality of Radix Pseudostellariae from different habitats. *Chin Med J Res Prac* (现代中药研究与实践), 2007, 22:36-38.
- 4 Bachem CW, Vander Hoeven RS, De Bryjin SM et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP; analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, 9:745-753.
- 5 Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269:173-179.
- 6 Li D(李东), Wu XJ(吴先军), Chen X(陈新). cDNA-AFLP analysis on transcriptome of *Salvia miltiorrhiza* under heat stress. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42:2083-2091.
- 7 Yu G, Duan JA, Yan H, et al. cDNA-AFLP analysis of gene expression differences between the flower bud and sprout-shoot apical meristem of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Genet Mol Biol*, 2011, 34:274-279.
- 8 Fu XS(傅兴圣), Zou LS(邹立思), Liu XH(刘训红), et al. Analysis of cyclic peptides in Pseudostellariae Radix by UPLC-ESI-TOFMS/MS. *J Chi Mass Spec Soc* (质谱学报), 2013, 34:179-184.
- 9 Liu XH(刘训红), Ju WZ(居文政), Cai BC(蔡宝昌), et al. HPLC-MS fingerprint of Radix Pseudostellariae. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2008, 30:160-163.
- 10 Xiao CH(肖承鸿), Zhou T(周涛), Jiang WK(江维克), et al. Genetic diversity and quality analysis of cultivated *Pseudostellaria heterophylla*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45:1319-1325.
- 11 Shi XM(石贤明), Jiang WW(姜卫卫), Wang ZZ(王正值), et al. Overview of cultivation technology of *Pseudostellaria heterophylla*. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2013, 25(11):15-28.
- 12 Si QL, Joseph O, Amber A. Antibacterial activity of a cell wall hydrolase from *Lactobacillus paracasei* NRRL B-50314 produced by recombinant *Bacillus megaterium*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42:229-235.
- 13 Feussner K, Feussner I, Leopold I, et al. Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato—the first stress-induced UBC of higher plants. *FEBS Lett*, 1997, 409:211-215.
- 14 Xu L, Liu F, Lechner E, et al. The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2002, 14:1919-1935.
- 15 Park GG, Park JJ, Yoon JM, et al. A RING finger E3 ligase

- gene, *Oryza sativa* delayed seed germination 1 (OsDSG1), controls seed germination and stress responses in rice. *Plant Mol Biol*, 2010, 74:467-478.
- 16 Martha A, Elizabeth A, Michael J, *et al.* Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucaenol cycloisomerase. *J Biol Chem*, 2000, 275:13394-13397.
- 17 Alain R, Francis K. Plant cyclopropylsterol-cycloisomerase: key amino acids affecting activity and substrate specificity. *Br J Plant*, 2014, 459:289-299.
- 18 Ma XM (马学敏). Study of the evolution and function of *CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1* gene of plant sterol biosynthesis. Beijing: Beijing Forestry University (北京林业大学), PhD. 2013.
- 19 Felton GW, Summers CB. Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory. *J Chem Ecol*, 1993, 19:1553-1568.
- 20 Yu ZG (余泽高), Qiao YL (乔丽雅). Relationship between wheat ascorbic acid oxidase activity and disease resistance of preliminary discussion. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2003, 1:31-33.
- 21 Guo KJ, Bu YY, Teisuo T. Arabidopsis cysteine proteinase inhibitor AtCYSb interacts with a Ca^{2+} -dependent nuclease, AtCaN₂. *FEBS Letters*, 2013, 587:3417-3421.
- 22 Tilman S, Friedrich L, Walter N, *et al.* Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the human complement receptor gC1q-R. *Yeast*, 1998, 14:303-310.
- 23 Pu YG (蒲友光). Structure and function of mitochondrial matrix proteins. Hefei: University of Science and Technology of China (中国科技大学), PhD. 2011.
- 24 Qi X, Bao FS, Xie Z. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerase in viral siRNA biogenesis. *PLoS ONE*, 2009, 4:1-11.
- 25 Allen E, Howell M. miRNAs in the biogenesis of transacting siRNAs in higher plants. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21:798-804.
- 26 Borsani O, Zhu J, Verslues PE, *et al.* Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123:1279-1291.
- 27 Pandey SP, Gaquerel, Gasek, *et al.* RNA-directed RNA polymerase 3 from *Nicotiana attenuata* is required for competitive growth in natural environments. *Plant Physiol*, 2008, 147:1212-1224.
- 28 Pandey SP, Baldwin. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant J*, 2007, 50:40-53.
- (上接第 312 页)
- 5 Wang LZ, Xue CH, Wang YM, *et al.* Extraction of proteins with low fluoride level from Antarctic krill (*Euphausia superba*) and their composition analysis. *J Agric Food Chem*, 2011, 59:6108-6112.
- 6 Li F (李芳), Liu JR (刘俊荣), Liang SS (梁姗姗), *et al.* Recovery and composition of Antarctic krill *Euphausia superba* protein. *J Dalian Ocean Univ* (大连海洋大学学报), 2013, 28:191-194.
- 7 Liu ZD (刘志东), Qu YH (曲映红), Wang Y (王媛), *et al.* The development of the bioactive substances of the Antarctic krill. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:1491-1495.
- 8 Chen YC, Jaczynski J. Gelation of protein recovered from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) by isoelectric solubilization/precipitation as affected by functional additives. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:1814-1822.
- 9 Xin M (辛敏), Huang Y (黄昀), Hao PF (郝鹏飞), *et al.* Optimization of extraction conditions of ferritin from chickpea seed. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:283-288.
- 10 Zi Y (訾艳), Wang CQ (王常青), Dang YF (党彦飞), *et al.* Study on the extraction and amino acid composition of white kidney bean globulin. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1267-1271.