

多伞阿魏简单重复序列区间-聚合酶链反应体系的建立和优化[△]

盛萍^{1,2*}, 苗莉娟¹, 安露莎¹, 姚蓝^{1,2}, 詹羽娇¹(1.新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R28;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1345-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.01

摘要 目的:建立并优化多伞阿魏简单重复序列区间(ISSR)-聚合酶链反应(PCR)体系。方法:通过单因素试验确定影响多伞阿魏ISSR-PCR扩增结果的Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶、DNA模板最佳水平范围。对Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶、模板DNA进行5因素4水平的正交试验,优选最佳ISSR-PCR体系条件。ISSR-PCR扩增结果用SPSS 18.0统计软件分析。结果:不同水平的因素对PCR均有明显影响,其中Mg²⁺、dNTPs、引物影响最大。多伞阿魏ISSR-PCR最佳反应体系为:在50 μl的反应体系中含有10×Taq Buffer 5 μl、Mg²⁺ 2.0 mmol/L、dNTPs 0.4 mmol/L、引物0.4 μmol/L、Taq DNA聚合酶1.75 u/50 μl、DNA模板0.25 ng/μl。在此基础上,从100条引物中筛选出15条扩增稳定、多态性丰富的ISSR引物。结论:建立的多伞阿魏ISSR-PCR体系具有较高的稳定性和重现性,可为进一步利用ISSR技术进行多伞阿魏遗传多样性分析、不同种源鉴定及亲缘关系分析提供基础。**关键词** 多伞阿魏;简单重复序列区间-聚合酶链反应体系;单因素试验;正交试验

Establishment and Optimization for ISSR-PCR System of *Ferula ferulaeoides*

SHENG Ping^{1,2}, MIAO Li-juan¹, AN Lu-sha¹, YAO Lan^{1,2}, ZHAN Yu-jiao¹(1.Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Distinctive Formulas, Urumqi 830011, China; 2.School of TCM, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish and optimize the ISSR-PCR system for *Ferula ferulaeoides*. METHODS: The ranges of Mg²⁺, dNTPs, primers, Taq DNA, polymerase and template DNA, which influenced ISSR-PCR system of *F. ferulaeoides*, were determined by single factor test; using them as factors and levels, the ISSR-PCR system was optimized by orthogonal experiment. ISSR-PCR result was analyzed by SPSS statistical software. RESULTS: Most of the factors at different levels had the significant effects on the result of PCR, and the most remarkable factors were the concentration of Mg²⁺, dNTPs and primers. The optimized ISSR-PCR system of 50 μl *F. ferulaeoides* as follows: 10×Taq Buffer 5 μl, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L, primer 0.4 μmol/L, Taq DNA polymerase 1.75 u/50 μl, DNA template 0.25 ng/μl. 15 ISSR primers with stable amplification and abundant polymorphism were selected from 100 ISSR primers. CONCLUSIONS: Established ISSR-PCR system is stable and reproducible, and provides the basis for further study on genetic diversity analysis, source identification and genetic relationship analysis of *F. ferulaeoides* by ISSR molecular marker technique.

KEYWORDS *Ferula ferulaeoides*; ISSR-PCR system; Single factor test; Orthogonal experiment

多伞阿魏[*Ferula ferulaeoides*(Steud.)Korov.]是新疆维吾尔族常用的重要药材,为伞形科阿魏属植物,仅分布于新疆古尔班通古特沙漠南缘地区的沙丘、沙地和砾石质的蒿属荒漠中,药用部位为根和油胶树脂^[1]。其挥发性成分在临床上用于治疗心腹冷痛、慢性肠胃炎、胃溃疡、风湿性关节炎等疾病^[2]。目前,对多伞阿魏的研究主要集中在挥发油成分分析^[3-4]、化学成分分离^[5-6]、药理作用^[7]和生药学^[8]等方面。因阿魏属药用植物植株外部形态较相似,仅靠传统经典鉴别方法不易解决品种鉴定的问题。迄今为止,利用分子标记技术对多伞阿魏进行研究尚未报道。

简单重复序列区间(Inter simple sequence repeats, ISSR)

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81060364)

*教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:特色中、维药资源质量标准。E-mail: xjshphy@163.com

标记技术是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等在微卫星标记的技术上发展起来的一种新型分子标记技术。该标记技术综合了其他标记技术的多种优点,具有操作简单、所需DNA模板量少、多态性高、稳定性好、产物特异性强等特点^[9],已被成功应用于植物的品种鉴定、遗传图谱的构建等方面^[10-12]。但是,其反应体系易受Mg²⁺、Taq DNA聚合酶、引物等因素的影响。建立优化的ISSR-聚合酶链反应(PCR)体系对保证ISSR试验结果的准确、可靠非常重要。因此,本研究采用单因素和正交试验设计,对多伞阿魏ISSR-PCR体系进行了优化,以为多伞阿魏后续分析提供依据。

1 材料

1.1 仪器

My Cyclery PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司);BG-Power型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);WD-9413B型凝胶成像分析仪(北京六一仪器厂);核酸蛋白测定仪(上海精科实业

有限公司);TG16-W型微量高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 药材

多伞阿魏样品于2011年采自新疆沙湾县、富蕴县、清河县、木垒县、奇台县、吉木萨尔县、裕民县、托里县等主产区,经笔者鉴定为真品。每个产地随机选取10株植株,每株随机采集其幼嫩叶置于硅胶袋中迅速干燥,然后置-40℃贮藏,备用。

1.3 试剂

Buffer、MgCl₂、dNTPs、Taq DNA聚合酶均购自上海生工生物工程有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;经筛选以引物U881[GGGGTG]3作为此次单因素试验、正交设计试验的引物。

2 方法

2.1 基因组DNA提取

本课题组前期已对阿魏属4种药用植物[多伞阿魏 *F. ferulaeoides* (Steud.) Korov.、准噶尔阿魏 *F. songorica* Pall. ex Spreng.、新疆阿魏 *F. sinkiangensis* K.Mshen.、托里阿魏 *F. krylovii* Korov.]总DNA提取方法(改良的CTAB法、改良的SDS法与试剂盒法)进行了比较研究^[3],结果表明,试剂盒法为提取阿魏属4种药用植物总DNA的最佳方法。故本研究中植物基因组DNA提取采用试剂盒Plant Genomic DNA Kit(离心柱型)进行,DNA提取操作步骤参照说明。用1.0%琼脂糖电泳和核酸检测仪检测DNA质量浓度,并将其稀释至50 ng/μl。

2.2 ISSR-PCR体系单因素试验

对影响多伞阿魏ISSR-PCR扩增结果的Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶和模板DNA分别设置了6个不同梯度的处理:Mg²⁺浓度设置为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L;dNTPs浓度设置为0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L;引物浓度设置为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μmol/L;Taq DNA聚合酶活性设置为1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25 u/50 μl;DNA模板质量浓度设置为0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 ng/μl。每个因素最佳水平范围确定后作为后续正交设计因素水平的基础条件。在PCR扩增仪上进行扩增。反应体系为50 μl,每个体系还包含5 μl 10× Taq Buffer。根据引物的退火温度及预试验,最后确定反应程序为:95℃预变性7 min,95℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸90 s,45个循环,72℃延伸10 min。4℃保存。扩增反应结束后,PCR产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶中含0.5 μl/ml EB,电泳缓冲液为1×TAE,Marker为DL2 000,电压为120 V,电泳时间为55 min,电泳结束后在凝胶成像系统下分析并拍照。

2.3 ISSR-PCR体系正交试验设计

根据对各项单因素试验考察结果分析,对影响ISSR-PCR扩增结果的Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶和模板DNA进行5因素4水平优化,选用L₁₆(4⁵)正交试验设计表。表中共有16个处理,每个处理做2次重复,以确定最佳反应体系条件。正交试验设计见表1。

2.4 ISSR-PCR体系的稳定性检测

用筛选获得的最佳反应体系,从100条ISSR引物中筛选出15个扩增稳定、多态性高的引物。再以U881为引物对22份多伞阿魏样品进行DNA扩增,重复3次,检测其稳定性。

3 结果

3.1 单因素试验结果分析

表1 正交试验设计与结果

Tab 1 Orthogonal design and results

序号	Mg ²⁺ , mmol/L	dNTPs, mmol/L	引物, μmol/L	Taq DNA酶, u/50 μl	DNA模板, ng/μl	评分1	评分2
1	1.0	0.1	0.4	1.25	0.25	1	1
2	1.0	0.2	0.6	1.50	0.50	2	3
3	1.0	0.3	0.8	1.75	0.75	7	4
4	1.0	0.4	1.0	2.00	1.00	8	5
5	1.5	0.1	0.6	2.00	0.75	3	2
6	1.5	0.2	0.4	1.75	1.00	12	12
7	1.5	0.3	1.0	1.50	0.25	9	9
8	1.5	0.4	0.8	1.25	0.50	10	10
9	2.0	0.1	0.8	1.50	1.00	5	7
10	2.0	0.2	1.0	1.25	0.75	6	8
11	2.0	0.3	0.4	2.00	0.50	15	16
12	2.0	0.4	0.6	1.75	0.25	16	13
13	2.5	0.1	1.0	1.75	0.50	4	6
14	2.5	0.2	0.8	2.00	0.25	11	11
15	2.5	0.3	0.6	1.25	1.00	13	14
16	2.5	0.4	0.4	1.50	0.75	14	15

3.1.1 不同Mg²⁺浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 Mg²⁺浓度是影响ISSR-PCR扩增结果的重要因素之一,Mg²⁺浓度过低或过高都不能产生有效的扩增产物。这主要是由于Mg²⁺可以提高DNA双链结构的稳定性,影响Taq DNA聚合酶的活性,还能与反应体系中的dNTP、引物及DNA模板相结合,影响引物与模板的结合效率^[4]。当反应体系中Mg²⁺的浓度过高时会增强背景干扰,过低将降低扩增产率^[5]。随着Mg²⁺浓度的增加,条带数目增多,清晰度增加,当浓度为2.0~2.5 mmol/L时条带最为清晰。因此,选择以2.0 mmol/L上下的1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L浓度水平作为Mg²⁺ISSR-PCR体系正交试验设计的水平范围。不同Mg²⁺浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响见图1。

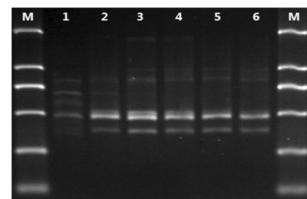


图1 不同Mg²⁺浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

1.05 mmol/L;2.10 mmol/L;3.15 mmol/L;4.20 mmol/L;5.25 mmol/L;6.30 mmol/L;M.蛋白标记

Fig 1 Effects of the concentration of Mg²⁺ on ISSR-PCR amplification

1.05 mmol/L;2.10 mmol/L;3.15 mmol/L;4.20 mmol/L;5.25 mmol/L;6.30 mmol/L;M.Mark

3.1.2 不同dNTPs浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 dNTPs是反应中磷酸基团的主要来源。在ISSR-PCR中,dNTPs浓度过高可加快反应速度,同时还可提高碱基的错误掺入率和试验成本;反之,低浓度的dNTPs会导致反应速度的下降,但可提高试验的精确性。此外,由于dNTPs直接螯合相应数量的Mg²⁺,其浓度的任何改变都会影响有效Mg²⁺的浓度^[6]。当dNTPs浓度>0.2 mmol/L时,条带不清晰,且大片段条带缺失;当dNTPs浓度>0.4 mmol/L时,ISSR-PCR产物非特异性扩增增加;当dNTPs浓度为0.3~0.4 mmol/L时,ISSR-PCR扩增位点清晰、稳定。因此,选择以0.3 mmol/L上下的0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L水平作为dNTP ISSR-PCR体系正交试验设计的水

平范围。不同dNTPs浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响见图2。

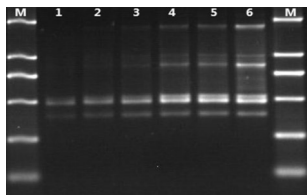


图2 不同dNTPs浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

1.0.05 mmol/L;2.0.1 mmol/L;3.0.2 mmol/L;4.0.3 mmol/L;5.0.4 mmol/L;6.0.5 mmol/L;M.蛋白标记

Fig 2 Effects of the concentration of dNTPs on ISSR-PCR amplification

1.0.05 mmol/L;2.0.1 mmol/L;3.0.2 mmol/L;4.0.3 mmol/L;5.0.4 mmol/L;6.0.5 mmol/L;M.Mark

3.1.3 不同引物浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 引物浓度也会对PCR的带型产生明显影响,过低或过高浓度的引物都不能产生很好的扩增效果。这是由于引物浓度过低,不能产生扩增产物;而引物浓度过高,会增加引物二聚体的形成,引起模板与引物错配,导致条带不清晰或产生新的特异性位点,使PCR特异性下降^[4]。当引物浓度为0.4~0.6 μmol/L时,带型最清晰且最多。因此,选择以0.6 μmol/L上下的0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L水平作为引物ISSR-PCR体系正交试验设计的水平范围。不同引物浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响见图3。

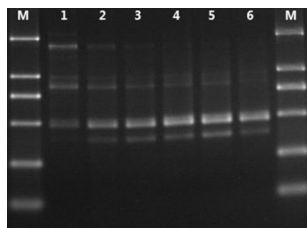


图3 不同引物浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

1.0.2 μmol/L;2. 0.4 μmol/L;3.0.6 μmol/L;4.0.8 μmol/L;5.1.0 μmol/L;6.1.2 μmol/L;M.蛋白标记

Fig 3 Effects of the concentration of primer on ISSR-PCR amplification

1.0.2 μmol/L;2.0.4 μmol/L;3.0.6 μmol/L;4.0.8 μmol/L;5.1.0 μmol/L;6.1.2 μmol/L;M. Mark

3.1.4 不同Taq DNA聚合酶活性对ISSR-PCR扩增结果的影响 在ISSR-PCR中,不同生产厂家及不同生产批次的Taq DNA聚合酶在活性及性能上都有着较大的差异,酶质量的好坏直接关系到反应的稳定性与重现性;而且酶的用量在ISSR-PCR中也是一个重要的影响因素,浓度过低则不能扩增,浓度太高又会产生非特异性扩增且增加成本^[17]。随着Taq DNA聚合酶活性的增加,条带模糊且非特异性条带增加。因此,选择以1.75 u/50 μl上下的1.25、1.50、1.75、2.00 u/50 μl水平作为Taq DNA聚合酶ISSR-PCR体系正交试验设计的水平范围。不同Taq DNA聚合酶活性对ISSR-PCR扩增结果的影响见图4。

3.1.5 不同DNA模板质量浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

DNA模板质量浓度也是影响ISSR-PCR扩增效果的主要因素之一。DNA模板质量浓度在0.25~1.0 ng/μl之间扩增条带清晰且最多,不会导致扩增条带的模糊和非特异性产物的出

现。因此,选择0.25、0.50、0.75、1.00 ng/μl水平作为ISSR-PCR体系正交试验设计的水平范围。不同DNA模板质量浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响见图5。

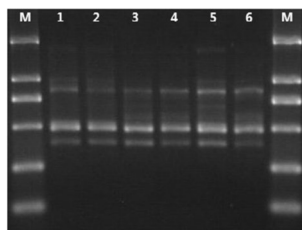


图4 不同Taq DNA聚合酶活性对ISSR-PCR扩增结果的影响

1.1.00 u/50 μl;2.1.25 u/50 μl;3.1.50 u/50 μl;4.1.75 u/50 μl;5.2.00 u/50 μl;6.2.25 u/50 μl;M.蛋白标记

Fig 4 Effects of the amount of Taq DNA polymerase on ISSR-PCR amplification

1.1.00 u/50 μl;2.1.25 u/50 μl;3.1.50 u/50 μl;4.1.75 u/50 μl;5.2.00 u/50 μl;6.2.25 u/50 μl;M.Mark

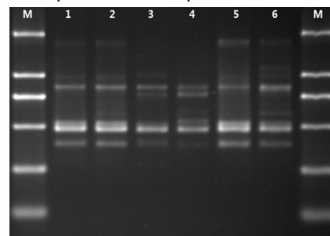


图5 不同DNA模板质量浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响

1.0.25 ng/μl;2.0.50 ng/μl;3.0.75 ng/μl;4.1.00 ng/μl;5.1.25 ng/μl;6.1.50 ng/μl;M.蛋白标记

Fig 5 Effects of the concentration of template DNA on ISSR-PCR amplification

1.0.25 ng/μl;2.0.50 ng/μl;3.0.75 ng/μl;4.1.00 ng/μl;5.1.25 ng/μl;6.1.50 ng/μl;M. Mark

3.2 ISSR-PCR体系正交试验结果直观分析

根据 $L_{16}(4^3)$ 正交试验ISSR-PCR产物电泳结果,16个处理2组重复均有谱带产生。依据谱带的强弱和杂带的多少对ISSR-PCR扩增结果依次打分,条带数量丰富、清晰的最佳产物计16分;最差的计1分。分别对重复2次的扩增结果进行独立计分。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则,同时考虑试验成本,初步选定第12组合为多伞阿魏ISSR-PCR的最佳反应体系。多伞阿魏ISSR-PCR体系电泳结果见图6;正交试验结果见表1。

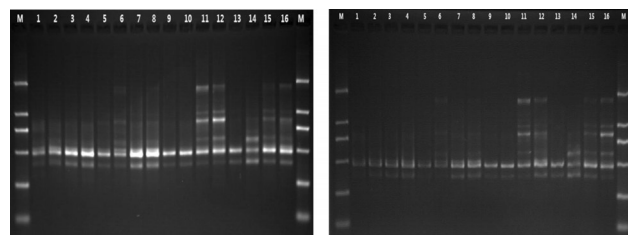


图6 多伞阿魏ISSR-PCR体系电泳结果

A.结果1;B.结果2;1~16.表1中的1~16序号;M.蛋白标记

Fig 6 Electrophoresis of orthogonal test of ISSR-PCR products in *F. ferulaeoides*

A.result 1;B.result 2;1-16.treatment number shown in table 1;M.Marker

3.3 ISSR-PCR体系正交试验方差分析

将上述处理的评分结果用SPSS 18.0进行方差分析。由F可知,该正交设计中各个因素对ISSR-PCR体系的影响从大到小依次为:dNTPs、Mg²⁺、引物、模板DNA、Taq DNA聚合酶。除了Taq DNA聚合酶外,其余各因素的P<0.05,表明这些因素水平间差异有统计学意义,可进一步进行因素内的多重比较分析。方差分析结果见表2。

表2 方差分析结果

Tab 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
Mg ²⁺	261.750	3	87.250	63.455	0.000
dNTPs	302.500	3	100.833	73.333	0.000
引物	63.250	3	21.083	15.333	0.000
Taq DNA聚合酶	10.750	3	3.583	2.606	0.088
DNA模板	19.750	3	6.583	4.788	0.014
误差	22.000	16	1.375		
总变异	680.000	31			

注:F_{0.05}(3,3)=9.28

note:F_{0.05}(3,3)=9.28

3.4 各因素不同水平间对ISSR-PCR扩增结果的影响

采用SPSS 18.0统计软件中的S-N-K法对各因素不同水平的结果进行多重比较,确定因素的最佳水平。

3.4.1 不同Mg²⁺浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 随着Mg²⁺浓度从1.0~2.5 mmol/L增加,评分结果均值由小变大,当增加到2.0~2.5 mmol/L时均值最大,2.0 mmol/L与1.0、1.5 mmol/L水平之间差异均有统计学意义(P<0.05),与2.5 mmol/L水平之间差异无统计学意义(P>0.05)。因此,Mg²⁺选择2.0 mmol/L为最佳浓度。

3.4.2 不同dNTPs浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 随着dNTPs浓度从0.1~0.4 mmol/L增加,评分结果均值由小变大,当增加到0.4 mmol/L时均值最大,且与其他3个水平之间差异均有统计学意义(P<0.05)。因此,dNTPs选择0.4 mmol/L为最佳浓度。

3.4.3 不同引物浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 随着引物浓度从0.4~1.0 μmol/L增加,评分结果均值呈下降趋势,0.4 μmol/L与其他3个水平之间差异均有统计学意义(P<0.05)。因此,引物选择0.4 μmol/L为最佳浓度。

3.4.4 不同Taq DNA聚合酶活性对ISSR-PCR扩增结果的影响 Taq DNA聚合酶活性在1.25~1.75 u/50 μl之间评分结果均值呈上升趋势,但Taq DNA聚合酶活性为1.75~2.0 u/50 μl时呈下降趋势,且1.75 u/50 μl与1.25、1.5 u/50 μl水平之间差异均有统计学意义(P<0.05),与2.0 u/50 μl水平之间差异无统计学意义(P>0.05)。因此,选择1.75 u/50 μl为Taq DNA聚合酶最佳活性。

3.4.5 不同DNA模版质量浓度对ISSR-PCR扩增结果的影响 DNA模版在0.25~0.75 ng/μl之间评分结果均值呈下降趋势,在1.0 ng/μl时又开始缓慢上升,但0.25 ng/μl与0.75 ng/μl水平之间差异有统计学意义(P<0.05),与0.5、1.0 ng/μl水平之间差异无统计学意义(P>0.05)。因此,选择DNA模版的最佳质量浓度为0.25 ng/μl。

3.5 ISSR-PCR体系的稳定性检测

筛选的多伞阿魏ISSR-PCR引物和退火温度见表3;优化的ISSR-PCR体系对22份多伞阿魏样品DNA扩增结果见图

7。从图7中可看出,条带数目多、清晰、重复性好,表明建立的ISSR-PCR体系稳定可靠,可进一步应用于多伞阿魏的分子标记研究中。

表3 筛选的多伞阿魏ISSR-PCR引物和退火温度

Tab 3 ISSR primers and annealing temperatures of *F. ferulaeoides*

引物	引物序列(5'-3')	退火温度,℃	引物	引物序列(5'-3')	退火温度,℃
UBC822	(TC)8A	49	UBC860	(TG)8RA	50
UBC824	(TC)8G	51	UBC866	C(TCC)5TC	58
UBC834	(AG)8YT	50	UBC869	(GTT)6	45
UBC836	(AG)8YA	50	UBC872	(GATA)4	35
UBC840	(GA)8YT	50	UBC881	(GGGGTG)3	55
UBC845	(CT)8RG	52	UBC892	TAGATCTGATATCTG-AATTCCC	51
UBC852	(TC)8RA	50	UBC895	AGAGTTGGTAGCTC-TTGATC	51
UBC853	(TC)8RT	50			

注:R=(A,G)

note:R=(A,G)

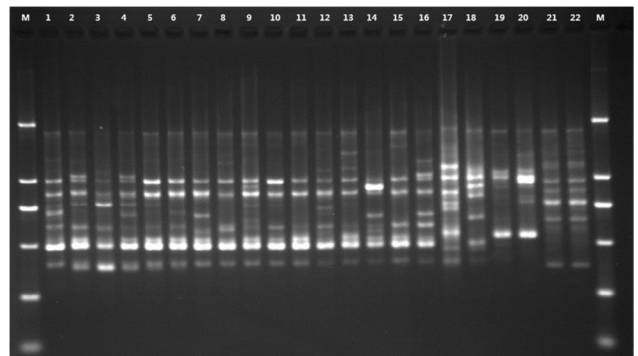


图7 优化的ISSR-PCR体系对22份多伞阿魏样品DNA扩增结果

1~22.22份多伞阿魏样品DNA; M. 蛋白标记

Fig 7 DNA amplification of 22 *F. ferulaeoides* samples with optimized ISSR-PCR reaction system

1~22.22 DNA of *F. ferulaeoides*; M.Marker

4 讨论

ISSR是基于PCR的分子标记技术,在进行PCR扩增反应时,Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶和模板DNA对条带的扩增有一定影响。本研究显示,多伞阿魏ISSR-PCR中各个因素对反应体系的影响从大到小依次为:dNTPs、Mg²⁺、引物、模板DNA、Taq DNA聚合酶。通过方差分析,Mg²⁺、dNTPs、引物对PCR影响最大,Taq DNA聚合酶影响最小。因此,最终建立多伞阿魏ISSR-PCR最佳反应体系为:在50 μl的反应体系中含有10×Taq Buffer 5 μl、Mg²⁺ 2.0 mmol/L、dNTPs 0.4 mmol/L、引物0.4 μmol/L、Taq DNA聚合酶1.75 u/50 μl、模板DNA 0.25 ng/μl。

本研究曾对退火温度和循环次数做过预试验,退火温度过低时杂带多;退火温度过高时引物预模板结合差,条带较弱。退火温度试验结果显示与本试验选中引物U881理论退火温度一致,故选用退火温度为55℃。通过循环次数试验发现,循环次数小于30个时,几乎没有谱带,而45个循环得到的条带强弱合适、清晰可辨,故本研究选用循环次数为45个。

ISSR-PCR体系中,不是所有的引物都能扩增出较好的条带。不同的植物种类有不同的适宜引物,因此针对不同的药

姜黄素酚羟基衍生物的合成^Δ

王 静*,王 鑫,刘 磊,秦 伟(齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江 齐齐哈尔 161000)

中图分类号 R284;R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1349-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.02

摘要 目的:对姜黄素酚羟基进行结构修饰,以期得到优于其先导化合物的衍生物。方法:首先在以阿司匹林为起始原料,以吡啶为催化剂条件下与氯化亚砷反应合成乙酰水杨酰氯;再以所得的乙酰水杨酰氯为原料,对姜黄素进行结构修饰,合成得预期的姜黄素酚羟基衍生物。通过反复试验优化工艺条件,并通过高效液相色谱、核磁共振谱进行结构确认。结果:合成了新的姜黄素酚羟基衍生物,经过高效液相色谱、核磁共振谱的结构确定,其最佳的反应溶剂为二氯甲烷,最佳催化剂为吡啶,最适宜的反应温度为35℃,最佳反应时间为3h,最佳展开剂为石油醚-乙酸乙酯(3:2,V/V)。结论:该试验可为进一步对姜黄素的结构修饰奠定基础。

关键词 姜黄素;酚羟基;结构修饰;亲核取代

Study on the Synthesis of Phenolic Hydroxyl Derivative of Curcumin

WANG Jing, WANG Xin, LIU Lei, QIN Wei (College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To modify the phenolic hydroxyl group of curcumin in order to obtain the derivate which is better than the leading compound. METHODS: Using aspirin as raw material, acetyl salicylic acid chloride was synthesized by using thionyl chloride in the condition of pyridine; and then acetyl salicylic acid chloride was used as raw material to modify the structure of curcumin so as to obtain expectant new compounds. The preparation technology was optimized through repeated trials; the target compound was identified by HPLC and NMR. RESULTS: The phenolic hydroxyl derivative of curcumin was synthesized and identified by HPLC and NMR. The best condition of the reaction was as follows: dichloromethane as solvent, pyriding as catalyst, reaction temperature 35℃, optimum reaction time 3 h, aether petrolei:acetic ether(3:2, V/V) as mobile phase. CONCLUSIONS: This paper lays the foundation for further structure modification of curcumin.

KEYWORDS Curcumin; Phenolic hydroxyl group; Structure modification; Nucleophilic substitution

用植物种类,有必要进行最佳引物的筛选。本研究通过筛选得到了15条适合多伞阿魏ISSR分析的引物,可为进一步研究多伞阿魏的遗传多样性和品种鉴定提供依据。

参考文献

- [1] 新疆生物土壤沙漠研究所.新疆药用植物志[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1977:125.
- [2] 谭秀芳,李晓瑾,杜翠玲,等.药用植物阿魏概况及研究进展[J].中国民族民间医药杂志,2006(8):12.
- [3] 倪慧,姜传义,刘淑兰,等.新疆多伞阿魏中挥发油成分报道[J].中药材,1997,20(1):34.
- [4] 倪慧,姜传义,陈茂齐.新疆多伞阿魏根中挥发油成分研究[J].中成药,2001,23(1):54.
- [5] 宋东伟,赵文军,吴雪萍,等.新疆多伞阿魏化学成分研究[J].中草药,2006,37(11):1627.
- [6] Kojima K, Isaka K, Ondognii P. Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula ferulaeoides*. IV. [J]. *Chem Pharm Bulletin* (Tokyo), 2000, 48(3):353.
- [7] 熊元君,刘发,叶尔波,等.新疆三种阿魏对胃肠道作用的比较[J].新疆医学院学报,1993,16(4):500.
- [8] 丁旭,谭勇,阎莉,等.多伞阿魏的鉴别研究[J].中药材,

2011,34(6):879.

- [9] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genome*, 1994, 20(2):176.
- [10] 周延清,景建洲,李振勇,等.怀区地黄遗传多样性的ISSR鉴定[J].中草药,2005,36(2):257.
- [11] 王翀,周天华,杨雪,等.ISSR-PCR鉴别绞股蓝属7种植物[J].中草药,2008,39(4):588.
- [12] 沈颖,徐程,万小凤,等.ISSR-PCR在石斛种间鉴别中的应用[J].中草药,2005,36(3):423.
- [13] 盛萍,苗丽娟,安露莎,等.阿魏属4种药用植物总DNA提取方法的比较[J].中华中医药杂志,2013,28(12):56.
- [14] 徐爽,张耀川,李树成,等.银杏ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J].生物技术通报,2012,23(1):80.
- [15] 宋丽,刘友平.花椒RAPD-PCR反应体系的建立与优化[J].林业科学,2011,22(31):2889.
- [16] 沈洁,丁小余,丁鸽,等.铁皮石斛居群差异的研究II ISSR指纹标记方法的建立与优化[J].中国中药杂志,2006,31(4):291.
- [17] 张福生,郭顺星.金线莲ISSR反应体系的建立与优化[J].中草药,2011,42(1):137.

(收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-01-13)

Δ基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12531821)
*教授,硕士。研究方向:药物研发、药物合成。电话:0452-2663160。E-mail:469531593@qq.com