

## 薏苡胚油脂分子标记鉴定及遗传多样性分析

黄倩<sup>a</sup>,叶聪莹<sup>a</sup>,刘小川<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学, a. 生命科学院; b. 生物工程研究所, 杭州 310018)

**摘要:** 薏苡被誉为“世界禾本科之王”。它作为药食两用植物,特别以薏苡中性油脂为主要有效成分,用于辅助抗癌的药物,已在美FDA获准Ⅲ期临床。利用34个多态性丰富的RAPD分子标记,分析了23份不同地理来源的薏苡种质的遗传多样性,结果获得405个多态性片段,通过UPGMA聚类分析法,23份供试薏苡资源被分为5种类型,分类结果与地理来源和种质系谱一致。薏苡胚油脂分子标记鉴定中,胚油脂含量检测发现23份种质平均值仅为3.47%,但LG013中却高达8.99%,同时,发现长度约为1050 bp的片段为LG013的特有条带。经克隆和特异引物的鉴定,结果显示在600 bp处LG013拥有特异性代表条带,可作为该品种鉴定和知识产权保护的重要依据。

**关键词:** 薏苡;胚油脂;分子标记;RAPD;遗传多样性

**中图分类号:** Q321 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851(2016)03-0458-05 **引用页码:** 050705

### 0 引言

薏苡(*Coix lacryma-jobi* L.)别名水玉米(东北),草珠子(山东),晚念珠(福建)等<sup>[1]</sup>,为一年生或多年生C4草本植物<sup>[2]</sup>。作为世界上最受青睐的药、食同源植物之一,薏苡被誉为“世界禾本科之王”,欧洲人甚至将薏苡视为“生命健康之禾”。它的营养价值很高,薏苡中含有丰富的蛋白质,含量约为14.26%;脂肪含量约为5.56%,所含的脂肪中,多为油酸、亚油酸这些对人体有益的不饱和脂肪酸;纤维含量约为0.44%;同时含有锌、钠、铁、钙、镁、铜、锰、镉等8种微量元素,锌含量为43.24 μg/g,钠含量为118.64 μg/g,铁含量为212.90 μg/g,钙含量为749.00 μg/g,镁含量为1193.60 μg/g,铜含量为11.70 μg/g,锰含量为36.06 μg/g,镉含量为0.64 μg/g;薏苡仁中含有约为0.2%的中性油脂,中性油脂证实具有抗癌功效<sup>[3-4]</sup>。

薏苡具有很高的药用价值,它作为药材,在很早以前就已被我们的祖先广泛使用,我国就将薏苡作为治疗肥胖<sup>[5]</sup>、肠炎<sup>[6]</sup>、小儿厌食症<sup>[7]</sup>、风湿性关节

炎<sup>[8]</sup>、湿疹、扁平疣、坐骨神经痛、传染性软疣、尖锐湿疣、慢性阑尾炎等疾病的药物<sup>[5-11]</sup>。在薏苡众多的药用价值中,最引人注目的是薏苡仁中性油脂、治癌症<sup>[9-10]</sup>这一药用价值。早在1961年之际,当时的研究工作者就从薏苡中提出来了薏苡仁酯,即薏苡仁中性油脂,后发现薏苡仁中性油脂有抑制癌细胞增殖和扩散<sup>[11]</sup>,促进癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>的功效。这个已经在人喉癌细胞Hep-2细胞凋亡实验<sup>[13]</sup>和人鼻咽癌细胞凋亡<sup>[14]</sup>实研究中得到了证实。

2015年,以薏苡中性油脂为主要成分的“康莱特注射液”特效抗癌药,首次通过美国FDA认证,进入Ⅲ期临床阶段,是目前唯一一个在美国得到FDA认可的中草药。目前薏苡胚油脂含量检测异常困难,NCBI数据库也缺乏薏苡这一小物种基因序列信息,国内没有人做薏苡胚油脂相关方面工作。本研究主要目的,是通过RAPD分子标记分析所收集的23种(LG001~LG023)薏苡种质的遗传多样性,并尝试对薏苡胚油脂性状进行分子标记鉴定,为薏苡油脂含量种质资源改良及分子育种研究奠定基础。

收稿日期: 2015-12-07

作者简介: 黄倩(1990-),女,湖北武汉,硕士研究生,主要从事分子遗传育种方面的研究。

通信作者: 刘小川, E-mail: xcliu@zstu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 材料

供试材料为 23 份不同地理来源的薏苡种质材料,由浙江理工大学生命科学学院生物工程研究所收集(表 1)。

表 1 供试薏苡的编号及粒色

编号	粒色	编号	粒色
LG001	深棕色	LG013	黄白色
LG002	黄白色	LG014	黄白色
LG003	黄白色	LG015	黑褐色
LG004	棕色	LG016	深棕色
LG005	黑褐色	LG017	黄白色
LG006	深棕色	LG018	黑褐色
LG007	黑褐色	LG019	黄白色
LG008	灰色	LG020	棕色
LG009	黄白色	LG021	棕色
LG010	黄白色	LG022	黄白色
LG011	深棕色	LG023	黄白色
LG012	黄白色		

### 1.2 方法

#### 1.2.1 薏苡胚油脂含量的计算

根据胚压前质量、胚压后质量、种粒重可计算得到 23 份薏苡胚油脂含量  $I$ :

胚油脂含量  $I=$

$$\frac{\text{胚压前质量}-\text{胚压后质量}}{\text{种粒重}} \times 100\% \quad (1)$$

其中:胚压前质量(g)测量是以小刀轻柔刮取薏苡胚(尽量刮干净)后称重;胚压后质量(g)测量是用力挤压两块透明板(中间垫有 3 层滤纸,薏苡胚置上)后,种粒重(g)测量直接称重得出。

#### 1.2.2 DNA 的提取

各供试材料取 30 粒,经 45 d 萌发、成小苗至 10 cm 左右,各称取 2.0 g 鲜嫩的薏苡叶片用液氮研磨,采用改良的 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取 DNA。用 65℃ 提前预热的 CTAB 液裂解细胞(NaCl 使用浓度 700 mM),氯仿异戊醇抽提(取上清),经 RNA 酶消化,−20℃ 预冷异丙醇沉淀 DNA(放冰上沉淀 20 min),70% 乙醇洗涤后,用 ddH<sub>2</sub>O 溶解。所有 DNA 样本经 Nano Drop2000 测定浓度,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组质量合格后,用 ddH<sub>2</sub>O 稀释到 10 ng/μL,−20℃ 保存、备用。

#### 1.2.3 RAPD 扩增、电泳及 EB 染色

RAPD 引物:薏苡作为小作物,在 NCBI 数据库中无薏苡基因组的任何信息<sup>[16]</sup>,从玉米、小麦、水稻等(薏苡与它们亲缘关系近,同为禾本科)近源种的 256 个 RAPD 引物中共筛选出 34 个扩增条带清晰、稳定的 RAPD 引物,由上海生工合成(表 2)。

表 2 RAPD 引物序列信息

RAPD 引物	序列信息	退火温度/℃	RAPD 引物	序列信息	退火温度/℃
RAPD02	AGTCAGCCAC	31	S28	GTGACGTAGG	31
RAPD03	GGGCCACTCA	33	S32	TCGGCGATAG	32
RAPD04	AATCGGGCTG	32	S39	CAAACGTCGG	32
RAPD05	AACGGTGACC	33	S43	GTCGCCGTCA	34
RAPD06	AAGCGACCTG	32	S44	TCTGGTGAGG	33
RAPD07	GGTGACGCAG	32	S55	CATCCGTGCT	32
RAPD08	GGAGGGTGTT	32	S71	AAAGCTGCGG	34
S1	GTTTCGCTCC	33	S78	TGAGTGGGTG	31
S2	TGATCCCTGG	31	S86	GTGCCTAACC	32
S3	CATCCCCCTG	32	S91	TGCCCCGTCGT	34
S8	GTCCACACGG	32	S93	CTCTCCGCCA	33
S10	CTGCTGGGAC	32	S94	GGATGAGACC	31
S267	CTGGACGTCA	32	S99	GTCAGGGCAA	32
S18	CCACAGCAGT	32	S111	CTTCCGCAGT	32
S20	GGACCCTTAC	32	S112	ACGCGCATGT	34
S22	TGCCGAGCTG	33	S135	CCAGTACTCC	31
S27	GAAACGGGTG	32	S263	GTCCGGAGTG	32

PCR 反应体系:使用 BIO-RAD S1000™ Thermal 扩增仪,10 μL 反应体系:30 ng DNA 模板,1.0 μL 10 × Taq Buffer (Takara, Dalian,

China), 0.8 μL dNTP 2.5 mM (Takara, Dalian, China), 0.4 μL Mg<sup>2+</sup> 25 mM (Takara, Dalian, China), 0.1 μL RAPD primer 20 uM (Sangon,

Shanghai, China), 0.1  $\mu\text{L}$  rTaq enzyme 5 U/ $\mu\text{L}$  (Takara, Dalian, China), 补 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: (94 $^{\circ}\text{C}$ , 3 min) 预变性, [(94 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s) 变性; (t  $^{\circ}\text{C}$ , 45 s) 退火, 具体 t $^{\circ}\text{C}$  参考表 2, RAPD 引物 T<sub>M</sub> 值; (72 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min) 延伸] 34 个循环, 继续延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min), 4 $^{\circ}\text{C}$ , 保存。电泳及 EB 染色: 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 15 min EB 染色、漂洗后, 紫外灯下观察实验结果并保存图片, 记录相关信息。

#### 1.2.4 RAPD 聚类分析

RAPD 聚类分析是以 23 份供试薏苡 RAPD 标记结果图为依据, 统计结果图中所有扩增条带, 并以此建立 Microsoft Excel 数据库, 若有条带记为 1, 没有条带则记为 0。按 UPGMA 聚类分析法, Ntedit 录入数据, NTSYS-pc2.10e 聚类分析软件分析数据, 获得系统聚类图。

#### 1.2.5 克隆、引物设计及鉴定

克隆: 将重组载体 (1050 bp 目的片段 DNA/载体 PMD-18T) 导入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中表达; 在 LB 固体板 (含 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amp) 上挑选阳性单克隆菌落; 经菌液 PCR (M13+/M13-引物) 检测合格后, 送上海生工测序。根据测序结果, 使用 Primer5.0 软件, 设计引物 F: TCTGGTGAGG GGAGTCACA, R: TCTGGTGAGGCATGGTGT。采用 TD PCR 程序对薏苡胚油脂含量标记进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 薏苡胚油脂含量分析

薏苡胚油脂含量的检测常使用 HPLC 法、紫外光谱法、层析法, 这些方法虽有效但操作起来非常复杂, 目前仍缺乏便捷、有效的检测薏苡胚油脂含量的手段。利用物理压榨法 (1.2.1), 通过公式 (1) 计算可得到 23 份供试薏苡胚油脂含量百分比 (%) 具简单、有效的特点。表 3 可知, 23 份供试薏苡资源的胚油脂含量在 1.728%~8.994% 之间, LG013 是这 23 份供试薏苡中胚油脂含量最高的品种, 高达 8.994%, 23 个种质资源的平均值仅为 3.47%。其中, LG013、LG010、LG001、LG023、LG005、LG015、LG007、LG017、LG006 这 9 个供试薏苡资源胚油脂含量明显高于平均值 3.47%, 可能与薏苡种质、地理来源有关。23 份供试薏苡的胚油脂含量的检测结果为薏苡胚油脂含量种质资源的相关研究, 寻找优良的薏苡种质品种奠定基础。

表 3 供试薏苡胚油脂含量百分比

编号	胚油脂含量/%	编号	胚油脂含量/%
LG013	8.994	LG009	3.279
LG010	4.693	LG008	3.106
LG001	4.444	LG011	2.946
LG023	4.154	LG002	2.910
LG005	3.885	LG022	2.730
LG015	3.865	LG021	2.610
LG007	3.777	LG018	2.504
LG017	3.766	LG004	2.425
LG006	3.569	LG019	2.243
LG020	3.316	LG016	2.241
LG003	3.295	LG012	1.728
LG014	3.279		

### 2.2 RAPD 标记分析

薏苡作为小作物, 在 NCBI 数据库中没有任何薏苡基因组的任何信息, 从玉米、小麦、水稻等 (薏苡与它们亲缘关系近, 同为禾本科) 近源种的 256 个 RAPD 引物中共筛选出 34 个扩增条带清晰、稳定的 RAPD 引物进行 RAPD 分析。利用 34 个多态性丰富的 RAPD 分子标记, 结果共获得 405 个多态性片段, 平均每个 RAPD 分子标记扩增得到 11 个多态性片段。其中, 在 S44 引物的体外扩增结果中, 如图 1 所示, 发现第 400 个多态性片段, 分子量约为 1050 bp, LG013 (23 个供试薏苡胚油脂含量最高, 达 8.99%) 在此处有特异条带, 其它 22 份薏苡此处均没有任何条带。使用割胶回收试剂盒 Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (Cat #9762) 将此带割胶回收, 并克隆、测序, 根据测序结果设计引物 F: TCTGGTGAGGGGAGTCACA, R: TCTGGTGAGGCATGGTGT 用来作为鉴定薏苡胚油脂性状分子标记。

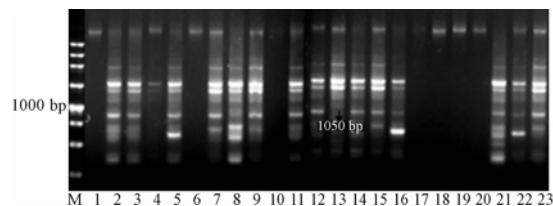


图 1 S44 引物对 23 份供试薏苡标记结果

### 2.3 种质间聚类分析

RAPD 标记聚类结果图中, RAPD 遗传相似系数, 其变幅为 0.55~0.96。其中 LG019/LG020 薏苡品种的相似系数最高, 达到 0.96。采用 UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) 聚类分析法, 以 0.75 遗传相似系数为标准将 23 种供试薏苡资源划分为 5 大类 (表 4): 第 I 类包括 LG012 (黄白色)、LG004 (棕色); 第 II 类包括 LG013 (黄白色)、LG015 (黑褐色)、LG023 (黄白色)、LG007 (黑褐色)、LG009 (黄白色)、LG014 (黄白色)、LG002 (黄白色)、LG022 (黄白色)、LG005 (黑褐色)、LG003 (黄白色)、LG016 (深棕色)、

LG011(深棕色);第 III 类包括 LG021(棕色)、LG008(灰色);第 IV 类包括 LG017(黄白色)、LG018(黑褐色)、LG001(深棕色);第 V 类包括 LG019(黄白色)、LG020(棕色)、LG006(深棕色)、LG010(黄白色)。LG013 是 23 种薏苡胚油脂含量最高的品种,高达 8.99%,属于第 II 类。从图 2 和表 4 可看出,第 I 类和第 IV 类遗传距离较近,第 II 类和 V 类遗传距离较近,第 III 类遗传距离呈现多样化,这一分类结果与种质系谱和地理来源一致。(图 2、表 4)

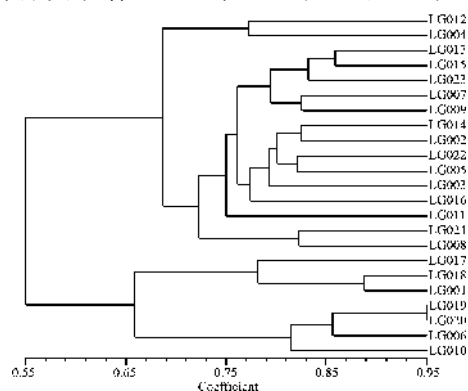


图 2 RAPD 标记聚类结果

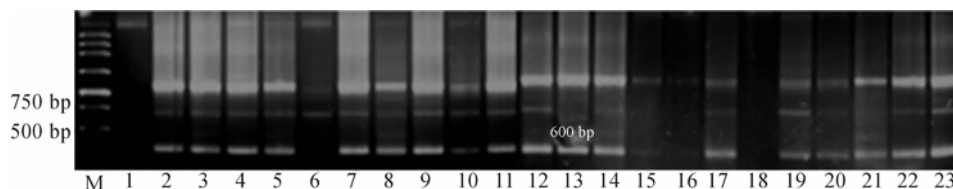


图 3 F/R 引物鉴定 23 份供试薏苡结果

### 3 结 论

本研究利用 34 个 RAPD 引物,对 23 份供试薏苡种质进行遗传多样性分析,采用 UPGMA 聚类分析法,以 0.75 遗传相似系数为标准将 23 种供试薏苡资源划分为 5 大类,这个结果与 23 份薏苡地理来源、种质系谱相一致,为薏苡种质资源相关研究奠定基础。LG013 胚油脂含量高达 8.99%,为 23 份供试薏苡胚油脂含量最高的品种(平均值仅为 3.47%)且分子鉴定结果表明 LG013 有 600 bp 特异性条带,可用于该品种鉴定、专利申请和高含量胚油脂性状的分子鉴定。相关薏苡胚油脂性状的分子鉴定仍需要 F2 代薏苡群体的进一步鉴定,才能真正确定 F/R 引物作为相关薏苡胚油脂性状的分子鉴定。

#### 参考文献:

[1] 黄锁义,李容,潘勇,等. 薏苡研究的新进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(11):223-226.

表 4 RAPD 聚类结果分析

类群编号	种质
I	LG012、LG004
II	LG013、LG015、LG023、LG007、LG009、LG014、LG002、LG022、LG005、LG003、LG016、LG011
III	LG021、LG008
IV	LG017、LG018、LG001
V	LG019、LG020、LG006、LG010

#### 2.4 分子标记鉴定结果分析

利用上下游引物 F/R (F: TCTGGTGAGG GGAGTCACA, R: TCTGGTGAGGCATGGTG),使用 Touchdown PCR 对薏苡胚油脂含量性状的分子标记进行鉴定,结果表明 LG013 有 600 bp 特异性条带,其它 22 份薏苡此处均没有条带(图 3)。这可能与胚油脂含量密切相关,并可作为该品种特异性条带, F/R 可用于该品种鉴定、专利申请和高含量胚油脂性状的分子鉴定。

- [2] 江忠东,郭菊卉,陈庆富. 薏苡属植物 DNA 多样性分析[J]. 广东农业科学,2013(2):124-127.
- [3] 金黎明,胡文忠,姜波,等. 薏米营养成分的测定与分析[C]//中国食品科学技术学会第七届年会论文摘要集,2004:94-106.
- [4] 周明强,雷朝云,周正邦,等. 贵州省薏苡的生产加工现状及发展潜力分析[J]. 湖北农业科学,2011,50(22):4660-4663.
- [5] KIM S O, YUN S J, LEE E H. The water extra of adlay seed (Coix lachrymajobi var. mayuen) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation[J]. Life Science,2007,35(11):297-308.
- [6] 张丰梅,杨峻山,赵杨景,等. 薏苡化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志,2002,37(1):8-11.
- [7] 吴岩,原永芳. 薏苡仁的化学成分和药理活性研究进展[J]. 华西药学杂志,2010,25(1):111-113.
- [8] SWAPNA M M, PRAKASHKUMAR R, ANOOP K P, et al. A review on the medicinal and edible aspects of aquatic and wetland plants of India [J]. Journal of Medicinal Plants Research,2011,5(33):7163-7165.

- [9] LEE M Y, LIN H Y, CHENG F, et al. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachrymal-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) bran [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 6(6):1933-1939.
- [10] YU F, GAO J, ZENG Y, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 119(2):252-258.
- [11] HUANG B W, CHIANG M T, YAO H T, et al. The effect of adlay oil on plasma lipids, insulin and leptin in rat [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(11):433-439.
- [12] WEN X R. Progress in study of chemical constituents and anti-tumor activities of semen coicis [J]. *Journal of Liaoning university of TCM*, 2008(3):135-137.
- [13] OKUBO K, SAITO K, FUKUDA H, et al. Traditional Chinese medicine for treatment of laryngeal papillomatosis [J]. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2010, 16(4):427-433.
- [14] CHEN H J, CHEN Y, CHIANG W. Inhibitory effects of adlay bran (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 141(2):119-127.
- [15] LI R H, XIA Y S, LIU S Z, et al. CTAB-improved method of DNA extraction in plant [J]. *Research and Exploration in laboratory*, 2009, 9(11):14-17.
- [16] GUO Y P, PENG Z H, ZHAO Z, et al. Genetic diversity analysis of Jobs tears germplasm resources by SSR markers in guizhou province [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(2):317-320.

## Identification of Embryo Oil Molecular Marker and Genetic Diversity Analysis of Coix

HUANG Qian<sup>a</sup>, YE Congying<sup>a</sup>, LIU Xiaochuan<sup>a,b</sup>

(a. Institute of Bioengineering; b. College of life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Job's-tears, which are the honored as the "king of grass family of the world", can be used as medical and edible plants. Especially, the neutral grease, major effective component in coix, can be used as auxiliary anticancer medicine and has been approved for phase-III clinic by FDA of America. Here, this paper analyzed the genetic diversity of 23 coix germplasms from varied geographic sources by using 34 RAPD molecular markers with rich polymorphism and obtained 405 polymorphic segments; according to the UPGMA clustering methodology, 23 coix sources for experiment were divided into 5 categories and the classification result was consistent with the geographic sources and germplasm genealogy. According to the identification the coix embryo grease molecular marker, it is found in the detection of embryo grease content that the average of 23 germplasms is merely 3.47% but the embryo grease content in LG013 reaches up to 8.99%; meanwhile, the fragment with a length of about 1050 bp is the exclusive strip of LG013. After identification of clone and specific primer, the result shows that LG013 has a specific representative strip in 600 bp and this can be used as an important basis for the variety identification and intellectual property protection.

**Key words:** coix; embryo grease; molecular marker; RAPD; genetic diversity

(责任编辑: 许惠儿)