

[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2020, 53(2): 21-31.

[19] Agnieszka L, Milena D, Elzbieta P, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.

[20] 杨 丽, 赵 岗, 樊秀梅, 等. 基于 Nrf2/HO-1 通路研究芹菜素改善妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(13): 27-31.

流式细胞术测定马蓝基因组大小

胡永乐^{1,2}, 宁书菊³, 叶 齐¹, 马小毛¹, 蔡国倩¹, 魏道智^{1*}
(1. 福建农林大学生命科学学院, 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建 福州 350002;
2. 武夷学院生态与资源工程学院, 福建 武夷山 354300; 3. 福建农林大学农学院, 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: **目的** 采用流式细胞术测定马蓝基因组大小。**方法** 以马蓝幼嫩叶片为材料, 水稻日本晴为参照, mGb 裂解液解离细胞后通过流式细胞仪检测荧光强度, 计算基因组大小。**结果** mGb 裂解液对细胞核解离效果较好, 马蓝基因组大小为 (0.99±0.01) Gb。**结论** 该方法既丰富了马蓝遗传信息, 又为其基因组学研究和流式细胞技术应用提供参考。
关键词: 马蓝; 基因组大小; 流式细胞术
中图分类号: Q7 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)02-0634-03
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.053

马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. 为爵床科马蓝属多年生草本植物, 主产于福建、浙江、四川、贵州等地, 其干燥根茎、根称为“南板蓝根”, 茎、叶经加工炮制可得青黛, 两者均收录于 2020 年版《中国药典》^[1]。目前, 复方南板蓝根片、复方感冒灵片、热毒清片等是市面上常见以南板蓝根为主要原料的中成药, 而青黛也是复方青黛胶囊、桂林西瓜霜含片、牛黄消炎丸等制剂的重要原料, 可见马蓝开发利用价值很高, 其中福建马蓝青黛含量在 5% 以上, 远高于 2020 年版《国家药典》规定, 是福建省大宗道地药材之一^[2]。近年来, 野生马蓝生态环境受人类活动破坏严重, 种质资源保护和驯化栽培长期未得到重视, 导致优质资源流失, 并且栽培种有效成分含量不稳定, 也使得品质参差不齐, 故对该道地药材进行种质资源保护和遗传背景解析具有重要的实际意义。

马蓝主要化学成分为靛蓝、靛玉红、吲哚酚苷、色胺酮等, 在拮抗原微生物、提高机体免疫功能、保肝等方面功效确切, 近年来被广泛应用于医疗保健、化妆用品、化工印染、食品加工、农业兽药等领域^[3], 相关研究也大多

集中于成分分析、吲哚类生物碱合成途径研究^[4-5], 但关于基因组的研究较少, 导致其有效成分生物合成通路和调控机制研究缺乏系统性, 限制了其药用价值的深入了解和开发。基因组大小是生物体单倍体基因组 DNA 总量, 又称 C 值, 其数值测定能为基因组研究提供基础参考^[6]。

流式细胞术是融合了激光技术、半导体技术、流体力学、细胞化学等多学科知识的自动分析技术, 相较于孚耳根微显影法、基因组测序法更简便易行, 检测结果更稳定可靠, 是近几年基因组大小测定的首选方法。因此, 本研究采用流式细胞仪测定马蓝基因组大小, 有助于该植物在生物进化、生长发育、生理生化机制、代谢机理方面的深入研究, 也可为今后其他植物样本检测中内参植物和裂解液的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 马蓝嫩叶采自福建农林大学马蓝栽培基地, 经福建农林大学魏道智教授鉴定为正品。水稻日本晴作为内参, 由福建农林大学植物免疫研究中心繁种保存。FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。MgCl₂ · 6H₂O

收稿日期: 2021-07-07
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573517); 福建省自然科学基金项目 (2019J01827); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (CXZX2020011A)
作者简介: 胡永乐 (1986—), 女, 博士生, 研究方向为药用植物资源开发利用。Tel: 13960613927, E-mail: huyongle114@163.com
* 通信作者: 魏道智 (1960—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药用植物资源开发利用。Tel: 13705034019, E-mail: weidz888@sohu.com
网络出版日期: 2022-05-25
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220524.1744.004.html>

(批号 20191114)、柠檬酸钠 (批号 20190929)、Na₂EDTA (批号 20200303) (国药集团化学试剂有限公司); MOPS (批号 0670200911)、PVP-40 (批号 0507031611)、Triton X-100 (批号 0694070511) (北京兰博利德商贸有限公司); β-巯基乙醇 (批号 WH0221K111, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 碘化丙啶 (批号 550825, 美国 BD 公司); RNase A (批号 20200318, 上海惠凌生物技术有限公司)。

1.2 细胞核悬浮液制备及染色 取马蓝或日本晴幼嫩叶片约 0.1 g, 置于 0.8 mL 预冷的 mGb 裂解液 (含 45 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O、20 mmol/L MOPS、30 mmol/L 柠檬酸钠、1% PVP-40、0.2% Triton X-100、20 μL/mL β-巯基乙醇、10 mmol/L Na₂EDTA, pH 7.5) 中, 无菌刀片迅速垂直切碎后置于裂解液中, 冰上静置 10 min, 400 目滤网过滤后得细胞核悬浮液。在细胞核悬液中加入一定体积预冷的 1 mg/mL 碘化丙啶、1 mg/mL RNase A 溶液, 直至两者终质量浓度都为 50 μg/mL, 冰上避光染色 0.5~1 h^[7]。

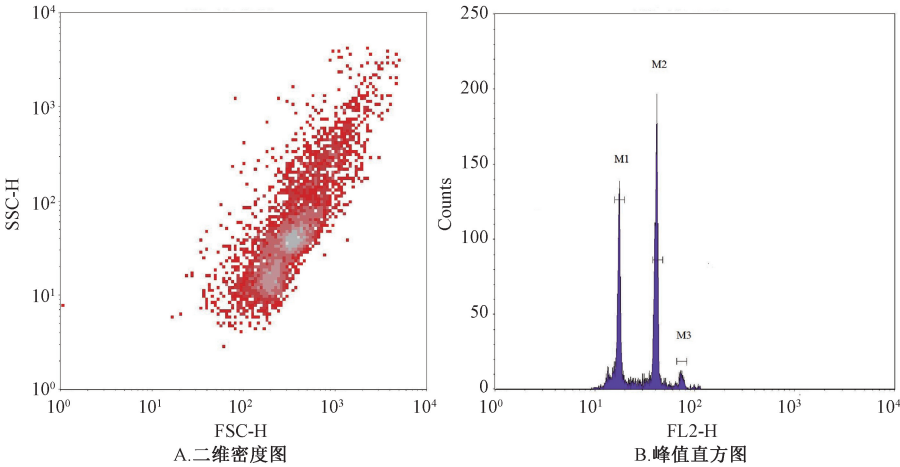
1.3 流式细胞仪检测 将马蓝与水稻日本晴的核悬浮液等比例混合, 采用 488 nm 波长蓝光激发, 检测 PI 发射光荧光强度, 每 1 次收集 10 000 个颗粒, 进行 3 次生物学重复,

通过 Modfit 3.0 软件分析作图, 变异系数控制在 5% 以内以保证数据可靠性^[8]。

1.4 基因组大小计算 于 488 nm 波长处捕捉 PI 荧光, 其强度可表示基因组 DNA 相对含量^[9]。分析马蓝、水稻日本晴 PI-DNA 复合体荧光峰值, 通过 DNA 含量比值计算马蓝基因组大小, 公式为基因组大小=水稻日本晴基因组大小×马蓝荧光强度/水稻日本晴荧光强度。

2 结果

以前向角散射光 (FSC) 为横坐标, 侧向角散射光 (SSC) 为纵坐标绘制二维密度图, 见图 1A, 发现颗粒大小和密度相同的粒子会聚集在一起, 聚集的粒子越多, 该区域的颜色会偏白, 以此对马蓝与水稻日本晴细胞群进行初步分群设门; 两者峰值无重叠, 区分度良好, 表明内参较合适。图 1B 可观察到相对较小的 M3, 为马蓝 G₂ 期的峰, 即 DNA 复制期的峰, 这主要是由于该植物比较幼嫩, 处于细胞分裂期的细胞占有较高比例。水稻日本晴基因组大小为 0.42 Gb^[10], 以 G₁ 期峰计算 DNA 含量, 确定马蓝基因组大小为 (0.99±0.01) Gb, 见表 1。



注: M1 为水稻日本晴 G₁ 期峰位, M2 为马蓝 G₁ 期峰位, M3 为马蓝 G₂ 期峰位。

图 1 流式细胞仪检测结果

表 1 马蓝基因组大小测定结果

试验号	水稻日本晴		马蓝		比值(B/A)	马蓝 C 值/Gb
	荧光强度(A)	变异系数/%	荧光强度(B)	变异系数/%		
1	17.16	4.10	40.51	3.63	2.36	0.99
2	17.13	3.97	40.52	3.42	2.37	0.99
3	17.51	3.35	40.51	3.55	2.31	0.97
$\bar{x}\pm s$	17.27±0.21	—	40.51±0.01	—	2.35±0.03	0.99±0.01

3 讨论与结论

目前植物基因组大小数据库 (https://cvalues.science.kew.org/) 已在全球范围内收录植物 C 值数据一万多种。C 值与细胞大小、体积、质量、发育速率等细胞水平上的表型特征存在正相关, 是具有物种特性的常数。近年来, 利用流式细胞术测定基因组大小的研究已在大量植物中开展。王珖等^[11]通过流式细胞仪测定甘薯近缘野生

种 *Ipomoea cordatotriloba* 的基因组大小为 (539.69±13.76) Mb, 与二代 Illumina 测序平台经 K-mer 分析得到的 560.70 Mb 相比误差较小。张小燕等^[12]通过流式细胞术检测人参基因组大小约为 3.42 Gb, K-mer 分析预估为 3.35 Gb; 段先飞等^[13]也对广金钱草基因组大小进行流式细胞术和 Genome Survey 测定, 结果表明 2 种方法估算数值基本一致。采用流式细胞术测定 C 值时需要注意裂解液和内参标准的

选择,裂解液要能使细胞核充分分离,同时尽量避免产生过多的细胞碎片,本研究选用的 mGb 裂解液可使细胞核解离较完全,水稻和马蓝变异系数分别为 3.81%、3.53%,均小于 5%,表明所检测的细胞核颗粒较均匀,达到标准。内参标准植物的 C 值要与待测样品相近,且遗传稳定、精确性高,细胞核易提取。本研究曾尝试使用模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 为内参,但拟南芥基因组大小为 125 Mb,马蓝约为其 8 倍,差距较大,影响实验结果的准确性,经过筛选,最终确定水稻日本晴为内参,该植物全基因组测序已完成,基因组大小合适,遗传背景清晰稳定,是常用且可靠的参照对象。经流式细胞术测得直方图可见马蓝样品和参照物峰值无重叠且区分度良好,符合要求,通过荧光强度对照算得马蓝基因组大小约为 (0.99±0.01) Gb。

马蓝、菰蓝和蓼蓝等都是中药青黛的源植物,主要药效成分为靛蓝、靛玉红、色胺酮等生物碱类化合物。尽管主要成分、药理作用有相似之处,但几种蓝靛植物隶属于不同科、属,指纹图谱以及组织形态差异较大。对马蓝基因组进行解析,将有助于揭示其遗传蓝图,开发培育优良品种。现阶段蓝靛植物中菰蓝的分子生物学研究较多,已通过测序组装,构建了大小为 293.88 Mb 的参考基因组,注释了 30 323 个蛋白编码基因,并获得了一些参与吲哚类、萜类和苯丙酸类代谢途径的候选基因^[14]。此外,昆明植物所结合 MinION 单分子和 Hi-C 测序技术组装获得了板蓝 *Strobilanthes cusia* 基因组 865 Mb^[15]。马蓝为福建省重要道地药材,遗传进化和生态环境的独特性是其质优效佳的根本原因,基因组测序将有助于解析道地药材遗传与环境的交互作用,从分子水平深入了解有效成分合成机制。课题组现阶段已完成了福建马蓝茉莉酸甲酯诱导下的转录组测定,并对吲哚类生物碱代谢通路的 5-烯醇式莽草酸-3-磷酸合成酶、色氨酸合成酶等关键酶基因进行了克隆分析^[4,16-17]。本研究采用流式细胞术测定马蓝基因组大小,将为后续马蓝基因组高通量测序组装提供基础数据,也为流式细胞技术在药用植物基因组大小测定领域的应用提供参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 208; 256.

[2] 刘小英, 彭建平, 林志敏. 建青黛产业现状、存在问题及发展对策[J]. 福建农业科技, 2016, 46(3): 59-62.

[3] 黄玉香. 马蓝药效物质形成关键基因的挖掘与功能研究 [D]. 厦门: 华侨大学, 2017.

[4] 公培民, 宁书菊, 叶 齐, 等. 马蓝色氨酸合成酶基因的克隆、序列及表达分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(3): 873-881.

[5] 杨 阳, 浦如月, 冯 格, 等. 高效液相色谱法同时测定马蓝根、茎、叶中 4 种成分的含量及其 3 种不同干燥方法的评价[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(2): 120-125.

[6] 樊慧杰, 柴 智, 陈乐乐, 等. 流式细胞术测定苦参基因组大小[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1646-1649.

[7] 汪 艳, 肖 媛, 刘 伟, 等. 流式细胞仪检测高等植物细胞核 DNA 含量的方法[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 126-131.

[8] 吉平平, 刘发旺, 王莉莉, 等. 基于流式细胞术的华细辛基因组 C 值测定[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 235-240.

[9] 田新民, 周香艳, 弓 娜. 流式细胞术在植物学研究中的应用——检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 21-27.

[10] Goff S A, Ricke D, Lan T H, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) [J]. *Science*, 2002, 296(5565): 92-100.

[11] 王 珧, 邓逸桐, 戴习彬, 等. 甘薯近缘种 *Ipomoea cordatotriloba* 基因组大小测定及高通量调查测序[J]. 热带作物学报, 2020, 41(6): 1154-1159.

[12] 张小燕, 刘志香, 廖保生, 等. 基于本草基因组学应用流式细胞术和高通量测序技术检测人参基因组大小[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2017, 19(10): 1724-1728.

[13] 段先飞, 陈晓蝶, 熊文波, 等. 基于流式细胞术和 K-mer 分析的广金钱草基因组大小估测[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(10): 1239-1243.

[14] Kang M H, Wu H L, Yang Q, *et al.* A chromosome-scale genome assembly of *Isatis indigotica*, an important medicinal plant used in traditional Chinese medicine: an *Isatis* genome [J]. *Hortic Res*, 2020, 7: 18.

[15] Xu W, Zhang L B, Cunningham A B, *et al.* Blue genome: chromosome-scale genome reveals the evolutionary and molecular basis of indigo biosynthesis in *Strobilanthes cusia* [J]. *Plant J*, 2020, 104(4): 864-879.

[16] Lin W J, Huang W, Ning S J, *et al.* *De novo* characterization of the *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek transcriptome and analysis of candidate genes involved in indican biosynthesis and metabolism[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0199788.

[17] Yu J, Zhang Y H, Ning S J, *et al.* Molecular cloning and metabolomic characterization of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Baphicacanthus cusia* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 485.