

中国牦牛 β 珠蛋白基因的克隆和序列分析*

袁青妍¹, 张庆波¹, 黄治国¹, 谢 庄¹, 殷甫路², 赵永华³

(1 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095;

2 红松洼种畜场, 河北 承德 310034;

3 龙日种畜场, 四川 红原 624400)

[摘 要] 根据黄牛 β 珠蛋白基因的序列设计引物, 扩增了中国牦牛的 β 珠蛋白基因, 并对其进行了克隆测序和氨基酸序列比较分析。结果显示, 其与黄牛 β 珠蛋白基因的同源性很高, 达到 97% 以上; 检测到中国牦牛 β 珠蛋白基因的 2 个等位基因 $\beta^{73A sn}$ 和 $\beta^{135A sn}$, 其中 67 号牦牛个体中检测到 2 个等位基因 $\beta^{73A sn}$ 和 $\beta^{135A sn}$, 64 号牦牛个体中检测到等位基因 $\beta^{135A sn}$, 1078 号牦牛个体中检测到等位基因 $\beta^{73A sn}$; 等位基因 $\beta^{135A sn}$ 是中国牦牛特有的一个等位基因, 推测该等位基因编码的第 135 位氨基酸天冬酰胺, 可能会降低牦牛血红蛋白的氧亲和力。

[关键词] 牦牛; β 珠蛋白基因; 等位基因; 氧亲和力

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)01-0100-05

牦牛主要分布在海拔 3 000 m 以上的寒冷、低氧地区, 那里的空气氧含量只有海平面的 1/3~1/2。牦牛的一个显著特征就是对高原低氧环境具有极好的适应性, 其血液中红细胞和血红蛋白的含量分别为 6 61~8 05 万/mm³ 和 99.2~113.8 g/L, 均远高于黄牛的 4 50 万/mm³ 和 81.2 g/L^[1], 并且其血红蛋白的氧亲和力也比黄牛的高^[2]。L althantluanga 等^[3-4] 分别于 1981 和 1985 年测定了牦牛血红蛋白 2 条 α 链及 2 条 β 链的氨基酸序列, 并推测牦牛血红蛋白氧亲和力高的原因可能是由于 β_{1135} 位的缬氨酸代替了丙氨酸所致。1988 年 Weber 等^[5] 进一步分析认为, 由于缬氨酸疏水性更强, 且体积比丙氨酸大, 会对 H-螺旋产生影响, 从而引起牦牛血红蛋白氧亲和力增高。但对牦牛 β 珠蛋白基因的核苷酸序列至今尚未见报道。为此, 本试

验克隆并分析了牦牛 β 珠蛋白基因, 以期能揭示牦牛血红蛋白氧亲和力高的分子基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 牦牛 DNA 样品 牦牛血样分别采自河北省红松洼种畜场(64 和 67 号牦牛个体)和四川省龙日种畜场(1078 号牦牛个体), 按参考文献[6]的方法提取基因组 DNA。

1.1.2 引 物 参照黄牛 β 珠蛋白基因序列, 设计了 4 对引物, 引物序列见表 1, 由上海博亚公司合成。其中, 第 1~3 对引物用于扩增 67 号牦牛个体的 β 珠蛋白基因, 第 4 对引物用于扩增 64 和 1078 号牦牛个体的 β 珠蛋白基因。

表 1 扩增所用的引物

Table 1 Primers for amplification

引物 Primers	引物序列 Primer sequence
第 1 对引物 The first primer	上游 Upstream: 5' CAG AAA GAG GGC TGA TGG TCT AAA G-3' 下游 Downstream: 5' GGA GAA CAC TGA GGA TTC CAC AAA C-3'
第 2 对引物 The second primer	上游 Upstream: 5' ACT TGT CCA CTG CTG ATG CTG TTA T-3' 下游 Downstream: 5' CCA AGG TTA GAT TCA GGG TAT TTC A-3'
第 3 对引物 The third primer	上游 Upstream: 5' CTT ATA TCT ACG GTC ACA GCT TGG G-3' 下游 Downstream: 5' TAT TTT CTC AAG GTC TCG ACT AGC C-3'
第 4 对引物 The fourth primer	上游 Upstream: 5' CAG AAA GAG GGC TGA TGG TCT AAA G-3' 下游 Downstream: 5' CTG CAA CTT GAA TTC TTT AAG GGA G-3'

[收稿日期] 2005-05-30

[作者简介] 袁青妍(1971-), 女, 陕西韩城人, 在读博士, 主要从事动物分子数量遗传学研究。

[通讯作者] 谢 庄(1947-), 男, 江苏无锡人, 教授, 主要从事动物分子数量遗传学研究。E-mail: xzie@njau.edu.cn

1.1.3 主要试剂 Perobest 酶购自 TaKaRa 公司; pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 扩增 67 号牦牛 β 珠蛋白全基因所用的反应体系 (10 μ L) 为: 50 ng/ μ L DNA 0.8 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 0.2 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 0.2 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 0.8 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 1 μ L, Probest 酶 0.05 μ L, ddH₂O 6.95 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 退火 1 min (退火温度: 引物 1 为 64.5 $^{\circ}$ C; 引物 2 为 60.5 $^{\circ}$ C; 引物 3 为 56.5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增 64 和 1078 号牦牛 β 珠蛋白全基因的反应体系为: 50 ng/ μ L DNA 0.8 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 0.2 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 0.2 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 0.8 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 1 μ L, Probest 酶 0.05 μ L, ddH₂O 6.95 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60.7 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 140 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 扩增产物的克隆与测序 扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化扩增产物。将纯化后的 67 和 64 号牦牛个体 β 珠蛋白基因的扩增产物, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下与 pGEM-Teasy 载体连接, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将 5

μ L 连接产物加入 200 μ L JM 109 感受态菌液中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s, 加入 800 μ L 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 下 123/min 培养 45 min 后, 再 6 000/min 离心 10 min, 弃去 800 μ L 上清液, 将剩余物用移液器轻轻混匀后涂布于含有 IPTG、X-gal 和 Amp (100 μ g/mL) 的培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取白色克隆接种于 3 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。对鉴定为阳性的克隆进行测序。1078 号牦牛个体 β 珠蛋白基因的扩增产物则直接进行测序。测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2.3 扩增产物的序列分析 将所测牦牛 β 珠蛋白基因序列用 DNA Star 软件进行同源比较。

2 结果与分析

2.1 67 号牦牛个体 β 珠蛋白全基因扩增结果

以 67 号牦牛个体的 DNA 为模板, 采用 3 对引物分别扩增牦牛 β 珠蛋白全基因, 第 1 对引物扩增到 1 条约 697 bp 的片段, 第 2 对引物扩增到 1 条约 716 bp 的片段, 而第 3 对引物扩增到 1 条约 774 bp 的片段, 见图 1。

2.2 64 和 1078 号牦牛个体 β 珠蛋白全基因扩增结果

分别以 64 号和 1078 号牦牛个体的 DNA 为模板, 采用 1 对引物扩增牦牛 β 珠蛋白全基因, 结果均扩增到 1 条约 2 034 bp 的片段, 见图 2。

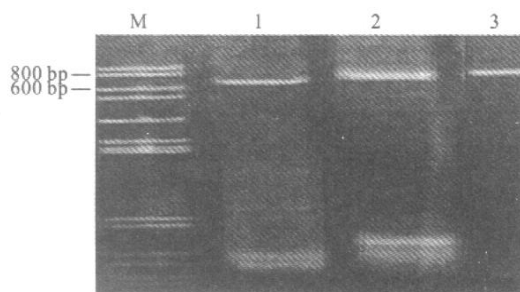


图 1 67 号牦牛个体 β 珠蛋白全基因的 PCR 扩增结果

M. pBR322 DNA/Alu 1 marker; 1. 第 1 对引物扩增产物; 2. 第 2 对引物扩增产物; 3. 第 3 对引物扩增产物

Fig. 1 Results for amplifying yak β -globin gene of individual 67 using three primers

M. pBR322 DNA/Alu 1 marker; 1. result for primer 1; 2. result for primer 2; 3. result for primer 3

2.3 序列差异比较

将 64, 67 和 1078 号牦牛个体 β 珠蛋白基因所编码的氨基酸序列, 与已发表的牦牛及黄牛 β 珠蛋

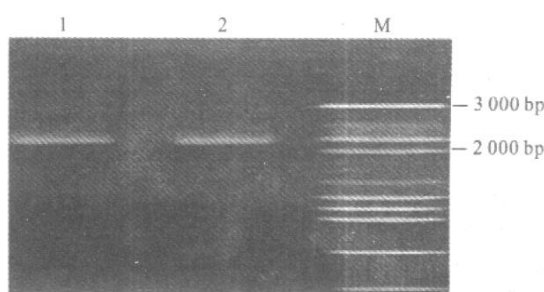


图 2 64 和 1078 号牦牛个体 β 珠蛋白全基因的 PCR 扩增结果

M. 100 bp DNA ladder; 1. 64 号牦牛个体的扩增产物; 2. 1078 号牦牛个体的扩增产物

Fig. 2 Results for amplifying yak β -globin gene of individual 64 and 1078 using one primer

1. the PCR result for individual 64; 2. the PCR result for individual 1078; M. 100bp DNA ladder

白链的氨基酸序列进行同源性比较分析。结果发现, 其只在第 50, 73, 117 和 135 位有差异, 具体差异情况详见表 2。

表 2 64, 67 和 1078 号牦牛与已发表的牦牛和黄牛 β 珠蛋白氨基酸序列比较结果Table 2 Comparison of the deduced amino acid of sequencing yak β globin gene with known yak and cattle β globin chains

比较项目 Item for comparison	50 位 Position 50	73 位 Position 73	117 位 Position 117	135 位 Position 135
黄牛 β 链 Cattle β chain	苏氨酸(ACT) Thr (ACT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	丙氨酸(GCT) A la (GCT)
牦牛 β_I 链 Yak β_I chain	苏氨酸 Thr	谷氨酸 Glu	天冬酰胺 A sn	丙氨酸 A la
牦牛 β_{II} 链 Yak β_{II} chain	丝氨酸 Ser	天冬酰胺 A sn	组氨酸 His	缬氨酸 Val
64 号牦牛个体的测序结果 The result for individual 64	丝氨酸(TCT) Ser (TCT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	组氨酸(CAT) His (CAT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)
67 号牦牛个体的测序结果 The result for individual 67	苏氨酸(ACT) Thr (ACT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	组氨酸(CAT) His (CAT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)
1078 号牦牛个体的测序结果 The result for individual 1078	苏氨酸(ACT) Thr (ACT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	天冬酰胺(AAT) A sn (AAT)	丙氨酸(GCT) A la (GCT)

注: 括号内为氨基酸所对应的密码子。

Notes: The code for residue is in parenthesis

由表 2 可以看出, 1078 号牦牛个体的 β 珠蛋白基因与黄牛的同源性高达 99.73%, 其所编码的氨基酸序列与黄牛的 β 链完全一样, 与已发表的牦牛 β_I 链只在第 73 位不同, 与牦牛 β_{II} 链在 50, 117 和 135 位不同(见表 2)。由此可认为, 本试验所扩增的 1078 号牦牛个体 β 珠蛋白基因中存在牦牛 β_I 链的一个新等位基因, 记为 $\beta^{73A\ sn}$ 。

64 号牦牛个体的 β 珠蛋白基因与黄牛的同源性高达 97.85%。其所编码的氨基酸序列与黄牛的 β 链相比, 有 3 个氨基酸不同, 即第 50, 117 和 135 位不同; 与已发表的牦牛 β_I 链有 4 处不同, 即 50, 73, 117 和 135 位不同; 与牦牛 β_{II} 链只有一处不同, 即第 135 位不同(见表 2)。由此可认为, 本试验所扩增的 64 号牦牛个体 β 珠蛋白基因中存在牦牛 β_{II} 链的一个新等位基因, 记为 $\beta^{135A\ sn}$ 。

67 号牦牛个体的 β 珠蛋白基因以第 1 对引物进行扩增, 产物长度为 697 bp。与黄牛的 β 链基因相比仅有一处不同, 即第 2 内含子的第 20 个碱基不同; 以第 2 和第 3 对引物进行扩增, 产物与黄牛的 β 链基因相比有 34 处不同, 这 34 处中有 30 处与 64 号牦牛个体 β 珠蛋白基因扩增产物的相应位置完全相同。即第 1 对引物扩增产物的外显子区(第 1 外显子与第 2 外显子)与黄牛的 β 链基因相同, 而第 2 和第 3 对引物扩增产物的外显子区(第 3 外显子)却与 64 号牦牛个体 β 珠蛋白基因扩增产物的对应区域相同。67 号牦牛个体 β 珠蛋白基因第 1 对引物扩增产物与黄牛 β 珠蛋白基因的对应区域同源性高达 99.86%, 而第 2 和第 3 对引物所扩增部分与黄牛的同源性仅为 97.08%, 但与 64 号个体的对应区域同源性高达 99.66%。因此可认为, 67 号牦牛个体 β 珠蛋白基因是 2 个等位基因 $\beta^{73A\ sn}$ 与 $\beta^{135A\ sn}$ 拼接在一起

的结果。

分析以上结果可知, 本试验检测到了中国牦牛 β 珠蛋白基因的 2 个等位基因 $\beta^{73A\ sn}$ 与 $\beta^{135A\ sn}$ 。67 号牦牛个体中检测到 2 个等位基因 $\beta^{73A\ sn}$ 与 $\beta^{135A\ sn}$, 64 号牦牛个体中检测到 1 个等位基因 $\beta^{135A\ sn}$, 1078 号个体检测到另一个等位基因 $\beta^{73A\ sn}$ 。Lalthantluanga 等^[4]测定了牦牛血红蛋白中 2 种类型 α 链及 2 种类型 β 链的氨基酸序列, 2 种类型 α 链之间存在 2 个氨基酸的不同, 而 2 种类型 β 链之间有 3 个氨基酸不同。也许他们当时也检测到 $\beta^{73A\ sn}$ 这个等位基因。

本试验将测定的牦牛 β 珠蛋白的氨基酸序列与已发表的其他牛 β 珠蛋白链的氨基酸序列进行比较, 发现其差异主要在 19, 50, 73, 117 和 135 位。等位基因 $\beta^{135A\ sn}$ 编码的第 135 位氨基酸为天冬酰胺(编码密码子为 AAT), 与已发表的其他牛 β 珠蛋白链此位置氨基酸完全不同, 已发表的牦牛 β_I 链为缬氨酸, β_{II} 链为丙氨酸, 欧洲野牛 β 链为苏氨酸, 黄牛、巴厘牛、大额牛和爪哇牛 β 链此位置的氨基酸均为丙氨酸。这表明等位基因 $\beta^{135A\ sn}$ 是中国牦牛 β 珠蛋白基因的一个特异性等位基因。

3 讨 论

刚开始克隆测定牦牛 β 珠蛋白基因的全序列时, 以 67 号牦牛个体的 DNA 为模板, 采用 3 对引物分别进行扩增, 每对引物的扩增产物都与下一对引物的扩增产物有一些重叠。这样虽可将全序列拼接出来, 但此方法有如下缺点, 即当这个个体的 β 珠蛋白基因在好几个位点上具有等位基因, 且恰好这几个位点处于不同引物的扩增产物中时, 这样拼接起来的全序列就不正确。从 67 号牦牛个体的扩增结果来看, 第 1 对引物是以等位基因 $\beta^{73A\ sn}$ 为模板扩

增, 而第2和第3对引物是以等位基因 $\beta^{35A\ sn}$ 为模板扩增, 这样拼接起来的全序列就很不准确, 因此决定采用1对引物对其全序列进行扩增。该引物的上游引物采用第1对引物的上游引物, 而下游引物是在将黄牛与人 β 珠蛋白基因序列的同源性进行比较之后, 重新设计的。实验结果表明, 该引物可将牦牛 β 珠蛋白基因全部扩增出来。

本试验中, 1078号和67号个体均检测到与黄牛相同的等位基因 $\beta^{3A\ sn}$ 。牦牛和黄牛属同一个属, 在进化上分化比较晚, 血缘关系很近, 像珠蛋白基因这样具有重要功能的基因, 一般比较保守, 在长期的进化中, 其氨基酸序列发生突变的频率比较低, 因此血缘关系较近的牦牛和黄牛拥有相同的 β 珠蛋白等位基因是非常可能的。

江家椿^[7]在海拔较高的那曲、加兴牦牛中, 发现一种变异的血红蛋白A₃, 他认为这可能是由于牦牛长期生活于高原低氧中而发生的适应性变异。安第斯山啮齿类动物的血红蛋白氧亲和力高于平原动物, 且随着海拔的增高, 动物动脉血氧饱和度达到50%时的氧分压降低, 动脉血氧饱和度增高^[8]。Monge和Whittembury对高原土生动物(羊驼、驼马、灰鼠、牦牛)与其各自的平原近亲动物(骆驼、兔子、牛以及各种鸟类)的研究结果表明, 高原土生动物的2, 3-二磷酸甘油酸含量低于平原近亲动物, 动脉血氧饱和度达到50%时的氧分压也低于平原近亲动物, 这两者共同作用引起氧解离曲线左移, 使氧亲和力增加, 氧易在肺部结合, 使机体保持了较高的动、静脉氧饱和度, 从而使组织获得足够的氧气以满足生理需要^[2]。Chappell等^[9]和Snyder^[10]研究发现, 生活在安第斯山的鹿鼠, 其 α -珠蛋白基因单倍型a^oc^o的频率在高海拔群体中占优势, 而单倍型a^lc^l的频率在低海拔群体中占优势, 具有单倍型a^oc^o的鹿鼠其血红蛋白氧亲和力高, 而具有单倍型a^lc^l

的鹿鼠其血红蛋白的氧亲和力反而低。当将具有这2种单倍型的鹿鼠放到海拔与它们生活地海拔相反的地区时, 其血红蛋白的氧亲和力与原地生活的没有太大变化。该试验结果以及Snyder^[10]的试验结果均表明, 当个体适应于新的海拔环境时, 虽然血液学参数、酸碱数值、血液-气体运输变化很大, 而血红蛋白氧亲和力却未发生变化, 这也许可以表明, 血红蛋白氧亲和力是受遗传控制的, 不会随环境的变化而发生代偿性变化。

从64和67号牦牛个体的DNA中检测到了中国牦牛特有的一个等位基因 $\beta^{35A\ sn}$ 。分析这个特异等位基因所在个体的来源发现, 64和67号牦牛个体均来自河北省红松洼种畜场, 而红松洼种畜场(海拔1700m)的牦牛是从海拔3200~4800m的青海省和甘肃省分别于1974和1991年引进的。根据前面的文献结果, 长期生活在高海拔地区的个体其血红蛋白氧亲和力高, 而长期生活在低海拔的个体其血红蛋白氧亲和力低。那么, 把牦牛从青海、甘肃等高海拔地区引种到低海拔的河北省时, 经过30多年对低海拔环境的适应, 牦牛血红蛋白的遗传结构就会产生适应于低海拔的变化, 即可能发生使血红蛋白氧亲和力降低的变化。由本试验结果可知, 64和67号个体 β 珠蛋白基因所编码的第135位氨基酸发生了变异, 由缬氨酸或丙氨酸突变为天冬酰胺。天冬酰胺为亲水性氨基酸, 体积为117.7 Å³, 可接触表面积为160 Å²; 丙氨酸和缬氨酸均为疏水性氨基酸, 但后者的疏水性更强, 丙氨酸的体积为88.6 Å³, 可接触表面积为115 Å², 缬氨酸的体积为140 Å³, 可接触表面积为155 Å²。这种变异, 即由与牦牛血红蛋白高氧亲和力有关的强疏水性的缬氨酸突变为强亲水性的天冬酰胺, 有可能引起牦牛血红蛋白的氧亲和力降低。但是否真的会降低, 作者将从模拟建立的牦牛血红蛋白三维结构上, 进一步进行阐明。

[参考文献]

- [1] 蔡立. 中国牦牛[M]. 北京: 农业出版社, 1992
- [2] Uest J B, Lahiri S. 高原与人[M]. 梁兵, 译. 北京: 民族出版社, 1991: 76-77
- [3] Lalthantluanga R, Braunitzer G. The primary structure of the beta I- and beta II-chains of yak hemoglobins (Bovidae) [J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1981, 362(10): 1405-1409
- [4] Lalthantluanga R, Wiesner H, Braunitzer G. Studies on yak hemoglobin (Bos grunniens, Bovidae): structural basis for high intrinsic oxygen affinity [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1985, 366(1): 63-68
- [5] Weber R E, Lalthantluanga R, Braunitzer G. Functional characterization of fetal and adult yak hemoglobin: an oxygen binding cascade and its molecular basis [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 1: 199-303
- [6] 萨姆布鲁 J, 弗时奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫等, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 465-467

- [7] 江家樵. 不同海拔高度牦牛西藏高原若干血液生理常值的比较[J]. 畜牧兽医学报, 1991, 22(1): 20-26
- [8] Ramirez G, Bittle P A, Rosen R, et al. High altitude living: genetic and environmental adaptation[J]. *Aviat Space Environ Med*, 1999, 70(1): 73-81.
- [9] Chappell M A, Snyder L R G. Biochemical and physiological correlates of deer mouse α -chain hemoglobin polymorphism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 5484-5488
- [10] Snyder L R. Low P_{50} in deer mice native to high altitude[J]. *J Appl Physiol*, 1985, 58(1): 193-199

Cloning and sequencing analysis of Chinese yak β globin gene

YUAN Qing-yan¹, ZHANG Qing-bo¹, HUANG Zhi-guo¹, XIE Zhuang¹,

YIN Pu-lu², ZHAO Yong-hua³

(1 College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Hongsongwabreeder Farm, Chengde, Hebei 310034, China;

3 Longribreeder Farm, Hongyuan, Sichuan 624400, China)

Abstract: Yak β globin is amplified by primers designed from cattle β globin gene. The cloning and sequencing results indicate that they have very high homology with cattle β globin gene with a value of above 97%. Two alleles, $\beta^{3A\ sn}$ and $\beta^{35A\ sn}$, were detected at β globin locus in Chinese yak. The sample 67 has these two alleles, while individual 64 has allele $\beta^{35A\ sn}$ and individual 1078 has allele $\beta^{3A\ sn}$. The allele $\beta^{35A\ sn}$ is the characteristic of Chinese yak after residue blasting. It is suggested that the $\beta^{135A\ sn}$ of this allele could reduce the oxygen affinity of yak hemoglobin.

Key words: yak; β globin gene; allele; oxygen affinity

(上接第 99 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)01-0097-EA

Preliminary study on improving the extraction technology of the Swainsonine from *Oxytropis kansuensis*

LIU Zhi-bin, ZHAO Xing-hua, YU Yong-tao, WANG Jian-hua

(College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 1.5 kg *Oxytropis kansuensis* powder was disposed with 40 kHz ultrasound in water to substitute the traditional Soxhlet extraction technology or the extraction in cold solvent. After concentration and removal of the impurity, n-butanol extracted by sparse acid was employed. The concentrated acid liquid was extracted with ammoniated chloroform, which was then concentrated to residue. The residue was sublimed in 100 °C olefin and 24 mg white crystal, which was preliminary determined as swainsonine was collected. This method simplified the extraction and the extraction rate reached 16 mg/kg.

Key words: swainsonine; ultrasound; *Oxytropis kansuensis*