

天门冬 AFLP 反应体系的建立及优化

欧立军^{1,2,3}, 黄园³, 王俞人³, 谭智文³

¹民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南怀化 418008;

²湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南怀化 418008;

³怀化学院生命科学系, 湖南怀化 418008)

摘要:为探讨天门冬种质间遗传多样性奠定基础, 采用单因子试验, 建立并优化了天门冬 AFLP 反应体系, 研究酶的用量、酶切时间、预扩增体系和选择性扩增等对 PCR 扩增的影响。酶切反应体系加入 5.0 U *EcoR* I 和 *Mse* I 于 37℃ 保温 3 h; 连接反应体系加入 1.0 U T₄-DNA 连接酶、2.0 pmol *Mse* I 接头和 2.0 pmol *EcoR* I 接头, 16℃ 保温过夜; 选择性扩增反应体系加入 1.0 U Taq DNA 聚合酶, 0.4 μL *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性引物; 并筛选得到了 8 对清晰、多态性高的 AFLP 引物。17 份天门冬种质对建立的 AFLP 反应体系检验, 证明该体系稳定可靠, 可用于天门冬种质多样性的分析。

关键词:天门冬; AFLP; 体系优化

中图分类号: Q751

文献标志码: A

论文编号: 2010-3100

Establishment and Optimization of AFLP Analysis System in *Asparagus*

Ou Lijun^{1,2,3}, Huang Yuan³, Wang Yuren³, Tan Zhiwen³

¹Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua Hunan 418008;

²Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua Hunan 418008;

³Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua Hunan 418008)

Abstract: To establish and optimize AFLP reaction system for *Asparagus* and lay foundation to analyze its genetic diversity, the single-factor was applied for optimizing four factors in the reaction system including restriction enzyme amount, time of digestion, preamplification system and final amplification. The DNA was completely digested by 5 U enzyme *EcoR* I and *Mse* I in 37℃ water-baths for 3 h. The digested fragments were legated with 2.0 pmol *EcoR* I, 2.0 pmol *Mse* I adaptors and 1 U T₄-DNA ligase at 16℃ to stand overnight. The Final amplification system included 1.0 U Taq polymerase, 0.4 μL *EcoR* I and *Mse* I primers. On this basis, 8 primers were screened with stable amplification and rich polymorphism. It was proved that this system was stable and credible. This optimized AFLP system would provide the basis for the genetic analysis of *Asparagus*.

Key words: *Asparagus*; AFLP; system optimization

0 引言

天门冬 [*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.] 为百合科天门冬属植物, 原产非洲, 中国主产于贵州、云南、四川、湖南、湖北等省, 是传统的中草药, 在中国已有几千年的使用历史, 在《神农本草经》和《千金方》等中均有记载, 是多个民族的常用药。目前, 对天门冬的研

究主要集中在化学成分、药理药效及临床应用等方面, 多项研究表明天门冬主要成分为糖类^[1-2]、氨基酸类^[3]、皂苷类^[4]等, 天门冬的临床应用主要集中在治疗乳腺小叶增生^[5]、治疗恶性淋巴肉瘤^[6]、镇咳、祛痰及平喘作用^[7]等方面, 以往主要采用形态学、孢粉学和显微结构等方面进行天门冬的物种鉴定^[8-12], 上述方法主

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目“天门冬种质资源遗传多样性与种质创新研究”(09K106)。

第一作者简介: 欧立军, 男, 1976 年出生, 湖南长沙人, 博士, 研究方向: 药用植物遗传与分子生物学。通信地址: 418008 湖南省怀化市迎丰东路 612 号, E-mail: ou9572@126.com。

收稿日期: 2010-11-02, 修回日期: 2010-12-23。

要是针对某几个物种且不能有效的进行区分,从而导致出现了较多的天门冬药材赝品。

AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术是基于PCR技术扩增基因组DNA限制性片段,基因组DNA先用限制性内切酶切割,然后将双接头连接到DNA片段的末端,接头序列和相邻的限制性位点序列,作为引物结合位点。它结合了RFLP和PCR技术特点,具有RFLP技术的可靠性和PCR技术的高效性。由于AFLP扩增可使某一品种出现特定的DNA谱带,而在另一品种中可能无此谱带产生。因此,这种通过引物诱导及DNA扩增后得到的DNA多态性可作为一种分子标记。AFLP分子标记检测出的多态位点覆盖整个基因组,易于标准化,且稳定性好、谱带丰富和灵敏度高^[13]。近年来,已普遍应用于药用植物DNA指纹图谱的构建^[14-15]、种质资源的鉴定^[16]和遗传多样性分析^[17]等方面的研究。欲进行AFLP分析,必须先建

立其优化体系,不少药用植物的AFLP体系已经得到和应用^[18-19]。本研究采用单因素实验设计,建立天门冬AFLP优化体系,为天门冬种质的鉴定和亲缘关系的确定等方面的研究等提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

采自湖南、贵州、广西、浙江等省的17份不同居群天门冬种质,经怀化学院曾汉元教授鉴定(表1)。采用CTAB法提取基因组DNA,用1.0%琼脂糖电泳和核酸检测仪检测DNA质量浓度,并稀释至30 ng/ μ L,存于-20℃冰箱备用。

Mse I 和 *Eco*R I 限制性内切酶、*T*₄-DNA 连接酶、*Taq* 聚合酶、2000 bp Marker 购自上海生物技术有限公司,广谱高密度 Marker 购自北京恩泽基因科技有限公司。*Mse* I / *Eco*R I 接头、*Mse* I / *Eco*R I 核心引物及 *Mse* I / *Eco*R I 选择性扩增引物由上海生物技术有限

表1 用于 AFLP 分析的不同居群天门冬

编号	居群	编号	居群
1	浙江杭州	10	贵州沿河宝塘
2	贵州独山	11	广西南宁
3	广东广州	12	贵州凯里
4	湖南衡山	13	贵州福泉
5	贵州余庆	14	贵州瓮安珠藏
6	湖南永州	15	贵州花溪
7	湖南新宁	16	贵州黔西
8	湖南坪阳	17	贵州兴义
9	湖南甘溪		

公司合成。

1.2 双酶切

天门冬基因组DNA样品同时用*Eco*R I 和 *Mse* I 进行双酶切,每种酶的用量作8个的处理:1、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 U,酶切反应体系如下:2 μ L Buffer、0.2 μ L 100 \times BSA,根据处理添加*Eco*R I (20 U/L) 和 *Mse* I (0 U/L);200 ng DNA 模板;加灭菌超纯水至总体积为20 μ L。酶切体系置于37℃水浴酶切10 h,然后放进70℃水浴10 min,灭去酶活性。取5 μ L 双酶切产物于1.6%琼脂糖上电泳,观察结果,选择适合的酶量。

取天门冬基因组样品同时进行*Eco*R I 和 *Mse* I 双酶切,使用上述试验确定的酶用量,酶切时间分别设置为1、2、3、4、5和6 h,酶切反应结束后70℃水浴10 min灭酶活性。选择适合的酶切时间。

1.3 连接

基因组DNA双酶切产物与*Eco*R I 和 *Mse* I 接头连接,连接反应体系为:2.5 μ L 10 \times *T*₄-DNA Ligase Buffer、0.4 μ L *Eco*R I 接头(5 pmol/ μ L)和0.4 μ L *Mse* I 接头(50 pmol/ μ L)、1 U *T*₄-DNA Ligase、15 μ L DNA 双酶切产物,补充灭菌超纯水至25 μ L,16℃过夜。

1.4 预扩增反应体系的优化

用DNA连接产物作模板,用有一个选择性碱基的引物E+AAT和没有选择性碱基的引物M0进行预扩增,对扩增体系的dNTPs、Mg²⁺、引物、DNA模板和*Taq*酶5个因素进行L16(4⁵)的PCR正交试验。PCR反应程序是:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;最后72℃延伸5 min。

1.5 选择性扩增

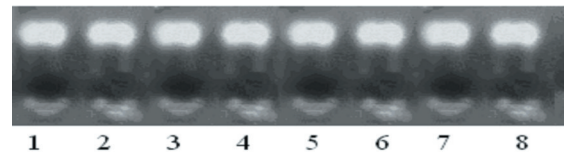
预扩增产物用灭菌超纯水稀释20倍作模板,对引

物 E1-E16 和 M1-M16 进行随机配对, 采用经优化的反应体系进行扩增, 挑选扩增产物片段大小合适, 分布较均匀的引物组合。PCR 反应条件: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 接下来的 12 个循环, 每个循环降低 0.7℃; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 23 循环; 最后 72℃ 5 min, 4℃ 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

DNA 提取的结果所提取的基因组 DNA 的 A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间, 电泳图条带清晰无拖尾(图 1), 说明所提取的基因组 DNA 完整且质量较高, 符合



泳道 1~8 为天门冬种质, 参考表 1

图 1 部分天门冬基因组 DNA

AFLP 分析的要求。

2.2 双酶切酶量和酶切时间的确定

酶切结果显示, 8 种处理的酶量均能把基因组 DNA 切为弥散状的条带(图 2-a), 酶量小于 4 U 时仍有些大于 2000 bp 的片段, 酶切不够彻底; 而当酶量为 5 U

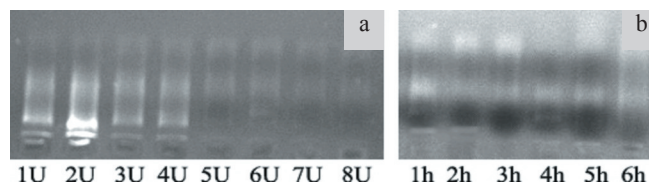


图 2 不同水平酶量(a)和酶切时间(b)效果图

或 5 U 以上时酶切彻底, 酶切片段都在 1000 bp 以下, 因此选用 5 U 的酶用量。1~2 h 酶切不彻底, 3~6 h 均能完全酶切, 片段大小在 100~1000 bp 之间(图 2-b), 选择 3 h 为实际酶切时间。

2.3 预扩增体系的确定

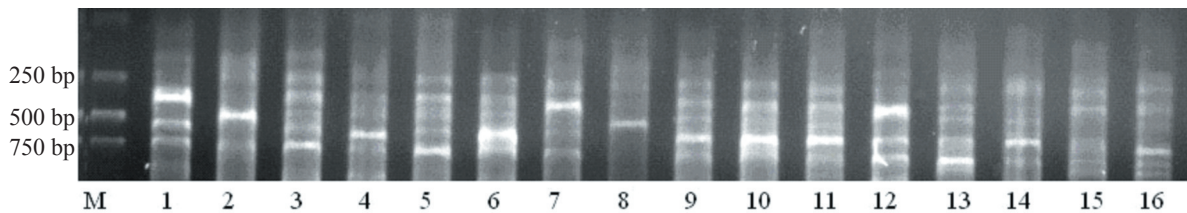
预扩增正交试验结果表明, 8 号组合的扩增产物在 750 bp 以下(图 3), 片段大小比较适合, 故选用 8 号预扩增体系, 即: 2 μL 10×PCR Buffer、0.6 μL dNTPs、0.4 μL 引物 E、0.4 μL 引物 M、1.0 U *Taq* 酶、2 μL 模板, 补充灭菌超纯水至 20 μL。

2.4 选择性扩增体系的确定

经过筛选, 有 8 对引物的扩增产物分布较均匀、产物片段大小合适(表 2)。对 17 个天门冬居群 DNA 样品用选择性引物 E+AAC/M+CTC 进行扩增, 结果显示了不同居群的多态性(图 4), 这说明建立的 AFLP 技术体系符合研究要求。

3 结论与讨论

AFLP 反应体系中, 不同的植物种类有不同的适宜酶切时间、酶的用量和引物等, 因此不同的植物需要进行体系的建立与优化。笔者通过正交和单因素试验

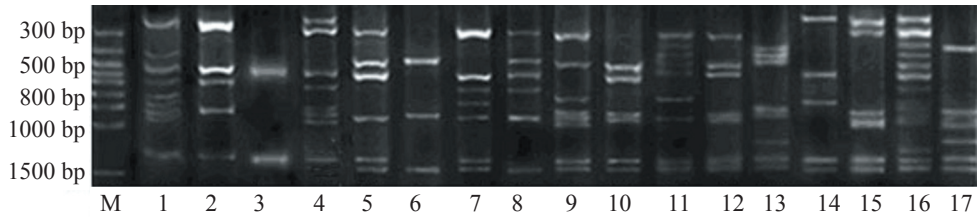


M 为 Marker, 1~16 为正交试验编号

图 3 正交试验电泳图

表 2 筛选得到的 AFLP 引物

编号	<i>EcoR</i> I 引物	<i>Mse</i> I 引物	编号	<i>EcoR</i> I 引物	<i>Mse</i> I 引物
1	E+AAC	M+CAG	5	E+AGT	M+CTC
2	E+ AAC	M+ AAC	6	E+ATT	M+CTG
3	E+AAG	M+CAC	7	E+ATA	M+CGG
4	E+AGA	M+CG A	8	E+ATC	M+CGC



M 为 Marker, 1~17 为天门冬种质, 顺序参考表 1

图 4 优化的 AFLP 反应体系对 17 份天门冬种质 DNA 扩增结果

及体系的优化, 适宜于天门冬 AFLP 分析的扩增体系, 并筛选得到了 8 对清晰、多态性高的 AFLP 引物, 这为天门冬 DNA 指纹图谱的构建、种质资源的鉴定和遗传多样性分析等方面的研究奠定了基础。

一般进行 AFLP 分析都采用聚丙烯酰胺胶电泳^[20], 其优点是分辨率高, 可达 1 bp, 但同时存在如电泳有很多干扰的影子带, 有时很容易误认为是多态性条带和操作复杂, 耗时长, 需要技术熟练等不足。相比而言, 高浓度的琼脂糖凝胶电泳是更好的分辨方法, 虽然分辨力不及前者, 但提高琼脂糖浓度足以分辨几个 bp 的差异, 且无影子带干扰, 只要筛选到合适的引物, 其快捷简便低廉的优点更适于实际应用, 因此本研究全部采用高浓度的琼脂糖凝胶。

AFLP 体系的建立涉及到很多方面。首先是基因组 DNA 的质量, 如果纯度不高, 杂质多则影响酶切效果, 一般说来, 采用 CTAB 法提取 DNA 时加入蛋白酶和 RNAase 酶, 抽提时注意操作, 最后做个纯化得到的 DNA 能满足 AFLP 分析的要求; 其次, 酶的用量和酶切时间也是影响 AFLP 体系建立的重要因素, 酶切不充分时, 会出现大片段和只有部分酶切片段, 而 AFLP 指纹在完全酶切和不完全酶切及有大片段存在时产生的效果大不相同; 最后, 还有预扩增和选择性扩增体系的优化。只有把影响 AFLP 效果的各个因子找准, 才能准确地进行 AFLP 分析。

参考文献

[1] 杜旭华, 郭允珍. 抗癌植物药的开发研究 IV. 中药天门冬的多糖类抗癌活性成分的提取与分离[J]. 沈阳药学院学报, 1990, 7(3): 197.
 [2] 李志孝, 黄成钢, 蔡育军, 等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学报, 2000, 35(5): 358-362.
 [3] 倪京满, 赵汝能, 王锐. 天门冬炮制前后氨基酸含量比较[J]. 中草药,

1992, 23(4): 182.
 [4] Liang Z Z, Aquino, R. Simone D, et al. Oligofurostanosides from *Asparagus cochinchinensis* L[J]. *Planta Med*, 1988, 54(4): 344-346.
 [5] 沈梓云, 平金良. 三苯氧胺、天门冬素治疗乳腺增生 513 例疗效分析[J]. *综合临床医学*, 1997, 13(2): 138-139.
 [6] Zhang H J, Sydara K, Tan G T, et al. Bioactive constituents from *Asparagus cochinchinensis* L[J]. *J Nat prod*, 2004, 67(2): 194-200.
 [7] 罗俊, 龙庆德, 李诚秀, 等. 地冬与天门冬的镇咳、祛痰及平喘作用比较[J]. *贵阳医学院学报*, 1998, 23(2): 132-134.
 [8] 张天友, 秦松云. 四川天门冬属植物资源[J]. *资源开发与保护*, 1992, 8(4): 268-269.
 [9] 倪京满, 赵汝能. 甘肃天门冬属植物花粉形态学的比较观察[J]. *兰州医学院学报*, 1990, 16(1): 17-19.
 [10] 徐杰, 赵一之, 田桂泉. 蒙古高原天门冬属植物分支系统演化的研究[J]. *内蒙古大学学报*, 2003, 34(3): 325-329.
 [11] 雷国莲, 李爱萍, 赵志梅. 羊齿天门冬的生药鉴定[J]. *西北药学杂志*, 1995, 10(2): 62-64.
 [12] 张天友, 秦松云. 四种天门冬的生药鉴别[J]. *中药材*, 1992, 15(8): 15-17.
 [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
 [14] 谢渊, 张小蕾, 李毅, 张婷, 单可人. 天麻 AFLP 分析技术体系的建立[J]. *生物技术*, 2007, 17(1): 46-48.
 [15] 王志安, 徐行, 沈晓霞, 等. 白术种质 AFLP 指纹图谱分析体系的建立和应用[J]. *中药材*, 2008, 31(4): 483-487.
 [16] 张杰, 徐涛, 张建光, 陈集双. 半夏栽培品遗传差异的 AFLP 分析[J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1884-1889.
 [17] 郑林用, 贾定洪, 罗霞, 等. 药用灵芝遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(17): 1733-1736.
 [18] 沈宇峰, 孙乙铭, 沈晓霞, 等. 夏枯草种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(3): 260-262.
 [19] 葛淑俊, 李广敏, 马峙英, 等. 甘草野生种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(1): 47-54.
 [20] 罗成, 刘锦, 顾蔚, 等. 华中五味子 AFLP 反应体系的建立[J]. *生物技术*, 2009, 19(2): 37-40.