

厚朴 AFLP 分子标记体系的建立

蒋燕锋, 斯金平, 黄华宏, 程龙军

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 以厚朴 *Magnolia officinalis* 为材料, 通过对扩增片段长度多态性(AFLP)反应体系中的酶切模板用量、扩增条件等几个方面进行优化, 建立了较为理想的厚朴 AFLP 反应体系。结果表明: ①采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)硅珠法提取的 DNA 质量较好, 适用于 AFLP 分析。②酶切的基因组 DNA 以 400 ng 为宜; 预扩增产物的稀释倍数以 30 倍为宜; 20.00 μL 选扩反应体系中 Mg^{2+} 最佳浓度为 $2.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 三磷酸脱氧核苷酸 (dNTPs) 最佳浓度为 $0.225 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶最佳用量为 16.67 nkat 时, 扩增带清晰且稳定, 扩增效果较好。旨在为研究厚朴天然种群的遗传多样性及遗传结构分析、新品种选育及鉴定和遗传图谱构建等奠定理论基础。图 7 表 1 参 12

关键词: 中草药; 厚朴; 扩增片段长度多态性; 中药材

中图分类号: S722.3; R282.71 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2010)02-0304-06

An AFLP molecular labeling technique for *Magnolia officinalis*

JIANG Yan-feng, SI Jin-ping, HUANG Hua-hong, CHENG Long-jun

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To establish an efficient and stable amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis system for *Magnolia officinalis*, selection and optimization of DNA template treatments and selective amplification conditions were undertaken using the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)- SiO_2 method for mapping. Results indicated that: High quality DNA samples were obtained with the CTAB- SiO_2 method and the DNA template used was 400 ng. The best treatments for the analysis were Mg^{2+} of $2.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) of $0.90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and *Taq* DNA polymerase of 16.67 nkat. This research showed that the CTAB- SiO_2 method was fit for AFLP analysis on *Magnolia*, that a 30 times dilution for the pre-amplification products could be used for selective amplification, and that the silver-staining AFLP system could provide a method for further study with molecular markers in the field of genetic diversity, for breeding new cultivars, and for genetic relationships with *Magnolia officinalis*. [Ch, 7 fig. 1 tab. 12 ref.]

Key words: Chinese herbal medicine; *Magnolia officinalis*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); Chinese medicine

中药材厚朴为木兰科 Magnoliaceae 植物厚朴 *Magnolia officinalis* 或凹叶厚朴 *M. officinalis* var. *biloba* 的干燥干皮、枝皮和根皮^[1]。前者主要分布于四川、湖北等省, 称为“川朴”, 其叶型为小凸尖叶; 后者主产于湖南、浙江、广西、福建等省, 称为“温朴”, 其叶型为凹叶。两者之间还有许多在叶形上呈中间状态的过渡类型。厚朴是中国特有的常用中药材, 长期以来主要利用野生资源。一方面因资源过度消耗, 日益枯竭, 另一方面因利用野生资源而导致品质参差不齐, 严重制约了厚朴药材现代化

收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-05-20

基金项目: 浙江省重大科技计划项目(2005C32052)

作者简介: 蒋燕锋, 从事药用植物遗传育种研究。E-mail: jyfeng1128@163.com。通信作者: 斯金平, 教授, 从事中药资源与良种选育等研究。E-mail: lssjp@163.com

国际化进程。厚朴因其特殊的分类地位和资源的日益枯竭而先后被列为国家珍稀濒危植物和二级保护中药材。厚朴中药材的质量控制和品质评价对保护和发展厚朴资源，满足中药现代化、产业化和国际化的要求尤为重要。扩增片段长度多态性(AFLP)是限制性片断长度多态性(RFLP)技术和聚合酶链式反应(PCR)技术的结合。AFLP 标记具有不需要预先知道基因组背景、多态位点丰富、灵敏度高和重复性好等优点，克服了 RFLP 检测位点有限和随机扩增多态性 DNA(RAPD)不稳定等缺点^[2]。AFLP 问世后便在树木的数量性状定位、种质资源鉴定、遗传连锁图谱构建、群体遗传结构及多样性研究、演化和亲缘关系研究等方面得到了广泛的应用^[3-8]，而对于厚朴来说，目前仅有郭宝林等^[9]利用 RAPD 技术探讨了厚朴种内关系和道地性问题。笔者以不同类型厚朴为试材，对实验过程中影响 AFLP 分析的酶切、连接、预扩增及选择性扩增的各个环节依次进行了优化，最终建立了适合厚朴的较为理想的 AFLP 分析体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

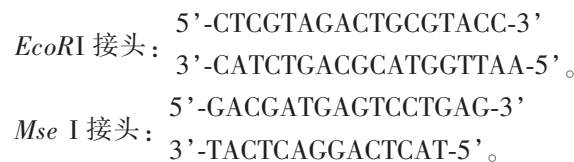
根据已有厚朴研究，于 9 月下旬至 10 月上旬(厚朴种子成熟期)在湖北鹤峰、浙江景宁、广西资源等 3 个分别代表小尖叶型、中间型及凹叶型的种源地种子，去掉外果皮后湿沙混藏。初春播种育苗于浙江林学院林木遗传育种科研苗圃。

采集正常生长的嫩叶，用冰壶带回实验室，液氮速冻后置 -70 ℃ 冰柜保存。

1.2 方 法

1.2.1 模板 DNA 的制备与检测 实验采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)-硅珠吸附法^[10]提取不同样品的厚朴叶片 DNA，用 NanoDrop 微量分光光度计(ND-1000)测定 DNA 的纯度和浓度。同时每个样品取 5 μL，加 1 μL 上样缓冲液混合后，于 10.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶进行电泳检测，在凝胶成像系统(Gel Doc™, Bio-Rad)下观察并照相。

1.2.2 DNA 的酶切与连接 酶切反应采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 双酶切组合，参考白桦 *Betula platyphylla* 基因组双酶切体系^[11]略作修改。厚朴的酶切体系为 *EcoR* I(20 × 16.67 mkat·L⁻¹, NEB)0.15 μL, *Mse* I(10 × 16.67 mkat·L⁻¹, NEB)0.30 μL, 10 × NEB buffer 5.00 μL, 100 × 牛血清蛋白(BSA)0.30 μL, 加双蒸水至 25.00 μL。模板 DNA 用量为 100 ~ 700 ng, 在 37 ℃ 水浴酶切 1 ~ 6 h 后放入 75 ℃ 水浴 15 min, 使酶失活后，立即置于冰上冷却。取 5.00 μL 反应液与 1.00 μL 上样缓冲液混合，于 10.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测。连接体系 25.00 μL, 含酶切产物 20.00 μL, T4 Ligase(400 × 16.67 mkat·L⁻¹, NEB)0.10 μL, *EcoR* I 接头(E 接头, 10.0 μmol·L⁻¹)0.50 μL, *Mse* I 接头(M 接头, 10.0 μmol·L⁻¹)1.00 μL, 10 × buffer 2.00 μL, 双蒸水 1.40 μL。16 ℃ 连接过夜。接头序列如下：



1.2.3 预扩增反应 预扩增反应体系：连接产物 2.00 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 × 16.67 mkat·L⁻¹, NEB)0.20 μL, E + A 引物(50 mg·L⁻¹)1.00 μL, M + C 引物(50 mg·L⁻¹)1.00 μL, 三磷酸脱氧核苷酸 dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹, TaKaRa)1.60 μL, 10 × PCR buffer 2.00 μL, 加双蒸水至 20.00 μL。预扩增在 ABI9700 PCR 仪上进行。反应程序为：94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min, 4 ℃ 保持。取 5.00 μL 预扩增产物与 1.00 μL 上样缓冲液混合后于 15.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳检测预扩增效果。

1.2.4 选择性扩增反应及其优化 选择性扩增的好坏直接关系银染效果的好坏，因此，选择扩增的优化至关重要。预扩增产物稀释一定倍数后进行选择性扩增，选择性碱基数为 3。反应体系为：稀释后的预扩增产物 2.00 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 × 16.67 mkat·L⁻¹, NEB)0.20 μL, E + ANN 引物(20 mg·L⁻¹)0.30 μL, M + CNN 引物(20 mg·L⁻¹)1.80 μL, dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹, TaKaRa)1.60 μL, Mg²⁺(25.0 mmol·

L⁻¹)1.00 μL, 10 × PCR buffer 2.00 μL, 加双蒸水到 20.00 μL。预扩增在 ABI9700 PCR 仪上进行。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s(以后降低 0.7 °C·循环⁻¹), 72 °C 1 min, 13 个循环; 然后在退火温度 56 °C, 其余条件不变的情况下, 再进行 23 循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保持。在此基础上, 我们从 4 个因素的多个水平进行选择性的优化(表 1), 4 个因素逐一优化, 且一个因素优化后的结果在后续因素的优化过程中固定下来。

1.2.5 PAGE 电泳及银染检测 反应结束后, 选择性扩增产物与上样缓冲液(体积分数为 98% 甲酰胺; 10.0 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 8.0; 体积分数为 0.25% 溴酚蓝; 体积分数为 0.25% 二甲苯青)等体积混合, 95 °C 6 min 后迅速将 PCR 管置于冰上以保持变性状态, 然后置于 -20 °C 冰箱用于后续的电泳检测。本实验中采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测^[12]。银染后的板晾干后在胶片观察灯下观察, 选择那些具有清晰条带的引物作为 AFLP 反应的最佳引物。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取与检测

CTAB-硅珠吸附法提取的厚朴叶片 DNA 经过琼脂糖凝胶电泳检测, 条带十分清晰明亮且无拖尾、背景干扰等现象(图 1), 表明蛋白质等杂质去除较干净, 纯度较高。经测定, 吸光度 D_{260}/D_{280} 比值在 1.8 左右, 但质量浓度相对较低, 在 90.0 mg·L⁻¹ 左右。

2.2 AFLP 反应体系的优化

本实验分别用 100 ~ 600 ng 不同样品的 DNA 进行酶切、连接、预扩增和选择性扩增, 结果在 15.0 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶上电泳检测。以湖北五峰种源的厚朴为例(下同), 扩增条带绝大部分为 100 ~ 750 bp, 且 400 bp 左右较为明亮(图 2)。最后经 60.0 g·L⁻¹ 变性聚丙烯酰胺变性胶电泳, 发现 DNA 浓度的不同没有导致 DNA 条带多寡的变化, 而且条带的清晰度也差别不大, 因此考虑 DNA 使用量居中, 为 400 ng。

表 1 选择性扩增各因素处理方案

反应因子	处理或终浓度
预扩产物稀释倍数	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 倍
dNTPs	0.150, 0.175, 0.200, 0.225, 0.250, 0.300, 0.350 mmol·L ⁻¹
Mg ²⁺	1.50, 1.75, 2.00, 2.25 mmol·L ⁻¹
Taq DNA 聚合酶	8.34, 16.67, 25.00, 33.34, 41.68 nkat

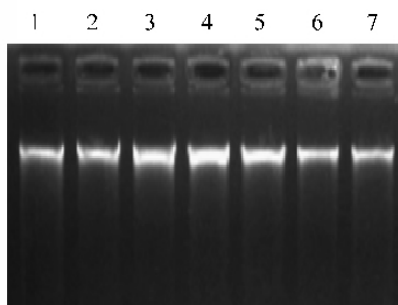
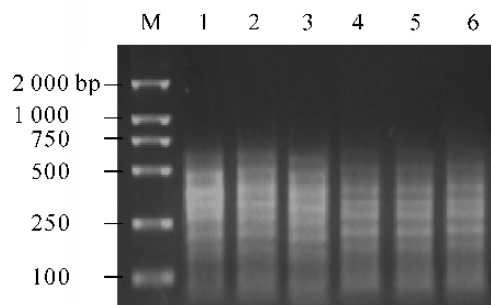


图 1 CTAB 硅珠法提取的 DNA 的琼脂糖电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted by CTAB-SiO₂ method



M. DNA Maker; 1~6. DNA 用量依次为 600, 500, 400, 300, 200, 100 mg

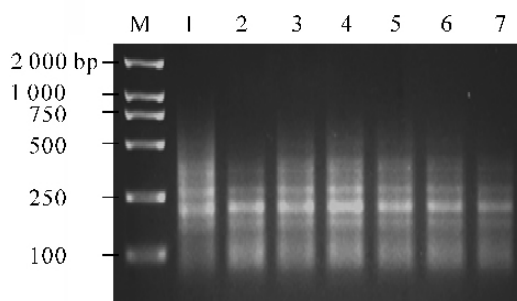
图 2 不同 DNA 用量对选择性扩增结果的影响

Figure 2 Effect of different DNA treatments on selective amplification result

预扩产物的用量对选择性扩增结果有重要影响。实验中湖北五峰种源的厚朴 DNA 经酶切、连接和预扩后, 预扩产物分别按 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 和 1:60 进行稀释, 选择性扩增后在 15.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳检测。发现稀释倍数为 20, 30 和 40 倍时, 条带较清楚且较明亮, 在 200 ~ 300 bp 之间明亮度最高, 片段扩增量较多(图 3)。而 30 稀释倍数是其中条带清晰度和明亮度是最好的, 故实验选用 30 稀释倍数。

dNTPs, Mg^{2+} 和 *Taq* DNA 聚合酶是影响扩增效果的关键因素。不同物种的 AFLP 分析中, dNTPs, Mg^{2+} , *Taq* DNA 聚合酶的最适浓度会有所不同。

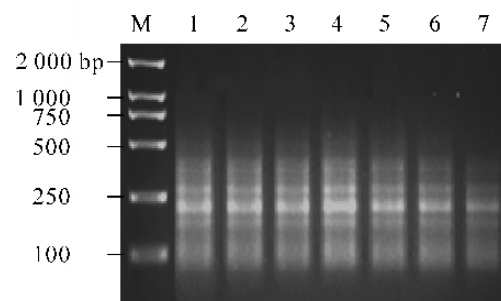
体系中的 dNTPs 是 PCR 反应的原料物质, 是反应必不可少的组分之一。厚朴研究发现, 体系中不同 dNTP 的浓度对扩增结果没有显著影响, 但浓度增加可稍微提高扩增产物的得率(图 4)。因此, 综合考虑试验成本和扩增效率, 选择厚朴 AFLP 选择性扩增中 dNTP 浓度为 $0.225 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



M: DL2000 DNA marker; 1~7: 预扩增产物的稀释倍数分别为 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60

图 3 不同稀释倍数预扩增产物的选择性扩增结果

Figure 3 Different selective amplification results with different dilution multiple of pre-amplification products



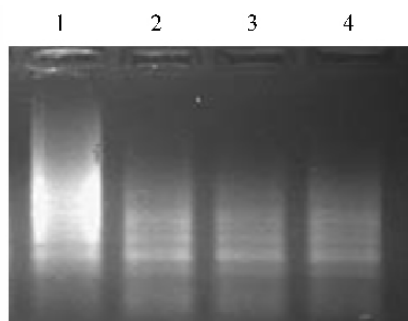
M: DL2000 DNA marker; 1~7: dNTPs 浓度分别为 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 4 不同 dNTPs 浓度对选择性扩增的影响

Figure 4 Effect of dNTPs concentration on selective amplification result

Mg^{2+} 可以影响酶的活性、扩增的真实性以及产物的特异性, 故 Mg^{2+} 浓度也是反应中不可或缺的重要因素之一。研究发现, 随着 Mg^{2+} 的浓度的增加, 扩增也越来越清晰。而当 Mg^{2+} 的浓度达到 $2.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 出现了非特异性扩增, Mg^{2+} 会与 dNTP 结合而影响扩增效率(图 5)。因此, 厚朴 AFLP 选择性扩增体系中 Mg^{2+} 的浓度为 $2.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

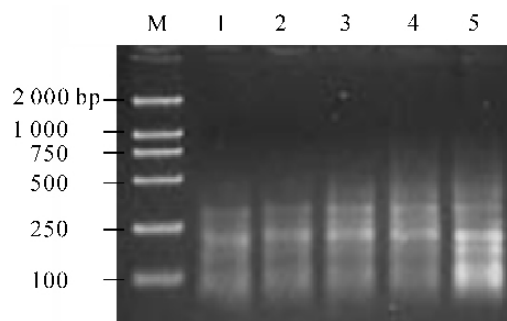
Taq DNA 聚合酶在扩增体系中起关键作用。研究发现, 聚合酶为 $8.34 \sim 33.34 \text{ nkat}$ 时扩增产物相对较集中, 且随着酶的增加, 集中的 PCR 产物带较清晰; 41.68 nkat 时可能酶的使用量过大而出现非特异性扩增(图 6)。综合考虑, 确定 $20.00 \mu\text{L}$ 反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶使用量为 16.67 nkat 。



1~4: Mg^{2+} 浓度分别为 2.25, 2.00, 1.75, 1.50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 5 不同 Mg^{2+} 浓度对选择性扩增的影响

Figure 5 Effect of Mg^{2+} concentration on selective amplification result



M: DL2000 DNA marker; 1~5: *Taq* DNA 聚合酶活性分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5($\times 16.67 \text{ nkat}$)

图 6 不同 *Taq* DNA 聚合酶用量的选择性扩增结果

Figure 6 Different treatments of *Taq* DNA enzyme on selective amplification result

2.3 厚朴 AFLP 优化反应体系的验证

为了验证上述实验获得的厚朴 AFLP 优化体系的可靠性, 我们对不同的厚朴样品使用 E-ACA + M-CAT 引物对进行选择性扩增, 扩增产物进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 7)。结果表明, 不同样品条带清晰, 说明优化的 AFLP 体系能产生较为理想的结果, 这为 AFLP 技术体系在厚朴种质资源鉴定、

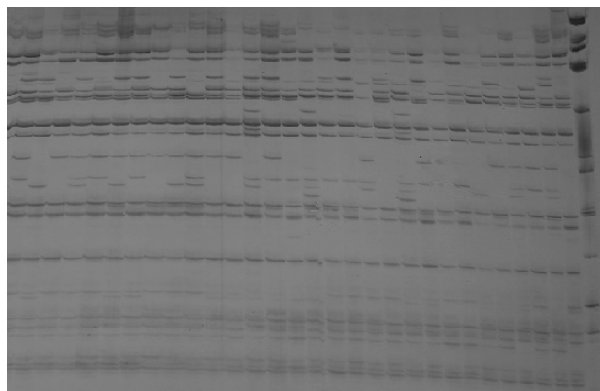


图7 不同样品 E-ACA +M-CAT 引物选择性扩增电泳图

Figure 7 An electrophoretogram of different samples' selective amplification result with the primer E-ACA and M-CAT

遗传连锁图谱构建、群体遗传结构及多样性研究、演化和亲缘关系研究等方面的应用奠定了基础。

因此,采用 CTAB 硅珠法提取的 DNA 质量较好,适用于 AFLP 分析。酶切的基因组 DNA 以 400 ng 为宜,37 ℃条件下酶切时间为 6 h 较理想;预扩增产物的稀释倍数以 20 倍为宜;20.00 μL 选扩反应体系中 Mg²⁺浓度为 2.00 mmol·L⁻¹, dNTPs 浓度为 0.225 mmol·L⁻¹, Taq DNA 聚合酶用量为 16.67 nkat,扩增带清晰且稳定,扩增效果较理想,可以获得清晰的 AFLP 指纹图谱。

3 讨论

AFLP 技术程序多且复杂,从基因组 DNA 的提取到电泳银染每个环节都必须严格要求,才能获得最佳的结果。模板 DNA 的质量和完全酶切是 AFLP 试验成败的关键。实验证明,用 CTAB-硅珠吸附法提取的厚朴 DNA 质量符合 AFLP 技术要求。酶切时模板以 400 ng 为宜,酶切时间为 6 h。预扩增是一承上启下的步骤,既可以检测酶切和连接的效果,又可以对选择性扩增模板起到纯化的作用。预扩产物的稀释倍数对于选择性扩增的成败非常重要,几个稀释梯度的琼脂糖电泳谱带差别不大,在垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳后稀释 30 倍的电泳谱带清晰,便于读取,其他稀释倍数下的扩增条带数目少、不清晰且扩增结果不稳定。Taq 酶的价格比较高,摸索适当的酶用量,对试验效果及节约成本都大有益处。AFLP 步骤多而且联系密切,因此,建议在厚朴 AFLP 分析时,每完成一步,最好取少量样品在琼脂糖凝胶上进行电泳检测,得到预期效果后再进行下一步试验。这样既节省时间,又不浪费试剂。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 176.
- [2] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 4407 - 4414.
- [3] 张德强, 张志毅, 杨凯. AFLP 技术在林木遗传改良中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2000, **22** (6): 75 - 78.
ZHANG Deqiang, ZHANG Zhiyi, YANG Kai. Applications of AFLP technique to genetic improvement in forest trees [J]. *J Beijing For Univ*, 2000, **22** (6): 75 - 78.
- [4] 张德强, 张志毅, 宋婉清. 毛白杨遗传作图最适分离群体的选择[J]. 北京林业大学学报, 2003, **25** (4): 21 - 24.
ZHANG Deqiang, ZHANG Zhiyi, SONG Wanqing. Optimizing segregation population selection for genetic linkage maps in *Populus tomentosa* [J]. *J Beijing For Univ*, 2003, **25** (4): 21 - 24.
- [5] 黄建安, 黄意欢, 刘仲华. AFLP 技术及其在茶树种质资源研究中的应用[J]. 亚热带植物科学, 2003, **32** (2): 60 - 63.
HUANG Jianan, HUANG Yihuan, LIU Zhonghua. A review of AFLP technology and its application in germplasm resources of tea trees [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2003, **32** (2): 60 - 63.
- [6] THOMAS J C, DAVIES E C, MALICK F K, *et al.* Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper up take

- from contaminated soils [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, **19** (2): 273 - 280.
- [7] 韩建萍, 王永炎, 张文生, 等. 扩增片段长度多态性标记技术应用于药用植物种质资源研究的前景[J]. 广州中医药大学学报, 2006, **23** (4): 352 - 355.
- HAN Jiangping, WANG Yongyan, ZHANG Wensheng, *et al.* Prospects based on AFLP applied in research of medical germplasm resources [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2006, **23** (4): 352 - 355.
- [8] 童再康, 斯金平. 厚朴遗传改良策略的研究[J]. 经济林研究, 2000, **18** (1): 12 - 16.
- TONG Zaikang, SI Jinping. Strategies of genetic improvement for *Magnolia officinalis* [J]. *Nonwood For Res*, 2000, **18** (1): 12 - 16.
- [9] 郭宝林, 吴勤, 斯金平. 厚朴道地性的遗传学证据[J]. 药学实践杂志, 2000, **18** (5): 314 - 316.
- GUO Baolin, WU Meng, SI Jinping. The genetic evidence of genuine medicinal materials *Magnolia officinalis* [J]. *J Pharm Pract*, 2000, **18** (5): 314 - 316.
- [10] 张博, 张露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 的提取方法 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, **28** (1): 13 - 16.
- ZHANG Bo, ZHANG Lu, ZHUGE Qiang, *et al.* A rapid and simple method of total DNA extraction from tree [J]. *J For Univ Nat Sci Ed*, 2004, **28** (1): 13 - 16.
- [11] 连莲, 魏志刚, 杨传平. 白桦 AFLP 体系的建立及优化[J]. 东北林业大学学报, 2007, **35** (5): 1 - 5.
- LIAN Lian, WEI Zhigang, YANG Chuanping. Establishment and optimization of AFLP technical system for *Betula platyphylla* [J]. *J Northeast For Univ*, 2007, **35** (5): 1 - 5.
- [12] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, **196**: 80 - 83.



浙江林学院结对帮扶欠发达乡镇农业骨干培训正式启动

为进一步贯彻落实中共浙江省委、浙江省人民政府关于低收入农户奔小康工程和欠发达乡镇结对帮扶工作会议精神, 浙江林学院于 2009 年 12 月 9 日正式启动结对帮扶欠发达乡镇农业骨干培训工作。数十名来自浙江林学院结对帮扶乡镇——庆元县贤良镇、黄田镇的干部参加了培训。

学校主持党委工作副书记汤勇出席启动仪式并致辞, 对庆元县贤良镇、黄田镇领导和学员的到来表示热烈欢迎。他以浙江林学院发展近况为背景, 围绕低收入农户增收重点, 狠抓农民培训就业; 注重建立长效联动机制, 利用学校专业优势, 增强农村造血功能; 立足学校自身客观实际, 加强相互联系沟通, 抓好科技帮扶工作; 发挥龙头企业带动作用等方面作了相关阐述。

此次培训活动充分结合贤良镇、黄田镇自然资源特色, 就山地蔬菜栽培技术、山区经济林生态高效栽培技术、竹林高效益栽培及反季节笋培育技术、山地生态养殖技术和乡村旅游开发经营管理等专题进行培训。

董良钜