

姜志艳,杨慧楠,邵学勤. 蒙古黄芪 AFLP 分子标记反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):40-43.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.010

蒙古黄芪 AFLP 分子标记反应体系的建立与优化

姜志艳,杨慧楠,邵学勤

(内蒙古科技大学生命科学与技术学院,内蒙古包头 014010)

摘要:以内蒙古特色药用植物黄芪为试验材料,建立并优化 1 套适用于黄芪的扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)反应体系。对 AFLP 反应体系的影响因素基因组 DNA 的提取、内切酶的确定及酶切时间、预扩增、选择性扩增反应等关键因素进行优化,并对 AFLP 适宜引物进行筛选。结果表明,黄芪基因组 DNA 的模板以 50 ng/ μ L 为宜,采用 *EcoR* I/*Mse* I 进行双酶切,酶切连接采用一步法完成;最佳酶连时间为 16 h;预扩增反应产物稀释 20 倍作为选扩模板,筛选出适用于黄芪 AFLP 分析的引物组合 5 对:E-AG/M-CGT、E-AT/M-CTG、E-GA/M-CAA、E-TC/M-CAA、E-GT/M-CTG,为黄芪的分子标记辅助育种、遗传图谱构建、种质资源研究奠定了基础。

关键词:扩增片段长度多态性(AFLP);内蒙古;黄芪;分子标记;反应体系;优化

中图分类号:S567.23+9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)19-0040-03

蒙古黄芪 [*Astragali membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *Mongholicus* (Bge.) Hsiao] 为豆科黄芪属,是内蒙古特色药用植物,具有很好的药用价值和经济价值。由于目前黄芪野生资源稀缺,大多进行人工栽培^[1]。近些年来,对药用植物黄芪的研究主要集中在其药理活性成分分析、有效成分提取等^[2],而有关黄芪的利用分子标记辅助育种、数量性状基因座(quantitative trait locus,简称 QTL)定位、构建分子遗传连锁图谱和进行黄芪种质遗传多样性研究的相关信息较少。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)具有多态性高、DNA 用量少、无需预知基因组序列信息、稳定性好等优点,该分子标记技术被广泛应用于植物遗传育种、种质资源研究^[3]、遗传多样性分析^[4-6]、构建遗传图谱(尤其是高密度分子图谱)^[7]及基因定位^[8]等方面。目前,已有研究者利用简单重复序列标记(simple sequence repeat,简称 SSR)、随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,简称 SRAP)等分子标记技术对黄芪进行了遗传多样性研究,王敖利用 SSR 分子标记对蒙古黄芪进行了遗传多样性研究^[9],钱丹等利用 SRAP 分子标记技术分析了蒙古黄芪的亲缘关系^[10]。但目前尚少见有关药用植物黄芪 AFLP 分子标记分析及反应体系相关研究的报道。为此,本研究以蒙古黄芪为试验材料,对 AFLP 分析过程中的影响因子进行研究,建立优化黄芪 AFLP 分析体系。以期从分子水平上对黄芪进行遗传多样性研究、遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种等研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为蒙古黄芪,黄芪幼叶于 2017 年 7 月采集于包头医学院内蒙古特色药用植物繁育种植基地。-80℃保存备用,黄芪组培苗于室内培养。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及检测 对黄芪单株叶片进行 DNA 的提取,黄芪基因组 DNA 提取采用植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度和完整性,用紫外可见分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,保存于 -20℃冰箱。

1.2.2 基因组 DNA 的酶切-连接 使用限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Mse* I (购自 NEB)对黄芪基因组 DNA 进行双酶切,同时加入 *EcoR* I/*Mse* I 接头,用 *T₄* DNA 连接酶进行连接作为预扩增模板,酶切-连接一步完成。反应总体积为 20.0 μ L,含样品 DNA 2 μ L (50 ng/ μ L),*EcoR* I 0.2 μ L (15 U/ μ L),*Mse* I 0.3 μ L (10 U/ μ L),BSA 0.3 μ L (10 mg/mL),*EcoR* I/*Mse* I (5 μ mol/ μ L)接头各 0.4 μ L,10×NEB reaction buffer 2.0 μ L,10 mmol/L ATP 0.4 μ L,*T₄*连接酶(350 U/ μ L)0.8 μ L,加 ddH₂O 补足总体积至 20.0 μ L。分别设定酶切-连接时间为 12、14、16 h,37℃温浴。取出后保存于 -20℃冰箱。

1.2.3 AFLP 模板 DNA 的预扩增 反应总体积为 20.0 μ L,包括酶切-连接产物 4.0 μ L,10×PCR-buffer 2.0 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 1.0 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L,dNTPs (2 mmol/L) 1.8 μ L,引物 E₀₀ (5'-GACTGCGTACCAAT TCA-3')、M₀₀ (5'-GATGACTCCTGAGTAA-3') (各 50 μ mol/L),用 ddH₂O 补足总体积至 20.0 μ L,离心混匀进行 PCR 反应。PCR 扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min,4℃保温。

1.2.4 AFLP 模板 DNA 的选择性扩增 选择性扩增反应采

收稿日期:2017-11-29

基金项目:内蒙古自然科学基金(编号:2015MS0872);内蒙古科技大学大学生科技创新基金(编号:2016013)。

作者简介:姜志艳(1976—),女,山东潍坊人,博士,副教授,主要从事植物分子遗传育种研究。E-mail:nmyabeibei@sina.com。

用表 1 中 E₃/M₃ 引物组合将预扩产物分别稀释 10、20、30、40 倍进行选择性的扩增。反应总体积 20.0 μL, 包括稀释预扩增产物 2.5 μL, 10 × buffer(含 Mg²⁺) 1.5 μL, dNTPs(2 mmol/L) 2.0 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.15 μL, 选择性引物(50 ng/μL) 各

1.0 μL, 用 ddH₂O 补足总体积至 20.0 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 13 个循环, 每个循环的退火温度下降 0.7 ℃; 然后 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 26 个循环; 每个循环增加 1 s, 最后 72 ℃ 10 min。

表 1 筛选 AFLP 分子标记的引物序列

EcoR I 引物		Mse I 引物	
引物	引物序列	引物	引物序列
E ₁	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'	M ₁	5'-GATGAGTCTGAGTAACAA-3'
E ₂	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT-3'	M ₂	5'-GATGAGTCTGAGTAACGC-3'
E ₃	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA-3'	M ₃	5'-GATGAGTCTGAGTAACGG-3'
E ₄	5'-GACTGCGTACCAATTC ATC-3'	M ₄	5'-GATGAGTCTGAGTAACGT-3'
E ₅	5'-GACTGCGTACCAATTC ACG-3'	M ₅	5'-GATGAGTCTGAGTAACTC-3'
E ₆	5'-GACTGCGTACCAATTC AGT-3'	M ₆	5'-GATGAGTCTGAGTAACTG-3'
E ₇	5'-GACTGCGTACCAATTC AAT-3'	M ₇	5'-GATGAGTCTGAGTAACTT-3'
E ₈	5'-GACTGCGTACCAATTC AGT-3'	M ₈	5'-GATGAGTCTGAGTAAATC-3'

1.2.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 在 PCR 产物中加入 1/3 体积的变性剂, 95 ℃ 变性 5 min, 于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶中, 恒定功率 70 W, 预电泳 30 min, 上样量为 6 μL, 电泳 2 h 后, 进行显色、扫描胶板。

2 结果与分析

2.1 黄芪基因组 DNA 提取质量的检测

中药植物高质量基因组 DNA 的提取对其后续试验的进行发挥着极为重要的作用。植物基因组 DNA 的提取受植物的组织材料、部位、形态特征等影响, 例如有的中药植物中含有多糖、酚等次生代谢物会直接影响 DNA 提取的纯度, 所以需要根据试验材料的实际情况, 科学、合理地采用 DNA 提取方法。本研究采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[5], 从含多糖、酚的蒙古黄芪中简便、快速地提取 DNA, 为分子遗传标记应用于黄芪的种质资源研究提供基础^[2]。

由图 1 可见, 提取的黄芪基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带明亮, 无脱尾弥散现象, 无 RNA 条带, 提取的基因组比较完整, 用紫外可见分光光度计检测 D_{260 nm}/D_{280 nm} 值都在 1.8~2.0, 可用于黄芪 AFLP 分析。

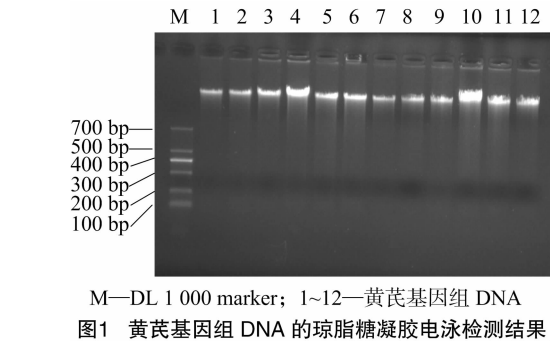


图 1 黄芪基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.2 酶切、连接体系的优化

本研究对黄芪基因组进行酶切连接采用了多种试验方法, 关于限制性核酸内切酶组合 EcoR I/Mse I、Pst I/Mse I 的选择与酶切、酶连分步法和一步法均有报道^[11]。经多次试验比较, 最终确立本试验中 AFLP 体系的建立采用 EcoR I/Mse I 双酶切, 酶切-连接一步完成, 试验对酶切连接时间作了不同设置, 处理时间为 12、14、16 h(图 2)。得出最佳的酶切-连接时间为 16 h。1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切-连接时间为 16 h 的产物在 100~1 500 bp 范围内出现均匀、清晰

的弥散带, 证明酶切彻底, 可以为 AFLP 研究提供理想的模板, 试验时间得到了缩减, 试验效率得到了提高。

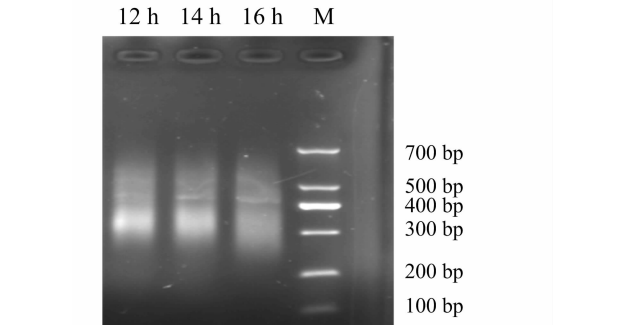


图 2 黄芪不同酶切-连接时间琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 预扩增产物的稀释倍数

预扩增反应是以酶切-连接产物作为模板, 用引物 E0/P0 进行预扩增, 在进行选择性扩增之前, 预扩增产物需要进行一定量的稀释, 本研究中将预扩增产物稀释倍数分别设为 5、10、15、20、25、30、40 倍, 经琼脂糖凝胶电泳检测可知, 不同稀释倍数的模板即模板浓度对扩增效果并无明显影响(图 3), 经过后续选择性扩增试验也证实了这一点, 为保证选扩产物量的充分, 最终确定将预扩产物稀释 20 倍。

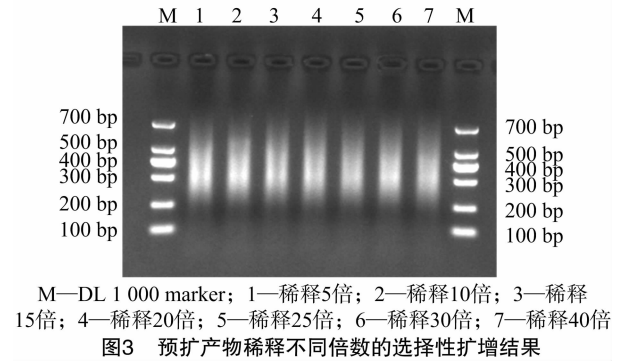


图 3 预扩产物稀释不同倍数的选择性扩增结果

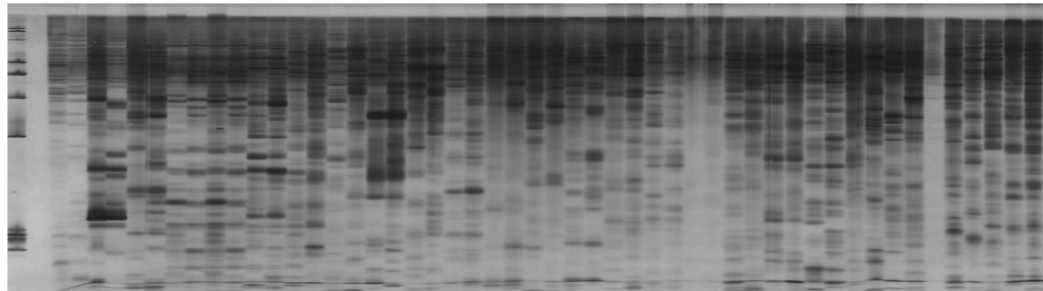
2.4 AFLP 引物的设计与筛选

根据接头序列互补原则设计选择性扩增引物, 选择性扩增引物是在预扩增引物 3' 端随机增加 2 个或 3 个选择性碱基来进行设计的, 在 AFLP 分子标记中的引物是随机组合的, 不同的引物组合成不同的引物对, 用于选择性扩增。本试验中黄芪 AFLP 分析所用 36 对引物分别采用 E/M 引物“2+2”

“2+3”“3+3”(数字 2、3 表示引物最后的碱基数)组合进行筛选得到。其中 5 对引物组合(E-AG/M-CGT、E-AT/

M-CTG、E-GA/M-CAA、E-TC/M-CAA、E-GT/M-CTG)表现出多态性,多态性比率 80.5%,详见图 4、图 5。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50



1~50 表示供试样本

Marker 条带由上至下依次为 1 000、700、500、400、300、200、100 bp。图 5 同

图 4 引物组合 *EcoRI*-AG/*MseI*-CGT 对部分黄芪材料选择性扩增结果

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

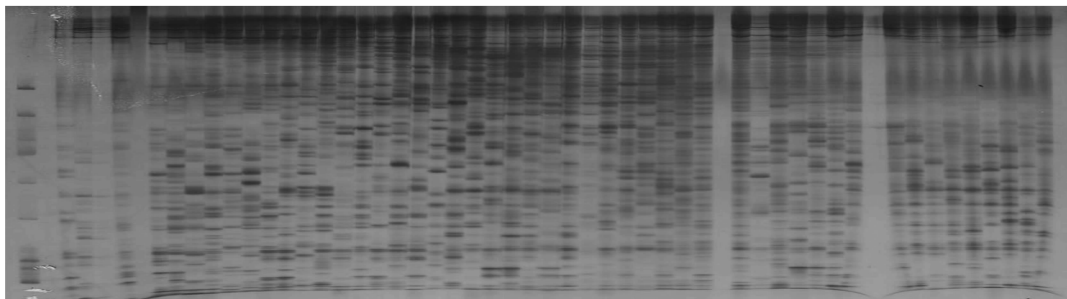


图 5 引物组合 *EcoRI*-AT/*MseI*-CTG 对部分黄芪材料选择性扩增结果

2.5 银染体系的优化

AFLP 分子标记中需要进行大量的凝胶电泳试验,凝胶电泳后胶板的显色费时、费力,同时还会受到诸多因素的影响,如电泳电压的高低、显影液的温度、银染的时间、配制胶板的质量、试剂尿素质量的好坏等,都会对银染结果产生影响。本试验参考多种银染方法,进行多次尝试与改进,最终得到优化的银染方法,用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、恒定功率为 70 W,预电泳时间为 30 min,预电泳时间不易过短,电泳时间为 120 min。具体步骤如下:(1)固定。将玻璃板从电泳槽中取出,拔出梳子,轻轻将长板取下,放入 2 L 蒸馏水+20 mL 冰乙酸+200 mL 无水乙醇溶液中,轻轻摇动 15~20 min。(2)漂洗。在 2 L 蒸馏水中漂洗 2 次,每次 2~3 min。(3)染色。在 2 L 蒸馏水中加入 4 g 硝酸银,染色 15 min。(4)显影。在 2 L 蒸馏水中加入 60 g 氢氧化钠、10 mL 甲醛显影至条带清晰为止。(5)中止。当条带不再清晰时,将板取出放入最初配好的固定液中,中止 2 min。(6)漂洗。在 2 L 蒸馏水中漂洗 2 min,自然风干,拍照。

3 讨论

黄芪作为内蒙古的特色药用经济植物,被广泛应用在医药中,但目前野生黄芪资源稀缺,所以大多采用人工栽培的方法培育黄芪。近年来,国内外对黄芪的研究除药理活性成分、有效成分提取外,开始从 DNA 分子水平上研究蒙古黄芪的道地性等并取得了一些进展,而对黄芪分子标记辅助育种、QTL 定位、构建遗传图谱的研究则鲜有报道。本研究所探讨的 AFLP 分子标记在黄芪上的应用,将会为蒙古黄芪遗传多样

性研究、图谱构建等奠定基础。

本研究采用 AFLP 分子标记技术对蒙古黄芪进行分析,结果表明有一定的可行性,扩增条带多、重复性好,为降低试验成本、缩短试验周期、提高试验效率,在体系优化过程中,采用 *EcoRI*/*MseI*对黄芪基因组 DNA 进行双酶切,且酶切-连接采用一步法完成,AFLP 分子标记虽然操作复杂、对试验技术要求高,但目前仍是一种十分理想、有效的分子标记方法^[11]。

对于某一种具体的试验材料药用植物黄芪来说,并不是所有引物对组合都是适宜的,所以大量的试验工作是必须筛选出适合某种具体药用植物的引物对。在进行大量的引物筛选过程中发现,不同引物对组合之间对于选择性扩增反应结果差异很大,有的引物对扩增出的主带多而清晰,差异条带也多,而有的引物对扩增出的条带数较少,有的引物对扩增出的差异条带也很少等。本研究应用中选出的扩增条带信号强、重复性好的 5 对引物组合对部分黄芪植株进行了分析。试验结果表明,AFLP 是标记效率最高的分子标记之一,但其技术操作复杂,影响因素很多,尤其是对该植物基因组信息了解得不是很清楚的情况下,一般选用该植物的同科近缘植物的 AFLP 引物进行筛选,是一种快速、有效的引物筛选方法。本试验中所筛选的引物来自黄芪同科不同属植物大豆。

参考文献:

- [1] 张 茹. 药用黄芪 ISSR 遗传多样性分析[D]. 太谷:山西农业大学,2014.
- [2] 全 欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1246-1249.

高慧新,封毅,王孝勋,等. 褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):43-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.011

褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

高慧新,封毅,王孝勋,吴燕春,戴忠华,田慧

(广西中医药大学,广西南宁 530200)

摘要:通过单因素考察结合正交试验的方法,基于反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶量、DNA 模板用量、dNTPs 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度等因素对简单重复序列间扩增 (ISSR) 反应体系进行优化。结果表明,褐苞薯蓣 ISSR-PCR 的 20 μ L 最佳反应体系为 *Taq* DNA 聚合酶 1.875 U, DNA 模板量 52.5 ng, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 引物浓度 0.437 5 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L, 10 \times *Taq* Buffer 2.0 μ L, 其余用 ddH₂O 补齐。

关键词:褐苞薯蓣;简单重复序列间扩增 (ISSR);单因素试验;正交设计

中图分类号: S632.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0043-03

褐苞薯蓣来源于薯蓣科薯蓣属植物褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill), 别称广山药、广西淮山, 根茎入药, 主产于广西桂平、玉林、灵山、陆川、平南等地, 野生于海拔 100~1 950 m 的山坡、路旁、山谷杂木或灌丛中, 我国南方各地也均有栽培。中医用其“补脾养胃, 生津益肺, 补肾涩精”; 壮医用其“调谷道气道水道, 补肺肾”^[1]。褐苞薯蓣在广西、福建、海南等地被作为山药地区习用品, 药用与食用由来已久^[2]。有研究发现, 褐苞薯蓣乙醇提取物各萃取层 (石油醚层、乙酸乙酯层和正丁醇层) 均表现出较好的抗炎和免疫调节活性^[3]。褐苞薯蓣产量大, 适应能力强, 占领了药材和食品市场上很重要的部分, 是一种重要的药用植物资源, 有研究的必要性。

ISSR 即简单重复序列间扩增 (inter simple sequence

repeat), 是近年应用较多的一种新型 DNA 分子标记技术, 它以微卫星重复序列为引物, 通常为 16~18 个碱基序列, 由 1~4 个碱基组成的串联重复序列和几个非重复的锚定碱基组成, 提高了 PCR 扩增反应的专一性。同时 ISSR 标记以其较低的成本、良好的稳定性及重复性、能较好地反映物种的遗传结构和遗传多样性变化等特点, 被视为理想的遗传标记方法^[4]。ISSR-PCR 反应易受多种因素的影响, 本试验利用单因素结合正交设计的方法, 旨在建立适合于褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应的最佳体系, 为褐苞薯蓣种质资源遗传多态性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 试验材料为褐苞薯蓣新鲜叶片, 采自广西中医药大学仙葫校区, 并由广西中医药大学药用植物教研室梁子宁副教授鉴定为薯蓣科薯蓣属植物褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)。

1.1.2 试剂与仪器

1.1.2.1 试剂 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker (D2000)、5 \times TBE 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 琼脂糖 (西班牙), GelRed 核酸染料 (美国), 其他所用试剂均为国产分析纯, ISSR-PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.1.2.2 仪器 Eppendorf 移液枪 (德国), 电子分析天平

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 广西中医药大学 2015 年度中药学优势学科建设课题 (编号: ZYX2015001); 2017 年杨世林教授团队骨干学员科研项目 (编号: CS17012); 壮瑶药协同创新中心项目 (编号: 桂教科研[2013]20 号); 广西壮瑶药重点实验室项目 (编号: 桂科基字[2014]32 号); 广西重点学科壮药项目 (编号: 桂教科研[2013]16 号); 广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目 (编号: J13162)。

作者简介: 高慧新 (1993—), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为中药品种鉴定与质量评价。E-mail: 2456658048@qq.com。

通信作者: 田慧, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药品种鉴定与质量评价。E-mail: 377244732@qq.com。

[3] Manifesto M M, Schlatter A R, Hopp H E, et al. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat gemplasm using molecular markers[J]. Crop Science, 2001, 41: 682-690.

[4] 李芳第, 王舰, 王芳, 等. 马铃薯种质资源遗传多样性分析的 AFLP 反应体系优化与引物筛选[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 179-185.

[5] 唐晓晶. DNA 分子标记在中药材鉴定中的应用研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2006.

[6] 陈巍, 郭秀珠, 黄品湖, 等. 浙南柚类地方资源遗传多样性分析和鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 643-646.

[7] Baon C D, Bailey C D. Taxonomy and conservation: a case study

from *Chamaedorea alternans*[J]. Annals of Botany, 2006, 98(4): 755-763.

[8] Deng Z Y, Zhang X Q, Wang X P, et al. Identification and molecular mapping of a stripe rust resistance gene from a common wheat line Qz180[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(2): 236-241.

[9] 王敖. 蒙古黄芪和膜荚黄芪居群遗传多样性研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.

[10] 钱丹, 黄璐琦, 崔光红, 等. 不同产地蒙古黄芪遗传关系的 SRAP 分析[J]. 中国中药杂志 2009, 34(4): 382-385.

[11] 雷永, 廖伯寿, 王圣玉. 花生 AFLP-银染体系的建立与优化[J]. 花生学报, 2003, 3(2): 301-305.