

盐肤木基因组 DNA 提取方法改进 及 AFLP 体系的建立

庞雅文¹, 段立柱¹, 宋德应², 任竹梅^{1*}

(1. 山西大学 生命科学学院, 太原 030006; 2. 湖北五峰土家族自治县林业局, 湖北 五峰 443400)

摘要: 经过反复试验, 摸索出一种提取高质量植物基因组 DNA 的方法: 改良的 4×CTAB 法。以盐肤木叶片为实验材料, 提取到高质量的基因组 DNA, 建立了酶切、连接、预扩增、选择性扩增的 AFLP 反应体系。通过两种引物组合“E+3/M+3”和“E+2/M+3”策略筛选出 8 对条带分辨率高、多态性好的引物组合, 优化了盐肤木的 AFLP 银染反应体系, 得到了清晰的 AFLP 指纹图谱, 为盐肤木种群遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 盐肤木; DNA 提取; 4×CTAB 法; AFLP 技术

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)01-0036-03

A modified method of genomic DNA extraction and establishment of AFLP systems in *Rhus chinensis*

PANG Ya-Wen¹, DUAN Li-Zhu¹, SONG De-Ying², REN Zhu-Mei^{1*}

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Bureau of Forestry of Wufeng County, Wufeng 443400, China)

Abstract: A modified method(4×CTAB) was used to extract the effective genomic DNA from the leaves of *Rhus chinensis*, and the systems of DNA restriction reaction, ligase reaction, pre-amplification and selective amplification reaction were established in this study. Using the two kinds of primer-combined methods (E+3/M+3 and E+2/M+3), 8 pairs of primers were finally selected to amplify the genomic DNA of *R. chinensis*, and clear bands with high genetic polymorphism and difference were obtained. The present results provided a strong foundation for the further examination of population genetic diversity and structure of *R. chinensis* using AFLP method.

Key words: *Rhus chinensis*; DNA extraction; 4×CTAB method; AFLP technology

高质量基因组 DNA 的提取是进行分子生物学研究的基础和关键。各种植物所含的物质成分及含量不同, 其 DNA 提取的方法也不同(李荣等, 2006), 目前主要采用 CTAB 法和 SDS 法, 其中 CTAB 法多用于木本植物 DNA 的提取(王军等, 2006; 黄绍辉等, 2007)。盐肤木(*Rhus chinensis*)属漆树科(Anacardiaceae)盐肤木属(*Rhus*), 又名五倍子树、五倍柴、盐肤子等, 具有较高的药用价值和经济价值(郑勉等, 1980)。近年来, 国内外对漆树科植物做

了大量的研究, 但主要集中于漆树、枳椇等经济价值较大的植物(Kuo 等, 1999; Rayne & Mazza, 2007; Viruel 等, 2005), 对盐肤木的研究主要集中在形态结构特点、种苗繁育、生理生化等方面(Fujimoto 等, 2000; Tangpu & Yadav, 2004; 赵军等, 2006; 王琼等, 2008), 其分子遗传多态性方面的研究仅有少量报道(Yi 等, 2004; Ren 等, 2008; 李继变等, 2009)。

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种十分理想的、有效的、先进的检测 DNA 多态性的分子标记技

收稿日期: 2010-04-25 修回日期: 2010-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(30670361); 山西省自然科学基金(2007011078)[Supported by National Natural Science Foundation of China (30670361); Natural Science Foundation of Shanxi Province(2007011078)]

作者简介: 庞雅文(1988-), 女, 山西晋城市人, 硕士研究生, 主要从事系统分类研究, (E-mail) yawen570@yahoo.com.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zmren@sxu.edu.cn)

术,具有 RAPD 和 RFLP 技术的双重优点(郑先云等,2003;朱成伟等,2006;Wang 等,2007),是迄今为止最有效的 DNA 分子标记(Vos 等,1995;王婷等,2008)。AFLP 作为一种高效的分子标记技术,对基因组 DNA 的质量要求较高,获取高质量的基因组 DNA 成为 AFLP 成功分析的关键。本研究材料盐肤木叶片中含有多糖、单宁等物质,采取常规方法得到的基因组 DNA 杂质较多,抑制了相关酶的活性;再者部分材料保存时间较长,常规方法提取的 DNA 降解较严重,已不能满足 AFLP 分子标记的要求。因此,本研究通过不断试验,采用改良的 4×CTAB 法提取到高质量的盐肤木基因组 DNA,建立了盐肤木 AFLP 分子标记体系,为盐肤木遗传多样性及遗传结构的研究奠定了坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

盐肤木叶片于 2004~2008 年 8~10 月间采自贵州丹寨、四川安县、湖北五峰和云南金平,经硅胶干燥保存。

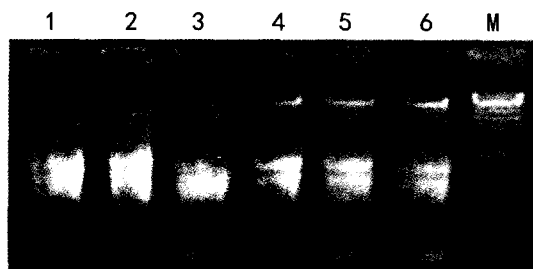


图 1 丹寨盐肤木样品基因组 DNA 提取琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *R. chinensis* from Danzhai, Guizhou, China

1-3: 常规 2×CTAB 法; 4-6: 改良的 4×CTAB 法。
1-3: Common 2×CTAB method; 4-6: Innovated 4×CTAB method; M: λDNA(*EcoR* I + *Hind* III).

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及检测 盐肤木基因组 DNA 的提取分别采用 2×CTAB 法和改良的 4×CTAB 法进行摸索筛选。改良的 4×CTAB 法改进之处主要是在常规 4×CTAB 法的基础上,将 Tris 和 EDTA 的浓度都增加一倍,而盐离子(NaCl)浓度不变。基因组 DNA 提取参照 Doyle JJ & Doyle JL (1987)和唐绍清等(2004)的方法进行。

1.2.2 AFLP 数据分析 AFLP 分析参照 Vos 等(1995)和唐绍清等(2004)的方法。采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 两种限制性内切酶对基因组 DNA 进行双酶切,酶切和连接采用两步法进行。

1.2.3 选择性引物筛选 本实验采用“E+3/M+3”(64 对)和“E+2/M+3”(32 对)两种引物筛选策略共 96 对引物组合进行 AFLP 选择性扩增,其中“E+3/M+3”引物组合为核心引物组(周延清,2005)。

2 结果与分析

2.1 盐肤木基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 电泳检测结果见图 1,可见,对于存放时间较长的盐肤木标本,常规 2×CTAB 法提取的 DNA 主带模糊,存在降解现象,而改良的 4×CTAB 法提取的基因组 DNA 主带清晰,无降解。

2.2 引物筛选

通过观察比较不同引物组合扩增位点的多态性和清晰度,从 96 对引物组合中筛选出 8 对条带分辨率高、多态性好的引物组合,分别是: E-AAG/M-CAA、E-AAG/M-CAC、E-ACA/M-CAA、E-AT/M-CAA、E-AT/M-CAT、E-AT/M-CAC、E-AT/M-CTC、E-AT/M-CTT。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染

引物组合 E-AT/M-CAT 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测结果见图 2,带型较清晰,多态性较好。

3 讨论

3.1 基因组 DNA 的提取

DNA 提取过程中,需防止 DNA 的降解,避免 RNA 的污染和抑制物的存在,被污染或降解的 DNA 不能扩增出条带或条带可重复性差(郑先云等,2007)。本研究采用常规 CTAB 法提取盐肤木基因组 DNA,发现部分样品提取的 DNA 存在严重降解、主带模糊不清、拖尾等现象,不能满足 AFLP 实验的要求。分析认为主要是由于部分标本存放时间较长,叶片内环境不稳定,且盐肤木叶片中多糖、单宁等物质含量较高引起。基因组 DNA 提取的效果与提取液成分及其含量关系密切,比如 EDTA 能抑制 DNA 酶活性,保护 DNA 不被内源核酸酶降解,对 DNA 的存在具稳定作用(陶爱丽等,2004);

Tris-HCl 作为缓冲液可稳定体系的 pH 环境;在裂解细胞膜的过程中,提取液中高浓度的盐不能完全除去果胶类多糖对 DNA 的影响,使得在离心沉淀过程中,DNA 与果胶类多糖形成很难溶解的胶状物质(黄捷等,2008);CTAB 可与多糖、蛋白质结合形成复合物(孟淑春等,2008),并有效地沉淀部分次生代谢物(李春霞等,2009);高浓度的 CTAB 可使细胞裂解更充分,核内 DNA 释放更完全。所以本研究在常规 4×CTAB 法的基础上,反复试验,将提取液中的 Tris-HCl 和 EDTA 量同时加倍后进行盐肤木 DNA 的提取,获得了高质量的基因组 DNA。

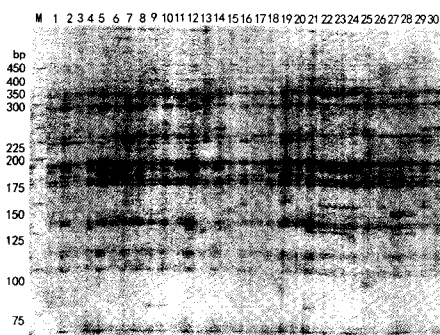


图 2 选择性引物组合 E-AT/M-CAT 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳银染结果

Fig. 2 PAGE results of selective amplification of *R. chinensis* using primers E-AT/M-CAT

3.2 引物组合筛选

引物组合的筛选是进行 AFLP 分析的关键。本研究首先采用 64 对“E+3/M+3”的引物组合,筛选出 3 对符合要求的引物组合(Katsiotis 等,2003;赵喜萍等,2007)。为了更充分说明盐肤木种群的多态性,为后续实验提供充足的依据,本研究又通过减少选择性碱基的数目来降低扩增片段的选择性,增加扩增产物条带的数目,从 32 对“E+2/M+3”的引物组合中筛选出 5 对引物组合(李风云等,2007;赵冰等,2007)。两种引物组合筛选策略共筛选出的 8 对引物组合,获得 372 条带,其中多态性条带 333 条,多态位点比例为 89.52%。扩增图谱条带分辨率高,多态性好、稳定性和重复性较理想。

综上所述,本研究采用改良的 4×CTAB 法提取的盐肤木基因组 DNA 主带清晰、无降解、质量较好,可以满足 AFLP 分子标记实验的要求;通过盐肤木 AFLP 相关条件的摸索及引物组合的筛选,建立了盐肤木 AFLP 反应体系,为盐肤木指纹图谱分析奠定了基础。

参考文献:

- 周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社
- 郑勉,闵天禄. 1980. 中国植物志(第 45 卷第 1 分册)[M]. 北京:科学出版社:100—101
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, **19**:11—15
- Fujimoto T, Kanetoshi A, Aopyagi M, et al. 2000. Studies on utilization of plant resources in Hokkaido. isolation of 6-pentadecylsalicylic acid from *Rhus javanica* leaves as an active component on histamine-release inhibitory effect[J]. *Hokkaidoristsu Eisei Kenkyushoho*, **50**:89
- Huang J(黄捷), Chen XB(陈晓斌), Ye HL(叶花兰), et al. 2008. The extraction and identification of genomic DNA from Okra(黄秋葵基因组 DNA 提取及鉴定)[J]. *Chin Agric Sci Bull(中国农学通报)*, **24**(4):99—103
- Huang SH(黄绍辉), Fang YM(方炎明). 2007. DNA Extraction of the endangered tree species *Cercidiphyllum japonicum* based on the modified method of SDS-CTAB(改进的 SDS-CTAB 法提取濒危植物连香树总 DNA)[J]. *J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究)*, **25**(1):98—101
- Katsiotis A, Hagidimitriou M, Drossou A, et al. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs[J]. *Euphytica*, **132**:279—286
- Kuo YC, Sun CM, Tsai WJ, et al. 1999. Blocking of cell proliferation, cytokines production and genes expression following administration of Chinese herbs in the human mesangial cells[J]. *Life Sci*, **64**(23):2 089
- Li CX(李春霞), Li HF(李宏飞). 2009. Study on efficient extraction for genomic DNA from *Malus* leaves by CTAB method (CTAB 法高效提取苹果叶片 DNA 的研究)[J]. *Northern Hort(北方园艺)*, **2**:49—52
- Li FY(李风云), Sheng WM(盛万民), Liu ZJ(刘昭军), et al. 2007. Genetic diversity analysis of potato cultivars by AFLP markers(马铃薯品种遗传多样性的 AFLP 分析)[J]. *Chin Agric Sci Bull(中国农学通报)*, **23**(8):58—61
- Li JB(李继变), Ren ZM(任竹梅), Ma EB(马恩波). 2009. Comparative genetic diversity of *Schlechtendalia chinensis* and their hosts *Rhus chinensis* population(角倍蚜与其唯一夏寄主植物盐肤木种群遗传多样性比较)[J]. *J Shanxi Univ(山西大学学报)*, **32**(2):298—303
- Li R(李荣), Niu JX(牛建新), Wang L(王林), et al. 2006. DNA extraction method for AFLP analysis in Walnut(适合核桃 AFLP 分析用的 DNA 提取方法研究)[J]. *Acta Agric Boreal-Occident Sin(西北农业学报)*, **15**(3):175—178
- Meng SC(孟淑春), Zhang HY(张海英), Zheng XY(郑晓鹰), et al. 2008. Extraction of DNA and establishment of AFLP techniques in leaves of Chinese cabbage(大白菜基因组 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立)[J]. *Mol Plant Breed(分子植物育种)*, **6**(2):370—376
- Rayne S, Mazza G. 2007. Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus* spp.): a review[J]. *Plant Foods Hum Nut*, **62**:165—175
- Ren ZM, Zhu B, Wang DJ, et al. 2008. Comparative population structure of Chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host-plant *Rhus chinensis*[J]. *Genetica*, **132**:103—112

(下转第 42 页 Continue on page 42)

References:

- Balloux F, Lehmann L, De Meeüs T 2003 The population genetics of clonal and partially clonal diploids[J]. *Genetics*, **164**:1 635—1 644
- Doyle JJ. 1991. DNA protocols for plants - CTAB total DNA isolation. Hewitt GM, Johnston A(eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*[M]. Berlin:Springer-Verlag 283—293
- Goudet J. 1995. FSTAT (version 1. 2): a computer program to calculate F-statistics[J]. *J of Hered*, **86**:485—486
- Hooftman DAP, van Kleunen M, Diemer M. 2003. Effects of habitat fragmentation on the fitness of two common wetland species, *Carex davalliana* and *Succisa pratensis* [J]. *Oecologia*, **134**:350—359
- Halkett F, Simon JC, F Balloux F. 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms[J]. *Trends Ecol Evol*, **20**,194—201
- Jump AS, Peñuelas J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**:8 096—8 100
- Lewis PO, Zaykin D. 2001. Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1. 0(d16c)[J]. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR. 1999. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays(PIMA) [J]. *Mol Ecol*, **8**:891—894
- Peng SL. 1996. Southern Subtropical Forest Community Dynamics [M]. Beijing:Science Press
- Wang ZF, Ye WH, Fu SL, et al. 2008. Microsatellites reveal unexpected clonal growth and genetically distinct groups in *Cryptocarya chinensis* in fragmented lower subtropical forest, China [J]. *Silvae Genetica*, **57**(6):324—332
- Wang ZF, Li G, Fu SL, et al. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cryptocarya chinensis* in lower subtropical China[J]. *Conser Genet*, **8**:1 235—1 237
- Wang ZF, Peng SL, Liu SZ, et al. 2003. Spatial pattern of *Cryptocarya chinensis* life stages in lower subtropical forest, China [J]. *Bot Bull Acad Sin*, **44**:159—166
- Wang ZF, Zhu P, Ye WH. 2009. Development and characterization of 13 microsatellite markers for *Cryptocarya concinna* in lower subtropical China[J]. *Conser Genet*, **10**(6):1 841—1 843
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. *Evolution*, **38**:1 358—1 370
- (上接第 38 页 Continue from page 38)
- Tao AL(陶爱丽), Wen ZZ(文祯中), Han YC(阚云超), et al. 2004. Extraction of genomic DNA from *Actinidia deliciosa* (美味猕猴桃基因组 DNA 的提取条件优化)[J]. *J Nanyang Teachers' Coll*(南阳师范学院学报), **3**(9):56—58
- Tangpu V, Yadav AK. 2004. Antidiarrhoeal activity of *Rhus javanica* ripen fruit extract in albino mice[J]. *Fitotherapy*, **75**(1):39—44
- Tang SQ(唐绍清), Du LF(杜林方), Wang Y(王燕). 2004. AFLP analysis of ser. *Chrysantha* Chang (*Camellia*, sect. *Chrysantha*) (山茶属金花茶组金花茶系的 AFLP 分析)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **22**(1):44—48
- Viruel MA, Escribano P, Barbieri M, et al. 2005. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica*, Anacardiaceae) with microsatellites[J]. *Mol Breed*, **15**:383—393
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acid Res*, **23**(21):4 407—4 414
- Wang J(王军), Yang CP(杨川平), Liu GF(刘桂丰). 2006. Extraction of genomic DNA from woody plants and its identification (木本植物基因组 DNA 提取及鉴定)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), **26**(5):589—594
- Wang Q(王琼), Song GL(宋桂龙). 2008. Study on hardseed and germinating characteristic of *Rhus chinensis* Mill. (盐肤木种子硬实与萌发特性研究) [J]. *Seed*(种子), **27**(4):59—61
- Wang T(王婷), Li AX(李爱贤), Ju JF(鞠建峰), et al. 2008. AFLP molecular marker technique and its application in the medicinal plant research(AFLP 分子标记技术及其在药用植物研究中的应用)[J]. *Qilu Pharm Affairs*(齐鲁药事), **27**(1):32—34
- Wang W, Chen LQ, Yang P, et al. 2007. Assessing genetic diversity of populations of topmouth culter(*Culter alburnus*) in China using AFLP markers[J]. *Biochem Systematics Ecol*, **35**:662—669
- Yi TS, Miller AJ, Wen J. 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **33**(3):861—879
- Zhao B(赵冰), Zhang QX(张启翔). 2007. Genetic diversity of germplasm resources of *Chimonanthus praecox* (L.) link based on AFLP marker(利用 AFLP 分子标记探讨蜡梅种质资源的遗传多样性)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **27**(11):4 452—4 459
- Zhao J(赵军), Cui CB(崔承彬), Cai B(蔡宾), et al. 2006. Research overview on *Rhus* spp. plant(国产盐肤木属植物的研究进展) [J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学报), **22**(1):48—51
- Zhao XP(赵喜萍), Wei SN(魏朔南). 2007. Genetic evaluation of *Toxicodendron vernicifluum* cultivars using amplified fragment length polymorphism markers(漆树品种的 AFLP 分析及评价) [J]. *J Mol Cell Biol*(分子细胞生物学报), **40**(4):262—266
- Zheng XY(郑先云), Guo YP(郭亚平), Ma EB(马恩波). 2003. The development of AFLP technology(AFLP 分子标记技术的发展)[J]. *Chem Life*(生命的化学), **23**(1):65—67
- Zheng XY(郑先云), Xuan T(宣涛), Long WM(龙文敏), et al. 2007. Establishment and optimization of the AFLP technological system for *Oxya chinensis* (中华稻蝗 AFLP 反应体系的建立与优化)[J]. *Acta Zootax Sin*(动物分类学报), **32**(4):856—860
- Zhu CW(朱成伟), Zhang QW(张青文), Ye ZH(叶志华), et al. 2006. Analysis of genetic diversity in different geographic populations of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) with AFLP technique(不同地区甜菜夜蛾种群的遗传多样性分析)[J]. *Acta Entomol Sin*(昆虫学报), **49**(5):867—873