

山苍子 AFLP 反应体系的建立及其引物筛选

田胜平¹, 汪阳东^{1*}, 陈益存¹, 占志勇¹, 斯林林²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:通过对山苍子幼嫩叶片、顶芽、花蕾 3 种组织的 DNA 提取效果分析和对影响酶切及选择性扩增效果的 4 个主要因素(酶切时间、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度)的比较研究,建立了适合于山苍子 AFLP 分析的技术体系。结果表明,山苍子的顶芽是较好的 DNA 提取材料;山苍子基因组 DNA 经 5 U *EcoR* I 和 5 U *Mse* I 酶切 1 h 即可完全酶切;最佳的选择性扩增体系为 20 μ L 反应体系中含有 1.0 U rTaq 聚合酶、2.0 μ L 10 \times PCR 缓冲液、1.8 μ L 25 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$ 、1.4 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、100 ng \cdot μ L⁻¹ 引物各 1.0 μ L。使用该反应体系获得了清晰、稳定的 DNA 指纹图谱,并筛选出 10 对多态性较好的 AFLP 引物组合,为利用 AFLP 标记技术进一步开展山苍子种群遗传结构、遗传分化等研究奠定了基础。

关键词:山苍子;基因组 DNA;AFLP;多态性引物

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Primer Screening and AFLP Amplification Reaction System of *Litsea cubeba*

TIAN Sheng-ping¹, WANG Yang-dong¹, CHEN Yi-cun¹, ZHAN Zhi-yong¹, SI Lin-lin²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: The effect of DNA extraction was analyzed by comparing the young leaf, terminal bud and flower of *Litsea cubeba*. The time of DNA digestion and several key factors affecting the PCR selective amplification such as Mg^{2+} concentration, dNTPs concentration and the amount of the selective amplification primer were also trialed. An optimized AFLP reaction system of *Litsea cubeba* was established. The results showed that the high quality genomic DNA as a PCR template could be isolated from the bud tissue; genomic DNA could be digested in a hour by 5 U *EcoR* I and 5 U *Mse* I; The optimal selection amplification system was 20 μ L reaction mix containing 1.0 U rTaq polymerase, 2.0 μ L 10 \times PCR buffer, 1.8 μ L 25 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$, 1.4 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 100 ng \cdot μ L⁻¹ primer each 1.0 μ L. Clear and stable amplification band patterns can be obtained and 10 pairs of AFLP primers with good genetic diversity were selected according to the optimized reaction system. The results will be an effective protocol for further studying the genetic structure and differentiation of *Litsea cubeba* population.

Key words: *Litsea cubeba*; genomic DNA; AFLP; the polymorphic primer

山苍子(*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.)别名山鸡椒、木姜子等,系樟科(Lauraceae)木姜子属(*Litsea* Lam.)植物,多为灌木或小乔木,高约 8~10 m^[1],全世界大约有 250 余种,中国约有 70 余种^[2]。原

产于中国,主要分布在长江以南的数十个省份,印度、印度尼西亚、马来西亚、日本等东南亚、东亚各国也有分布^[3]。其果实、树皮、树叶、树干均可提炼山苍子油,山苍子油中富含柠檬醛、高级醇、有

收稿日期:2011-07-13

基金项目:浙江省科技计划项目(2009C32107);国家林业局重点科研项目(2011-01)

作者简介:田胜平(1986—),男,安徽安庆人,硕士研究生,主要从事化工原料植物育种研究。

* 通讯作者:汪阳东,副研究员,从事分子生物学研究。E-mail:wyd111111@126.com

机酸,其中柠檬醛含量约占精油的70%~80%,是制造紫罗兰酮素系列香料的重要原料^[4];此外,山苍子油还是许多食品的香料添加剂以及各种香水、 V_E 、 V_A 、 V_K 合成的重要原料来源^[5];其核仁提炼出的核仁油含有大量的脂肪酸,主要成分为月桂酸和癸酸。其中月桂酸的含量达50%以上,可用来代替椰子油和棕榈仁油,广泛应用于表面活性剂、保鲜剂、防腐剂制造等工业领域^[6-7]。我国是世界上最大的山苍子油生产国和出口国,年出口量达3 000~5 000 t左右,产品远销美、日、英、法、德、瑞士、荷兰、印尼等国^[8]。

我国的山苍子野生资源地理分布范围较广,由于长期的自然选择作用以及地理的隔离效应,导致了其在自然界中形成了丰富的遗传变异,种内品种较多,且不同品种的品质和产量均存在很大的差异,品种选育的空间很大。现有的研究主要侧重于其精油化学成分分析^[9-11]、繁殖技术^[12-14]以及精油加工应用^[15-19]等方面,有关山苍子的遗传变异研究和良种选育工作至今尚未开展。探索适合于山苍子 AFLP 分析的技术体系,对于将来深入开展山苍子的遗传变异研究、分子标记辅助育种以及从分子水平上研究山苍子品种间的分类鉴定都有重要的指导作用。AFLP 是一种基于 PCR 的 DNA 指纹技术,近年来,AFLP 数据作为核基因技术的代表与 mtDNA 基因测序数据组合,在解决种内遗传分化、种间系统发育问题方面共同发挥着重要的作用^[20]。在揭示物种的遗传变异方面,H. Nybom^[21]等还认为 AFLP 与 ISSR 相比,可更为准确地估计群体内的变异水平。尽管 AFLP 实验技术对 DNA 的浓度不太敏感,但它对 DNA 的质量要求比一般的分子标记技术要高,而且 AFLP 技术体系复杂,操作程序较多,针对特定的物种或分类群,需要对各个技术环节进行摸索和优化。因此,高质量 DNA 的提取以及 AFLP 反应体系的建立是进行 AFLP 成败的关键。本研究通过对山苍子不同组织材料 DNA 的提取效果进行比较,以及对 AFLP 反应体系的酶切时间和选择性扩增体系中的几个关键影响因子进行优化,建立了一套适合于山苍子 AFLP 分析的技术体系,为进一步研究山苍子种群遗传结构、遗传分化以及重要经济性状的关联分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于 DNA 提取效果分析的山苍子植株新鲜组织采自中国林科院亚热带林业研究所黄公望森林公园内;用于多态性引物筛选的山苍子植株个体分别采自浙江富阳(FY)、浙江龙泉(LQ)、安徽岳西(YX)、湖南衡山(HS)、福建建瓯(JO)、云南景东(JD)。

试剂:AFLP 引物及接头由上海生工生物工程有限公司合成;*Mse* I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; λ DNA、rTaq 聚合酶购自 Takala 公司;酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)、亲和硅胶购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 山苍子基因组 DNA 的提取及质量检测

本研究参照 J. J. Doyle 等^[22]的 CTAB 法加以改进。改进的方法中在 CTAB 液裂解前,用 DNA 洗脱液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 8.0),1.4 mol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹ EDTA,2% β -巯基乙醇)反复洗脱几次至上清液不再黏稠;在加入 2×CTAB 裂解液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 8.0),20 mmol·L⁻¹ EDTA,1.4 mol·L⁻¹ NaCl,2% CTAB,2% β -巯基乙醇,5% PVP)的同时加入 200 μ L 的高盐 TE(1.0 mol·L⁻¹ NaCl,10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 8.0),1.0 mmol·L⁻¹ EDTA),混匀,65℃温育 30~60 min;离心,取上清液于另一离心管,并加入 1/5 倍体积的 7.5 mol·L⁻¹ 的 NH₄Ac,颠倒混匀,冰浴 30 min。将提取的 DNA 浓度调整至 50 ng· μ L⁻¹ 备用。将山苍子新鲜幼嫩叶片、顶芽和花蕾 3 种组织研磨后,分别取等质量的粉末,用改进的 CTAB 法进行各组织基因组 DNA 的提取,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度。

1.3 AFLP 反应体系建立与优化设计

1.3.1 酶切与连接 本试验选用了 *Eco*R I/*Mse* I 双酶切组合,为确定酶切效果,试验前分别进行了两种酶对基因组 DNA 的单独酶切,在确保两种酶单独酶切效果之后,再进行双酶切和连接反应,单酶切体系和双酶切反应体系见表 1。为确定最佳的酶切反应时间,设置了 6 个酶切反应时间梯度试验,时间分别为 1、2、3、4、6、8 h;用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。连接反应采用 37℃连接 4 h,连接体系见表 1。

表1 山苍子 AFLP 反应体系

	单酶切体系(20 μL)	双酶切体系(20 μL)	连接体系(20 μL)	预扩增体系(20 μL)
<i>EcoR</i> I	5.0 U <i>EcoR</i> I 2.0 μL 10 \times PCR 缓冲液 4.0 μL DNA (50 ng \cdot μL^{-1}) 加 ddH ₂ O 至 20 μL	5.0 U <i>EcoR</i> I 5.0 U <i>Mse</i> I 3.0 μL DNA (50 ng \cdot μL^{-1}) 加 ddH ₂ O 至 20 μL	2.0 U T4 连接酶 2.0 μL 10 \times T4 缓冲液 1.0 μL <i>Mse</i> I 接头 (50 pmol \cdot μL^{-1}) 1.0 μL <i>EcoR</i> I 接头 (5 pmol \cdot μL^{-1}) 加 ddH ₂ O 至 20 μL	4.0 μL 酶切连接模板 1.0 μL <i>Mse</i> I 引物 (100 ng \cdot μL^{-1}) 1.0 μL <i>EcoR</i> I 引物 (100 ng \cdot μL^{-1}) 1.6 μL MgCl ₂ (25 mmol \cdot L ⁻¹) 1.6 μL dNTPs (2.5 mmol \cdot L ⁻¹) 1.0 U rTaq 聚合酶 2.0 μL 10 \times Taq 缓冲液 加 ddH ₂ O 至 20 μL
<i>Mse</i> I	5.0 U <i>Mse</i> I 2.0 μL 10 \times PCR 缓冲液 4.0 μL DNA (50 ng \cdot μL^{-1}) 加 ddH ₂ O 至 20 μL			

1.3.2 预扩增体系及选择性扩增优化设计 预扩增引物采用 E₀₀/M₀₀ 引物组合,引物序列 E₀₀: 5-GACTGCGTACCAATTC-3; M₀₀: 5-GATGAGTCCT-GAGTAA-3。取酶切连接液 4.0 μL ,加入 16 μL 混合液(反应体系如表1)进行预扩增。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 30 个循环,将预扩增产物稀释 20 倍,备用。

分别对选择性扩增反应体系中的引物浓度、Mg²⁺ 浓度和 dNTP 浓度分别进行了优化,以建立合适的山苍子 AFLP 扩增体系:引物依次设置 200、100、50、25 ng \cdot μL^{-1} 4 个浓度梯度;Mg²⁺ 浓度梯度为不同体系中分别加入 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 μL ,dNTP 浓度梯度为不同体系中分别加入 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 μL 。其余组分为稀释后的预扩增产物 4.0 μL ,10 \times PCR 缓冲液 2.0 μL ,rTaq 聚合酶 1.0 U,加 ddH₂O 至 20 μL 。降落式 PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,13 个循环,每次循环降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 电泳及银染检测

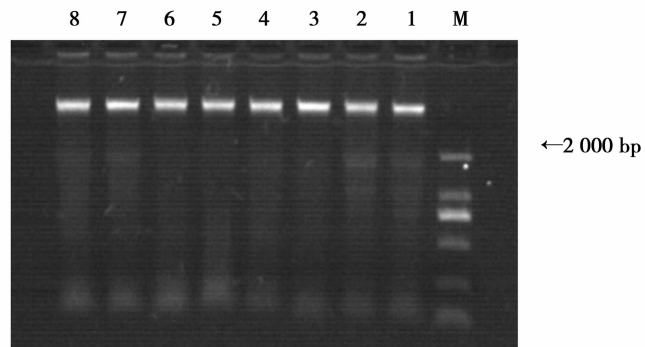
为了获得山苍子不同群体植株的 DNA 指纹图谱,将选择性扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。使用质量分数为 6% 的聚丙烯酰胺凝胶 80 mL,加入 10% 的 APS 240 μL 和 TEMED 64 μL 混匀后立刻灌胶,聚合 1 h 以上,95 W 预电泳约 25 ~ 30 min。选择性扩增产物中加入 8.0 μL 上样缓冲液(98% 甲酰胺,10 mM EDTA(pH 值 8.0),0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲苯腈蓝),混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,立刻转移到冰浴中以防扩增产物复性,上样 6.0 μL ,95 W 恒功率电泳 70 min 左右。电泳结束后采用王亚军等^[23] 描述的银染检测方法进行 AFLP 指纹显色反应。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

为了获得适宜于山苍子 AFLP 分析的高质量

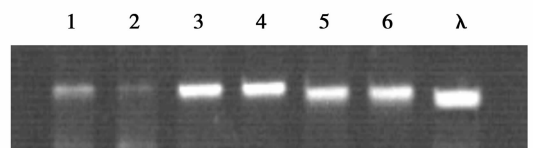
DNA,经过摸索,最终采用改进的 CTAB 法提取山苍子植株芽组织的 DNA。改进后的 CTAB 法提取的 DNA,吸光度比值在 1.7 ~ 1.9 之间,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰且无拖尾,无蛋白质、多糖等杂质残留胶孔(图 1),在后续的酶切实验中,基因组 DNA 均能被 *EcoR* I 和 *Mse* I 充分酶切,说明用改进的 CTAB 法提取的 DNA 符合 AFLP 分析的要求。



M:DL 2 000 Marker;1 ~ 8:不同山苍子个体的 DNA 样本

图1 改进的 CTAB 法提取山苍子顶芽组织的 DNA

在以山苍子植株幼嫩叶片、顶芽和花蕾为材料提取 DNA 的对比实验中,研究发现,山苍子植株的顶芽、花蕾是较为理想的 DNA 提取材料,提取的 DNA 所含的杂质少,条带清晰。然而在以花蕾为材料的 DNA 提取过程中,发现经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)抽提后的上清液仍含有大量的黄色色素,最终导致经超纯水溶解的 DNA 含有一定的色素,从而影响下一步的酶切实验。从叶片提取的 DNA 纯度较差,DNA 得率也较低(图 2、表 1)。



λ : λ DN A(50 ng \cdot μL^{-1});1 ~ 2:叶片;3 ~ 4:顶芽;5 ~ 6:花蕾

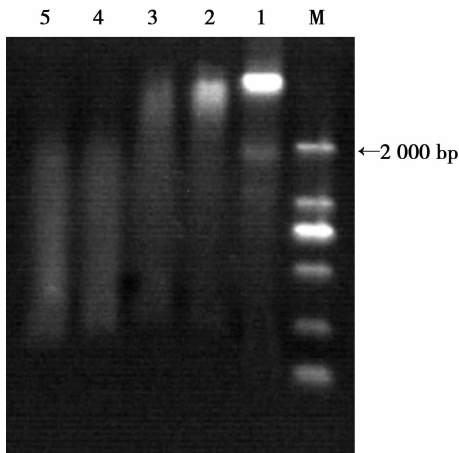
图2 改进的 CTAB 法提取 3 种不同组织的 DNA

表2 改进的 CTAB 法提取山苍子不同组织类型的 DNA 样品 ($n=8$)

组织类型	DNA 质量	
	DNA 浓度/ $(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}) (\bar{X} \pm SD)$	OD260/OD280 $(\bar{X} \pm SD)$
顶芽	98.23 \pm 0.12	1.82 \pm 0.01
叶片	42.45 \pm 0.02	2.13 \pm 0.02
花蕾	85.46 \pm 0.01	1.95 \pm 0.02

2.2 酶切及连接

EcoR I 和 *Mse* I 两种酶的单酶切电泳结果如图3所示, *EcoR* I 酶切后, 基因组 DNA 主带消失, 酶切产物电泳条带低于基因组 DNA 的主带, 并呈现均匀的弥散现象; *Mse* I 酶切后成相对集中的小分子 DNA 片段, 这表明两种酶都能分别进行山苍子基因组 DNA 的完全酶切。 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切产物在凝胶上呈现连续的大小不同的 DNA 片段 (图3)。这不仅说明山苍子基因组 DNA 能被 *EcoR* I 和 *Mse* I 彻底消化, 而且证明了试验所用的酶切体系适合山苍子的 AFLP 分析。

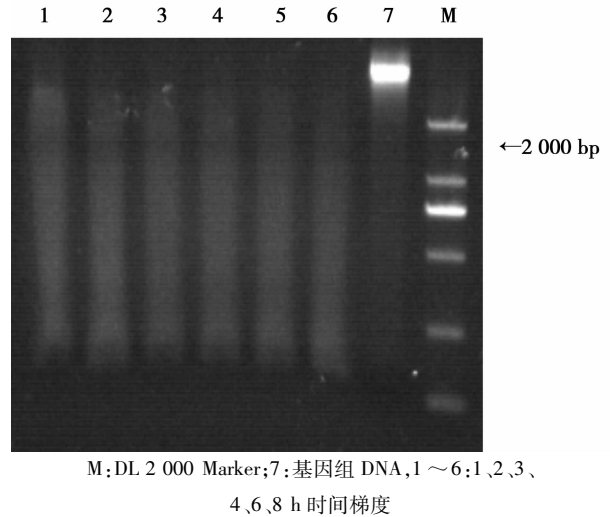


M: DL 2 000 Marker; 1: 基因组 DNA, 2~3: *EcoR* I 酶切, 4~5: *Mse* I 酶切
图3 *EcoR* I 和 *Mse* I 单酶切效果

双酶切反应中酶切时间对酶切效果有很重要的影响, 酶切结果又直接影响着连接反应。酶切时间过短, 基因组 DNA 不能被限制性内切酶完全酶切; 时间过长, 酶的特异性降低, 酶切片段的长度变小, 导致连接反应中的接头不能有效连接。为了进一步探究适合山苍子的双酶切时间, 本实验还设置了6个不同酶切时间的梯度, 如图4所示, 设置的6个酶切时间结果和原基因组 DNA 对比发现, 基因组 DNA 的主带消失, 6个酶切时间的带型相近, 呈均匀弥散状, 判断1 h 即可完成酶切。

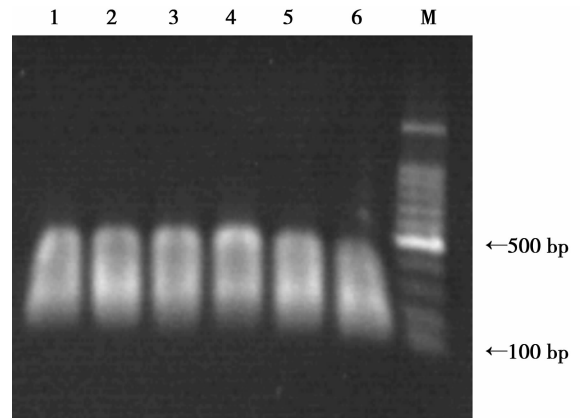
2.3 扩增体系的建立和优化

预扩增反应起着承上启下的作用, 既反应酶切



M: DL 2 000 Marker; 7: 基因组 DNA, 1~6: 1、2、3、4、6、8 h 时间梯度
图4 双酶切时间梯度对比效果

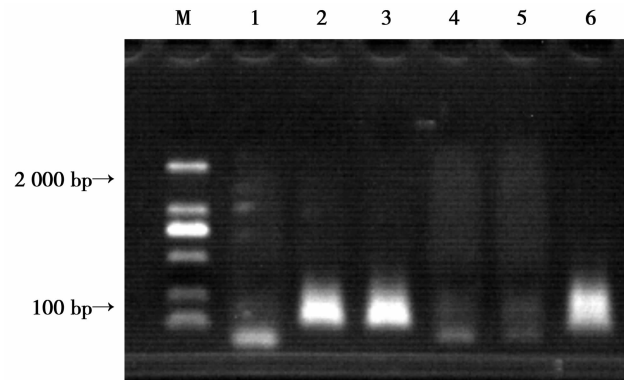
与连接效果的好坏, 又直接影响着选择性扩增的电泳结果。 *EcoR* I 接头和 *Mse* I 接头与酶切片段连接后, 利用 E_{00} 和 M_{00} 寡核苷酸为引物进行预扩增, 扩增结果表明, 预扩增片段主要集中在 100 ~ 500 bp 之间, 不同样品间预扩增带型相对一致 (图5)。这表明接头与酶切片段已连接上, 预扩增效果较好, 可为选择性扩增提供理想的模板; 同时也表明此前进行的基因组 DNA 的提取、酶切和连接操作符合要求。



M: DL 1 500 Marker; 1~6: FY、LQ、JO、HS、JD、YX 样品
图5 预扩增产物电泳检测

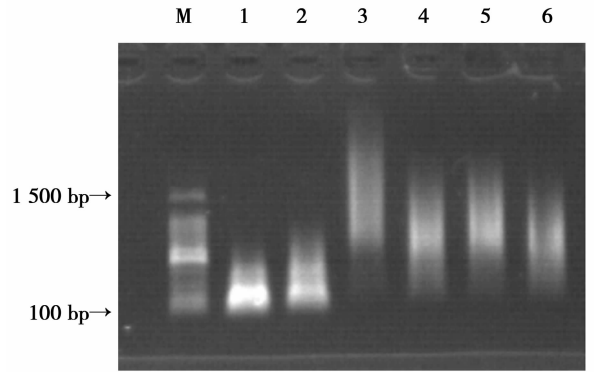
由于选择性扩增直接影响实验结果, 本实验对影响选择性扩增的几个关键因子 ($dNTPs$ 浓度、 Mg^{2+} 浓度以及引物浓度) 进行了梯度优化。结果显示, $dNTPs$ ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 使用量为 $1.4 \mu\text{L}$ 时, 选择性扩增取得了最佳效果, 浓度过高或过低均不同程度地存在非特异性扩增或主带扩增不明显现象 (图6)。 Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 使用量小于 $1.6 \mu\text{L}$ 时, 没有条带, 只有弥散的带痕; Mg^{2+} 使用量为 $1.6 \mu\text{L}$ 时, 主带虚弱; Mg^{2+} 使用量为 $1.8 \mu\text{L}$ 时, 主带次带均

清晰可见(图7)。扩增体系中引物使用量小于100 ng时,扩增效果不明显,只有弥散的带痕;引物使用量为200 ng时,主带扩增较模糊,且存在非特异性扩增现象;引物使用量为100 ng时,主带次带均清晰可见,扩增效果最好(图8)。优化后的山苍子 AFLP 选择性扩增的最佳反应体系为:20 μL 反应体系中含有1.0 U rTaq 聚合酶、2.0 μL 10 \times PCR 缓冲液、1.8 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ 、1.4 μL 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs、100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 引物各1.0 μL , 预扩增产物稀释20倍作为选择性扩增模板。使用该体系,不同山苍子个体经不同引物组合的选择性扩增产物在1%的琼脂糖凝胶上呈主带明亮,次带虚弱现象,扩增效果较好(图9)。



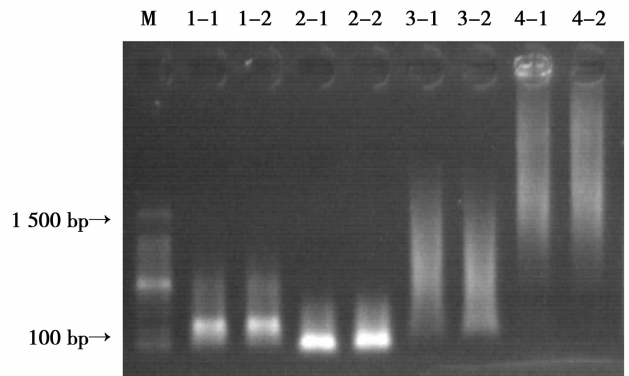
M; DL 2 000 Marker; 1~6: 0.225, 0.200, 0.175, 0.150, 0.125, 0.100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图6 dNTP 浓度变化的选择性扩增效果



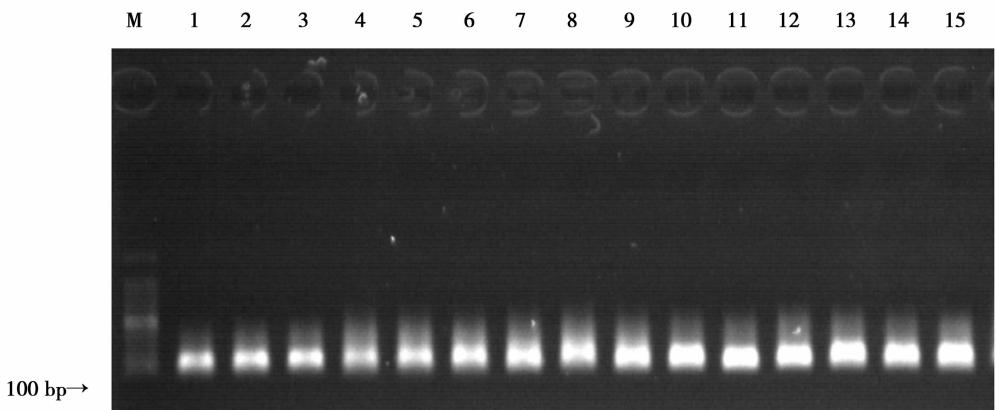
M; DL 1 500 Marker; 1~6: 2.25, 2.00, 1.75, 1.50, 1.25, 1.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图7 Mg^{2+} 浓度变化的选择性扩增效果



M; DL 1 500 Marker; 1-1, 1-2: 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 2-1, 2-2: 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 3-1, 3-2: 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 4-1, 4-2: 25 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

图8 引物浓度变化的选择性扩增效果



M; DL 1 500 Marker; 1~3, 4~6, 7~9, 10~12, 13~15 分别为 EAAC/MTCC、EACG/MCTT、EAAG/MTCC、EACT/MCTT、EACT/MGCT 引物组合

图9 不同引物组合的选择性扩增效果

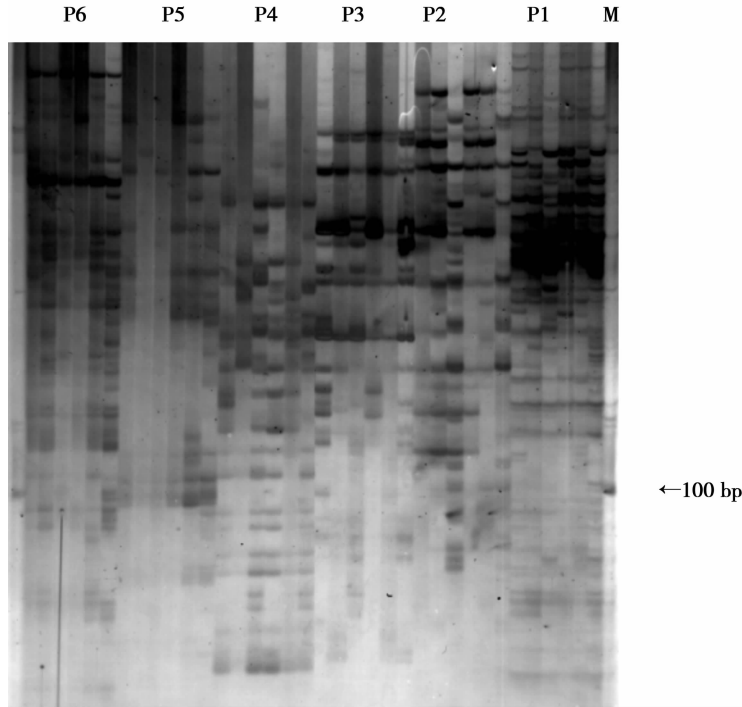
2.4 多态性引物的筛选

为了获取可供山苍子自然群体遗传多样性分析的引物组合,本实验从6个不同群体中选取生态型差异较大的山苍子个体用于多态性引物的筛选,最后共筛选出10对多态性引物。总的来看,山苍子

AFLP 图谱的片段大小在50~500 bp 范围内,各引物组合平均扩增出的条带数在30条左右,片段大小范围较为适中,不同引物组合扩增的多态性高低、条带清晰度、分布均匀度均相差较大(图10)。筛选的10对引物共扩增出303条条带,其中多态性条带为

259 条,多态性比率达 75.0% ~ 94.1%。其中 EACG/MCAA 引物多态性最高(94.1%),EACT/MCTT 引物多态性最低(75.0%)(表 3)。筛选出的

这 10 对引物多态性较好,可以进一步用于山苍子遗传多样性研究。



M: DL 1 500 Marker; P1 ~ P6: EAAC/MTCC、EACG/MCTT、EACG/MCTA、EAAG/MTCC、EACT/MCTT、EACT/MCCT 引物组合,每 6 个泳道为筛选的一对引物

图 10 部分引物组合产生的 PAGE 谱带

表 3 山苍子 AFLP 引物筛选结果及条带多态性

引物组合	总条带数	条带范围/bp	多态条带数	多态性比率/%
EAAG/MTCC	28	50 ~ 400	24	85.7%
EAAG/MCAA	26	50 ~ 400	23	88.5%
EACT/MCTT	32	100 ~ 500	24	75.0%
EACT/MCAA	30	100 ~ 400	26	86.7%
EACG/MCTT	28	50 ~ 400	25	89.3%
EACG/MCCT	23	50 ~ 400	20	87.0%
EAAC/MTCC	34	50 ~ 500	28	82.4%
EACG/MCTA	36	50 ~ 400	31	86.1%
EACT/MCCT	32	50 ~ 500	26	81.3%
EACG/MCAA	34	50 ~ 500	32	94.1%

3 讨论

樟科的许多植物如肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl.)、锡兰肉桂 (*C. zeylanicum* Bl. Bijdr.)、阴香 (*C. burmannii* (C. G. et Th. Nees) Bl.) 等属于分子生物学家所称的顽拗植物 (recalcitrant plant)。这类植物细胞内含有大量的多糖、鞣质、多酚等多种次生代谢产物,采用常规的 CTAB 法、SDS 法、高盐低

pH 法提取总 DNA 时,都不能很好地除掉这些物质,导致提取分离出的 DNA 由于不可逆地结合了这些次生代谢物而呈棕褐色, DNA 溶液粘稠,这种不纯的 DNA 既不能被内切酶酶切,也不能作为 PCR 模板,不能用于常规的分子生物学分析和研究^[24]。在实验初期,本研究分别采用了常规 CTAB 法、SDS 法和试剂盒法提取山苍子基因组 DNA。结果发现, SDS 法的提取效果最差,提取的 DNA 含杂质较多,

且 DNA 溶液的粘稠度较高;试剂盒法提取的 DNA 溶液尽管不存在 DNA 粘稠的问题,但研磨后的山苍子叶片粉末经裂解液裂解后粘稠度仍较高,所释放出的 DNA 大多被次生代谢物质所包裹,最终导致提取的 DNA 得率较低,此外,试剂盒法提取的 DNA 降解较严重,这可能与试剂盒所采用的离心柱有关;在采用常规的 CTAB 法提取山苍子基因组 DNA 时发现,经 CTAB 液裂解后的上清液粘稠度极高,下一步抽提操作也难以进行。为此,作者在传统 CTAB 法的基础上加以改进,如在加入 CTAB 裂解液前,先用 DNA 洗脱液反复洗脱几次、水浴裂解时加入高盐 TE 以及在裂解液中加入醋酸铵冰浴 30 min,以达到降低粘稠度的目的。实验证明,这些处理对 DNA 的提取有一定的有效性,所得 DNA 粘稠度较低,但尚不能满足于 AFLP 实验对高质量 DNA 的要求。采用改进的 CTAB 法在以山苍子植株幼嫩叶片、顶芽和花蕾为材料提取 DNA 的对比实验中,作者发现,以山苍子顶芽组织为材料提取 DNA 时,经 CTAB 裂解后的上清液粘稠性较低,经两次抽提后,上清液呈较为透明状的液体,所得 DNA 纯度和得率都较高。这可能是由于在山苍子叶片组织中存在的难以抽提的次生代谢物质在芽的发育早期还尚未参与合成或含量较低的缘故。因此,选用山苍子植株的顶芽组织,并采用改良的 CTAB 法进行样本 DNA 的提取,所得 DNA 质量能满足 AFLP 分子标记实验的要求。

酶切反应是 AFLP 反应的关键步骤之一。本研究选用 *EcoR* I/*Mse* I 酶切组合,获得的条带分布均匀,能满足后续分析的要求。在以往的研究中,为了使基因组 DNA 得到充分酶切,一般采用延长酶切时间的方法,然而,随着酶切时间的延长,内切酶的特异性降低,很容易形成非特异性酶切现象,这势必会对连接和后续的实验产生影响。为了确定合适的酶切反应时间,在保证 DNA 质量的前提下,对酶切时间进行优化,实验发现,山苍子基因组 DNA 在 37 °C 条件下经 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切 1 h 即可完全完成酶切,这一结论与赵敏在进行喙尾琵琶甲 (*Blaps rhynchopetera* Fairmaire) 基因组 DNA 酶切反应时的结论一致^[20]。在后续的预扩增反应中也充分显示出酶切 1 h 和其它酶切时间的预扩增片段范围也近乎一致,这与通常所认为的酶切反应时间至少需要 4 h 以上有所不同,大大缩短了试验时间,说明在保证 DNA 模板质量和内切酶高效率的前提下,较短的时间内就可以完成基因组 DNA 的限制性酶切。预扩增的

引物一般只含有 1 个选择性碱基或不含选择性碱基,选择性较差,在琼脂糖凝胶中往往形成连续的一片^[25]。理论上,预扩增产物分子量大小应在 100 ~ 1 500 bp^[26]。然而,山苍子预扩增产物却仅集中在 100 ~ 500 bp 范围之内,这在许多其它植物 AFLP 反应过程中是非常少见的,可能与其基因组中酶切位点的分布有关。

本试验采用单因子 PCR 优化设计对各个影响因素进行研究,对最佳水平的确定更为直观,综合各因素最佳水平,确定了最佳反应体系;并筛选出可供山苍子遗传多样性研究的 10 对多态性高、条带较为丰富的引物组合。所构建的山苍子 AFLP 反应体系为进一步开展山苍子种群遗传学研究奠定了良好的技术基础。然而,由于 AFLP 不能同 ISSR 或 RAPD 等标记一样可以直接通过琼脂糖电泳进行条带的优化比较,本实验没有进一步采用正交设计或均匀设计来考虑选择性体系中各因素的交互作用,AFLP 条带的优化将在接下来的银染步骤中进一步地探索。

参考文献:

- [1] Mao A A, Wetten A, Fay M, et al. *In vitro* propagation of *Litsea cubeba* (Lours.) Pers., a multipurpose tree[J]. Plant Cell Report, 2000, 19(3):263-267
- [2] 王 旭, 杨关锋. 我国山苍子开发利用中存在的问题研究与发展对策[J]. 经济林研究, 2010, 28(3):136-139
- [3] 陈卫军, 龚洵胜, 游小敏. 山苍子播种繁殖及扦插育苗初探[J]. 经济林研究, 2004, 22(4):59-60
- [4] 汤青云, 钟桐生, 汤建国, 等. 山苍子中油脂的提取与利用[J]. 湘南学院学报, 2004, 25(5):61-63
- [5] Luo M, Jiang L K, Zou G L. Acute and genetic toxicity of essential oil extracted from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. [J]. Food Prot, 2005, 68(3): 581-584
- [6] 黄光文, 卢向阳. 我国山苍子油研究概况[J]. 湖南科技学院学报, 2005, 26(11): 97-100
- [7] 陈铁壁, 袁先友, 张 敏, 等. 超临界 CO₂ 萃取山苍子核仁油的工艺研究[J]. 生物质化学工程, 2009, 43(1):5-8
- [8] 潘晓杰, 陈卫军, 侯红波. 山苍子资源利用加工现状及开发前景的研究[J]. 经济林研究, 2003, 21(1):79-80
- [9] Yu Y, Jia Z J, Luo B, et al. The fungicidal terpenoids and essential oil from *Litsea cubeba* in Tibet[J]. Molecules, 2010, 15(10):7075-7082
- [10] Rumi K, Pathak M G, Kanjila P B. Physico-chemical characteristics of seed oils of some *Litsea* species found in north-east India [J]. Natural Product Radiance, 2007, 6(4):297-300
- [11] 王发松, 杨得坡, 任三香, 等. 山苍子叶挥发油的化学成分与抗真菌活性[J]. 中药材, 1999, 22(8):400-402
- [12] 孙雁霞, 石大兴, 王米力, 等. 山苍子的离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4):353

- [13] 陈卫军, 龚洵胜, 游小敏, 等. 山苍子播种繁殖及扦插育苗初探[J]. 经济林研究, 2004, 22(4):59-60
- [14] 赵佐敏. 影响山苍子离体快繁效果的主要因素研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9):1650-1652
- [15] Wang Y, Jiang Z T, Li R. Complexation and molecular microcapsules of *Litsea cubeba* essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives[J]. Eur Food Res Technol, 2009, 228:865-873
- [16] Luo M, Jiang L K, Xiao M, et al. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36(4):277-283
- [17] 殷志勇, 王秋娟, 贾莹. 山苍子水提物柠檬醛抗哮喘作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 11(2):197-201
- [18] 肖勇, 李良. 木姜子属挥发油成分及其生物活性研究概况[J]. 云南化工, 2007, 34(5):85-92
- [19] 蔡海清, 钟世安, 艾海东. 山苍籽核仁油合成生物柴油研究[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2009, 40(6):1516-1521
- [20] 赵敏, 冯颖, 和锐, 等. 喙尾昆甲 DNA 提取方法比较与 AFLP 反应体系建立[J]. 林业科学研究, 2010, 23(2):234-240
- [21] Ci X Q, Chen J Q, Li Q M. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaois* (Lauraceae) from Southwest China [J]. Plant Syst Evol, 2008, 273(3-4):237-246
- [22] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19:11-15
- [23] 王亚军, 吴立山, 厉盛华, 等. 几种药品对聚丙烯酰胺凝胶电泳银染的影响[J]. 水利渔业, 2005, 25(2):13-14
- [24] Vroh Bi I, Harvengt L, Chandelier A, et al. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction [J]. Plant Breed, 1996, 115(3):205-206
- [25] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- [26] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用 [J]. 杂交水稻, 1996, (5):27-30
- [27] 李鹏, 汪阳东, 陈益存, 等. 油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立 [J]. 林业科学研究, 2008, 21(2):194-199
- [28] 萨姆布鲁克 J, 拉赛尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002