

红花基因组扩增片段长度多态性反应体系的建立和优化

张阵阵¹, 郭美丽^{1*}, 张军东²

(1. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 2. 药学院药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨影响红花扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)的各种因素,建立并优化红花 AFLP 反应体系,为研究红花品质性状的遗传基础及建立分子辅助标记育种的技术平台奠定基础。**方法:**CTAB 法提取红花基因组 DNA,用 Beckman 紫外可见分光光度计测定样品 DNA 浓度与纯度质量(D 值);检测后分别进行一步法酶切与连接,或两步法酶切与连接,以检测哪种方法更适合;酶切连接产物设置不同的稀释倍数(5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍和 30 倍)进行预扩增,预扩增产物设置不同稀释倍数(10 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、150 倍和 200 倍)进行选择扩增;选择性扩增产物 95℃ 变性 8 min 后,用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。**结果:**本研究建立适用于红花的 AFLP 体系:用乙醇沉淀 DNA,建立的模板不含 PCR 反应抑制剂及其他酶反应抑制剂,可被限制性内切酶 *Mse* I 和 *Eco*R I 完全酶切;确定两步法进行酶切、连接,酶切时间为 37℃ 3 h,连接 16℃ 过夜,缓冲液采用 NEB 公司 Buffer 2;预扩增产物最佳稀释倍数为 25 倍;选择性扩增最佳稀释倍数为 75 倍;上述建立的 AFLP 反应体系,PAGE 电泳中主带清晰,没有降解。**结论:**本研究建立的反应体系适用于红花基因组 DNA 的 AFLP 研究。

[关键词] 红花;基因组,植物;扩增片段长度多态性

[中图分类号] R 282.71

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)03-327-04

Establishment and optimization of the amplified fragment length polymorphism reaction system of *Carthamus tinctorins* L. genome

ZHANG Zhen-zhen¹, GUO Mei-li^{1*}, ZHANG Jun-dong² (1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the factors affecting amplified fragment length polymorphism (AFLP) of *Carthamus tinctorins* L. genome, and to develop and optimize the AFLP reaction system, laying a foundation for Marker-assisted breeding of *Carthamus tinctorins* L.. **Methods:** Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) method was used to extract the genomic DNA of *Carthamus tinctorins* L., whose concentration and purity were determined by UV spectrophotometry. The genomic DNA was digested by restricted enzyme and ligated with one-step method or two-step method so as to find out which one is more suitable. Then the products were prepared with different dilution multiples (5, 10, 15, 20, 25 and 30) for pre-amplification and with different concentrations of gradients (10, 25, 50, 75, 100, 150 and 200) for selected amplification. Then they were subjected to PAGE electrophoresis and silver-staining after denaturing at 95℃ for 8 min. **Results:** The AFLP reaction system for *Carthamus tinctorins* L. genome included the following steps: the genomic DNA was precipitated with alcohol by CTAB method to avoid contamination by any inhibitors; the DNA was completely digested by *Mse* I and *Eco*R I at 37℃ for 3 hours. Two-step method was superior to one-step method in this AFLP system. The digestion time was 3 hours at 37℃ and ligated at 16℃ over night, with Buffer 2 (NEB Company) as the specific buffer. Furthermore, the optimal dilution was 25 folds for pre-amplification and 75 folds for selected amplification. In this reaction system, the strips in PAGE electrophoresis were clear and less decomposed. **Conclusion:** The AFLP reaction system in this experiment is suitable for silver-stained AFLP of *Carthamus tinctorins* L. analysis.

[KEY WORDS] *Carthamus tinctorins* L.; genome, plant; amplified fragment length polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 327-330]

红花为菊科一年生草本植物红花(*Carthamus tinctorins* L.)的干燥管状花^[1],是传统的活血化瘀中药,始载于《开宝本草》,具有扩张冠状动脉、抗凝、降血压、耐缺氧、活血化瘀、抗炎镇痛防治血栓等多种药理学作用^[2],临床应用广泛。由于长期的自然选择和人工选择,红花种内产生了明显的分化,形成了丰富的种质资源,从外部形态到有效成分的组成及含量上均存在一定差异^[3]。红花中有效成分含量的高低,

[基金项目] 国家自然科学基金(30271588);国家中医药管理局课题(02-03ZP54);上海市基础研究重点项目(043919313)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30271588); State Administration of Traditional Chinese Medicine of China (02-03ZP54) and Key Project in Basic Research of Shanghai Municipal Government (043919313)。

[作者简介] 张阵阵,硕士。

* Corresponding author. E-mail: mlguo@smmu.edu.cn

是影响红花品质的主要因素和筛选红花优良品种的重要依据,因此,采用分子标记技术,建立稳定、准确的鉴定红花相关品质的方法具有重要意义。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是1993年由荷兰科学家 Zabeau 发明的一种检测 DNA 分子多态性的方法, AFLP 与其他检测方法相比具有多态性高、DNA 用量少、无需预知基因组序列信息、稳定性好等优点^[4]。这种方法已广泛应用于我国主要农作物的基因多态性分析、定位与辅助育种,如小麦、玉米、棉花、大豆等^[5],而就药用植物的重要性状,特别是品质性状的研究罕见报道。本研究建立了药用植物红花基因组 DNA 的 AFLP 技术体系,旨在建立红花重要的品质性状分子标记研究的技术平台,为进一步进行红花品质性状的定向调控及分子辅助标记遗传育种研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 红花杂交 F₂代(♀×♂:品系 16号×25号的杂交后代第2代)的叶片采自第二军医大学药学院药圃;限制性内切酶 *Mse* I 和 *Eco*R I 均购自 NEB 公司, T₄ DNA 连接酶购自 MBI 公司;尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED 购自上海华舜生物公司; *Taq* 酶、硝酸银、剥离硅烷、亲和硅烷购自北京鼎国生物工程公司;引物、接头由上海生工生物公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 DYCZ-20A 型电泳槽、DYY-12 型电泳仪电源(北京六一仪器厂), P270 型摇床(中国科学院武汉科学仪器厂), DK-S12 型电热恒温水浴锅(上海华连医疗器械有限公司), PL3002 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司)。PCR 仪(德国 Biometra 公司), ELITE 300 型电泳仪、GES 型电泳槽、Wealtec 凝胶成像系统(Dolphin-DOC)均为美国公司产品,高速离心机(德国 Eppendorf 公司), He_λIOS 型紫外可见分光光度计(美国 Beckman 公司)。

1.3 模板 DNA 提取 以红花幼嫩叶片为材料,按照 CTAB 微量法^[6]提取 DNA,并针对红花叶片内含物特殊性对 CTAB 法加以改进,具体步骤如下:取红花新鲜叶片 1.0 g,用液氮研磨成粉末,迅速转入 1.5 ml 的离心管中;加 600 μl 2% CTAB 提取液(提取液中加入 1% 抗氧化剂 β-巯基乙醇),在涡旋混合器上振荡,颠倒混匀后,放置于 65℃ 水浴锅中加热 1 h;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混合液,混匀,37℃,振荡 30 min;8 000 r/min 离心,取上清液;加 2 倍体积 -20℃ 的无水乙醇沉淀 DNA;8 000 r/min 离心,弃上清,用 75% 乙醇洗沉淀 2 次;室温干燥 DNA 沉淀;用 100~200 μl TE(10 mmol/L Tris, 50 μmol/L EDTA, pH8.0)溶解,加入 1/100 体积的 10 mg/ml RNA 酶,37℃ 消化 30 min;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混合液,混匀,37℃,振荡 30 min;8 000 r/min 离心,弃上清,加入 5 mol/L 醋酸铵至终浓度 0.5 mol/L,混匀;加 2 倍体积 -20℃ 无水乙醇沉淀 DNA;8 000 r/min 离心,弃上清,用 70% 乙醇沉淀 2 次;室温干燥 DNA 沉淀;用 4℃ 50 μl TE 溶解, -70℃ 长期贮存。

1.4 DNA 浓度与质量测定 用 Beckman 紫外可见分光光度计测定样品 DNA 浓度与纯度质量(D 值);1.0% 琼脂糖凝

胶电泳检测 DNA 质量:5 μl DNA 样品+2 μl 溴酚蓝上样缓冲液,加样于含溴化乙锭(EB)凝胶上,于 4 V/cm 电压下电泳 0.5 h 后,紫外灯下观察、拍照。

1.5 限制性消化与接头连接 酶切反应体系为 DNA(100 ng/μl) 2.5 μl, *Mse* I (12 U/μl) 0.25 μl, *Eco*R I (10 U/μl) 0.25 μl, Buffer 4 μl, BSA 0.2 μl, ddH₂O 12.7 μl, 37℃ 酶切 3 h, 72℃ 10 min;连接体系为酶切完成的 DNA 样品,再加 MA (25 μmol/L) 1.0 μl, EA (5 μmol/L) 0.5 μl, ATP (10 mmol/L) 0.25 μl, T₄ DNA 连接酶(3 U/μl) 0.15 μl, Buffer 1.0 μl, ddH₂O 2.1 μl, 16℃ 连接过夜。

1.6 预扩增 预扩增反应体系为连接完成的 DNA 样品 1.0 μl, M₀₀ (50 ng/μl) 0.6 μl, E₀₀ (50 ng/μl) 0.6 μl, 10× PCR Buffer 2.0 μl, *Taq* 酶(5 U/μl) 0.2 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μl, ddH₂O 15.2 μl, 混合后加 1 滴石蜡油,进行预扩增;反应条件为:72℃ 5 min;95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 20 个循环;72℃ 5 min, 4℃ 保温,扩增在 PCR 热循环仪上进行,预扩增后,扩增产物在 1.5% 琼脂糖检测, -20℃ 保存备用。

1.7 选择性扩增 选择性扩增反应体系为预扩增混合液 5.0 μl, *Mse* I 引物(50 ng/μl) 0.8 μl, *Eco*R I 引物(50 ng/μl) 0.4 μl, 10× PCR Buffer 2.0 μl, *Taq* 酶(2 U/μl) 0.4 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μl, ddH₂O 11.0 μl, 混合后加 1 滴石蜡油,进行选择性扩增;反应条件为 95℃ 2 min;95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 3 个循环;95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 24 个循环;72℃ 5 min, 4℃ 保温,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20℃ 保存备用。

1.8 电泳 按 30 V/cm 的电压进行 20~30 min 预电泳。扩增产物 95℃ 变性 8 min, 然后立即冰浴。预电泳结束后除去尿素,加入 PCR 扩增产物:甲酰胺上样液(98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝)8:3 混合,开始用 30 V/cm 进行电泳,5 min 后提高至 40~60 V/cm,并保持恒压状态。55 cm 长,0.4 mm 厚的凝胶板,在 2.5 kV 恒压状态下电泳 2 h 即可走到底部。

1.9 银染检测 固定胶:将胶小心放置盛有 10% 醋酸溶液的玻璃缸内,在摇床上摇动 20 min 或至电泳染料颜色消失。洗胶:在摇床上用超纯水洗胶 3 次,每次 2 min。染色:将胶移至 0.1% 的预冷硝酸银溶液(内含 0.15% 甲醛)玻璃缸中,染色 30 min。显色:将胶浸入超纯水中、取出沥水、立即放入盛有预冷反应液(每 20 ml 的 3% 的碳酸钠+30 μl 甲醛+4 μl 10 mg/ml 的硫代硫酸钠)的玻璃缸中。胶从超纯水中取出到放入反应液中的时间为 5~10 s。胶在摇床上摇动至出现模板带或可见第一条带。将胶转至剩余的 1 L 预冷的反应液中,继续显色 2~3 min 或至全部条带显现出来。终止显色反应:倒掉反应液,加入 1 L 10% 醋酸溶液,在摇床上反应 2~3 min,终止显色反应。洗胶:用超纯水漂洗聚丙烯酰胺凝胶 2 次,每次 2 min。干胶:通过热对流或室温放置,使胶变干。

2 结果

2.1 模板 DNA 的检测 用改进后的 CTAB 法提取的红花

基因组 DNA, DNA 主带清晰, 测定结果 D_{260}/D_{280} 为 1.87, 浓度为 $250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。说明提取的 DNA 纯度高, 蛋白含量较少, 能够满足 AFLP 分析的需要。实验发现, 在 2% CTAB 提取液中加入 1% 抗氧化剂 β -巯基乙醇以排除酚类物质及色素的干扰, 可以增加 DNA 提取物的溶解性; 沉淀 DNA 所选的有机溶剂是乙醇, 它对盐类的沉淀少, 且痕量的乙醇易于挥发。

2.2 限制性消化与接头连接 用内切酶 *Mse* I、*Eco*R I 双酶切红花 DNA 基因组后, 片段集中在 $100\sim 500 \text{ bp}$, 说明酶切较完全。实验中, 对红花基因组酶切和连接的“一步法”虽然具有实验周期短, 时间效率高等优点, 但是, 由于限制性内切酶和连接酶对缓冲液及最佳反应温度的要求不太一致, “一步法”所得到的产物较少。通过对比实验, 确定 $0.5 \text{ U}/250 \text{ ng}$ 的 T_4 DNA 连接酶用量, “两步法”中酶切时间为 37°C 3 h, 16°C 过夜, NEB Buffer 2 后续的扩增效果最好。

2.3 预扩增反应 对连接产物设置不同的稀释倍数(5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍、30 倍)进行对比研究, 电泳结果表明, 稀释倍数为 25 倍的高相对分子质量区域($>1000 \text{ bp}$)未见条带, 说明消化完全, 连接效率较高, 如图 1 所示。

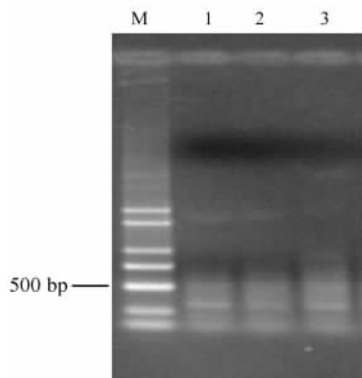


图 1 红花基因组 DNA 稀释 25 倍的 AFLP 预扩增电泳图

Fig 1 Pre-amplification profile of 25 dilution multiples in *Carthamus tinctorius* L. genome with AFLP

M: Marker; 1-3: Pre-amplification product in *Carthamus tinctorius* L. genome

2.4 选择性扩增反应 选择性扩增的条带, 实际上是从扩增产物中, 筛选出能被合适引物组合选择性碱基识别的 DNA 片段, 其结果需要用高分辨的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测^[6], 对预扩产物设置不同稀释倍数(10 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、150 倍和 200 倍)对比实验, 稀释 75 倍的扩增效果最好, 稀释 100 倍的信号较弱, 200 倍无条带。结果见图 2。

3 讨论

到目前为止, 有关中药红花基因组 DNA 的研究较少, 我们曾研究了红花品种的随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分子鉴定技术^[7], 但 RAPD 标记本身存在重复差和共迁移问题, 在琼脂糖电泳下不能分开红花基因组大小相同而碱基序列不同的片段。本研究建立的 AFLP 技术稳定性好, 其银染检测系统能分辨出红花基

因组一次扩增约 $50\sim 80$ 条扩增带。

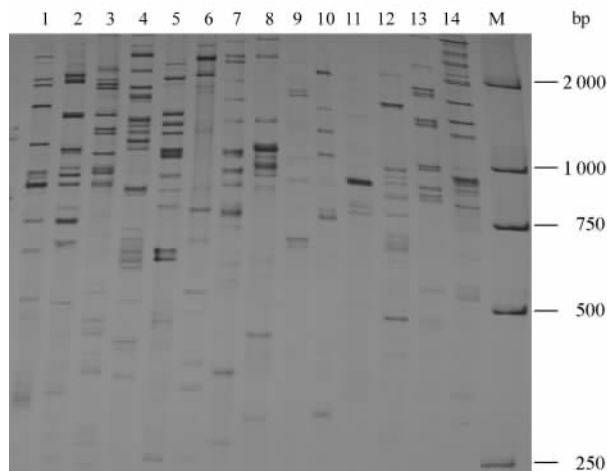


图 2 红花基因组 DNA 稀释 75 倍不同引物扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig 2 Polyacrylamide gel profile of amplification product of 75 dilution multiples in *Carthamus tinctorius* L. genome with AFLP

M: Marker; 1: E-ACC-M-CAA; 2: E-ACC-M-CAC; 3: E-ACC-M-CAG; 4: E-ACC-M-CAT; 5: E-ACC-M-CTA; 6: E-ACC-M-CTC; 7: E-ACC-M-CTG; 8: E-ACC-M-CTT; 9: E-AAG-M-CAA; 10: E-AAG-M-CAC; 11: E-AAG-M-CAG; 12: E-AAG-M-CAT; 13: E-AAG-M-CTA; 14: E-AAG-M-CTC

AFLP 操作步骤复杂, 流程长, 影响因素多, 需要针对不同植物品种进行系统研究, 并优化每一步反应条件, 建立相应的 AFLP 反应体系。

模板 DNA 的纯度质量直接影响 AFLP 成功。本研究建立的 DNA 提取方法适用于红花叶片内含物特殊性, 提取的 DNA 纯度在 $1.8\sim 2.0$ 之间, 能满足红花 AFLP 的需要。

根据我们实验结果, “两步法”在连接时可不用担心酶的过度消化, 提高了连接效率, 分别在限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶的最佳温度分别是 37°C 和 16°C , 完成酶切和连接反应。

在 AFLP 两次的扩增中, 不同稀释倍数产物对实验结果有一定影响, 设置红花基因组的 PCR 产物不同的模板浓度梯度, 研究发现产物稀释 25 倍进行预扩增, 再稀释 75 倍进行选择扩增, 扩增效果较好。另外, 预变性时间设定为 5 min 可以增加红花基因组的扩增产物的得率的方法。

AFLP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测是非常关键的一步, 也是较难操作的步骤, 本研究的凝胶电泳长度大于 40 cm 才能确保红花基因组 DNA 的有效分离。此外, 玻璃板一定要非常清洁, 否则会产生气泡, 并导致染色背景, 在剥离时更容易使凝胶撕裂; 制胶完成后, 要恒定功率预电泳以去除尿素, 提高分辨率, 同时可以使凝胶温度升高, 保证红花选择性产物的单链状态。实验用 6% 的聚丙烯酰胺电泳, 采用不同的恒功率(90 W、110 W、150 W)进行电泳实验, 结果无大差异; 而太高的电压会使凝胶的分辨率降低, 并且使带扩散。

银染中水的质量很关键,杂质使低分子量条带可能无法出现,我们试验了蒸馏水、重蒸水、去离子水的影响,蒸馏水结果不好,去离子水成本太高,重蒸水能取得满意结果,成本也不高。染色后的洗涤时间很重要,需要根据不同的物种摸索合适的洗涤时间,如果凝胶洗涤时间太长,银颗粒会脱离DNA,产生很少或没有序列信号,如果洗涤时间过长,染色步骤需要重新进行。整个银染可以在室温下进行所有步骤,但显影反应除外,显影溶液必须预冷至 10~12℃ 以减小背景杂色,同时在显影溶液中加入甲醛和硫代硫酸钠;染色及显影溶液都用新配的,重复使用任何溶液都会对条带的清晰度产生影响。

总之,我们的研究表明,要得到稳定、重现性好、特异性强的结果,不能照搬 AFLP 的常规操作步骤和方法,一定要系统研究,逐个条件摸索,才能建立特异性的反应体系,得到满意结果。AFLP 标记技术的关键,在于高质量模板提取和特异性反应体系的建立,本研究建立了红花特异性 AFLP 反应体系,为红花重要的品质性状分子标记研究技术平台的建立及红花品质性状的定向调控奠定了基础。

[参考文献]

[1] 杨玉霞,吴卫,郑有良. 红花研究进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22: 365-369.
 [2] 樊兰英. 近十年来红花的临床应用进展[J]. 江西医学院学报, 2002, 42: 185-188.
 [3] 郭美丽,张芝玉,张汉明,等. 不同产地红花药材的质量评价[J]. 中国中药杂志,2000,25: 5-7.
 [4] Bonin A, Pompanon F, Taberlet P. Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity[J]. Methods Enzymol, 2005,395: 145-161.
 [5] 程丽莉,苏淑钗,秦岭,等. 板栗叶片 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 北京农业大学学报,2005,20:5-9.
 [6] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社,2002:1039-1044.
 [7] 郭美丽,姜伟,张志珍,等. 红花种质的 RAPD 分子鉴定[J]. 第二军医大学学报,2003. 24:1116-1119.

[收稿日期] 2005-10-17 [修回日期] 2005-12-16

[本文编辑] 尹茶

Comparison of HER-2/neu, ER and PCNA expression in premenopausal and postmenopausal patients with breast carcinoma

Zheng W, Zheng J, Ma L, Meng F, Huang L, Ma D(Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] We attempted to compare the pattern of HER-2/neu, ER and PCNA in premenopausal and postmenopausal patients with breast carcinoma to identify potential biological differences. Five hundred and forty-eight samples from 318 premenopausal and 230 postmenopausal women with invasive ductal carcinoma of the breast were evaluated for HER-2/neu, ER and PCNA expression by immunohistochemistry. HER-2/neu expression showed 27.4% positivity in premenopausal and 24.8% in postmenopausal women; there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). In contrast, HER-2/neu expression was found to be significantly associated with ER negativity in the two groups ($P<0.05$ in premenopausal, $P<0.001$ in postmenopausal patients). However, it was significantly associated with PCNA expression only in the postmenopausal group ($P<0.001$). 54.4% showed premenopausal tumor cell ER positivity, whereas 64.3% of the postmenopausal group showed positivity. ER expression showed a significant correlation with patient menopausal status ($P<0.05$). The prevalence of PCNA positivity in the tumor cell components is slightly higher in postmenopausal compared to premenopausal women ($P>0.20$). The current study is consistent with reports from other groups regarding the correlation of HER-2/neu with adverse pathologic features and with expression of other markers in carcinoma. We also observed there was no trend toward increased HER-2/neu expression in either premenopausal or postmenopausal patients, i. e. there was similar HER-2/neu expression in the two groups. This suggests that HER-2/neu status could be used to determine assignment to specific intensive adjuvant therapy and evaluation of biological behavior in both pre- and postmenopausal patients with breast carcinoma.

[APMIS,2005,113: 175-181]