

AFLP 法构建人参、西洋参基因组 DNA 指纹图谱

罗志勇^{1*}, 周 钢¹, 周肆清², 陈湘晖³, 罗建清⁴, 胡维新¹

(湖南医科大学 1. 分子生物学研究中心, 2. 计算机中心, 3. 湘雅医院, 4. 卫生统计学教研室, 湖南 长沙 410078)

摘要: 目的 采用扩增片段长度多态性 DNA(AFLP) 分子遗传标志技术, 分析人参、西洋参基因组 DNA 多态性。方法 人参、西洋参干燥根基因组 DNA, 经 EcoRI/ MseI 酶切并与其相应的人工接头连接后, 使用选择性引物进行 PCR 扩增。结果 经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 成功构建出多态性丰富和重复性好的人参、西洋参 DNA 指纹图谱。结论 AFLP 法有望成为一种独立的切实可行的手段, 将在人参、西洋参等药用植物的鉴定、生物进化、系统发育研究及指导道地性药材的科学栽培等方面发挥重要作用。

关键词: 人参; 西洋参; 引种西洋参; 基因组 DNA; 扩增片段长度多态性 DNA; DNA 指纹图谱

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)08-0626-04

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术^[1,2] 已应用于中药材人参、西洋参^[3,4]、地胆草^[5]、甘草^[6]、淫羊藿^[7]、乌梢蛇和金钱白花蛇^[8] 的鉴定。该法有许多优点, 但同时也存在一些严重的不足, 如实验结果重复性差是其主要的弱点, 因而难以在实际中应用^[9-11]。1995 年 Vos 等^[10] 在 Zabeau 的基础上发展了一种用于构建 DNA 指纹图的新技术, 称为扩增片段长度多态性 DNA (amplified fragment length polymorphism, AFLP)。该方法用一人工接头 (adapter) 与限制酶切的基因组 DNA 片段连接, 制成 AFLP 模板 DNA, 合成一系列 3'-末端随机改变数个碱基的 PCR 引物进行 PCR 特异条件的扩增, 经电泳检测后可得到 DNA 指纹图谱。与 RFLP, RAPD 比较, AFLP 法构建的 DNA 指纹图谱具有重复性好、灵敏度高的优点^[9-11], 展示了 AFLP 技术特别适合品种鉴定的应用价值和广阔前景。本研究首次将 AFLP 技术应用于人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)、西洋参 (*Panax quinquefolium* L.) 基因组 DNA 多态性分析, 采用 EcoRI 和 MseI 双酶切上述基因组 DNA, 成功构建出具有丰富多态性的 DNA 指纹图谱。

材 料 和 方 法

材料 供试人参、西洋参、引种西洋参的干燥根

分别原产于我国吉林省、美国威斯康星州、我国吉林省。

仪器 ZK401 高速冷冻离心机 (Hermle 公司, 德国); UV-3100S 分光光度计 (Shimadzu 公司, 日本); 480 型基因扩增仪 (珠海 Hema 公司); Seqi-Gen™ 电泳测序系统 (Bio-Rad 公司, 美国); ISO3000 照相机 (Polaroid 公司, 美国); IBM PIII450 计算机; SQ9636 图象扫描仪 (美国)。

试剂 AFLP™ Analysis System II (GIBCO BRL 公司); PVP, Taq DNA 聚合酶, TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺) 及过硫酸铵 (Promega 公司); 尿素、丙烯酰胺、N', N'-亚甲双丙烯酰胺、CTAB, SDS, β-巯基乙醇 (超纯, Sagon 公司); 其余试剂均系国产分析纯。

基因组 DNA 制备 样品 DNA 提取采用作者改进的植物基因组 DNA 提取法^[12]。挑选无霉变和虫蛀人参、西洋参的干燥根用 75% 乙醇消毒, 手术刀片刮弃表皮, 取组织 1 g, 置小研钵中, 加入液氮研磨成粉, 将其转移到 50 mL 塑料离心管中, 立即加入保温 60℃ 的 6 × CTAB 提取液 [CTAB 6%, Tris-HCl (pH 8.0) 100 mmol·L⁻¹, EDTA 20 mmol·L⁻¹, NaCl 1.4 mol·L⁻¹, 巯基乙醇 2%, PVP 5%] 混匀, 60℃ 保温 1 h, 并不时振摇。冷却至室温后加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提, 轻轻颠倒混匀, 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液加入 1/10 体积预热 65℃ 的 10% CTAB/NaCl 溶液 (CTAB 10%, NaCl 0.7 mol·L⁻¹), 室温下孵育 10 min, 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 重复抽提 1 次, 吸取上清液加入等体积的 1 × CTAB 沉淀缓冲液 [CTAB 1%, Tris-HCl (pH 8.0) 50 mmol·L⁻¹, EDTA 10

收稿日期: 2000-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800190) 和美国中华医学学会 (CMB) 基金 (9906) 湖南医科大学杰出青年基金资助项目

* Tel: (0731) 4805449, Fax: (0731) 4481180,

E-mail: mbrc@public.cs.hn.cn

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 疏基乙醇 1%], 轻轻颠倒混匀, 60°C 保温 30 min, $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 小心去上清液, 后加入高盐 TE 溶液[Tris-HCl (pH 8.0) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8.0), NaCl $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 1 mL 溶解 CTAB-DNA 沉淀复合物, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 室温下放置 1 h, $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去上清液后, 分别用 65% 和 85% 乙醇各洗涤 2 次, 弃洗液, 自然干燥后并溶于 TE 溶液[Tris-HCl (pH 8.0) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 400 μL 中。

DNA 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 浓度和纯度的测定 取样品 DNA 10 μL 与上样缓冲液 2 μL 混匀, 上样于 0.8% 琼脂糖凝胶上, 用 $1 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液, $5 \text{ v} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 30 min, $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭染色后, 紫外灯下观察结果并照相; 取一定量样品 DNA, 稀释 50 倍, 于分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} 值, DNA 纯度根据 A_{260}/A_{280} 之比值判断。

基因组 DNA 的 EcoRI/ MseI 酶切 反应体系 25 μL 中含有 $5 \times 5 \mu\text{L}$ (反应缓冲液), 人参、西洋参、引种西洋参基因组均为 250 ng, 对照拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*, Ara) DNA 250 ng, EcoRI/ MseI 2.5 U, 37°C 反应 2 h 后, 70°C 孵育 15 min 以灭活限制酶活性, 离心反应管收集反应体系, 并置于冰上。

EcoRI/ MseI 基因组 DNA 片段与人工接头的连接 在上述 EcoRI/ MseI 酶切后产物中, 加入人工接头溶液[EcoRI/ MseI 人工接头, ATP $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl (pH 7.5) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg (Ac)₂ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KAc $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 24 μL , T₄ DNA 连接酶 1 U。室温轻轻混匀, 于 20°C 反应 2 h, 并取连接反应产物 10 μL 用 TE 稀释 10 倍, 混匀, 作为 AFLP 预扩增反应的模板, 余下的连接产物于 -20°C 保存。

AFLP 预扩增反应 反应体系 50 μL 含上述稀释模板 5 μL , 预扩增引物混合物 (含 dNTPs) 40 μL , $10 \times \text{PCR}$ 反应缓冲液[Tris-HCl (pH 8.4) $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl₂ $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$], Taq DNA 聚合酶 1 U。离心混匀, 并在反应体系表面覆盖 2~3 滴矿物油。 94°C 30 s, 52°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 20 次。以作为下一步选择性 AFLP 扩增反应的模板。

选择性 AFLP 扩增反应 混合体系 1 (Mix1) 50 μL 含 EcoRI 引物 (E-AA) 5 μL , MseI 引物 (M-CAG) (含 dNTPs) 45 μL ; 混合体系 2 (Mix2) 100 μL

含消毒蒸馏水 79 μL , $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 20 μL , Taq DNA 聚合酶 2.5 U; 选择性 AFLP 扩增反应体系 20 μL 含 Mix1 5 μL , Mix2 10 μL , 预扩增反应产物 5 μL 。离心混匀, 反应体系表面覆盖 2~3 滴矿物油。 94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min 30 s, 接着每循环一次降低退火温度 1°C , 循环 9 次; 再接着 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 循环 23 次。

聚丙烯酰胺凝胶电泳及 AgNO₃ 染色 选择性 AFLP 扩增产物分别加入等体积 (20 μL) 甲酰胺染料 (甲酰胺 98%, EDTA $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 溴酚蓝, 二甲苯菁), 离心混匀, 94°C 加热变性 3 min, 立即置于冰上。取上样缓冲液 3 μL 于 6% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺—甲叉双丙烯酰胺 20:1, 尿素 7.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液), 40 W 恒功率预电泳 20 min 后, 再取 PCR 产物 10 μL 上样于凝胶孔中, 40 W 恒功率电泳, 直到二甲苯菁迁移至凝胶 2/3 长度, 停止电泳, 时间约 2 h。然后将玻板与凝胶分离, 凝胶牢固附着于粘合硅烷处理的玻板上, 并将其浸入固定溶液 (乙醇 10%, 乙酸 0.5%) 中孵育 3 min, 接着在含 0.2% AgNO₃ 上述固定液中孵育 5 min, 双蒸水漂洗 20 s, 迅速置显色溶液 (NaOH 3.0%, 甲醛 0.5%) 染色至背景均匀, DNA 带清晰, 固定溶液孵育 5 min, 蒸馏水淋洗后于蒸馏水漂洗 10 min, 自然干燥, 阅片灯下照相。

数据分析 电泳照片经计算机图象扫描仪扫描, 经转换后形成标准图像文件 (BMP) 并存于 TIF 文件中, 用 DNA Simdex™ Version 3.0 软件^[14] 计算其相似度指数 (Similarity Index, SI)。

结果与讨论

在本研究中, 从药用植物人参、西洋参、引种西洋参的干燥根组织中提取到高质量的 DNA, 使其被 EcoRI/ MseI 完全酶切, 是成功构建 AFLP DNA 指纹图的前提。目前, 关于植物基因组 DNA 提取方法相关文献报道很多, 就其提取原理来看, 主要有 2 种——CTAB 法和 SDS 法。由于 SDS 法提取的 DNA 产物含多糖类杂质较多, 直接影响基因组 DNA 的限制性核酸内切酶的酶切效果, 而 CTAB 法的最大优点是能很好地去除多糖类杂质^[13]。作者在选用 CTAB 法提取人参、西洋参等植物基因组 DNA 时发现, 采用通常的 $1 \times \text{CTAB}$ 裂解液分离出的 DNA 纯度和产率均不够高, 从而影响到 AFLP DNA 指纹分析 (数据另文发表)。因此, 对 CTAB 法作了如下改进: 提高 CTAB 裂解液 CTAB

浓度(4 - 6 × CTAB),有利于核酸与蛋白质完全解离及 CTAB-DNA 复合物形成;通过增加 PVP 及 β-巯基乙醇的含量,防止植物细胞中多酚类物质氧化形成色素。在低盐条件下,CTAB-DNA 复合物发生沉淀,通过离心,可去除多糖类、蛋白质、色素及多酚类成份^[12]。提取的高分子量 DNA 大小约 21.2 kb,但由于人参、西洋参已经干燥处理,且储藏时间较长,故 DNA 分子有部分降解(图 1)。表 1 显示了 DNA 纯度,理论上 1.80 为最纯,从而表明所提上述样品的 DNA 纯度较高。

Tab 1 A₂₆₀, A₂₈₀, A₂₆₀/A₂₈₀ ratio of genomic DNAs of various plant materials determined by spectrophotometer ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Name of Sample	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
<i>P. ginseng</i> C. A. Meyer (Jilin, China)	0.048 ± 0.002	0.027 ± 0.003	1.78
<i>P. quinquefolium</i> L. (Wisconsin, USA)	0.064 ± 0.004	0.037 ± 0.004	1.73
<i>P. quinquefolium</i> L. (Jilin, China)	0.045 ± 0.004	0.025 ± 0.003	1.80

作者通过对其基因组进行 EcoRI/ MseI 酶切,分别将酶切片段与人工接头作进一步的连接,使用 E-AA 和 M-CAG 选择性引物对,首次成功构建了栽培人参、西洋参、引种西洋参干燥根组织特定的基因组 AFLP DNA 指纹图谱,而且获得的 DNA 指纹多态性数目比 RAPD^[4]、RFLP 高得多(图 2),实验重复 3 次可得到相同的结果。一种重复性好、多态性丰富的人参、西洋参及其混淆品基因组 DNA 指纹库将会在未来得到广泛应用。与此同时,应用 DNA Simdex™ Version 3.0 软件对上述 DNA 指纹进行二维图象处理,该软件系建立在 Windows 基础上并使用了复杂的图象分析技术的第三代计算机程序,它能对 DNA 指纹图谱的条带进行自动识别与定位并计算出不同样品间相似度指数。从计算出的相似度指数(表 2)显示,人参与西洋参基因组 DNA 指纹

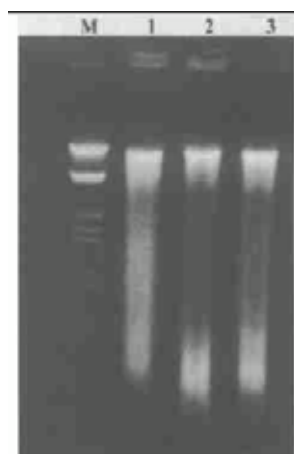


Fig 1 Genomic DNAs extracted from various plant materials were electrophoresed on a 0.8% agarose TBE gel

Lane 1. *Panax ginseng*, dried root from Jilin, China; Lane 2. *P. quinquefolium*, dried root from Wisconsin, USA; Lane 3. *P. quinquefolium*, dried root from Jilin, China; Lane M: λDNA/EcoRI + HindIII fragments

的相似度指数较高,与 Shaw 等^[4] RAPD 的分析结果一致。表明二者在遗传上有较近的亲缘关系。此外,西洋参与引种到我国吉林的西洋参 DNA 指纹的相似度为 0.76,提示引种西洋参的遗传物质基础 - 基因组 DNA 与西洋参相比,仍有一定的变异,但遗传因素和环境因素在西洋参药用有效成份形成中的地位及其相互作用的关系有待进一步探讨。总

Tab 2 Similarity indexes of various medicinal plant materials deduced by AFLP with E-AA and M-CAG selective primer pair ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sample	Similarity Indexes
PG vs PQ	0.63 ± 0.03
PG vs PQ*	0.65 ± 0.02
PQ vs PQ*	0.76 ± 0.02
PG vs Ara	0.23 ± 0.03
PQ vs Ara	0.29 ± 0.02
PQ* vs Ara	0.25 ± 0.01

Letter codes refer to Fig 2

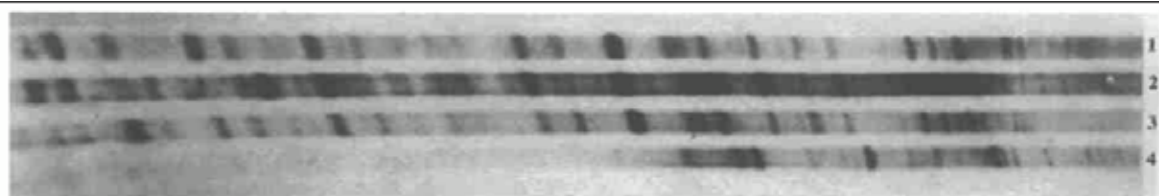


Fig 2 AFLP genomic fingerprints of various medicinal plant materials by E-AA and M-CAG selective primer pair Lane 1. PG (*Panax ginseng*); Lane 2. PQ (*P. quinquefolium*, Wisconsin, USA); Lane 3. PQ* (*P. quinquefolium*, Jilin, China); Lane 4. Ara (*Arabidopsis thaliana*)

之, AFLP 分子标记不仅有望成为一种独立的、切实可行的手段应用于人参、西洋参等药用植物品种的鉴别, 而且它在人参、西洋参等药用植物生物进化、系统发育研究及指导道地性药材的科学栽培等方面将具有极其广阔的前景。

致谢: 湖南医科大学分子生物学研究中心谢慎思教授、生理学教研室贺石林教授给予热情指导, 实验用药材经吉林省延边医学院药系生药学教研室刘永镇教授鉴定。

References:

- [1] Williams JGK, Kuvelik AR, Libak KJ, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (22): 6531 - 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(24): 7213 - 7218.
- [3] Cheung KS, Kwan HS, But PPH, *et al.* Pharmacognostical identification of American and Oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. *J Ethnopharmacology*, 1994, **42**: 67 - 68.
- [4] Shaw PC, But PPH. Authentication of panax species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. *Planta Med*, 1995, **61**(5): 466 - 469.
- [5] Cao H, But PPH, Shaw PC. Authentication of the Chinese drug "Kır Dī Dan" and its substitutes use random-primed polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1996, **31**(7): 543 - 553.
- [6] Yamazaki M, Sato A, Shimomura K, *et al.* Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analysis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, **17**(11): 1529 - 1531.
- [7] Nakai R, Shoyama Y, Shiraishi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, **19**(1): 67 - 70.
- [8] Wang YQ, Zhou KY. A preliminary study on the identification of crude snake drugs by molecular genetic markers [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, **32** (5): 384 - 387.
- [9] Yu K, Pauls KP, *et al.* Optimization of the PCR program for RAPD analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 2606.
- [10] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(21): 4407 - 4414.
- [11] Chen H, Wang ZS, Zhu LH. Construction of rice DNA fingerprinting by SRFA [J]. *Chin J Biotech* (in Chinese), 1996, **12**(3): 266 - 269.
- [12] Luo ZY, Zhou G, Chen XH, *et al.* An improved method for extraction of the plant genomic DNA [J]. *Lett Biotechnol* (in Chinese), in press.
- [13] Wang GL, Fan HJ. *Principle and Technique for Plant Gene Engineering* [M]. Beijing: Science Publishing House, 1998. 370 - 372.
- [14] Archer ES, Leung FC. Computer program for automatically calculating similarity indexes from DNA fingerprints [J]. *Biotechniques*, 1998, **25** (2): 252 - 254.

CONSTRUCTION OF GENOMIC DNA FINGERPRINTING IN PANAX GINSENG AND P. QUINQUEFOLIUM BY AFLP

LUO Zhi-yong¹, ZHOU Gang¹, ZHOU Si-qing², CHEN Xiang-hui³, LUO Jiar-qing⁴, HU Wei-xin¹

(1. Molecular Biology Research Center, 2. Computer Center, 3. Xiangya Hospital, 4. Health Statistics Department, Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT: **AIM** To analyse the genetic polymorphisms of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by amplified fragment length polymorphism DNA (AFLP) molecular genetic marker technique. **METHODS** Genomic DNAs extracted from dried roots of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* were digested by EcoRI in combination with MseI and ligated with EcoRI and MseI adapters, respectively. Meanwhile, the polymerase chain reactions were performed with E-AA and M-CAG selective primer pairs. **RESULTS** The distinct, reproducible genomic DNA fingerprints were constructed using denatured polyacrylamide gel electrophoresis assay. **CONCLUSION** AFLP, a powerful tool, was shown to play important roles in authentication, biological evolution, phylogenetic development of medicinal plant materials, including *Panax ginseng* and *P. quinquefolium*, and in guidance of genuine medicinal materials cultivation.

KEY WORDS: *Panax ginseng*; *Panax quinquefolium*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); DNA fingerprinting