

PCR 产物的 RFLP 分析在黄芪亚族(豆科)系统学研究中的应用初探

卞友

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

顾红雅 瞿礼嘉 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要

用聚合酶链式反应(PCR)将豆科黄芪亚族 7 属 9 种及甘草亚族 1 属 1 种植物叶绿体基因组中 *ndhF* 和 *psbA* 基因中一段约 3.1 kb 的 DNA 扩增出来, 并摸索出一最佳的 PCR 条件, 使得此条带得以特异性扩增, 可直接用于限制性内切酶水解。通过对此扩增片段的限制性片段长度多态性(RFLP)的初步分析, 认为利用 PCR 扩增出的 DNA 进行 RFLP 分析来探讨植物的系统进化问题在中国现行条件下大有潜力, 其方法简单易行, 结果可信。

关键词 黄芪亚族; 聚合酶链式反应; 限制性片段长度多态性

A PRELIMINARY STUDY ON THE USE OF RFLP ANALYSIS OF THE PCR AMPLIFIED PRODUCTS IN THE SYSTEMATIC INVESTIGATION OF THE SUBTRIBE ASTRAGALINAE (FABACEAE)

Ding Shi-you

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204*)

Gu Hong-ya, Qu Li-jia and Chen Zhang-liang

(*National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871*)

Abstract

The analysis of variation at the molecular level has been proven extremely useful in the reconstruction of plant phylogenetic relationships. A DNA fragment of 3100-base

收稿日期: 1994-01-14 接受日期: 1994-04-09

承蒙吴征镒教授指导, 特致谢忱。

* 本项目由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室资助。

pairs (bp) in the chloroplast genes *ndhF* and *psbA* has been amplified from 9 species of 7 genera in the subtribe Astragalinae and 1 species in the subtribe Glycyrrhizinae. A proper procedure for specifically PCR-amplifying the 3.1 kb fragment was presented. By this procedure, the PCR products could be digested directly after amplification. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the PCR-amplified products indicated that it had potential systematic significances in the phylogenetic studies of the subtribe Astragalinae. This approach could also reduce time, expense and the amount of DNA required, and furthermore, obtain reliable results.

Key words Astragalinae; Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism

植物分子系统学(molecular systematics)的主要内容就是在分子水平上(如蛋白质、核酸)研究植物的系统与进化。近年来,这一领域在国外发展非常迅速,并已取得了许多引人注目的进展^[1,2]。黄芪亚族(Astragalinae)隶属于豆科山羊豆族(Galegeae),对于本亚族分子系统学,特别是DNA水平研究的文献甚少。最早的报道是Lavin等对豆科136种植物叶绿体DNA(chloroplast DNA,简称cpDNA)进行的限制性片段长度多态性(RFLP)分析,发现在蝶形花亚科中,一些温带草本族cpDNA没有反向重复序列(inverted repeated sequence,简称IR),与豆科大多数类群不同。同时,在这些温带草本族中,叶枕退化或缺,染色体基数为7或8,从而认为它们之间有着较近的亲缘关系^[3],这与Polhill从形态地理学上所得的推测相符^[4]。另外,热带Milletieae中Wisteria的cpDNA亦缺少IR,其染色体基数为8,据此推测其与Galegeae可能存在关联^[1]。Liston利用聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction,简称PCR)将黄芪属14个近缘种叶绿体基因组中的一段约4.1 kb的片段扩增出来,并用23种不同的限制性内切酶酶解这些PCR产物,发现了37个突变位点和一个10 bp的长度变异,并据此对这些近缘种进行了分支分析^[5]。在黄芪亚族的系统学研究中,前人对种级水平上的分类学研究已做了许多深入而细致的工作^[4]。但对属级水平的系统关系仍存在着许多争议,这同样是豆科系统学的难题之一。cpDNA是一双链环状DNA分子,在绿色植物中其大小和碱基的排列均很保守,除了很少区域属“多变区”外,大部分区域都相当稳定,这样的材料较适用于进行属级以上分类群的系统学研究^[6]。由于提纯cpDNA的步骤繁琐、费时,本文试图利用PCR技术扩增叶绿体基因组的特异片段,通过RFLP分析手段,探讨其在黄芪亚族系统学上不同等级水平上的应用价值。

1 材料和方法

1.1 植物材料

见表1。

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 PCR仪 中国科学院遗传学研究所产品PCR-90。

表1 植物材料
Table 1 Plant materials

种 名 Species	采 集 地 Locality
<i>Alhagi pseudalhagi</i> Desv.	宁夏 Ningxia
<i>Calophaca sinica</i> Rehd.	山西 Shanxi
<i>Caragana bicolor</i> Komar.	云南 Yunnan
<i>C. franchetiana</i> Komar.	云南 Yunnan
<i>C. sinica</i> Rehd.	陕西 Shaanxi
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	宁夏 Ningxia
<i>Gueldenstaedtia verna</i> (Georgi) Boriss	北京 Beijing
<i>Halimodendron holodendron</i> (Pall.)	甘肃 Gansu
<i>Spirogyocarpella nubigena</i> (D. Don) Yakovl.	云南 Yunnan
<i>Tibetia coelestis</i> (Diels) P. C. Li	云南 Yunnan

1.2.2 CTAB 缓冲液(2×) 2%(W/V) CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma H5882), 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA, 0.1M/L Tris-HCl pH 8.0, 使用前加入 0.2%(V/V) 巯基乙醇。

1.2.3 寡聚核苷酸引物(primer) 引物 1: 5' -TCCCTCTTCATG-TATGGTTACC-3' (ndhF-731, 根据蚕豆 cpDNA 序列^[7]); 引物 2: 5' -GACTG-CAATTTTAGAGAG-ACGCG-3' (psbA-3, 根据烟草 cpDNA 序列^[8]), 由北京大学生命中心 DNA 合成仪(ABI) 合成。

1.2.4 Taq DNA 聚合酶及缓冲液 北京农业大学产品。

1.2.5 限制性内切酶 New England Biolab 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 种子萌发 将种子在水中浸泡 1 d(一些沙漠地区生长的植物种子先用开水泡 3 次), 待种子吸胀后, 将其移入放有潮湿纱布的培养皿中, 室温光照下放置数天, 待长出第 1 片真叶后, 剪下子叶及幼叶待用。

1.3.2 总 DNA 的提取(CTAB 法 依据 Doyle 等的方法^[9], 作了部分改动)。将子叶及幼叶(约 50 mg) 在液氮中研磨至细粉状, 移入装有 500 μL 60℃ 预热的 CTAB 缓冲液的微量离心管中, 置 60℃ 水浴保温 45 min, 加入等体积氯仿 异戊醇(24:1), 轻轻倒置几次混匀, 5000 r/min 离心 5 min, 小心取水相, 移入一新微量离心管, 24:1 再抽提 1 次, 取水相加 2/3 体积预冷异戊醇, 置 -20℃ 放置至少 30 min, 在 10000 r/min, 4℃ 条件下离心 2 min, 弃上清液, 沉淀重悬于 100 μL 1×TE 中, 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2—2.5 倍预冷 100% 乙醇, 置 -20℃ 20 min, 10000 r/min, 4℃ 离心 2 min, 弃上清液, 加 1 mL 70% 乙醇洗涤 1—2 次, 真空干燥, 视 DNA 量多少, 加入 50—200 μL 1×TE 重悬 DNA, 置 4℃ 备用。

1.3.3 聚合酶链式反应(PCR) 100 μL 反应体积中包括: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3); 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; 0.01% 明胶; dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.1 mmol/L; 引物 1 和 2 各 50 pmol; Taq DNA 聚合酶约 2.5 单位; 作为模板的总 DNA 约 0.5 μg。先无模板的反应体系中加入矿物油 50 μL 置 70℃, 2—5 min, 然后加入模板(总 DNA), 94℃ 变性 1 min, 接以 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 循环 5—7 次, 然后将退火温度降为 50℃ 再循环 25 次, 末次循环后置 72℃ 延伸 5—10 min。取出离心管, 除去矿物油, 取 5 μL 反应液电泳检查。

1.3.4 PCR 产物的回收 ①琼脂糖凝胶电泳回收法(参考分子克隆手册^[10]): PCR 产物若有几个条带时, 回收约 3.1 kb 的片段, 具体步骤如下: 配制 0.8% 琼脂糖凝胶, 溴化乙锭(EB) 在配胶时加入, 将 PCR 反应液全部加入加样孔中, 5 V/cm 电泳 2 h, 用手提式长波紫外灯观察, 小心切下含有约 3.1 kb 片段的琼脂糖胶, 放入微量离心管中, 加 1×TE 淹

住琼脂糖块,加等体积用 0.1 mol/L Tris-HCl 平衡至 pH 8.0 的酚,混匀,置液氮中冻 30 min,取出振荡至全溶,10000 r/min 离心 6 min,取上清液,加等体积酚 氯仿(1:1)和氯仿 异戊醇(24:1)各抽提 1 次,水相移入另一离心管加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2—2.5 倍体积预冷 100% 的乙醇,混匀,置-20℃ 20 min,10000 r/min,4℃,离心 10—15 min,弃上清液,70% 乙醇洗两次,真空干燥,重悬于 10—20 μ L 水中,置-20℃ 冰箱保存。

②直接回收法:取 1/10 体积 PCR 反应液进行电泳检查,若仅有 1 条约 3.1 kb 的条带时,将此 PCR 反应液加等体积氯仿 异戊醇(24:1)抽提 1 次,取水相加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2—2.5 倍体积的冰乙醇,置-20℃,30 min 后,10000 r/min,4℃ 离心 15 min,弃上清液,70% 乙醇洗两次,真空干燥,重悬于 10 μ L 水中,置-20℃ 冰箱保存。

1.3.5 酶解 取 5 μ L 回收的 DNA 悬浮液,加 2 μ L 相应的限制性内切酶缓冲液(10 \times),10 单位限制性内切酶,必要时加 2 μ L BSA(10 \times),加水至总体积 20 μ L,在适当温度下(依不同的酶而定)保温 2 h,1%—1.4% 琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm,2 h,紫外灯下观察,照像。

2 实 验 结 果

2.1 CTAB 法提取总 DNA

利用 CTAB 法从微量的植物材料中提取到较高质量、大小约 50 kb 的总 DNA(包括核 DNA 和质体 DNA),与 λ -DNA 大小相似(图 1, C),PCR 的结果也表明此法提取的总 DNA 可以满意地扩增出 cpDNA 中的特异片段(图 1, D—J)。

2.2 PCR 扩增

所用的两段寡聚核苷酸引物之间的 DNA 为 cpDNA 基因组的 *ndhF* 和 *psbA* 基因中的一段。据 Herdenberger 等的研究,这段 DNA 在蚕豆中为 3.1 kb 左右^[7],用我们设计的引物进行 PCR 扩增,在黄芪亚族 7 属 9 种及甘草亚族 1 属 1 种的总 DNA 中都能稳定、特异地扩增到一段约 3.1 kb 的 DNA 片段,种间大小差异不大(图 1, D—J)。我们认为此片段应是包括 *ndhF* 和 *psbA* 基因的 DNA 片段。



图 1 总 DNA 和 PCR 产物

Fig. 1 Total DNA and PCR products

A. λ -Hind III/EcoRI Marker; B. λ DNA; C. Total DNA *Gueldenstaedtia verna*; D—J. PCR products. D. *A. thagi pseudalhari*; E. *Calophaca sinica*; F. *Caragana bicolor*; G. *Gueldenstaedtia verna*; H. *Halimodendron holodendron*; I. *Spongioarpella nubigena*; J. *Glycyrrhiza uralensis*

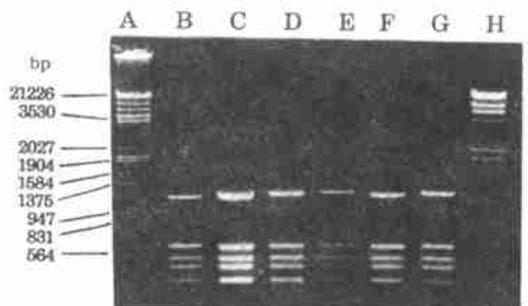


图 2 PCR 产物的 RsaI 酶解

Fig. 2 RsaI digest of the PCR-amplified cpDNA fragment

A. λ -Hind III/EcoRI marker; B. *A. thagi pseudalhari*; C. *Caragana sinica*; D. *C. bicolor*; E. *C. franchetiana*; F. *Halimodendron holodendron*; G. *Spongioarpella nubigena*; H. λ -Hind III marker

2.3 PCR 产物的回收

用琼脂糖凝胶电泳回收法得到的 DNA 片段进行限制性内切酶酶解时,发现一些片段被部分酶解,这可能是由于回收过程中一些酶的抑制物没能去除干净。这样的结果将给以后的分析工作带来许多麻烦,另外我们也尝试了其他的回收方法,如 DEAE-纤维素膜电泳回收法、低熔点琼脂糖回收法等,但这些方法都存在这样或那样的缺陷,或步骤复杂、回收率低,或酶切结果不好。我们用直接回收到的 PCR 扩增片段进行酶解,得到了很好的结果。

2.4 酶解

从图 2—4 我们可以看出,在同一属不同种间,大多具相同的酶切位点,突变较少,而在同一亚族不同属间,存在较多的不同位点突变,亚族间的植物则具有更多的位点差异,这些酶切位点的异同和多少与用经典方法所得的这些类群间的亲缘关系基本一致(论文在准备中)。

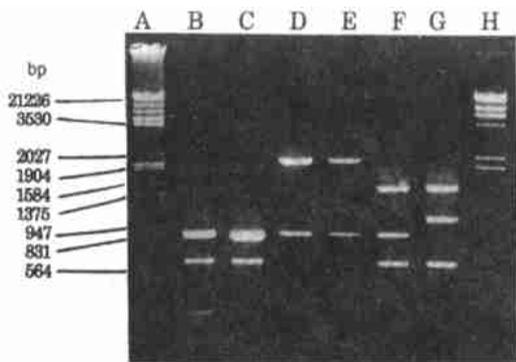


图 3 PCR 产物的 *Dra*I 酶解

Fig. 3 *Dra*I digest of the PCR-amplified cpDNA fragment

A. λ -Hind /Eco RI marker; B. *Alhagi pseudalhagi*; C. *Caragana sinica*; D. *C. bicolor*; E. *C. franchetiana*; F. *H. alimodendron*; G. *S. spongiocarpella nubigena*; H. λ -Hind marker

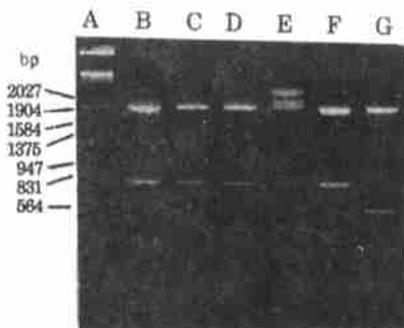


图 4 PCR 产物的 *Hae*III 酶解

Fig. 4 *Hae*III digest of the PCR-amplified cpDNA fragment

A. λ -Hind /Eco RI marker; B. *Alhagi pseudalhagi*; C. *Caragana sinica*; D. *C. bicolor*; E. *C. franchetiana*; F. *H. alimodendron*; G. *S. spongiocarpella nubigena*

3 讨 论

聚合酶链式反应是利用 DNA 聚合酶依赖于 DNA 模板的特性,模仿体内的复制过程,在附加的一对引物之间诱发的聚合酶反应。这种由 Mullis 发明的方法由于能简捷、快速、高效地将 DNA 特异片段大量扩增^[1],从而被认为是分子生物学领域的一项重大突破,短短几年发展迅速并臻完善。这项技术应用于植物系统学研究尚处于尝试阶段,但其却存在着巨大潜力。在此之前,植物分子系统学对 cpDNA 的研究主要有下述两种方法:第一,整个 cpDNA 基因组的 RFLP 分析,或用探针对某一特定片段进行索氏杂交,分析其 RFLP 式样^[6]。第二,单个基因或其片段的全序列测定。从本文结果来看,与这些方法相比较,PCR 技术应用于 RFLP 分析至少有下列优点:(1)不需提纯 cpDNA。(2)毋需使用同位素或其它标记物,不受同位素半衰期的限制,并减少实验室的污染。(3)省去了繁杂的基因克隆步骤,节约大量时间;不需经过测序,却能得到相似的结果,如 Liston 的

RFLP 分析可以检测出 10 bp 的长度变异。(4) 需要的植物材料很少, 从少于 50 mg 的植物材料中提取的总 DNA 即可满足 PCR 的需要量; 经过 20—25 个循环; 理论上可以将靶序列扩增约 10^6 倍, 即可以检测出在总 DNA 中存在 $1/10^{13}$ 量的单拷贝靶序列。

在 PCR 程序设计上, 我们采用了 Erlich 等的“热启动(hot start)”法^[12], 即在加模板 DNA 之前, 让反应液加热至 70℃, 这样更好地保证其扩增的特异性。在变性、退火、延伸这 3 个温度中, 退火的温度至关重要, 不同的植物的 PCR 要求不同, 过高则扩增效率低, 过低则特异性不好, 我们设计了 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃ 等系列比较温度, 发现在 55℃ 时效果最佳。另外, 为了增加其扩增效率, 我们严格控制开始几轮循环的退火温度于 55℃, 然后将其降至 50℃, 因为开始的 PCR 产物将成为以后扩增的模板, 这样在不影响其特异性的前提下, 扩增效率大为提高。

由于 Taq DNA 聚合酶缺乏校正功能, 在一个 30 轮循环的 PCR 反应中, 其核苷酸掺入错误率可达 0.25%^[13]。为避免这种随机性的掺入错误而造成酶切位点的可能变化, 我们采用多次反应的产物混合在一起回收用于酶切。

本项目的研究仍在进行之中, 从目前的结果我们可初见端倪, 可以预测用 PCR 扩增 cpDNA 的某些片段, 分析其 RFLP 的方法在本亚族的系统学研究上存在着极大的潜力。

参 考 文 献

- 1 Doyle J J. Variation at the DNA level: Uses and potential in legume systematics. In: Sturton C H ed., *Advances in Legume Systematics*, Part 3. Kew: Royal Botanic Gardens, 1987. 1—30
- 2 Soltis P S, Soltis D E, Doyle J J. *Molecular Systematics of Plants*. London: Chapman and Hall, 1992.
- 3 Lavin M, Bruneau A, Doyle J J *et al.* Loss of the chloroplasts DNA inverted repeat as a tribal character in the leguminosae. *Amer J Bot*, 1988. **75**: 189 [Abstract]
- 4 Polhill R M, Raven P H. *Advances in Legume Systematics*, Part I. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981.
- 5 Liston A. Variation in the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2 of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. *Amer J Bot*, 1992. **79**: 365—398
- 6 Palmer J D, Jansen R K, Michaels H J *et al.* Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation. *Ann Mol Bot Gard*, 1988. **75**: 1180—1206
- 7 Herdenberger F, Weil J H, Steinmetz A. Organization and nucleotide sequence of the broad bean chloroplast genes trnL-UAG, ndhF and two unidentified open reading frames. *Current Genetics*, 1988. **14**: 609—615
- 8 Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M *et al.* The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its organization and expression. *EMBO*, 1986. **5**: 2043—2049
- 9 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987. **19**: 11—15
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 318—323
- 11 Mullis K, Faloona F, Scharf S *et al.* Specific enzymatic amplification DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1986. **51**: 263—273
- 12 Erlich H A, Gelfand D, Sninsky J J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 1991. **252**: 1643—1651
- 13 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. **239**: 487