

三叶木通 MSAP 反应体系的优化及引物筛选

高 寰¹, 张 铮^{1,2,3*}, 周 婷¹, 曹向然¹, 陈阳洋¹, 王喆之^{1,2,3}

1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062

2. 陕西师范大学 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710062

3. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

摘 要: **目的** 研究三叶木通表观遗传多样性, 建立并优化三叶木通甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 反应体系。 **方法** 以三叶木通叶片为材料, 利用正交试验建立三叶木通 MSAP 的预扩增和选择性扩增的最佳反应体系。 **结果** 建立的 MSAP 最佳反应体系为酶切反应: *HpaII*/*MspI* 10 U, *EcoR* I 10 U; 预扩增反应: 总体积 20 μ L, 连接产物 2 μ L, *E00*、*HM00* 各 125 ng, dNTPs 0.312 5 mmol/L, Mg^{2+} 1.875 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 2 U; 选择性扩增反应: 总体积 20 μ L, 稀释 200 倍的预扩增产物 5 μ L, 引物 E-ACT、HM-CAT 各 50 ng, dNTPs 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 1.250 mmol/L, *Taq* DNA 酶 1 U。利用优化的体系, 最终从 MSAP 的 80 对引物中筛选出有效引物 6 对。 **结论** 建立的 MSAP 反应体系可用于后续三叶木通 DNA 甲基化的相关研究。

关键词: 三叶木通; MSAP; 遗传多样性; 体系优化; 引物筛选; 酶切反应

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0572-05

Optimization of MSAP reaction system for *Akebia trifoliata* and primers screening

GAO Huan¹, ZHANG Zheng^{1,2,3}, ZHOU Ting¹, CAO Xiang-ran¹, CHEN Yang-yang¹, WANG Zhe-zhi^{1,2,3}

1. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

3. National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Xi'an 710062, China

Abstract: Objective To establish and optimize the MSAP reaction system for analysis on epigenetic diversity in *Akebia trifoliata*.

Methods The leaves of *A. trifoliata* were as materials, using orthogonal $L_{16}(4^5)$ method to establish pre-amplification and selective amplification optimum reaction system of the MSAP. **Results** The optimal MSAP reaction systems include: 10 U *HpaII*/*MspI* and *EcoR* I in the enzyme digestion; in the 20 μ L pre-amplification mixture contained 2 μ L of ligation products, 125 ng of each pre-selective primers, *E00* and *HM0*; 0.312 5 mmol/L of dNTPs, 1.875 mmol/L of Mg^{2+} , 2 U of *Taq* DNA polymerase; in the 20 μ L selective amplification mixture contained 5 μ L of 1 : 200 diluted pre-amplification products, 50 ng of each selective primer, 0.250 mmol/L of dNTPs, 1.250 mmol/L of Mg^{2+} , and 1 U of *Taq* DNA polymerase. Using the optimal MSAP reaction system to screen for six pairs of effective primers from 80 pairs of primers of MSAP. **Conclusion** Those results provide fundamental reference for further epigenetic studies on *A. trifoliata* DNA methylation.

Key words: *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.; MSAP; genetic diversity; optimization of system; primers screening; enzyme digestion

表观遗传为没有 DNA 序列变化的、可遗传的基因表达改变^[1]。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式之一, 已成为当今分子生物学领域的研究热点。DNA 甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 是基于 AFLP 技术的一种用于检测基因组甲基化变异的

PCR 技术^[2]。MSAP 分子标记使用能够识别 5'-CCGG 的四核苷酸位点的同裂酶 *HpaII*/*MspI* 分别和内切酶 *EcoRI* 组合, 对 DNA 序列进行切割。*HpaII* 只对一条 DNA 链上胞嘧啶发生甲基化的 DNA 链有酶切活性; *MspI* 对单链或双链上内部胞嘧啶甲基化序列有酶切活性。基于此, 可以使相同 DNA 序列扩增出

收稿日期: 2011-10-18

基金项目: 陕西省科技攻关项目 (2010K17-05-02); 2010 年国家级大学生创新性实验计划资助项目 (101071825)

作者简介: 高 寰 (1986—), 女, 硕士, 研究方向为植物遗传多样性。E-mail: gaohuan_9132@163.com

*通讯作者 张 铮 E-mail: zhangzheng@snnu.edu.cn

不同的谱带, 以此判断 DNA 5'-CCGG 位点胞嘧啶的甲基化状态和程度^[3]。此技术无需预先知道所分析 DNA 的序列, 并且甲基化多态性高, 引物设计简单, 现已成为检测植物基因组 DNA 甲基化水平的重要方法, 在研究植物表观遗传方面具有极大的应用价值^[4-5]。

三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 为木通科 (Lardizabalaceae) 木通属 *Akebia* Decne. 落叶木质藤本植物, 是我国传统中药材。其具有清热利尿、活血通脉、舒肝益肾等功效, 现代药理研究表明其还具有降压、抗肿瘤、抗衰老等作用^[6-8], 已被收录于《中国药典》2010 年版。目前国内对三叶木通的研究多集中在生物学形态特征、化学成分、药用价值、遗传多样性及亲缘关系等方面的研究^[9-11], 但对其表观遗传的研究尚未见报道。本研究以三叶木通叶片为材料, 对 MSAP 技术过程中的主要影响因素进行正交试验分析, 建立并优化三叶木通 MSAP 反应体系, 为今后研究其 DNA 甲基化奠定基础。

1 材料

三叶木通叶片采自陕西商洛镇安县, 与陕西师范大学种质资源圃内的三叶木通比对鉴定, 确定所采材料确为三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz., 经硅胶干燥后于 -40 °C 保存。

限制性内切酶 *HpaII*、*MspI* 和 *EcoRI* (NEB 公司), T4 连接酶 (MBI 公司), *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司), DL2000 Marker (西安润德生物技术有限公司), 引物和接头由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

Microfuge 22R 离心机、DU730 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter 公司), PTC-200 PCR 仪 (BIO-RAD 公司), Tanon-1600 数码凝胶图像处理系统 (上海天能科技有限公司), DYCZ-20F 型 DNA 序列分析电泳槽、DYY-12 型电泳仪电源 (北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

MSAP 技术的 DNA 提取采用本实验室改良的 CTAB 法^[11-12], 叶片经液氮处理迅速研磨后用缓冲洗涤液 (0.025% NaCl, 0.2 mol/L Tris-Cl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1% PVP, 4% 巯基乙醇) 清洗 3 次, 氯仿-异戊醇抽提前先用等体积苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提 1 次, 用 50% 体积的 5 mol/L NaCl 替换 NaAc。提取的基因组 DNA 样品于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2 MSAP 的酶切与连接

2.2.1 双酶切体系 总体积 25 μ L, 包括 500 ng 基因组 DNA、NEB 缓冲液 2.5 μ L、*EcoRI* 10 U、*HpaII*/*MspI* 10 U、100 $\times$ BSA (10 mg/mL) 0.2 μ L。37 °C 恒温孵育 2 h, 65 °C 变性 20 min。酶切产物于 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.2 连接体系 将两个单链的接头 (*EcoRI*-adapter I、*EcoRI*-adapter II、H/M-adapter I、H/M-adapter II) 复性为双链结构, 即 95 °C 变性 5 min, 缓慢冷却至室温, -20 °C 冷冻保存备用。连接体系总体积 20 μ L, 各因素水平设置参照三叶木通 AFLP 反应体系^[11], 22 °C 连接反应 2 h, 65 °C 变性 10 min 后迅速取出, 放入 -20 °C 保存。

2.3 预扩增的正交反应体系

根据单因子预试验结果, 初步选定预扩增的各因素水平范围, 用 E-00/HM-00 引物组合进行连接产物的预扩增反应, 反应总体积 20 μ L。采用正交试验 $L_{16}(4^5)$ 对预扩增反应中的 5 个因素: *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、连接产物、dNTPs 和引物的反应浓度进行试验, 反应条件见表 1。PCR 扩增程序: 94 °C、2 min, 94 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、1 min, 30 个循环。预扩增产物于 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.4 选择性扩增的正交反应体系

在前期预试验基础上, 选用 E-ACT/HM-CAT 引物组合, 对预扩增中最佳组合的产物进行选择性

表 1 预扩增反应体系的因素与水平

Table 1 Factors and levels of different pre-amplification systems

水平	因素				
	$Mg^{2+}/(mmol \cdot L^{-1})$	dNTP/(mmol·L ⁻¹)	引物/(ng· μ L ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/(U· μ L ⁻¹)	连接产物/ μ L
1	0.625 0	0.125 0	50	0.5	1.0
2	1.250 0	0.187 5	100	1.0	2.0
3	1.875 0	0.250 0	150	1.5	3.0
4	2.500 0	0.312 5	200	2.0	4.0

扩增。采用正交 $L_{16}(4^5)$ 确定选择性扩增反应中的 5 个因素 (*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 的浓度、预扩增产物稀释倍数、dNTPs、引物) 的最佳反应条件。各因素水平见表 2。PCR 扩增程序: 94 °C、2 min; 94 °C、30 s, 65 °C、30 s (每循环降低 0.7 °C), 72 °C、1 min, 共 13 个循环; 72 °C、5 min; 94 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、1 min, 共 24 个循环。

选择性扩增产物于 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 引物筛选

利用优化的选择性扩增体系, 采用 *Eco*RI 引物 8 个, H/M 引物 10 个, 共组合 80 对引物进行筛选, 见表 3。通过琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选出条带丰富清晰的引物组合。对琼脂糖凝胶筛选出的引物组合进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的进一步检测和筛选。

表 2 选择性扩增反应体系的因素与水平

Table 2 Factors and levels of different selective amplification systems

水 平	因 素				
	$Mg^{2+}/(mmol\cdot L^{-1})$	dNTP/ $(\mu mol\cdot L^{-1})$	引物/ $(\mu mol\cdot L^{-1})$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/ $(U\cdot \mu L^{-1})$	预扩增产物稀释倍数
1	0.625	0.125 0	50	0.5	50
2	1.250	0.187 5	100	1.0	100
3	1.875	0.250 0	150	1.5	150
4	2.500	0.312 5	200	2.0	200

表 3 MSAP 分析的引物序列

Table 3 Sequence of primers used for MSAP analysis

引 物	序 列	引 物	序 列
E-AAC	5'GACTGCGTACCAATTCAAC3'	HM-CAG	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCAG3'
E-ACT	5'GACTGCGTACCAATTCAAT3'	HM-CTC	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCTC3'
E-AAG	5'GACTGCGTACCAATTCAAG3'	HM-CTA	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCTA3'
E-ACA	5'GACTGCGTACCAATTCACA3'	HM-CAA	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCAA3'
E-ACC	5'GACTGCGTACCAATTCACC3'	HM-CAT	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCAT3'
E-ACG	5'GACTGCGTACCAATTCACG3'	HM-CTG	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCTG3'
E-AGC	5'GACTGCGTACCAATTCAGC3'	HM-TCCA	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA3'
E-AGG	5'GACTGCGTACCAATTCAGG3'	HM-TCAA	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA3'
HM-CAT	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGCAT3'	HM-TCGA	5'ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA3'

2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

2.6.1 制胶 取 60 g/L PA 胶 80 mL, 96 μ L TEMED 和 100 g/L APS 240 μ L 混匀制胶, 恒定功率 85 W 预电泳 1 h。

2.6.2 电泳样品准备 取选择性扩增产物 4 μ L 并加入等体积的缓冲液 (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯氰), 混匀, 95 °C 变性 5 min 后迅速取出放入冰中冷却, 防止复性, 上样量 8.0 μ L。

2.7 银染检测

采用三叶木通 AFLP 反应体系中的银染检测法^[6]。

3 结果

3.1 基因组 DNA 提取

本研究采用改良 CTAB 法所得的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 DNA 主带清晰, 没

有降解, 见图 1。经紫外分光光度计测定, A_{260}/A_{280} 值在 1.7~1.9, 说明 DNA 纯度高, 蛋白质量极少, 完全满足 MSAP 反应对 DNA 的要求。

3.2 预扩增结果

依据预扩增产物片段范围应集中在 100~750 bp 呈弥散状分布的原则, 对预扩增电泳图进行直观

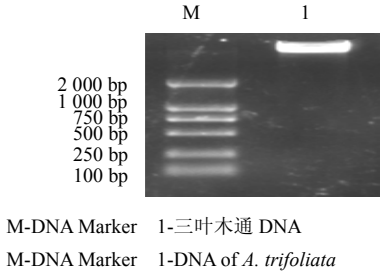
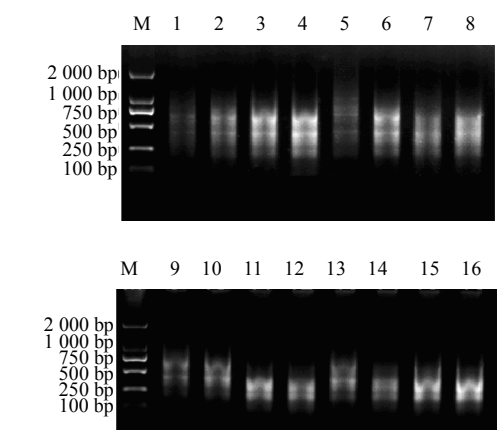


图 1 基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA

分析。从图 2 可以看出 1~10 体系整个预扩增产物的片段主要集中在 100~750 bp, 相对于 11~16 体系更符合 MSAP 对预扩增产物的要求。但是 1, 5 体系扩增的产物量较少, 不利于后续选择性扩增的进行, 第 2、3、4、7、9 泳道的非特异性扩增较多。第 6、8、10 泳道条带亮度较高, 扩增产物浓度高, 且主要集中在 100~750 bp, 符合预扩增对产物的要求。最终确定第 6 号泳道的体系为最佳体系: 连接产物 1 μ L, E00、HM00 各 150 ng, dNTPs 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 1.875 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 并选择第 6 号正交组合产物为选择性扩增模板。



M-DNA Marker 1~16-预扩增反应体系正交组合中的个因素组合
M-DNA Marker 1—16-pre-amplification reaction system
orthogonal combination of factor combinations

图 2 预扩增正交体系电泳图
Fig. 2 Electrophoresis of orthogonal design pre-amplification systems

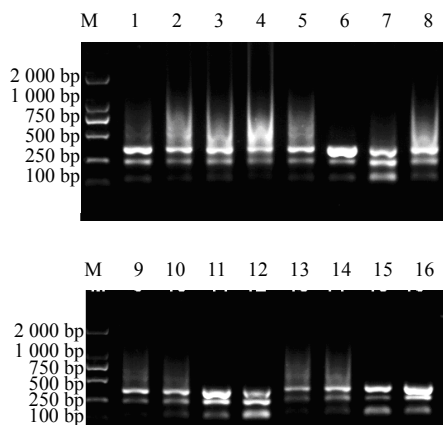
3.3 选择性扩增结果

运用直观分析法对选择性扩增正交电泳图 (图 3) 进行分析, 可以看到 1~16 号体系非特异性扩增在逐渐减少, 而 11、12、15、16 的非特异性扩增几乎没有。对正交体系表各个因素进行单因素分析, 发现随着模板稀释倍数的增大, 非特异性扩增逐渐减小。当达到 150~200 倍时, 扩增产物的特异性有明显的提高。从整个电泳图中可以看出 6、11、12、15、16 泳道效果较好, 扩增产物浓度较高, 条带清晰, 无明显的非特异性扩增, 且片段主要集中在 500~100 bp, 符合选择性扩增对产物的要求。同时兼顾结果与试剂用量, 故选择第 16 号体系: 总体积 20 μ L, 稀释 200 倍的预扩增产物 5 μ L, E-ACT、HM-CAT 各 50 ng, dNTPs 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 1.875

mmol/L, *Taq* DNA 酶 1 U。

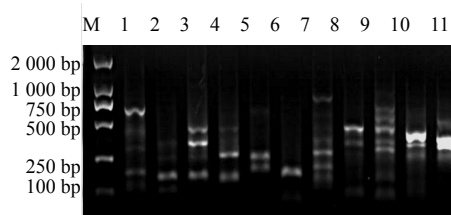
3.4 引物筛选结果

采用优化的三叶木通 MSAP 反应体系, 通过琼脂糖凝胶电泳检测从 80 对引物中初筛出 11 对扩增条带清晰, 丰富的引物, 见图 4。



M-DNA Marker 1~16-选扩增反应体系正交组合中的因素组合
M-DNA Marker 1—16-selective amplification reaction
system orthogonal combination of factor combinations

图 3 选择性扩增正交体系电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of orthogonal design selective amplification systems



1-E-AAC/HM-CAA 2-E-AAC/HM-CAG 3-E-AAC/HM-TCGA
4-E-AAC/HM-CTC 5-E-AAC/HM-CTA 6-E-AAC/HM-CAC
7-E-ACT/HM-CAA 8-E-ACT/HM-CAG 9-E-ACT/HM-TCGA
10-E-ACT/HM-CTC 11-E-ACT/HM-CTA

图 4 引物筛选电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of primers screening

3.5 银染结果

将 11 对不同引物组合的选择性扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的银染第 2 次筛选, 选取条带清晰, 多态性好的引物组合共 6 对 (图 5)。

4 讨论

在建立和优化分子标记反应体系时, 常用单因子试验和正交试验两种方法。但单因子试验无法考虑到各因素间的相互影响作用, 而正交试验设计具有均衡分散, 综合可比及可伸缩, 效应明确等特点,

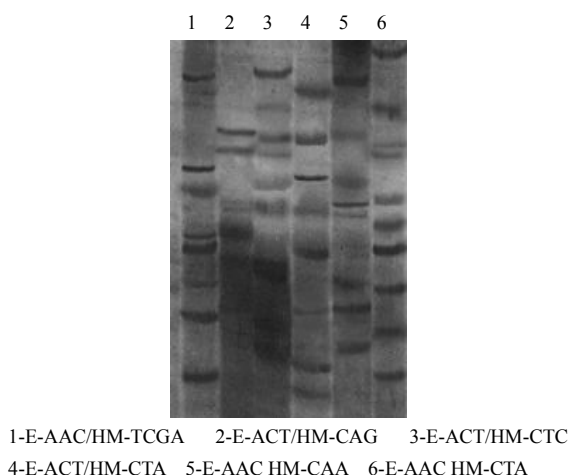


图 5 引物筛选的银染结果

Fig. 5 Silver stained results of primers screening

可较快地找到因素间的最优组合^[13-14]。故本实验在建立三叶木通 MSAP 反应体系时,根据预试验了解该反应体系中各因素的浓度水平范围,在此基础上利用正交试验获取最佳反应体系。

本实验着重对三叶木通 MSAP 反应体系中预扩增和选择性扩增进行优化。对预扩增正交试验进行单因素分析,发现引物浓度和模板浓度是影响本实验的关键因素。随着模板浓度的升高,预扩增产物片段范围整体偏下,无法达到预扩增对产物的要求。引物浓度过低,条带变弱,产物量明显下降。引物浓度过高,非特异性扩增产物增多。在选择性扩增中发现模板稀释倍数是影响实验的关键因素,随着稀释倍数的增大,扩增产物的非特异扩增明显减少。在对预扩增产物稀释至 150~200 倍时均可获得较好的产物。

本实验扩增结果表明,扩增反应中 Mg^{2+} 浓度, dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶量三者之间的配比关系对扩增效果的影响也较为重要。结果显示 Mg^{2+} 浓度过高致使反应产生非特异性扩增,浓度过低会导致 *Taq* DNA 聚合酶的活性降低。过多的 dNTPs 则可与游离的 Mg^{2+} 结合,从而降低反应中 Mg^{2+} 的实际浓度,对扩增反应产生一定的抑制作用。本实验结论与多数研究报道一致^[15-16]。

本实验建立并优化了适于三叶木通 MSAP 技术的反应体系。在此基础上进行引物筛选,得到 6 对适于三叶木通 MSAP 反应的引物,为分析三叶木通 DNA 甲基化奠定基础。

参考文献

- [1] Jab L E, Lamb M J. The changing concept of epigenetics [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 981: 82-96.
- [2] Reyna-López G E, Simpsonand J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703-710.
- [3] Mc C M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 3640-3659.
- [4] 郭万里. 中国松嫩平原短芒野大麦天然种群分子遗传与表观遗传多样性及其遗传结构的研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2006.
- [5] 白小玲. 玉米基因组 DNA 甲基化水平及其与杂种优势关系的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.
- [6] 傅立国, 陈潭清, 郎楷勇, 等. 中国高等植物 (第 3 卷) [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [7] 应俊生, 陈德昭. 中国植物志 (第 29 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 高慧敏, 王智民. 木通属药用植物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 10-14.
- [9] 李秀华, 肖娅萍, 谢 娇. 三叶木通种质资源形态多样性研究 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 88-93.
- [10] 席在星. 三叶木通 RAPD 最佳反应体系的研究 [J]. 实验室研究与探讨, 2006, 25(6): 608-610.
- [11] 王 喆, 张 铮, 褚会娟, 等. 三叶木通 AFLP 反应体系的建立及优化 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2074-2077.
- [12] 张 铮, 王 强. 三叶木通总 DNA 提取方法的比较 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(3): 141-144.
- [13] 原勤勤, 文亚峰, 何 钢, 等. 用正交设计方法优化枣树 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 70-74.
- [14] 盖钧益. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [15] 郑道军, 刘国民, 梁永发, 等. 中国木犀科苦丁茶 ISSR 实验条件优化的研究 [J]. 植物研究, 2009, 29(2): 234-241.
- [16] 武 创, 司龙亭, 姜 晶. 萝卜 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 186-190.