

番荔枝 DNA 的提取和 AFLP 体系的建立

赵志常¹, 胡桂兵², 刘运春², 欧阳若², 罗石荣³

(1. 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610065; 2. 华南农业大学 园艺学院 广东 广州 510642

3. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:以 7 份番荔枝品种为试材, 通过对 DNA 的提取、酶切、连接、预扩增和选择性扩增等分析, 建立并研究番荔枝的 AFLP 分析体系, 以找出番荔枝品种间的亲缘关系, 为番荔枝的杂交育种的亲本选择和嫁接砧中砧穗选择提供理论基础。结果表明: 利用该体系对 7 份番荔枝的样品进行了分析, 可以获得清晰的条带, 表明所建立的体系可用于番荔枝 AFLP 分析。

关键词:番荔枝; DNA 提取; AFLP

中图分类号:S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)10-0044-04

番荔枝原产于热带美洲, 约 17 世纪传入中国, 现在台湾、广东、广西、福建、云南、海南均有少量栽培。除中、南美洲外, 印度、马来西亚、菲律宾、泰国产量较多。番荔枝叶互生, 椭圆状披针形, 叶揉碎有特殊香味。聚合浆果黄绿色, 由多数圆形心皮和花托合生的肉质小果聚合而成, 球形或心脏形, 有许多鳞片突起, 形似荔枝, 因其来源于国外故称为番荔枝。番荔枝营养极丰富, 每

100 g 番荔枝果肉组织中含水为 8.36 g, 可溶性固形物 18%~26%, 脂肪 0.14%~0.3%, 矿物质 0.6%~0.7%, 碳水化合物 23.9%, 钙 0.2%, 磷 0.04%, 铁 1.0%, 有机酸 0.42%, 含总糖 15.3%~18.3%, 维生素 C 为 265 mg, 蛋白质含量为 1.55 g 等很多人体所需的物质。番荔枝果实具有养颜美容、补充体力、清洁血液、健强骨骼、预防坏血病、增强免疫力、抗癌作用。自古称为上等滋补品, 营养价值极高。

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 即扩增片段长度多态性, 是由荷兰科学家 VOS 等^[1] 创建发展起来的一种检测 DNA 分子多态性的方法。该技术是基于 PCR 选择扩增基因组 DNA 限制性酶切片段而检测多态性的一种 DNA 指纹技术, 它结合了 RAPD 的高效性和 RFLP 的稳定性、重复性好等特点。由于可采

第一作者简介:赵志常(1977-), 男, 在读博士, 现主要从事热带果树的遗传育种研究工作。E-mail: zhaozhichang2001@163.com。

通讯作者:欧阳若(1947-), 男, 海南万宁市人, 教授, 主要研究方向为果树遗传育种。

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(80504)。

收稿日期:2009-05-16

Study on the Photosynthetic and Physiological Hybrid Vigor of Walnut

ZHOU Lan-ying¹, PU Guang-lan¹, XIAO Qian-gang²

(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China; 2. Chengdu Institute of Forestry, Chengdu, Sichuan 610000, China)

Abstract: The photosynthetic and physiological characteristics of walnuts were measured with the Licor-6400 photosynthetic system, including net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (Tr), water use efficiency (WUE), intercellular CO_2 concentration (C_i) and stomatal conductance ($Cond$) of hybrids, female parent Yunxin7914 and walnut from Xinjiang. The results showed that: the P_n of hybrid was higher than female parent and walnut from Xinjiang at the level of 1%, while the C_i was lower at the level of 1%, which indicated that the hybrid had stronger ability to assimilate CO_2 , was higher in photosynthetic rate and with high yields characters. The hybrid was higher than female parent and walnut from Xinjiang at the level of 1% in WUE , the order of mean was hybrid (1.20) > walnut from Xinjiang (0.83) > female parent (0.61). The hybrid can assimilate more CO_2 when consumed equal water, which has relatively higher water use efficiency than female parent and walnut from Xinjiang. All information above suggested that the hybrid has significant heterosis.

Key words: Walnut; Photosynthetic and physiological; Hybrid vigor

用不同的人工接头, 不同的限制性酶以及不同的选择碱基数目组合, 因此 AFLP 具有多态性高, 检测位点多, DNA 和 cDNA 用量少, 无需已知基因和 cDNA 序列信息等优点, 是迄今为止较为有效的分子标记, 但 AFLP 分析对 DNA 和 cDNA 模板质量要求较高。AFLP 分析目前广泛用于种质资源遗传多样性和亲缘关系、图谱构建、基因定位、基因克隆、基因表达与调控等研究^[2-7]。AFLP 与集团分析法 (BuLked segregant analysis, BSA) 结合并成功用于苹果中低酸基因的克隆^[8]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番荔枝品种: 秘鲁番荔枝 (*A. cherimola*)、圆滑番荔枝 (*A. glabra*)、牛心番荔枝 (*A. reticulata*)、AP 番荔枝 (*A. atemoya*)、比丽巴番荔枝 (*R. deliciosa*)、山刺番荔枝 (*A. montana*) 和刺果番荔枝 (*A. muricata*), 种植于中国热带农业科学院热带作物品种资源所。取新生的新鲜的叶片放入冰盒中带回实验室, 用纸吸干水分放入 -80℃ 冰箱备用。

1.2 试验试剂

1.2.1 CTAB 提取液 2%CTAB (w/v), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2%PVP, 2%β-巯基乙醇。

1.2.2 AFLP 分析试剂 AFLP 试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司, PCR 用品购博瑞克公司。

1.3 植物 DNA 提取

称取幼叶 2~3 g, 在预冷的研钵中加入液氮研磨成粉末状, 迅速转入 50 mL 离心管中, 并加入 65℃预热的提取液 10 mL, 65℃水浴 60 min。每隔 10 min 振荡 1 次。加入 10 mL 苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 上下轻轻摇动 10 min。4℃, 4 000 rpm, 离心 10 min。取上清液移入另一干净的 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 上下轻轻摇动 10 min。将上清液移入另一干净的 50 mL 离心管中, 再加入等体积的异丙醇或预冷的 2 倍体积无水乙醇, 轻轻摇动离心管, 会出现白色的絮状物。用干净的玻璃棒或移液管挑出白色絮状物移入 1.5 mL 离心管中。若没有出现可以将其放置 -20℃, 1 h 至过夜。然后将 50 mL 离心管 4℃, 4 000 rpm, 离心 10 min, 去掉上清液。用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 每次都是沉淀悬浮, 不要使沉淀紧贴离心管底, 然后风干。在风干的沉淀中, 加 0.5 mL TE (pH 8.0), 同时加入 0.2 mg/mL 的 RNase A, 37℃放置 60 min。加入 1/3 体积的 NaAC (3 M, pH 5.2), 12 000 rpm 离心 10 min。取上清液, 同时加入 1/10 体积的 NaAC (3 M, pH 5.2) 和 2 倍体积的冷无水乙醇 -20℃放置 1 h 沉淀 DNA。4℃, 12 000 rpm 离心 10 min 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 然后风干, 根据 DNA 的量加入 0.2~1.0 mL

TE 溶解 DNA, -20℃保存。

1.4 AFLP 分析体系的建立

1.4.1 酶切 酶切体系 (20 μL): DNA 样品 (0.5~1 μg/μL) 2 μL, 10×buffer 2 μL, EcoRI 0.5 μL, MseI 0.5 μL, ddH₂O 15.0 μL, 37℃过夜反应。加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次, 取上清液加入 2 倍体积的冷乙醇和 1/10 体积 NaAC (3 M, pH 5.2) -20℃放置 2 h, 12 000 rpm 离心 10 min, 去除上清液, 用 75% 的乙醇洗涤 2 次, 风干后加入 10 μL ddH₂O 溶解。即得到双酶切产物。

1.4.2 连接 连接体系 25 μL: 10×T4 buffer 2.5 μL, 双酶切产物 2 μL, 接头 E 1 μL, 接头 M 1 μL, T4 DNA ligase 1 μL, ddH₂O 17.5 μL, 16℃过夜反应, -20℃保存。

1.4.3 预扩增 PCR 反应体系 20 μL: 在 0.2 mL PCR 管中分别加入 10×PCR buffer 2 μL, MgCl₂ (25 mM) 1.2 μL, dNTP (2.5 mM) 1.6 μL, primer 1 (20 pmol/μL) 1 μL, primer 2 (20 pmol/μL) 1 μL, Taq 酶 (2.5 U/μL) 0.4 μL, 模板 (5~100 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 10.8 μL。预扩增程序: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 80 s 共 30 个循环; 72℃延伸 5 min。将预扩增的产物按 1:20 稀释后放入 -20℃冰箱中作为选择扩增的模板。

1.4.4 选择性扩增 反应体系如前, 选择性扩增的程序: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 60 s 共 14 个循环 (每个循环降低 0.7℃); 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s 共 30 个循环; 72℃延伸 5 min, 完成后产物保存在 -20℃冰箱中以备电泳分析。

1.4.5 凝胶电泳分析 丙烯酰胺: N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 (19: 1), 配置大小为 8 cm (w) × 7.3 cm (h) × 0.75 mm, 6% 的聚丙烯酰胺凝胶。于电压为 80 V 的条件下预电泳 30 min, 然后加入混合有上样缓冲液的样品进行电泳。电泳结束后, 分别进行 10% 的冰乙酸固定 30 min, 然后洗涤 2 次; 将胶放入含有硝酸银和甲醛的溶液中染色 30 min, 漂洗数秒后; 将胶放入冰水的显色液中, 显色 5~10 min, 当条带与背景比较明显时, 加入 10% 的冰乙酸固定液中中止反应, 将胶放入仪器中扫描拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取的效果

采用改良的 CTAB 法可以从不同番荔枝品种中提取 DNA, 所获得的 DNA 呈现乳白色, 易溶于水和 TE 中, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳检测可以看到明显的主带, DNA 比较完整, 无降解 (图 1)。通过分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值为 1.7~1.9。

2.2 酶切及连接

采用了 EcoRI/MseI 2 种酶及 T4DNA 连接酶对 DNA 进行酶切和连接, 经过电泳检测表明, DNA 酶切充分, 酶切产物片段大小符合 AFLP 分析的要求 (图 2), 可

以用于 AFLP 的后续部分的操作。

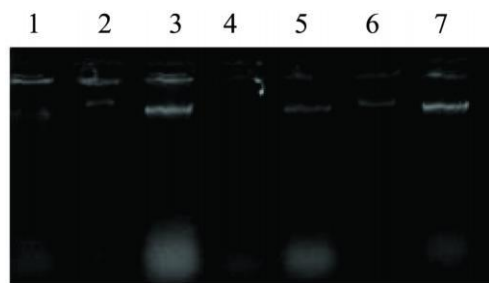


图 1 总 DNA 的电泳检测

注: 1: 秘鲁番荔枝; 2: 圆滑番荔枝; 3: 牛心番荔枝; 4: AP 番荔枝; 5: 比丽巴番荔枝; 6: 山刺番荔枝; 7: 刺果番荔枝。

Fig 1 Electrophoresis of total DNA

Note: 1: *A. cherimola*; 2: *A. glabra*; 3: *A. reticulata*; 4: *A. atemoya*; 5: *R. deliciosa*; 6: *A. montana*; 7: *A. muricata*.

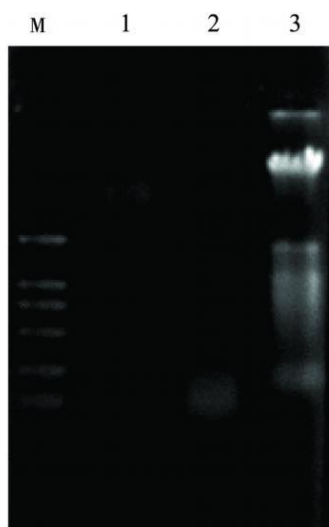


图 2 酶切产物的电泳结果

注: M: DNA marker (DL2000); 1: EcoRI 酶切产物; 2: MseI 产物, 3: 总 DNA。

Fig 2 The results of enzyme restriction

Note: M: DNA marker (DL2000); 1: EcoRI restriction; 2: MseI restriction; 3: total DNA.

2.3 预扩增反应

以连接产物为模板, 进行预扩增。试验采用一个选择性碱基的引物对基因组 DNA 进行了预扩增, 电泳后可以发现片段大小在 500~2 000 bp 之间(图 3), 符合预扩增的结果。将预扩增后的产物经过稀释(1:20)可作为选择性扩增的模板。

2.4 选择性扩增反应

Mg^{2+} 浓度是影响 Taq 聚合酶活性的主要因素, 还会影响到片断的特异性和片断的产率; dNTPs 是 PCR 反应体系中的核苷酸的来源, dNTPs 可以结合 Mg^{2+} ,

dNTPs 的浓度的改变也会影响 Mg^{2+} 的有效性; PCR 的反应程序也会对片断的产量产生影响, 因此该试验对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 的浓度, PCR 反应程序进行了优化, 筛选出可以用于 AFLP 分析的反应体系和反应程序。



图 3 预扩增的电泳检测

注: M: DNA marker (DL2000); 1: 预扩增的结果。

Fig 3 Electrophoresis of preamplification

Note: M: M; DNA marker (DL2000); 1: the result of preamplification.

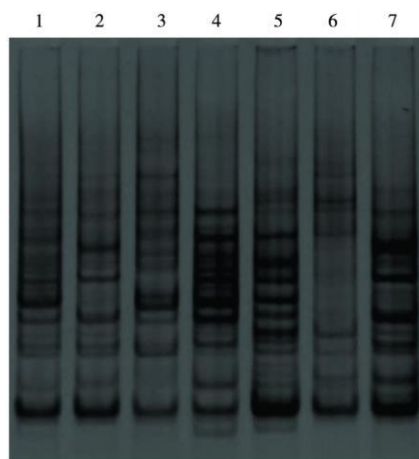


图 4 引物 EcoRI-CAG 和引物 MseI-CGA 选择扩增番荔枝的 AFLP 图谱

注: 1: 秘鲁番荔枝; 2: 圆滑番荔枝; 3: 牛心番荔枝; 4: AP 番荔枝; 5: 比丽巴番荔枝; 6: 山刺番荔枝; 7: 刺果番荔枝。

Fig 4 AFLP amplification profile using the template DNA of with primer EcoRI-CAG+MseI-CGA

Note: 1: *A. cherimola*; 2: *A. glabra*; 3: *A. reticulata*; 4: *A. atemoya*; 5: *R. deliciosa*; 6: *A. montana*; 7: *A. muricata*.

3 讨论

番荔枝的叶片中含有较多的糖、蛋白质、酚等次生物质是影响 DNA 提取的主要原因。加入 1/3 体积的 NaAC(pH 5.2)可以有效降低 DNA 沉淀中糖的含量, 加入

苯酚可以较好地去除蛋白质,再用氯仿/异戊醇去除残留的苯酚,以免影响模板 DNA 的酶切效果。提取的 DNA 样品呈现白色,极易溶于水和 TE 中,较少含有多糖,蛋白质的污染。提取的 DNA 可以完全被酶切开,试验结果也表明提取的模板 DNA 可以较好的用于 AFLP 分析。

PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、Taq 聚合酶、dNTPs 等物质都会影响 PCR 扩增的结果,标准的缓冲液对于各种模板的寡核苷酸引物都能行之有效,但它并非对于模板与引物的任何一种特定组合都是最佳的。因此,应当将反应体系进行修饰和改良,尤其要对 Mg^{2+} 浓度进行优化,将其调至最佳。dNTPs 是反应中磷酸根的主要来源,其浓度的任何变化都将影响到 Mg^{2+} 的有效性。对这些反应物质之间的比例进行一定的优化是 PCR 能否扩增出产物的关键。

电泳也是影响 AFLP 是否成功的关键, AFLP 的结果还受到了电泳的温度、显色时间,显色液的温度等因素的影响。电泳时温度不能太高,否则会影响聚丙烯酰胺的聚合性,影响样品的质量;显色液温度高低也是影响银染质量的关键因素,显色液温度太低,导致显色时间加长,条带背景加深,条带模糊;显色液温度过高,显色时间缩短,条带着色少,条带不易分辨,固定、染色、显色,每个过程完成后都要用 ddH_2O 去除残留液,再进行下一个过程的操作,避免因残留药品对结果造成影响。在电泳时最好用新配置的电泳缓冲液和染色液,同时,

要保证装溶液的器皿的干净,避免污染,否则会引起条带模糊和背景加深,从而影响分辨效果。试验在 $8\text{ cm}(\text{w}) \times 7.3\text{ cm}(\text{h}) \times 0.75\text{ mm}$, 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳可以得到较清晰的条带,表明所建立的反应条件适合 AFLP 的分析。

参考文献

- [1] Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [2] Fang J F, Qiao Y S, Zhang Z. Application of AFLP in the cultivar identification of mango[J]. Guihaia, 2001, 21(3): 281-283.
- [3] Van droogenbroeck B, Breyer P, Goetghebuer P, et al. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relation from Ecuador[J]. Theor Apple Genet, 2002, 105(23): 289-297.
- [4] Eimezawy A, Dreyer F, Jacobs G, et al. High resolution mapping of the bolting gene B of sugar beet[J]. Theor Apple genet, 2002, 105: 110-105.
- [5] Bryang J, Mclean K, Bradshaw J E, et al. mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato *Solanum vernei*[J]. Theor Apple Genet, 2002, 105: 68-77.
- [6] Sun D L, Zhao Q C, Song W Q. Relationships analysis of chinese cabbage species by AFLP[J]. Horticulturae sinica, 2001, 28(4): 331-335.
- [7] Wang C H, Wang W, Dai H Y. Cloning an AFLP marker of columnar gene of apple[J]. Journal of Fruit Science, 2001, 18(4): 193-195.
- [8] Yu X Y, Li M, Liu Z, et al. A novel gene screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45: 139-145.

DNA Extraction from Sweetsop (*Annona squamosa* L.) and Establishment of AFLP Analysis System

ZHAO Zhi-chang¹, HU Gui-bing², LIU Yun-chun², OU Yang-ruo², LUO Shi-rong³

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China; 2. College of Horticultural Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 3. Tropical Germplasm Resource Research Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Studying family relationship in sweetsop germplasm resources, in order to select parents in sweetsop breeding and grafted rootstock. The reaction system of AFLP in 7 sweetsop germplasm resources was studied, and analysis system was established by detected the results of several reactions, such as DNA extraction, enzyme restriction, adapter ligation, preamplification and selective amplification. The several germplasm resources of sweetsop were studied by using AFLP technique with primer EcoRI-CAG + MseI-CTGA, and clear amplification bands were obtained. The results showed that the reaction system could be used for AFLP analysis of sweetsop.

Key words: Sweetsop; DNA extraction; AFLP