

# 木瓜属植物 AFLP 分析体系的建立与应用

尹长虹, 马燕, 臧德奎

(山东农业大学 林学院 山东 泰安 271018)

**摘要:**以 29 个木瓜属品种为试材, 研究该属植物基因组 AFLP 反应体系的建立。通过检测 AFLP 分析中的 DNA 提取、酶切及连接、预扩增和选择性扩增的结果, 对影响 AFLP 分析的主要因素进行探讨, 建立了木瓜属植物的 AFLP 分析体系, 并利用该体系筛选出 E-AAG+M-CAA、E-ACA+M-CAA、E-AAG+M-CAC、E-AAG+M-CAG、E-AAG+M-CAT、E-AAG+M-CTG、E-ACA+M-CTT 和 E-ACG+M-CTT 共 8 对引物组合, 对供试品种进行扩增, 获得的条带清晰可辨, 说明所建立的反应体系适合于该属植物进行 AFLP 分析。

**关键词:**木瓜属; AFLP; DNA 提取; 引物组合  
**中图分类号:**S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)13-0116-04

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 即扩增片段长度多态性<sup>[1]</sup>是一项新的 DNA 指纹技术, 结合了 RFLP 和 PCR 技术的特点, 具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性。该技术采用同位素标记放射自显影方法, 稳定性好, 条带也清晰, 已被广泛用于检测遗传多样性、指纹图谱和品种鉴定、基因定位、遗传作图、天然居群的遗传结构与保护生物学研究等方面, 成为遗传多样性和品种分类研究的有效手段<sup>[2-4]</sup>, 如在紫丁香、蔷薇、野生兰、牡丹、紫薇等多种园林植物的遗传多样性研究中均取得了较好效果<sup>[5-9]</sup>。

木瓜属 (*Chaenomeles*) 植物属于蔷薇科, 是重要的观赏和药用植物, 目前尚无该类植物的 AFLP 分子标记方面的研究。该研究对木瓜属植物 AFLP 分析体系进行了分析和优化, 摸索出适合该属植物的 AFLP 体系和试验方案, 获得了清晰的 DNA 指纹图谱。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料取自山东农业大学木瓜种质资源圃(泰安市)和山东临沂市河东区汤河镇, 共 29 个品种(表 1)。取 1 a 生枝条上刚露尖未展叶或刚展叶时的健康嫩叶, 洗净后置-70℃冰箱内备用。

### 1.2 DNA 提取

**第一作者简介:**尹长虹(1988-), 女, 硕士, 研究方向为观赏植物种质资源。E-mail: zangdk@sdau.edu.cn。  
**通讯作者:**臧德奎(1966-), 男, 博士, 教授, 现从事园林植物方面的教学研究工作。E-mail: zangdk@sdau.edu.cn。  
**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30972406); 山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目(2004BS06003)。  
**收稿日期:**2010-03-22

在常规的 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取 DNA 的基础上进行了适当改进。

### 1.3 AFLP 分子标记技术流程

**1.3.1 模板 DNA 制备** DNA 酶切及人工接头连接采用双酶切目的 DNA, 选用 EcoR I / Mse I 2 种酶, 再用 T4DNA 连接酶, 酶切和连接一步完成。在 0.5 mL 离心

表 1 供试木瓜属品种

编号	品种名
1	‘猩红与金黄’ <i>C. × superba</i>
2	‘长寿’ <i>C. × superba</i>
3	‘报春’ <i>C. speciosa</i>
4	‘绿宝石’ <i>C. × superba</i>
5	‘多彩’ <i>C. speciosa</i>
6	‘紫衣’ <i>C. × superba</i>
7	‘凤凰木’ <i>C. speciosa</i>
8	‘红星’ <i>C. speciosa</i>
9	‘大富贵’ <i>C. × superba</i>
10	‘红宝石’ <i>C. × superba</i>
11	‘复长寿’ <i>C. × superba</i>
12	‘单白’ <i>C. japonica</i>
13	‘碧雪’ <i>C. × superba</i>
14	‘单粉’ <i>C. japonica</i>
15	‘日落’ <i>C. japonica</i>
16	‘红霞’ <i>C. speciosa</i>
17	‘醉杨妃’ <i>C. cathayensis</i>
18	‘罗扶’ <i>C. cathayensis</i>
19	‘长俊’ <i>C. cathayensis</i>
20	‘一品香’ <i>C. cathayensis</i>
21	‘夕照’ <i>C. speciosa</i>
22	‘沂红’ <i>C. × superba</i>
23	‘矮红’ <i>C. japonica</i>
24	‘粉蝶’ <i>C. × superba</i>
25	‘红舞’ <i>C. × superba</i>
26	‘日本红’ <i>C. japonica</i>
27	‘沂橙’ <i>C. × superba</i>
28	‘骄阳’ <i>C. × superba</i>
29	‘四季红’ <i>C. japonica</i>

管中加入限制性酶切及连接反应体系混合液(按表 2 配制),混匀离心数秒,37℃保温 5 h,8℃保温 4 h,4℃过夜。

1.3.2 预扩增反应 在 0.5 或 0.2 mL 离心管中加入预扩增混合液(按表 3 配制),混匀,按下列参数进行 PCR 扩增:94℃变性 2 min;94℃变性 30 s,56℃复性30 s,72℃延伸 80 s,循环 30 轮;72℃延伸 5 min。

1.3.3 选择性扩增反应 首先用 TE buffer 按 1 : 20 稀释样品,作为选择扩增模板。其次需要选择引物对,AFLP 引物盒中总共有 64 对引物,随机选择引物对。再在 0.5 或 0.2 mL 离心管中加入选择性扩增的混合液(按表 4 配制),混匀,离心数秒,按下列参数 PCR 循环:94℃2 min;一轮扩增参数:94℃30 s,65℃30 s 72℃80 s;以后每轮循环退火温度递减 0.7℃或 1℃,扩增 12 轮;接着按下列参数扩增 23 轮:94℃30 s,55℃30 s,72℃80 s;最后延伸 72℃5 min。

1.3.4 引物的筛选和变性 PAGE 凝胶的制备 从 AFLP 试剂盒中的 64 引物中随机选出 8 物组合分别为:E-AAG+M-CAA, E-ACA+M-CAA, E-AAG+M-CAC, E-AAG+M-CAG, E-AAG+M-CAT, E-AAG+M-CTG, E-ACA+M-CTT 和 E-ACG+M-CTT。用 4.0%的丙烯酰胺胶 100 mL 加入 10%过硫酸铵 500 μL 和 TEMED 100 μL 制胶。用 BioRad 3000 电泳系统 110 W 恒定功率电泳 2.5 h。干胶后,MD Storm-820 系统压磷屏、扫磷屏、检测、压片、冲片、照相、冲印相片。

表 2 AFLP 限制性酶切及连接反应体系(总体积 20 μL)

组分	体积/μL
DNA 模板(浓度:50 ng/μL)	4
Adapter	1
EcoRI/MseI(4 U/μL)	2
10× Reaction buffer	2.5
ATP(10 mmol/L)	2.5
T4 Ligase(4 U/μL)	1
AFLP-Water	7

表 3 AFLP 预扩增 PCR 反应体系(总体积 25 μL)

组分	体积/μL
模板 DNA(来自酶切连接的)	2
pre-amplification	1
dNTPs	1
10× PCR buffer	2.5
Taq DNA poly mease(2 U/μL)	0.5
AFLP-Water	18

表 4 AFLP 选择性扩增 PCR 反应体系(总体积 25 μL)

组分	体积/μL
预扩增稀释样品	2
dNTPs	2.5
10× PCR buffer	0.5
EcoRI 引物(prime)	1(共 8 种,按需要挑选 1 种)
MseI 引物(荧光标记)	1(共 4 种,按需要挑选 1 种)
Taq DNA polymase(2 U/μL)	0.5
AFLP-Water	17.5

2 结果与分析

2.1 用于酶切的基因组 DNA 的量

基因组 DNA 的酶切和连接是后续预扩增和选择性扩增的基础。若酶切不完全,则不能充分反映 DNA 中酶切位点和酶切片段长度的多态性。因此,基因组 DNA 的完全酶切是多态性得以检出的根本保证,而影响酶切是否完全的一个重要因素就是用于酶切的 DNA 的量。过多容易导致酶切不完全,过少则模板浓度太低。研究比较了基因组 DNA 不同用量的酶切效果。结果表明 300~400 ng 基因组 DNA 酶切后,最终得到的谱带少,且谱带多集中于测序胶的上部;50~150 ng 基因组 DNA 用于酶切时,预扩增得到的模板浓度过低;采用 200 ng 既可酶切完全,又能在预扩增后得到合适浓度的模板。因此确定在 20 μL 酶切—连接体系中以 200 ng 基因组 DNA 为宜。

2.2 酶切连接步骤的选择

AFLP 是对酶切 DNA 片段进行选择扩增,因此 AFLP 分析过程中酶的选择至关重要。限制性核酸内切酶同其它酶类一样,反应系统应包括酶、底物和反应缓冲液,并且还需要合适的反应温度。影响限制性内切酶反应的因素很多,DNA 制品中的污染如 PVP、酚、氯仿、乙醇、EDTA、高盐浓度等均可抑制酶切活性。其抑制可通过增加酶作用单位数,增大反应体积以稀释可能的抑制物或延长反应时间来加以克服。进行 AFLP 分析时,DNA 限制性内切酶为双酶消化,即采用稀有碱基切点酶(识别位点 4 个碱基)和常见碱基切点酶(识别位点 6 个碱基)同时进行酶切,酶切完全,酶切产物及连接后的产物经 1.0%琼脂糖电泳检测,结果显示 DNA 酶切充分(图 1),酶切产物片段大小符合 AFLP 分析对酶切片段的要求<sup>[11-12]</sup>。表明酶切彻底,连接完全,可用于下一步的试验。

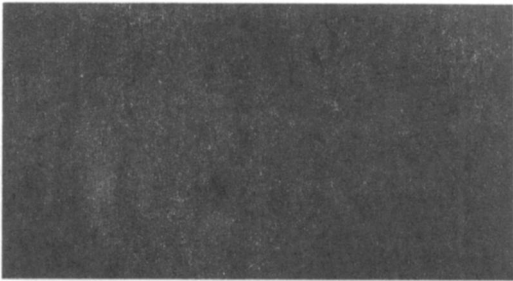


图 1 酶切连接产物检测

2.3 预扩增

由图 2 可看出,预扩增反应弥散带分散均匀且连续成一片。预扩增反应起着承上启下的作用,既反映酶切和连接效果的好坏,又直接影响着选择性扩增的电泳结果及所获得的预扩增产物。

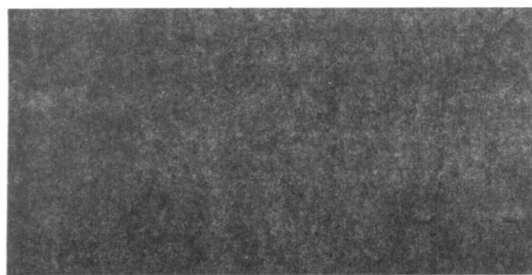


图2 预扩增图

## 2.4 引物筛选

引物的设计是 AFLP 技术中重要的步骤。引物的改进是 AFLP 较 RAPD、PCR 最主要的变革。AFLP 试剂盒提供 EcoRI 引物为: E-AAC、E-AAG、E-ACA、E-ACT、E-ACC、E-ACG、E-AGC 和 E-AGG 共 8 对; Mse I 引物为: M-CAA、M-CAC、M-CAG、M-CAT、M-CTA、M-CTC、M-CTG 和 M-CTT 共 8 对。EcoRI 引物与 Mse I 引物可组合成 64 对引物组合, 用于 AFLP 分析的选择性扩增。然而, 对于具体植物而言, 并非所有 64 对引物组合都是适宜的, 必须筛选出适于具体植物的引物对。

该试验选取引物组合的主要标准是: 总扩增条带数适中, 既不能太多也不能太少; 条带分布的疏密程度均匀。经研究, 筛选出来可用于荧光的 8 对引物对分别为: E-AAG+M-CAA、E-ACA+M-CAA、E-AAG+M-CAC、E-AAG+M-CAG、E-AAG+M-CAT、E-AAG+M-CTG、E-ACA+M-CTT、E-ACG+M-CTT。该 8 对引物组合均具有扩增位点较多, 带型质量好, 分辨率较高, 条带疏密合适, 分布均匀等特点。如引物 E-AAG+M-CAT 扩增出 183 条带, 不仅总条带数适中, 而且条带分布较均匀(图 3)。

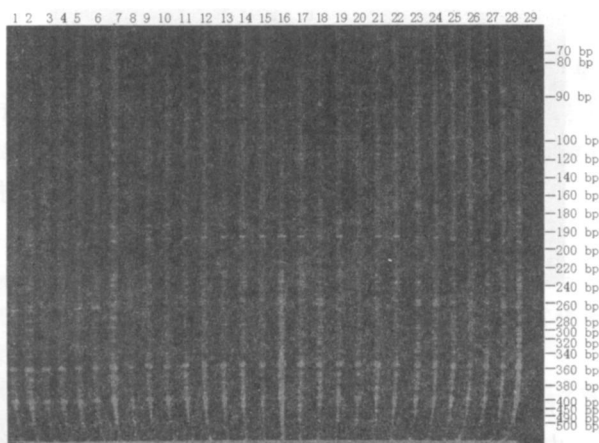


图3 AFLP 扩增图(引物 E-AAG+M-CAT)

## 2.5 选择性扩增反应

高浓度的引物可能导致非特异性扩增; 反之, 引物浓度不足则导致 PCR 的效率极低, 扩增产物的产量不足<sup>[13]</sup>。研究采用 25  $\mu$ L 反应体系中含 EcoR I primer (4.0U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L 和 Mse I primer (4.0 U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L 较为适宜。选择性扩增引物的碱基数目直接影响 AFLP 扩增位点的数目。碱基数越少, 扩增条带数越多, 能获得较多的信息, 但若条带过于密集则不利于读取。反之, 碱基数越多, 扩增条带数目越少, 信息量太小。该研究所筛选的 EcoR I-AGC+Mse I-CAC 均为 3 个选择性碱基的引物组合, 对 29 个木瓜属品种进行的扩增得到了清晰的带型(图 3), 共扩增出 1 095 条谱带(70 ~ 500 bp), 其中 1 035 条具有多态性, 占 94.52%, 平均每对引物扩增出 137 条可统计的带, 其中 129 条具有多态性。

## 3 讨论

木瓜属植物的叶片含有较多的多糖、酚类、蛋白质, 这些物质是污染 DNA 的主要次生代谢产物<sup>[14]</sup>。在 2% CTAB 提取缓冲液中加入 PVP、 $\beta$ -巯基乙醇可有效去除植物组织中的多糖、酚类物质, 从而减少次生代谢物质的污染, 试验结果显示 AFLP 分析效果好。

AFLP 对起始模板浓度不太敏感, 当模板 DNA 在 25 pg ~ 25 ng 的 1 000 倍范围内变化时其带型完全相同, 只有当模板量低于 2.5 pg 时, 带型才发生改变(变弱或缺失)。因此在不减少内切酶用量的情况下模板 DNA 用量可少至 100 ng。为了确保酶切完全, 延长酶解时间也有一定作用。基因组模板 DNA 通过限制性内切酶产生连接反应和扩增反应的亚片段, 所以基因组的充分酶切是 AFLP 成功的另一关键。在使用限制性内切酶水解基因组时, 一定要彻底<sup>[15-16]</sup>。同一 DNA 样本完全酶切与不完全酶切形成的 AFLP 指纹分布方式不同, 而这并不代表真实的 DNA 多态性。不完全酶切的产物扩增后在电泳凝胶上会出现额外的条带, 主要是一些高分子量的带型<sup>[17-19]</sup>。

引物筛选结果表明, 引物不同, 对 DNA 模板的结合力不同, 模板不同, 对引物的反应力也不同, 则扩增产物片段的大小、分布、紧密度都可能完全不同。因此 AFLP 分析体系中进行引物的筛选是必须的。AFLP 引物中选择性碱基的数目主要取决于研究对象基因组的大小<sup>[20]</sup>, 拥有 3 个选择性碱基的引物在扩增过程中错配率较低, 因此 AFLP 引物(包括 EcoRI 的引物和 MseI 的引物)中常至少有一个含 3 个选择性碱基才能产生适宜的带型。木瓜属植物基因组较为复杂, 采用 E+3/M+3 引物组合适于 AFLP 选择性扩增。该研究筛选出的 8 对引物, 其多态性比例相当高, 对木瓜属品种的区分能力强, 具有较大应用价值。

利用建立的反应体系对 29 个木瓜属品种进行的 AFLP 反应, 经 4% 的丙稀酰胺凝胶电泳检测结果 显示, 条带清晰, 不同品种间 DNA 谱带多态性丰富 并且能很好地把它们区分开来。研究试材来自木瓜属 的不同种类, 取材广泛且具有代表性, 证实该体系稳定可 靠, 适用于该属植物基因组 DNA 的 AFLP 研究。

AFLP 研究中尚有很多因素会对结果产生影响。 不同厂家及同一厂家不同批次的 *Taq* 酶的活性存在差 别, *Taq* 酶的活性高, 信号扩增强, 反之则弱; 同时, 电泳 时温度太高, 丙烯酰胺聚合不良, 也会影响 AFLP 扩增 片段的质量。电泳前样品要充分变性, 否则会加深泳道 的背景, 而显影时间长短则是影响银染质量的关键。显 影液温度太低, 胶板显带时间延长, 会导致背景加深, 条 带相对模糊; 显影液温度太高, 显影时间过短, 则条带颜 色浅而不易分辨。研究表明, 显影液温度以 6℃ 左右为 宜。此外, 制备 4% 聚烯酰胺凝胶应尽可能采用新配制 的丙烯酰胺溶液(以 4℃ 冰箱保存期不超 6 d 为宜), 否则 引起条带变弱和背景加深而影响分辨。因此 AFLP 实 验操作对试验结果的影响应引起足够的重视。

参考文献

[1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. A new technique for DNA finger-  
printing [J]. *Nucleic Acids Res* 1995 3(21): 4407-4414.  
[2] Bohn M, Utz H F, Meldinger A E. Genetics similarities among winter  
wheat cultivars determined on the basis on RFLPs, AFLPs and SSRs and  
their use for predicting progeny variance[ J ]. *Crop Sci* 1999 39(2): 228-237.  
[3] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, et al. Molecular mapping of a rice  
gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and  
SSR techniques[ J ]. *Theoretical and Applied Genetics* 2000, 100: 727-734.  
[4] Tomkins J P, Wood T C, Barnes L S, et al. Evaluation of genetic varia-  
tion in the daylily ( *Hemerocallis* spp. ) using AFLP markers[ J ]. *Theoretical  
and Applied Genetics*, 2001, 102: 489-496.

[ 5 ] 苟本富, 谢颖, 熊运海, 等. 应用 AFLP 技术对蔷薇进行遗传多样性  
研究的方法初探[ J ]. *西南农业学报* 2004 17(3): 365-367.  
[ 6 ] 王献, 柴永生, 耿永普. 紫薇叶片 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的  
建立[ J ]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(2): 198-192.  
[ 7 ] 明军, 顾万春. 紫丁香天然群体遗传多样性的 AFLP 分析[ J ]. *园艺学  
报*, 2006, 33(6): 1269-1274.  
[ 8 ] 刘萍, 王子成, 尚富德. 河南部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析  
[ J ]. *园艺学报* 2006 33(6): 1369-1372.  
[ 9 ] 张俊祥, 李枝林, 范成明, 等. 云南野生兰属主要种间亲缘关系的  
AFLP 分析[ J ]. *园艺学报* 2006, 33(5): 1141-1144.  
[ 10 ] Fang G SH, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing  
polysaccharides from plant genomic DNA[ J ]. *Biotechniques* 1992, 13: 52-57.  
[ 11 ] Jack E, Felix C, Manju G. Genetic markers map construction and their  
application in plant breeding[ J ]. *Horticulture* 1996 31: 729-740.  
[ 12 ] 明军, 张启翔, 晏小兰, 等. 梅花基因组 AFLP 银染反应体系的建立  
和优化[ J ]. *北京林业大学学报* 2003 25(3): 17-21.  
[ 13 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory  
Manual*. 2nd ed [ M ]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.  
[ 14 ] 王彩虹, 王倩, 戴洪义, 等. 与苹果柱型基因(Co)相关的 AFLP 标记  
片段的克隆[ J ]. *果树学报*, 2001, 18(4): 193-195.  
[ 15 ] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技  
术的构建[ J ]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(5): 413-415.  
[ 16 ] Madkall D, Zhang Z, Redone E, et al. Level of polymorphism and genetic  
mapping of AFLP markers in rice[ J ]. *Genome* 1996, 23(21): 4407-4414.  
[ 17 ] Meksem K, Leister D, Pepeman J, et al. A high-resolution map of the  
vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and  
AFLP markers[ J ]. *Mol. Gen. Genet*, 1995, 249: 74-81.  
[ 18 ] Maheswaran M, Subudhi P K, Nandi S, et al. Polymorphism, distribution  
and segregation of AFLP markers in a double haploid rice population[ J ].  
*Theor. Appl. Genet*, 1997, 94: 39-45.  
[ 19 ] 张春庆, 杨凯, 贾继增. DNA 指纹技术- AFLP 的优化[ J ]. *山东农业大  
学学报*, 2002, 33(1): 89-92.  
[ 20 ] 陈启亮, 李清国, 田瑞, 等. AFLP 标记及其在园艺植物遗传育种中的  
应用[ J ]. *长江大学学报* 2005 2(2): 19-24.

Establishment of AFLP Analysis System and its Application in *Chaenomeles*

YIN Chang-hong, MA Yan, ZANG De-kui

(Forestry College Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** Twenty-nine cultivars in the genus *Chaenomeles* were used as materials to establish the AFLP(Amplified Frag-  
ment Length Polymorphism)reaction system for studying the relationship and genetic diversity in flowering quince  
resources. The AFLP analysis system was established by detected the results of several reactions such as DNA extrac-  
tion, enzymes restriction, pre-amplification and selective amplification; the main factors which affected AFLP analysis  
were analyzed. Eight pairs of primers, E-AAG+M-CAA, E-ACA+M-CAA, E-AAG+M-CAC, E-AAG+M-CAG,  
E-AAG+M-CAT, E-AAG+M-CTG, E-ACA+M-CTT, and E-ACG+M-CTT, were selected to selectively amplify  
the genomic DNA of the cultivars, and clear amplification bands were obtained. The results suggested that the reaction  
system was good for *Chaenomeles* AFLP analysis.

**Key words:** *Chaenomeles*; AFLP; extraction of DNA; primer combinations