

空间诱变辣椒 AFLP 反应体系的优化

周春阳¹, 郭亚华², 谢立波², 王 雪², 高永利², 周 宇²

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要:为了建立适合空间诱变辣椒的 AFLP 反应体系,以 3~4 叶期的辣椒叶片为试材,对体系中的 DNA 用量、酶切与连接、预扩增及产物的稀释倍数等关键因素进行了优化,确立了适合空间诱变辣椒的 AFLP 反应体系。结果表明:采用该体系对空间诱变辣椒进行 AFLP 分析,能够得到清晰稳定的分子标记图谱。

关键词:空间诱变;辣椒;AFLP 反应体系;优化

中图分类号:S 641.303.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)21-0103-03

空间诱变是指利用空间环境中的强辐射、微重力、高真空等条件,使植物种子发生基因突变和染色体畸变,从而诱发植物突变的一种育种方式。经研究发现,经过空间诱变的辣椒种子,可发生遗传性基因突变,主要表现在植株、果型、产量、品质等性状改变。除此以外,维生素 C 和可溶性固形物、铜、铁等微量元素含量也有所提高^[1]。因此,选择利用空间环境对辣椒进行诱变,在一定程度上可以加速其育种进程,改善品质。

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 技术是 RFLP 和 PCR 相结合的产物,其特点是所需 DNA 量少,不需要 Southern 杂交和预先知道 DNA 序列,具有高效、快速、稳定、可靠等优点^[2-4]。已经被广泛应用于植物的遗传多样性分析、品系鉴定等研究^[5-6]。但因植物的种类不同,AFLP 的技术体系也有所差异。该试验主要对空间诱变辣椒叶片的 DNA 提取方法、酶切、预扩增体系等方面进行优化,确立了一套适合空间诱变辣椒 AFLP 的反应体系,为进一步深化空间诱变辣椒的分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该研究所用的材料由黑龙江省农业科学院园艺分院提供的经过空间诱变、能稳定遗传的辣椒品种。采集 3~4 叶期的辣椒叶片,称取重量约 1.0 g 左右,立即用液氮冷冻,放入 -80℃ 待用。

第一作者简介:周春阳(1987-),女,在读硕士,研究方向为蔬菜育种。E-mail:zhouchunyangbd@yahoo.com.cn。

责任作者:谢立波(1973-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,副研究员,现主要从事空间育种研究工作。E-mail:xielibolibo730215@sina.com。

基金项目:航天育种工程资助项目(2006HT20012);国家大宗蔬菜产业技术体系资助项目(CARS-25-G-11);黑龙江省自然科学基金重点资助项目(ZD200818-01);黑龙江省自然科学基金资助项目(C200943)。

收稿日期:2011-08-30

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用了改良 CTAB 法^[7]。具体步骤如下:①将叶片放入研钵中,加液氮充分研磨成粉末后转移到 1.5 mL 离心管中,加入 65℃ 预热的 2% 的 CTAB 提取液(提取液中,加入 1% 的 DTT)700 μL,65℃ 水浴 30 min。②将离心管取出冷至室温,加氯仿:异戊醇(24:1)700 μL,充分混匀,12 000 r/min 离心 10 min。③取上清液转移至新离心管,重复②1 次。④取上清液至新离心管后加入等体积预冷的异丙醇 -20℃ 沉淀 20 min,10 000 r/min,离心 10 min。⑤去上清液,沉淀用预冷的 70% 的乙醇漂洗 2 次后风干,加入 50 μL 灭菌的去离子水溶解,置于 -20℃ 冰箱中保存备用。取 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 酶切和连接 采用 *EcoRI* 和 *MseI* 2 种限制性内切酶对 DNA 进行 2 种酶切方法的比较。方法 1:先加入 *MseI* 酶切,后加入 *EcoRI* 酶切,总体系为 50 μL, DNA 5 μL, *MseI* (10 U/μL) 1 μL, 10×Tango buffer 4 μL, ddH₂O 30 μL, 65℃ 反应 2 h 置于冰上,再加入 *EcoRI* (10 U/μL) 1 μL, 10×Tango buffer 1 μL, ddH₂O 8 μL, 37℃ 反应 2 h, 75℃ 灭活 15 min。方法 2: *MseI* 和 *EcoRI* 2 种酶同时加入体系进行双酶切,总体系为 40 μL, DNA 5 μL, 10×Tango buffer 5 μL, *MseI* (10 U/μL) 1 μL, *EcoRI* (10 U/μL) 1 μL, ddH₂O 38 μL, 37℃ 反应 2 h, 75℃ 灭活 15 min。此步骤中设定模板量梯度,即加入的基因组 DNA 的浓度分别设为 20、40、60、80、100 ng/μL 比较不同模板 DNA 量对酶切的影响。酶切后加入 10 μL 的连接液,16℃ 连接过夜。

1.2.3 预扩增 取酶切连接产物 5 μL 作为 DNA 模板, dNTP (2 mmol/L) 2 μL, 10×buffer 2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL, E00 (10 μmol/L) 0.6 μL, M00 (10 μmol/L) 0.6 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 加 ddH₂O 至总体系 20 μL。在预扩增的同时进行单变量的优化, Mg²⁺ (25mmol/L) 浓度的优化梯度是 0.8、

1.2、1.6、2.0、2.5 μL , 其它体系不变; dNTP(2 mmol/L)浓度的优化梯度是 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μL ; 引物的优化梯度是 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μL ; *Taq* 酶(5 U/ μL)用量的优化梯度是 0.1、0.2、0.3 μL 。对预扩增产物稀释 10、20、30、40、50 倍后分别进行选择性扩增, 比较预扩增产物在不同稀释倍数下的选择性扩增效果。

1.2.4 选择性扩增 选择性扩增的体系与预扩增优化后的体系相同, 取预扩增稀释产物 5 μL 为 DNA 模板进行选扩, 产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行银染检测。在 20 μL 选择性扩增产物加入 5 μL 甲酰胺上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后, 置于冰上, 取 5 μL 在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 当第一条蓝色指示带电泳到电泳板底端时停止, 取下电泳板进行银染。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

用改良的 CTAB 法提取的基因组 DNA 经过 1% 的琼脂糖电泳检测结果如图 1, DNA 片段完整, 条带整齐, 没有降解, 表明该方法提取的基因组 DNA 质量较好, 符合 AFLP 的要求。

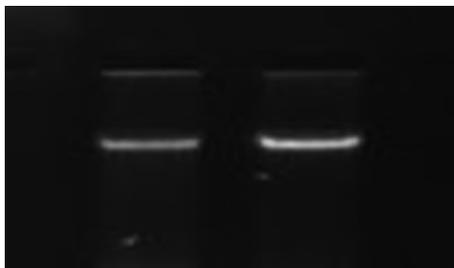


图 1 基因组 DNA 质量检测
Fig. 1 The result of temple DNA

2.2 酶切和连接

由图 2 可知, 2 种酶切方法得到的片段都在 100~500 bp 之间, 但是方法 1 比方法 2 酶切的效果更好, 片段更集中, 所以使用方法 1 比较妥当。试验结果表明, 模板 DNA 用量的不同对 AFLP 分析结果影响不大, 所以体系采用 100 ng/ μL DNA 用量, 既节约 DNA 的用量, 又可以完全酶切。

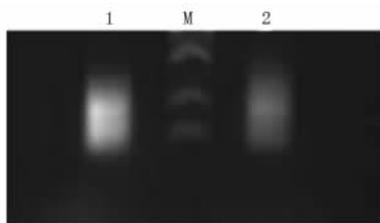


图 2 酶切效果比较

注: 1: 方法 1; M: DL2000 marker; 2: 方法 2。

Fig. 2 Comparison of the enzyme digestion

Note: 1: one method 1; M: DL2000 marker; 2: two method.

2.3 预扩增反应体系的优化

试验结果证明, 当 Mg^{2+} 浓度过小时, 扩增量很少, 当 Mg^{2+} 浓度过大时, 非特异性扩增则增加, 影响扩增的效率, 因此, Mg^{2+} 浓度应设定为 2.0 mmol/L。试验中设计 dNTP 浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L, 结果表明当浓度为 0.2 mmol/L 时, 扩增效果最好。引物浓度小于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时, 则扩增量少, 大于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增量无明显差别, 但非特异性扩增增多, 所以, 引物浓度设定为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。该试验设计了 3 个 *Taq* DNA 聚合酶的用量梯度, 结果表明, *Taq* DNA 聚合酶浓度低会导致扩增效果不明显, 所以浓度设定为 1 U, 即能获得好的扩增效果又不会造成浪费。通过对选择性扩增的电泳谱条带背景的比较发现预扩增产物稀释 10、20 倍后背景颜色较深, 条带不清晰, 不利于读取; 而 30~50 倍能够得到较清晰的条带, 并且节约成本, 因而确定预扩增产物稀释倍数在 30~50 之间。

2.4 优化后的 AFLP 体系

通过对影响 AFLP 反应体系中几个关键因素的比较优化试验, 建立了适合空间诱变辣椒的 AFLP 反应体系。

2.4.1 酶切连接体系 基因组 DNA 的浓度为 100 ng/ μL , 酶切体系为 50 μL , DNA 5 μL , *Mse* I(10 U/ μL) 1 μL , 10 \times Tango buffer 4 μL , ddH₂O 30 mL, 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后置于冰上, 再加入 *Eco*R I(10 U/ μL) 1 μL , 10 \times Tango buffer 1 μL , ddH₂O 8 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 75 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min。酶切完成后加入 10 μL 的连接液, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。DNA 样品可做下一步 AFLP 预扩增的模板。

2.4.2 预扩增 20 μL 反应体系 由表 1 可知, 预扩增反应程序: (1)94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; (2)94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (3)56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (4)72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; (5)29 times to(2); (6)72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; (7)END。PCR 反应结束后, 将预扩增产物稀释 30 倍后, 用做选扩的模板。

表 1 预扩增反应体系

Table 1 The reaction system of pre-amplification

试剂 Reagent	试剂原浓度 Original concentration	用量 Dosage/ μL
酶切连接产物 Enzyme cut connection product		5.0
E00	10 $\mu\text{mol/L}$	0.6
M00	10 $\mu\text{mol/L}$	0.6
dNTP	2 mmol/L	2.0
MgCl ₂	25 mmol/L	1.6
<i>Taq</i> polymerase	5 U/ μL	0.2
PCR buffer	10 \times	2.0
MilliQ H ₂ O		8.0

2.4.3 选择性扩增 20 μL 体系 由表 2 可知, 选择性扩增反应程序: (1)94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; (2)94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (3)65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, -0.7 $^{\circ}\text{C}/\text{cyc}$; (4)72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; (5)12 times to(2); (6)94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (7)56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (8)72 $^{\circ}\text{C}$ 1min; (9)24 times to(6); (10)72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。利用以上条件获得了 AFLP 的较好的扩增结果(图 3)。

表 2 选择性扩增体系

Table 1 The selective amplification system

试剂 Reagent	浓度 Concentration	用量 Dosage/ μL
预扩增产物稀释液 Diluent of advance product amplification		5.0
<i>Eco</i> R I primer	50 ng/ μL	1.0
<i>Mse</i> I primer	50 ng/ μL	1.0
dNTP	2 mmol/L	2.0
MgCl ₂	25 mmol/L	1.6
PCR buffer	10×	2.0
<i>Taq</i> polymerase	5 U/ μL	0.2
MilliQ H ₂ O		7.8

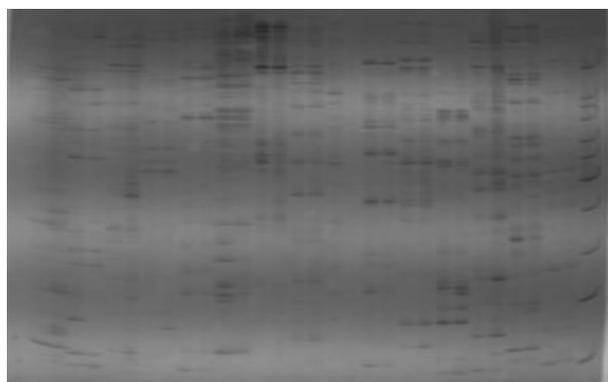


图 3 选择性扩增的电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of selective amplification on polyacrylamide gels

3 讨论

AFLP 技术主要包括模板 DNA 的制备,酶切,连接,预扩增与选择性扩增,凝胶电泳及银染,过程较繁琐,技术难度较大,因此试验条件的优化显得更加重要^[8]。基因组 DNA 的质量直接影响 AFLP 的结果,该试验采用了改良的 CTAB 法,在缓冲液中用 DTT 代替了巯基乙醇,可有效的去除酚类物质并防止氧化,减少刺激性气味,降低毒性,所获得的 DNA 纯度较高,无污染,符合 AFLP 标记的要求^[9]。该试验选择了低频酶 *Eco*R I 和 高频酶 *Mse* I 的组合,由于不同的酶有不同的适宜温度,因此温度不一样,最好分开酶切,虽然 *Mse* I 在 37℃ 也有一定的酶切活性,但酶切效率低,所以该试验采用分步酶切。

Optimization of AFLP System for Hot Pepper Induced by Space

ZHOU Chun-yang¹, GUO Ya-hua², XIE Li-bo², WANG Xue², GAO Yong-li², ZHOU Yu², HUANG Feng-lan³, PENG Mu³

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Horticultural Sub-Academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069; 3. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for the Nationality, Tongliao, Inner Mongolia 028000)

Abstract: In order to establish a suitable AFLP reaction system of pepper induced by space, taking 3~4 leaf stage of pepper leaves as test materials, several significant influencing factors, including the dosage of template DNA, enzyme digestion and ligation, pre-amplification and the dilute of pre-amplification products were optimized, and a suitable AFLP reaction system for hot pepper induced by space was constructed. The results showed that by this optimized system, a clear and credible AFLP fingerprint could be obtained.

Key words: induced by space; hot pepper; AFLP analysis system; optimization

预扩增和选择性扩增是 AFLP 分析的重要步骤,其中 Mg²⁺ 浓度是影响扩增结果的重要因素, Mg²⁺ 过低时, *Taq* 聚合酶的酶活明显降低, Mg²⁺ 浓度过高时, 则非特异性扩增就增大, 因此, 选择合适的 Mg²⁺ 浓度是扩增反应成功的关键。dNTP 浓度过低时, 会引起合成的效率降低, 扩增量不够, 导致扩增产物的单链化, dNTP 浓度过高会促进错误的掺入。当引物浓度小时, 扩增量就少, 但引物浓度过高则导致非特异性扩增的增加^[10]。因此看出, 在扩增体系中各种试剂的优化是十分重要的。

根据试验对 AFLP 体系中的几个重要参数的优化, 确立了适合空间诱变辣椒的 AFLP 反应体系。应用该试验优化后的体系, 对选择性扩增产物进行了电泳和银染检测, 得到了清晰可辨、扩增信号好、强度基本一致的条带, 为今后空间诱变辣椒的差异表达基因分析和基因克隆等奠定了基础。

参考文献

- [1] 邹学校. 中国辣椒[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] Pieter Vos. AFLP A new technique for DNA finger printing[J]. Nucleic Acide Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] Habu Y, Fukadatanaka S, Hisatomi Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA gerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4bp sequence [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1997, 234: 516-521.
- [4] Nurwakagari P, Breit A, Hess C, et al. A conformational contribution of the luteinizing hormone-receptor ectodomain to receptor activation[J]. Endocrinology, 2007, 38(1-2): 259-275.
- [5] Bachem C W B, Hoeven R S, Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development[J]. The Plant J, 1996, 9(5): 745-753.
- [6] 王岩, 张宝玺, 张国裕, 等. 辣椒叶片 DNA 提取方法的优化[J]. 长江蔬菜, 2006(8): 59-61.
- [7] 刘玉皎, 李萍, 张小田. 巯基乙醇和 PVP 对蚕豆 DNA 质量的影响[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(3): 248-250.
- [8] 鞠秀芝, 杜胜利, 宗兆锋, 等. AFLP 技术及其常见问题与解决方案[J]. 天津农业科学, 2004, 10(4): 6-9.
- [9] 蔡秀珍, 刘克明, 龙春林. 野生芋属植物干叶片 DNA 的提取及 PCR 扩增[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 51-53.
- [10] 刘科伟, 杨学玲, 王述彬, 等. 辣椒 AFLP 技术体系的建立与优化[J]. 江西农业学报, 2009, 21(7): 1-3.

(注: 该文作者还有黄凤兰和彭木, 工作单位为内蒙古民族大学生命科学学院。)