

# 野生茄子 cDNA-AFLP 分析体系的优化和建立

王 忠<sup>1,2</sup>, 杨 清<sup>2</sup>, 汪 仁<sup>1</sup>, 郑玉红<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 植物研究所, 植物多样性与系统演化研究中心, 江苏 南京 210014;

2. 南京农业大学 生命科学学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:**以高抗黄萎病的野生茄子托鲁巴姆的根为试材, 对影响 cDNA-AFLP 分析体系的 6 个关键因素进行分析, 以期建立适宜茄子的 cDNA-AFLP 分析体系, 并得到清晰可辨的 cDNA-AFLP 图谱。结果表明:采用改良的 Trizol 法提取的 RNA 较完整, 纯度较高;置换合成法合成双链 cDNA 成本低且效率高;连接产物取原液作为预扩增反应的模板, 预扩增产物稀释 50 倍作为选择性扩增的模板, 在 25  $\mu$ L 反应体系中加入 2  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  (25 mM) 和 0.2  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mM), 可以获得带型丰富且重复性好的结果。

**关键词:**茄子; cDNA-AFLP; 体系优化

**中图分类号:**S 641.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0108-05

1996 年, Bachem 等<sup>[1-2]</sup>将 AFLP 技术应用于 mRNA 表达差异分析, 发展了一种 mRNA 指纹图谱技术, 即 cDNA-AFLP 技术。该技术结合了 RT-PCR 和 AFLP 的特点, 并保留了 AFLP 技术的可靠性与高效性, 可对生物体转录组进行全面、系统的分析, 现已被公认为是进行转录基因组学研究的重要工具和寻找差异表达基因的最有效手段, 被广泛用于基因差异表达、表达基因遗传连锁作图和基因克隆, 以及真核生物亚种间的不同基因和基因表达时空性的研究中。如利用 cDNA-AFLP 技术在马铃薯发芽过程的研究、玉米发育过程中的基因表达、水稻雄性不育基因表达、杨树导管的次生长基因表达、烟草种子破除休眠基因的表达等方面广泛应用<sup>[3-6]</sup>。

茄子(*Solanum melongena* L.) 是 1 a 生草本植物, 古称酪酥、昆仑瓜, 以幼嫩果实供食用, 最早产于印度。因其营养丰富, 具有较高的药用和保健功能, 备受消费者的青睐。据统计, 目前我国每年茄子的栽培面积已达 20 多万  $hm^2$ 。然而长期以来, 茄子的生产一直受到黄萎病、灰霉病、青枯病等病害的影响, 尤其是黄萎病<sup>[7]</sup>。从分子水平利用 cDNA-AFLP 技术找出调控茄子黄萎病发病的功能基因, 对茄子黄萎病发病机理和遗传育种的研究具有更深远意义。现以有极高抗病性和抗逆性的近

源野生茄子托鲁巴姆为材料, 对 cDNA-AFLP 反应体系的关键影响因素进行优化, 以期提供更为快捷高效的 cDNA-AFLP 分析方法, 为茄子黄萎病相关基因的克隆及发病机理的研究奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**植物材料:**野生茄子托鲁巴姆(*Solanum torvum*)由课题组实验室收集保存。2005 年 11 月 25 日播种在温室内, 2006 年 1 月 5 日分苗, 播种与分苗的基质全部经过高温灭菌, 2006 年 2 月 18 日于幼苗 4~5 叶期进行病原菌的接种。采用茄子黄萎病病原菌(*Verticillium dahliae* Kleb)粗毒素接种托鲁巴姆, 分别取接种后 6、24 和 72 h 的幼嫩根尖为处理的样本, 0 h 为对照。

**试验试剂:**Trizol Reagent 购自 Invitrogen, Reverse Transcriptase 购自 Promega, mRNA 纯化、cDNA 双链的合成和 PCR 相关试剂购自 Takara, 限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI* 购自 Fermentas 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

**引物 AFLP 分析用接头和引物:**所用的接头引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。*EcoRI* 接头:上游 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 下游 5'-AATTGGTACGCGTCTAC-3'; *MseI* 接头:上游 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 下游 5'-TACTCAGGACTCAT-3'。预扩引物 E00: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3', M00: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。选择性扩增引物: 5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3', 5'-GATGAGTCCTGAGTAACNN-3', 其中 N 分别为 G/A/T/C。

**第一作者简介:**王忠(1979-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物分子育种。E-mail: wangzhong@cnbg.net.

**责任作者:**杨清(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向植物基因组学与基因工程。E-mail: qyang19@njau.edu.cn.

**收稿日期:**2012-06-19

## 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取与纯化 采用改良的 Trizol 法分离纯化茄子幼嫩根尖的总 RNA,即在加入 Trizol 之后,放入-70℃冰箱中,第2天取出室温解冻后继续(使根尖细胞裂解更充分且减少 RNA 降解)。重复氯仿的抽提步骤(进一步去除上层水相中的色素等物质),重复 75%乙醇洗涤沉淀的步骤(进一步去除小离子和残留的异丙醇),其余步骤同 Trizol 使用说明。用 DNase I 去除 RNA 中可能混杂的 DNA,然后按纯化 mRNA,用核酸蛋白仪测量样品的浓度,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 单链 cDNA 与双链 cDNA 的合成 按 Promega 公司 Reverse Transcription System 说明书合成 cDNA 第 1 链,采用置换法合成 cDNA 双链。取 30  $\mu\text{L}$  cDNA 第 1 链产物依次加入  $10\times\text{Taq}$  buffer 8  $\mu\text{L}$ 、 $5\times\text{RNase H}$  buffer 16  $\mu\text{L}$ 、10 mM dNTP Mixture 4  $\mu\text{L}$ 、RNase-free  $\text{H}_2\text{O}_2$  19  $\mu\text{L}$ 、RNase H(60 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、 $\text{Taq I}$ (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,共 80  $\mu\text{L}$ 。16℃下保温 2 h,70℃,10 min,然后迅速置于冰上,加入 9  $\mu\text{L}$   $10\times\text{T}_4$  DNA Ligase buffer、1  $\mu\text{L}$   $\text{T}_4$  DNA Ligase(350 U/ $\mu\text{L}$ ),37℃下保温 30 min。合成的 cDNA 双链纯化:将终止反应产物中加入等量的酚:氯仿:异戊醇混匀,10 000 r/min 离心 30 min,取上清,用 2 倍预冷的无水乙醇沉淀过夜,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用无水乙醇冲洗 2 次,风干,加入 20  $\mu\text{L}$  TE 溶解。

1.2.3 cDNA 的酶切与接头连接 用 *EcoRI* 和 *MseI* 2 种限制性内切酶对 cDNA 进行分步酶切。先用 *EcoRI* 进行单酶切:在 5  $\mu\text{L}$  双链 cDNA 中依次加入  $10\times\text{Tango}$  buffer 3.4  $\mu\text{L}$ 、dd $\text{H}_2\text{O}$  4.6  $\mu\text{L}$ 、*EcoRI*(10 U/ $\mu\text{L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ ,混匀后 37℃下反应 2 h,再加入 *MseI*(10 U/ $\mu\text{L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{Tango}$  buffer 1.6  $\mu\text{L}$ ,然后补水至 25  $\mu\text{L}$ ,在 65℃下反应 2 h。取 5  $\mu\text{L}$  酶切产物电泳以检测酶切是否完全。对酶切完全的 cDNA 进行接头连接:*EcoRI* 和 *MseI* 各自的上下游 Adaptor 等体积混合,95℃下变性 5 min 后迅速置于冰上使其快速退火合成双链接头。在 10  $\mu\text{L}$  cDNA 双酶切产物中依次加入 *EcoRI* 接头 1  $\mu\text{L}$ (5 pmol/ $\mu\text{L}$ )、*MseI* 接头 1  $\mu\text{L}$ (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )、 $10\times\text{T}_4$  DNA Ligase buffer 2  $\mu\text{L}$ 、dd $\text{H}_2\text{O}$  5.5  $\mu\text{L}$ 、 $\text{T}_4$  DNA Ligase(350 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,16℃下反应过夜( $\geq 12$  h),连接完成后,将连接产物再于 65℃变性 10 min,以使连接酶和限制性内切酶失去活性,再用 TE 将连接产物稀释不同倍数进行预扩增体系的选择。预扩增体系如下:试验中将连接产物设立不同的稀释倍数:未稀释及稀释 5、10、15 和 20 倍,作为预扩增的模板,以探讨最佳的稀释倍数。预扩增反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ :包含连接产物 2  $\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR}$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、25 mM  $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{L}$ 、10 mM dNTP Mixture 0.5  $\mu\text{L}$ 、预扩增引物各 1.0  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )

0.2  $\mu\text{L}$ 、dd $\text{H}_2\text{O}$  15.8  $\mu\text{L}$ 。稍混匀后运行如下 PCR 程序:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,28 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。预扩增结束后,取 5  $\mu\text{L}$  产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测预扩增效果,另取 5  $\mu\text{L}$  预扩增产物加入 TE 稀释不同倍数进行选择扩增,其余产物于-20℃下保存。选择性扩增反应体系与预扩增体系相同,引物换为选择性扩增引物,模板用预扩增稀释产物。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 60 s,13 个循环(每循环退火温度降低 0.7℃);接着 94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,24 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃下保存。扩增后的产物与 10  $\mu\text{L}$  的 Loading buffer(98% 去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.25% 溴酚兰)混合,95℃变性 10 min,立即转移至冰浴冷却,用于电泳。将 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶在 1 000 V 电压下电泳 2~3 h,然后参照 Halima 等<sup>[8]</sup>的快速染色法进行银染。为确保试验的准确性,以上 cDNA-AFLP 优化体系试验均至少重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 质量检测

提取的总 RNA 经过分光光度计检测  $A_{260}$  和  $R$  ( $A_{260}/A_{280}$ )以及结合 1% 甲醛的琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的质量和完整性。由图 1 可见清晰的 28S、18S 2 条带,二者亮度之比接近 2.0。纯化后所有样品的  $R$  值均处在 1.8~2.0,无蛋白质或 DNA 污染(图 1 右),说明 RNA 的纯度和完整性较好,且浓度都超过 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。满足下一步分子生物学试验要求。



图 1 样品总 RNA 的电泳检测结果

注:右图为纯化后结果。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of extracted total RNA

Note: the right map was purified RNA.

### 2.2 双链 cDNA 的合成

利用 SMART 技术合成 cDNA 第 1 链(Single-strand cDNA, sscDNA),见图 2 左,弥散带集中在 100~1 500 bp。利用置换法合成双链 cDNA(Double-strand cDNA, dscDNA),4 个批次的样品 dscDNA 合成电泳结果见图 3,条带集中在 500~3 500 bp。

### 2.3 dscDNA 的酶切检测效果

该试验的 cDNA-AFLP 分析采用 *EcoRI* 和 *MseI* 限制性内切酶对合成的 dscDNA 进行酶切。由图 3 可知,酶切后 cDNA 条带呈均匀的弥散状,片段主要集中在 100~1 000 bp。与酶切前相比,酶切后 cDNA 片段分布范围明显减小,说明酶切完全,适合于下一步的接头连接和多态性扩增。

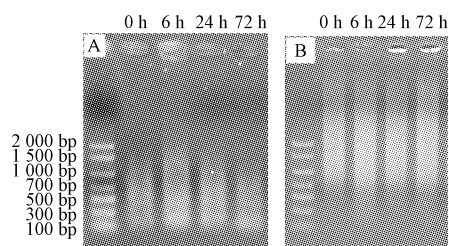


图2 cDNA 的电泳检测

注:A:单链 cDNA;B:双链 cDNA。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of cDNA

Note: A: Single-strand cDNA; B: Double-strand cDNA.

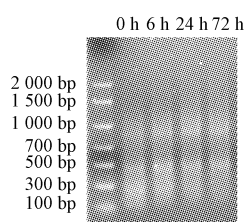


图3 双链 cDNA 酶切后的电泳检测

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of double strand cDNA after enzyme digestion

## 2.4 接头的连接效率检测

该试验以组成型表达的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*) 基因为内参, 利用 *GAPDH* 基因的特异引物和 cDNA-AFLP 技术体系中的预扩增引物相结合, 以连有接头的 cDNA 样品 (仅选对照) 为模板进行 PCR 扩增, 30 个循环后, 所得扩增片段的强度基本一致 (图 4), 说明接头的连接效率满足进一步试验要求。

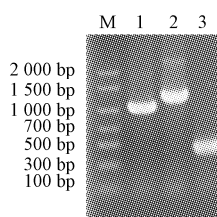


图4 接头的连接效率检测

注: M: DNA Marker; 1: 用预扩引物 E00 和 *GAPDH* 3' 引物 PCR 结果; 2: 用预扩引物 M00 和 *GAPDH* 3' 引物 PCR 结果; 3: 用 1 对 *GAPDH* 引物扩增结果。

Fig. 4 Ligation efficiency detection of adaptors

Note: M: DNA Marker; 1: PCR products with the *GAPDH* 3' and primer E00; 2: PCR products with the *GAPDH* 3' and primer M00; 3: PCR products with a pair of *GAPDH* primers.

## 2.5 预扩增体系的选择

连接后的 dscDNA 产物先以未接菌的对照进行模板浓度对预扩增体系影响的试验。试验中设立不同的稀释倍数: 未稀释及稀释 5、10、15 和 20 倍, 其它条件均不做改动。预扩增反应后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测发现, 未经稀释的效果最好, 在琼脂糖上呈现明亮的连

续一片 (图 5 左)。而经稀释后的 cDNA 的预扩增产物相比之下亮度减弱、弥散带的范围减小。因此, 后续试验均选用未稀释的模板浓度进行预扩增反应。该研究中处理 4 个样品的预扩产物琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 5, 预扩产物片段长度集中在 100~1 000 bp。

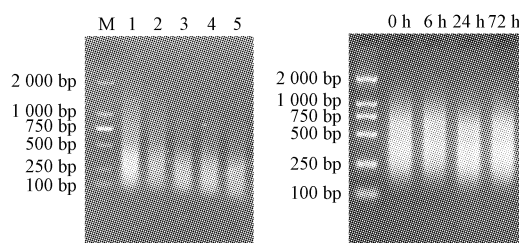


图5 预扩增产物的电泳检测结果

注: M: DNA Marker 1~5: 分别为连接产物未稀释, 稀释 5、10、15 和 20 倍的预扩增结果。

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of pre-amplification products

Note: M: DNA Marker 1~5: The products of pre-amplification with the template with no dilution, dilute 5, 10, 15 and 20 times respectively.

## 2.6 选择性扩增体系的选择

该研究根据 Bachem 阐述的 cDNA-AFLP 方法, 通过对其体系各环节的摸索发现, 在选择性扩增中模板 cDNA 的浓度、dNTP 的浓度、 $Mg^{2+}$  浓度等均会影响最终结果的好坏。因此, 选取未侵染的茄子材料, 加入选择性扩增的一对特异引物, 分别对影响扩增结果的这些反应条件进行优化。

**2.6.1 预扩产物浓度对选择性扩增的影响** 试验以 25  $\mu$ L 作为反应体系, 其中加入稀释程度不同的预扩增产物为模板 (预扩产物的初浓度调整为 10 ng/ $\mu$ L), 分别是未稀释、稀释 5、10、20、50 和 100 倍, 体系中其它加样量保持不变。结果发现以稀释 50 倍的预扩产物为模板进行选扩的效果较好 (图 6)。高浓度模板的扩增产物会出现拖尾现象, 推测可能是因为模板过多, 扩增过程初期耗尽体系中的引物, 使退火发生在 PCR 产物 3'-OH

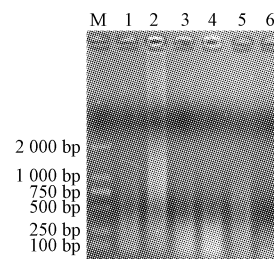


图6 不同稀释倍数的预扩产物对选择性扩增的影响

Note: M: DNA Marker; 1~6 分别为预扩产物未稀释, 稀释 5、10、20、50 和 100 倍的扩增结果。

Fig. 6 Effect of different concentration of preamplification on selective amplification

Note: M: DNA Marker; 1~6: The products of selective amplification with the template no dilute, dilute 5, 10, 20, 50 and 100 times, respectively.

端、模板 cDNA 间或 PCR 产物之间,从而进行随机延伸或终止,出现了弥散拖尾的情况。而稀释的倍数太大则导致扩增量明显不够,且扩增产物主要集中在小片段处。

2.6.2  $Mg^{2+}$  浓度对选择性扩增的影响  $Mg^{2+}$  离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大,浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性,浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。该试验在选择性扩增体系中以预扩产物稀释 50 倍为模板,在 25  $\mu$ L 的反应体系中分别加入 1.5、2 和 2.5  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  (25 mM),其它加样量保持不变。结果发现,使用 2  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  扩增效果最佳,其扩增产物的弥散带在 250~750 bp 范围内较亮,适于后期的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 7)。

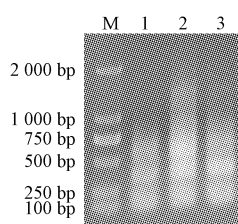


图 7  $MgCl_2$  用量对选择性扩增的影响

注:M;DNA Marker;1~3:分别为用 1.5、2 和 2.5  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  扩增的结果。

Fig. 7 Effect of  $MgCl_2$  concentrations on selective amplification

Note:M;DNA Marker;1~3: The products of selective amplification with 1.5, 2 and 2.5  $\mu$ L  $MgCl_2$ , respectively.

2.6.3 dNTPs 浓度对选择性扩增的影响 在 25  $\mu$ L 的反应体系中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mM),以预扩产物稀释 50 倍为模板,用 2  $\mu$ L 的  $MgCl_2$ ,在其它加样量保持不变的情况下进行选择扩增。结果表明 dNTPs 的用量在 0.2~0.8  $\mu$ L 范围内的扩增产物均符合选扩的要求,而用 1  $\mu$ L 的 dNTPs 扩增的产物片段相对减小(图 8)。为提倡节约,该试验后面的选择性扩增均使用 0.2  $\mu$ L 的 dNTPs。最终,试验选择侵染后 4 个时期的样品,采用最佳组合,即在 25  $\mu$ L 的反应体系中以预扩产物稀释 50 倍为模板,分别加入 2  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  (25 mM)、0.2  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mM) 进行

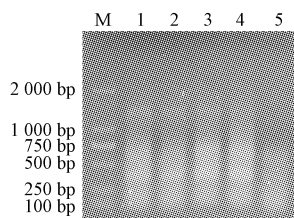


图 8 dNTPs 用量对选择性扩增的影响

注:M;DNA Marker;1~5:分别为用 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1  $\mu$ L 的 dNTPs 扩增的结果。

Fig. 8 Effect of dNTPs concentrations on selective amplification

Note:M;DNA Marker;1~5: The products of selective amplification with 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1  $\mu$ L dNTPs respectively.

选择性扩增,得到了令人满意的结果,弥散带在 250~750 bp 范围内均较亮(图 9),适于通过后期的聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选差异条带。以不接菌为对照,用不同引物组合选择性扩增后的产物经 9% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测得到抗病茄子接种粗毒素前、后基因的差异表达谱(图 10),平均每对引物组合扩增得到 20~40 条 TDFs (Transcript-derived fragments)。

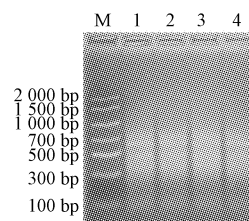


图 9 4 个样品使用最优组合进行选择扩增的结果

注:M;DNA Marker;1~4:分别代表病菌侵染后的 4 个样品。

Fig. 9 Results of selective amplification of 4 samples with the optimized dosage

Note:M;DNA Marker;1~4: the products of selective amplification on 4 treated samples.

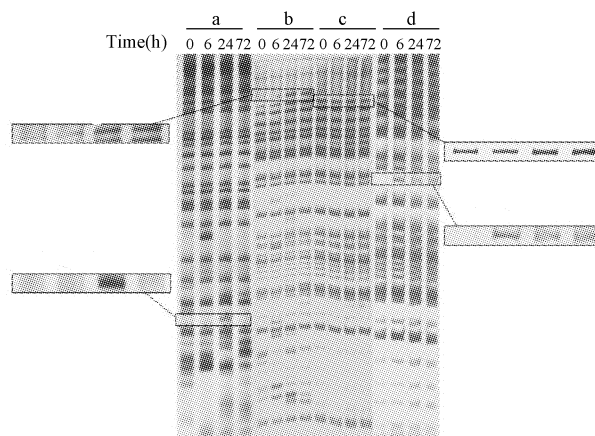


图 10 部分引物组合选择性扩增产物在 9% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上的检测结果

注:a,b,c,d 代表不同的引物组合,每引物组合下为病菌侵染后 4 个时间的样品选扩结果(侵染后 0、6、24 和 72 h),盒状标记为部分挑选用于分离和测序的 TDFs。

Fig. 10 Detection results of selective amplified products of part primers combinations on 9% polyacrylamide gel electrophoresis Representative amplification pattern using four kinds of primer combinations

Note:a, b, c and d represent different primer combination; detection results of selective amplified products of every primer combination (Templates were cDNA libraries at 0, 6, 24 and 72 h after treatment). Box-shaped marking indicate different TDFs, which were isolated and sequenced.

### 3 讨论

由于 cDNA-AFLP 技术试验程序较繁琐,其中的操作步骤步步相关,要建立广谱的转录图谱的工作量就非常大。而且由于物种之间的差异,使得 cDNA-AFLP 技

术在不同物种间会有一些差异,因此在进行深入研究前,试验对 cDNA-AFLP 技术在茄子上的应用进行了一些探索,得到了适合茄子 cDNA 的 AFLP 反应体系。提取高质量的总 RNA 及双链 cDNA 的获得是 cDNA-AFLP 分析成功的关键性影响因素,该试验采用改良的 Trizol 法获得茄子根的总 RNA,具有提取质量高、蛋白等杂质明显降低等优点。目前,双链 cDNA 合成过程中第 2 链的合成方法主要有置换合成法和 SMART 法,该研究采用置换合成法,主要是因为这种方法试验成本低且操作简单方便,减少了基因信息的丢失或改变,能够以 ng 级的总 RNA 为模板合成高质量、高产量的 cDNA。cDNA-AFLP 技术要准确地反映基因间表达量的差异,就得选择合适的酶切组合。通过对茄子 Gen-Bank 筛选后发现,60% 以上所有分析 cDNA 有 1 个 *EcoRI* 酶切切点,大约 90% 这些 cDNA 有另外的 *MseI* 酶切切点。因此选择 *MseI* 和 *EcoRI* 内切酶组合,这样就覆盖了基因组大部分的 cDNA。作为模板的连接产物和预扩增产物的浓度直接影响扩增反应的质量和效率,浓度偏低会使扩增条带减弱;浓度太高则使引物或 dNTP 过早被耗尽,底物过量扩增,导致扩增结果不稳定,影响带型统计分析。*Taq* 酶、dNTP、 $Mg^{2+}$  和引物的量也是影响预扩增和选择性扩增反应的重要因素。该试验在保证达到最佳效果的基础上,遵循节约成本原则,最终选择连接后的 dsDNA 产物为模板进行预扩增。在 25  $\mu$ L 的反应体系中以预扩产物稀释 50 倍为模板,分别加入 2  $\mu$ L 的  $MgCl_2$  (25 mM)、0.2  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mM) 进行选择性扩增,最终获得产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳具有条带清晰、分辨率高、差异条带丰富、覆盖

面广、重复性好等特点。该研究新建立的茄子 cDNA-AFLP 体系已经适用于分析并研究茄子抗黄萎病的差异显示基因。下一步将回收差异条带,利用 RT-PCR 或反向 Northern 来进一步验证,为茄子抗黄萎病相关基因的克隆,分子标记辅助育种奠定基础,从而丰富茄子分子遗传学方面的研究资料。

### 参考文献

- [1] Bachem C W B, Van Derhoeven R S, De 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]. Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.
- [2] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16(2): 157-173.
- [3] Durrant W E, Rowland O, Piedras P, et al. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles [J]. The Plant Cell, 2000, 12(6): 963-977.
- [4] 于虹, 丁国华. cDNA-AFLP 技术及在差异表达基因克隆上的应用 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 77-80.
- [5] Nazeem P A, Jose Sherin, Sheeba N K, et al. Differential gene expression for bacterial wilt incidence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) revealed by cDNA-AFLP analysis [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2011, 8(3): 1-7.
- [6] Wang L, Zhou B R, Wu L L, et al. Differentially expressed genes in *Populus simonii*  $\times$  *Populus nigra* in response to NaCl stress using cDNA-AFLP [J]. Plant Science, 2011, 2(1): 796-801.
- [7] 李怀芳, 刘凤权, 郭小密. 园艺植物病理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [8] Halima B, Jacquemin J M, Baudoin J P, et al. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels [J]. Biotechnology Agronomy Society and Environment, 2006, 10(2): 77-81.

## Optimization and Establishment of cDNA-AFLP Technical System in *Solanum melongena*

WANG Zhong<sup>1,2</sup>, YANG Qing<sup>2</sup>, WANG Ren<sup>1</sup>, ZHENG Yu-hong<sup>1</sup>

(1. Research Center of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

**Abstract:** In this study, the key factors affecting cDNA-AFLP on establishing cDNA-AFLP analysis system for roots were analyzed in *Solanum melongena* with high resistance to *Verticillium wilt*, and a distinct electrophoretogram of cDNA-AFLP was obtained. The results showed that total RNA extracted by improved Trizol method was highly pure and complete. The double-stranded (ds) cDNA was synthesized using low-cost and efficient replacement and synthesis method. The abundant and repeatable cDNA-AFLP fingerprints have been obtained when original ligation products were used as template in the preamplification PCR and the preamplification products were diluted to 50 times for selective amplification in 25  $\mu$ L reaction volume containing 2  $\mu$ L  $MgCl_2$  (25 mM) and 0.2  $\mu$ L dNTPs (10 mM).

**Key words:** *Solanum melongena*; cDNA-AFLP; system optimization