

牡丹 AFLP 荧光反应体系的建立和优化

朱红霞

(上海城市管理学院, 上海 200438)

摘要:以牡丹的叶片为材料,通过对扩增长度多态性(AFLP)反应体系中几个关键参数进行优化,建立了牡丹的 AFLP 荧光反应体系,首次在牡丹 DNA 提取、酶切连接、预扩增、选择性扩增等试验过程取得的成功,得到了清晰的部分牡丹品种指纹图谱。为牡丹品种指纹图谱的绘制、亲缘关系的研究等奠定基础。

关键词:牡丹; DNA 提取; AFLP; 指纹图谱

中图分类号:S 685.11; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)10-0164-04

牡丹属于芍药科、芍药属,是我国的传统名花,被誉为“花中之王”和“花相”,在国际上也久享盛誉。在长期的人工栽培、杂交选育和自然选择条件下牡丹形成了丰富的品种,成为神、色、香、姿俱佳的重要园林植物。AFLP (限制性内切酶片段长度多态性 Amplified Fragment Length Polymorphism) 技术是一种选择性扩增限制性片段的技术,该技术自从问世以来,就以其带纹丰富、DNA 用量少、灵敏度高、稳定性高、重复性好等优点在多种植物、多种领域广泛应用。目前有关牡丹、芍药 AFLP 分析鲜见报道,且未曾见 AFLP 荧光反应体系的研究。因此,以 5 种牡丹品种为试材,旨在建立牡丹 AFLP 反应体系,为牡丹品种指纹图谱的构建,分子标记等研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 品种 5 个牡丹品种采自菏泽百花园,供提取 DNA 的全部材料均为 4 月份已展开正在生长的叶片,每个品种的叶样均分别自 3~5 棵植株采集后混合而成。

1.1.2 试剂 内切酶 EcoRI 和 Mse I; NEB (New England BioLabs); T4 连接酶; NEB, Promega; Taq 酶; Promega, 以上试剂为鼎国生物,上海生工,华美生工等公司产品。试验所需引物和接头(EcoRI 接头、Mse I 接头和引物)均由鼎国生物合成。

1.1.3 仪器 PCR 仪: PE9600; Ferro Tec life express Thermal cycler。电泳仪: 君仪 JY5000。离心机: Sigma 1-15K。紫外分光光度仪: Bio-RAD SmartspecTM 3000。测序仪: ABI PRIS MTM377。

作者简介: 朱红霞(1978-),女,硕士,讲师,发表论文 20 余篇,研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: mongqiu2000@sina.com。

收稿日期: 2007-06-19

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取在 Doyle^[1]等(1987)方法的基础上略加改进 具体过程如下: ①样品于液氮中迅速研成粉末,将粉末转入 2 mL 离心管中,加入 700 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 提取液,同时加入 15 μ L β -羟基乙醇,混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 30~60 min。②取出离心管,加入等体积酚/氯仿(V/V=1:1)(pH7.5~8.0)混合液,充分混匀,10 000 rpm 离心 10 min,取上清,转入另 1.5 mL 离心管中。③加入等体积氯仿,充分混匀,8 000 rpm 离心 5 min,取上清。④在两次抽提后的水相中加入 2 倍体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇,颠倒混匀,静止 5 min,使 DNA 沉到管底。⑤将上清液缓慢倒出,70%乙醇反复冲洗,振荡并离心,倒去上清液,真空抽干或室温自然干燥。⑥将沉淀溶于 200~500 μ L 的 1 \times TE 缓冲液,常温下溶解,加入 0.5~1 μ L RNaseA 储备液(100 μ g/mL),在 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min。⑦Agarose 胶和紫外分光光度计检测 RNA 的去除情况,若去除干净进行下一步,否则延长 RNA 酶作用时间,直到去除干净。⑧加入等体积的氯仿再抽提一次,混匀,8 000 rpm 离心 5 min,将上清转入 1.5 mL 离心管;加入两倍体积预冷的无水乙醇,混匀,在 8 000 rpm 离心 5 min,收集沉淀。⑨用 70%乙醇冲洗 2~3 次后室温晾干至无酒精味。视沉淀的多少而溶于适量 1 \times TE 缓冲液,分装后放入-20 $^{\circ}$ C 储备或放入 4 $^{\circ}$ C 待用。

1.2.2 DNA 浓度与质量测定 用 Bio-RAD Smartspec MT 3000 紫外分光光度仪测定样品 DNA 浓度与质量(OD 值)。以 0.5%琼脂糖凝胶检测 DNA 主带质量: 5 μ L DNA 样品+3 μ L 溴酚蓝上样缓冲液,加样于含溴化乙锭(EB)的凝胶上于 4 v/cm 电压下电泳 30~45 min,于紫外灯下观察、记录、拍照。

1.2.3 酶切连接和模板 DNA 的制备 试验采用 EcoRI 和 MseI 双酶切目的 DNA,然后用 T4DNA 连接酶,将 EcoRI 和 Mse I 接头与酶切片段连接起来,构建成预扩

增模板 DNA, 37℃保温 5 h, 8℃保温 4 h, 4℃过夜。进行下一步。酶连体系见表 1。

表 1 AFLP 反应体系

酶切连接体系	预扩增体系	选择性扩增体系
4 μL DNA (50 ng/μL)	2 μL 酶切连接模板 DNA	2 μL 预扩增模板
1 μL Adapter	1 μL p ₁ - anpmix	2.5 μL 10X PCR buffer
2 μL EcoRI/Mse II (4u/μL)	1 μL dNTP (2.5 mM)	0.5 μL dNTP (2.5 mM)
2.5 μL 10X Reaction buffer	2.5 μL 10X PCR buffer	1 μL EcoRI 引物 (5 ng/μL)
2.5 μL 10mM ATP	0.5 μL Taq DNA polymase	1 μL Mse I 引物 (30 ng/μL)
1 μL T4 Ligase (3 u/μL)	18 μL AFLP - Water	0.5 μL Taq 酶 (5 U/μL)
7 μL AFLP - Water		17.5 μL AFLP - Water
总体积 20 μL	总体积 25 μL	总体积 25 μL

1.2.4 选择性模板 DNA 制备(预扩增) 选择性模板 DNA 的制备即预扩增, 采用表 1 体系。PCR 扩增程序: 94℃ 2 min, 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 80s, 72℃ 5 min, 30 循环。取 5 μL 预扩增产物和 3~5 μL 上样缓冲液混合后在 0.8% 琼脂糖胶中检测预扩增结果。剩余预扩增产物用 0.1× TE, 1:20 倍稀释待用, 4℃保存。

1.2.5 引物的标记 利用 DNA 合成 5 末端 FAM 标记的 MseI 引物(FAM 为荧光标记物), 由 PE 公司提供。

1.2.6 选择性扩增 选择性扩增体系见表 1, 以上混匀, 离心数秒, 按下列参数 PCR 循环: ①一轮扩增参数: 94℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 80s; ②以后每轮循环温度递减 0.7℃, 扩增 12 轮; ③接着按下列参数扩增 23 轮: 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 80s。取扩增后的 PCR 样品 2 μL 和 2 μL 变性缓冲液混匀后, 94℃ 变性 2 min 后转入冰浴中冷却, 上样。在 4% agarose 胶上检测, 4 V/cm 电泳 40 min。

1.2.7 扩增产物的凝胶电泳分析 凝胶电泳扩增反应结束后, 在 4% 丙烯酰胺凝胶上电泳, 先预电泳: 1 000 V 恒压电泳(PreRun Module: GSRUN 36F-2400)(温度设定 51℃)3 min; 再次清除气泡和尿素后, 加入已变性处理的样品 3 000 V 恒压电压约 3h。电泳结束后, DNA - 测序仪自动根据在每个样品中加入的荧光分子量标准, 将电泳图象压缩上百倍进行保存。之后可以建立矩阵文件, 对电泳结果进行对比和分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度的紫外检测

Bio-RAD Smartspec™ 3000 测定样品(原液稀释 100 倍)DNA 浓度与质量。样品测定完成后, 测定结果如表 2。

表 2 DNA 样品紫外测定结果

样品	A ₂₆₀ nm	A ₂₈₀ nm	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Conug/mL
1	0.009	0.005	1.8136	44.7345
2	0.015	0.008	1.8335	76.4942
3	0.019	0.011	1.8202	96.854
4	0.021	0.011	1.8392	100.089
5	0.024	0.013	1.8852	120.67

2.2 凝胶电泳检测

检测所得样品溶液中 RNA 的存在及 DNA 质量如何, 将 DNA 样品在琼脂糖凝胶上进行电泳。结果(见图

1)表明: 提取的 DNA 样品的主谱带清晰, 无拖尾、降解现象, 无 RNA 带, 这进一步说明该 DNA 样品质量好, 提取过程较少 DNA 损伤。

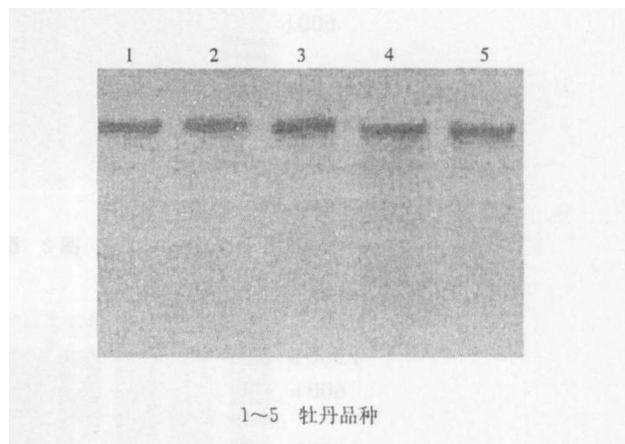


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 DNA 提取分析

试验改进了操作流程, 进一步减少了色素和其它物质的影响, 提高了模板 DNA 的纯度。首先, 交替使用酚、氯仿这两种不同的蛋白质变性剂, 以增加去除蛋白杂质的效果。其次, 在第一次沉淀 DNA 后, 先将上清液缓缓倒出, 用 70% 乙醇反复冲洗后, 再离心收集沉淀, 而不是先离心, 后冲洗的方法。这样避免了大量色素、多糖等杂质与 DNA 共沉淀, 从而使 DNA 得到进一步纯化。再次, 把琼脂糖凝胶或紫外检测 DNA 蛋白质去除情况步骤提前到第二次纯化前进行, 以保证不同活性的 RNA 酶(RNase)有效反应和 RNA 去除干净^[3]。最后, 在无水乙醇沉淀 DNA 时, 采用短时间沉淀, 因为 DNA 在无水乙醇的沉淀速度, 大于色素、多糖和酚类物质, 所以用有机溶剂沉淀 DNA 时间宜短, 减少共沉淀。

2.4 酶切和连接效果检测

酶切完全彻底是 AFLP 技术成功的一个重要的前提条件。试验用的 EcoRI 为 6 个碱基切点的内切酶, 酶切片断应较大; 而 MseI 为 4 碱基切点的内切酶, 酶切片断较 EcoRI 小, 酶切片断一般在 100~1 500 b。对牡丹、芍药供试品种基因组 DNA 进行双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳发现, 其片断大小在 100~1 500 b 范围内, DNA 带呈均匀弥散状, 说明酶切充分(如图 2)。

2.5 预扩增效果的检测

酶切连接后的预扩增产物为 AFLP 选择性扩增提供模板, 预扩增的好坏直接说明接头连接是否成功, 这是关系到 AFLP 扩增效果的又一个重要的环节, 供试材料的预扩增片断经检测, 各材料有相似的状态和长度, 片断大小也相接近, 一般在 100~1 500 b 范围内(如图 3), 为之后进行选择扩增提供了理想的模板。

2.6 选择性扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶上电泳后结果

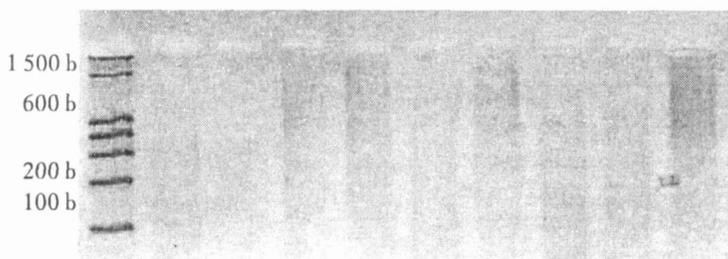


图2 酶切和连接检测

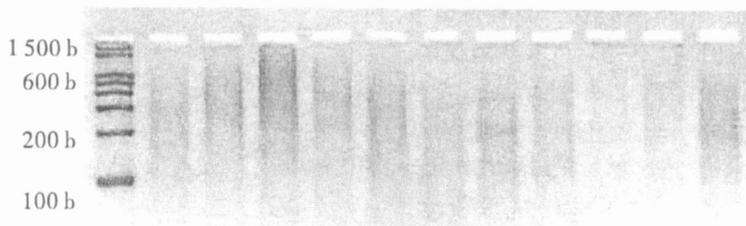
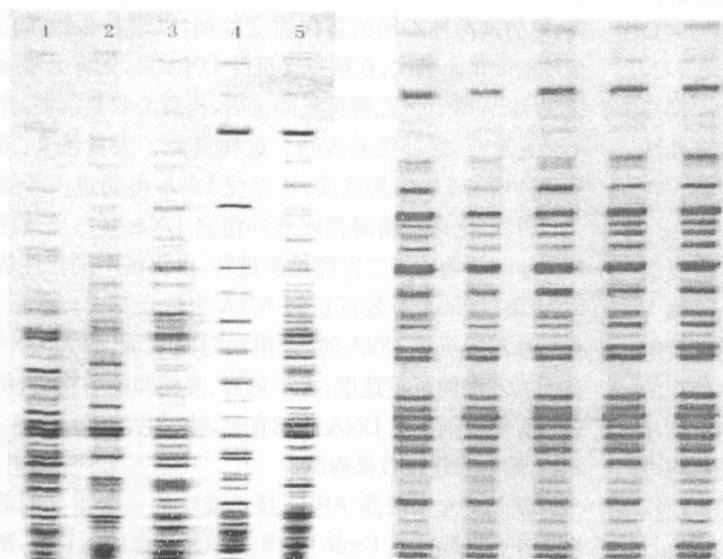


图3 预扩增效果检测

图4 选扩产物在4%聚丙烯酰胺凝胶上电泳后结果
(E-AGG/M-CAG、E-AAC/M-CTA)

采用上述体系,选扩产物在4%聚丙烯酰胺凝胶上电泳得到了清晰的条带。如图4所示为引物组 E-AGG/M-CAG、E-AAC/M-CTA 所得结果。

3 讨论与小结

3.1 总DNA提取和纯化。牡丹叶内酚类、色素、单宁等物质含量较高,这些次生物质与核酸形成复合物,DNA埋在这种粘稠的胶状物中,难以溶解或产生程度不同的褐变,直接影响DNA质量及扩增反应的效果。为此,试验参照相关研究采用了几种处理以去除这些次生物质,结果发现:①将黄褐色的DNA沉淀作为材料重新提取

获得的效果较好,但提纯后浓度大大降低,因而该法适用于采用较大离心管操作的提取过程,由于大体积的离心管可盛放较多的材料,因而获得较多的DNA沉淀,故经得起反复的提纯;②在 $2\times$ CTAB提取液中预先加入2%(W/V)的PVP(polyvinylpyrrolidone,聚乙烯吡咯烷酮)、材料研磨后加入提取液的同时再加入2%的 β -巯基乙醇,这一处理也获得较好质量的DNA,并且较之于第一种处理更省时方便,且适于小离心管操作,因而较为实用^[3]。研究最终采用了该法。

3.2 在牡丹 AFLP 体系建立过程中,除对模板DNA的质量要求高外,酶切链接中EcoRI、Mse I、T4DNA的质量和浓度,选择扩增的反应中引物的筛选扩增以及电泳时胶的浓度都很关键。进行引物筛选时,采用3+2的引物组合扩增效果较好,带纹清晰,分辨率高,多态性、稳定性和重复性都比较理想。2+2引物组合产生的条带太多,给分析带来困难;2+3或3+2的引物在低分子量地区也产生难以分辨的条带。一般用质量分数为4%的PAGE胶、3000W恒功率、3h较合适。

3.3 荧光法 AFLP 对玻璃板的清洁程度要求较高。清洗的经验是:用稀盐酸浸泡0.5h,用自来水冲洗数遍,然后用热纯净水冲洗,自然晾干或真空抽干。清洗的重点部位是玻璃板下端2~4.5cm处激光头进行来回扫描的部位。清洗过程中要避免引入杂质,不用洗衣粉等含有

落叶期牡丹非叶材料提取 DNA 的方法

杨英军, 楚爱香, 杨占所

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:以牡丹休眠时期根、茎、芽为材料,用 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法进行 DNA 提取。结果表明:采用 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法均能从不同采样期的根、茎、芽中提取出 DNA,采样时期对提取效果没有显著影响;以牡丹根采用 CTAB 法提取,所获得的 DNA 产量高、质量优,是获取落叶期牡丹 DNA 的最佳组合。

关键词:牡丹;落叶期;DNA 提取

中图分类号: S 685. 110. 32 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)10-0167-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr)属芍药科、芍药属、牡丹组植物,是我国的传统名花,在我国有悠久的栽培历史。尤其是近年来,随着牡丹国花地位的确定和人们生活水平的提高,牡丹的分子生物学方面的研究也随

之兴起¹⁻⁴。

提取高质量的 DNA 是分子生物学研究的基础,经典的提取方法有 CTAB 法和 SDS 法等。叶片是应用最为广泛的提取材料,尤以幼嫩叶片效果为最佳¹⁻³。牡丹叶内酚类、色素和单宁等含量较高,并与核酸形成复合物, DNA 难以溶解或产生不同程度褐变,直接影响提取质量及扩增反应。林启冰²以牡丹嫩叶为材料,成功获得了可用于 AFLP 分析的高纯度 DNA,赵翊³以干燥后的叶提取也获得了同样的结果。

第一作者简介:杨英军(1969-),男,副教授,博士,河南孟津人,现从事果树分子生物学有关研究工作。

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(0611030700);河南省科技攻关资助项目(072102140015)。

收稿日期:2007-07-16

酶蛋白的洗涤剂,因为任何可以吸收激光波长的物质都可以在激光照射下激发出荧光,从而产生杂质峰,对分析结果的影响很大。荧光法对凝胶的要求也较高,因为不象银染法,一块玻璃板涂抹 repel silane,一块涂抹 binding silane。所以制备好的凝胶液会很容易地贴着涂抹了 binding silane 的玻璃板往下流。而荧光法的两块玻璃板什么也不涂,所以凝胶液不太容易往下流,而且易产生气泡。因此在制备凝胶混合液时要充分抽滤、

要抽气,以防止气泡的产生。另外,凝胶在使用前至少凝结 2 h,预电泳要进行约 0.5 h 直至温度上升到 51℃。

参考文献

- [1] Doyle J J, Doyle L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull 1987, 19: 11-15.
- [2] 明军,张启翔,晏小兰. 梅花基因组 AFLP 银染反应的建立和优化[J]. 北京林业大学学报. 2003, 25(3): 17-21.
- [3] 郭先锋. 中国芍药部分种和品种亲缘关系研究[D]. 北京林业大学博士学位论文, 2003.

DNA Template Preparation and Technology System Construction for AFLP Analysis in *Paeonia suffruticosa*

ZHU Hong-xia

(Shanghai Polytechnic College of Urban Management, Shanghai 200438 China)

Abstract: The improved method of CTAB-DNA isolation was used to extract total DNA from leaves of *Paeonia suffruticosa* in this study. AFLP analysis in *Paeonia suffruticosa* was established. Clear and high resolution DNA fingerprints were obtained in this study, which made a success in DNA extraction, restriction-ligase reaction, pre-amplification and staining techniques. The aim of this paper was to lay a foundation for the establishment of DNA fingerprinting, selection and breeding of eminent cultivars and genetic relationship in *Paeonia suffruticosa*.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; Extraction of DNA; AFLP; Fingerprints