

杏叶片 DNA 提取和荧光 AFLP 反应体系的建立

张俊环, 孙浩元, 杨 丽, 王玉柱

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘要:以杏嫩叶为材料, 利用改进的 CTAB 法, 提取到高质量的杏叶片总 DNA, 通过优化酶切、连接、预扩增、选择性扩增等试验条件, 建立了高效稳定的杏荧光 AFLP 反应体系; 筛选出多态性好的 12 对引物组合, 均获得稳定、清晰的扩增图谱, 可进行杏品种鉴定、种质资源的遗传多样性和亲缘关系分析等研究。

关键词:杏; DNA 提取; 荧光 AFLP 标记

中图分类号: S 662.2; Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)19-0145-04

杏是中国原产果树品种之一, 有着悠久的驯化栽培历史和广泛的分布地区, 种质资源极为丰富, 我国拥有世界三分之二的品种和类型, 对这些品种资源的遗传背景进行分子水平的研究, 将为有效地利用现有资源进行品种改良、挖掘优异基因, 并最终为育种和生产服务提供了一条新途径。已有的研究表明, 分子标记技术是研究植物遗传多样性与亲缘关系, 从而对品种资源合理利用与保护的有利工具。扩增片段长度多态性(AFLP)是继 RFLP、SSR、RAPD 之后发展最快的 DNA 分子标记技术, 该技术结合了 RFLP 的稳定性和 RAPD 技术的简便高效性, 同时又能克服 RFLP 带型少、信息量小以及 RAPD 技术不稳定的缺点^[1], 并且和 SSR 相比, AFLP 无需事先知道 DNA 序列, 免去了 SSR 标记中引物设计的麻烦, 因此成为目前较为理想的分子标记技术, 已在果树分子遗传连锁图的构建^[2]、品种鉴定^[3]、种质资源遗传多样性分析^[4,6]、亲缘关系研究^[7]、分子标记辅助育种^[8,9]等领域得到了广泛的应用。但是, 目前有关杏的 AFLP 分析的报道较少, 且未曾见杏 AFLP 反应体系方面的研究。因此, 该研究以不同来源的杏种质资源为试材, 探讨用常规的 CTAB 法制备 DNA 模板以及建立适合杏基因组荧光 AFLP 分析的技术体系, 旨在为相关的遗传分析奠定基础。

第一作者简介:张俊环(1974), 女, 山东菏泽人, 博士, 副研究员, 现主要从事果树分子生物学研究工作。E-mail: zhang_junhuan@163.com.

通讯作者:王玉柱(1960), 男, 北京平谷人, 博士, 研究员, 现主要从事果树资源与育种技术研究工作。

基金项目:北京市自然科学基金重点资助项目(6081001); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2008BAD92B02); 国家“十一五”公益性行业科研专项资助项目(200904032)。

收稿日期:2010-06-02

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材取自北京市农林科学院林业果树研究所杏种质资源圃。取正常生长的幼嫩叶片, 用冰壶带回实验室, 液氮速冻后置-80℃冰柜保存备用。

1.2 叶片 DNA 的提取

称取材料 50 mg, 液氮研磨成粉末, 迅速转入盛有 800 μL 2% CTAB 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mmol/L NaCl, 2%(W/V) CTAB)的 2 mL 离心管中, 加入 0.016 g PVPP 和 20 μL β-巯基乙醇, 剧烈振荡混匀, 60℃预热 40 min, 其间混匀 2~3 次, 取出样品于室温放置, 待样品冷却到室温; 加入 800 μL 氯仿:异戊醇(24:1), 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液到 2 mL 离心管中加入 1.5 倍体积 1×CTAB 沉淀液(50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 1%(W/V)CTAB, 20 mmol/L β-巯基乙醇), 放置 20~30 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 将沉淀晾干, 溶于 200 μL TE-buffer, 加入 400 μL 95%乙醇, 20 μL 3 mol/L NaAc, -20℃沉淀 1 h, 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 75%乙醇洗沉淀 2 次; 室温干燥 DNA 沉淀; 用 4℃50~100 μL TE 溶解, -20℃贮存备用。

1.3 DNA 的质量检测

1.3.1 DNA 紫外吸收值 取 10 μL DNA 溶液用 TE 稀释至 500 μL, 在 Eppendorf Biophotometer 6131 型仪器上检测 DNA 的浓度及纯度。

1.3.2 DNA 的电泳检测 取 5 μL DNA 样品加 2 μL 荧光标记的溴酚蓝上样缓冲液; 以 Marker λDNA/Hind II 为标准于 0.8%琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像仪拍照判断 DNA 分子量大小及完整程度。

1.4 AFLP 反应体系的建立

1.4.1 酶切连接各样品基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行 在 20 μL 反应体系中含有 DNA 模板 (50 ng/ μL) 4 μL , *Pst* I 和 *Mse* I 接头 1 μL , *Pst* I (4 U/ μL) 和 *Mse* I (4 U/ μL) 2 μL , 10 \times Rection buffer 2.5 μL , 10 mmol/L ATP 2.5 μL , T4 Ligase (3 U/ μL) 1 μL , 超纯水 7 μL 。将上述混合液均匀离心数秒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 h, 8 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

1.4.2 预扩增 用预扩增引物组合进行预扩增。反应体系为 25 μL 。含酶切—连接产物 2 μL , *Pst* I 和 *Mse* I 预扩增引物 1 μL , dNTPs 0.5 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , 超纯水 18.5 μL 。预扩增反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s, 循环 30 次。预扩增完成后, 取 5 μL 预扩增产物和 1 μL Loading Buffer 混匀后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中检测预扩增的效果。对检测理想的预扩增产物样品用 TE 稀释 20 倍后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.3 选择性扩增 用荧光标记的经过筛选的多态性好的引物进行正式选择性扩增。其中 *Mse* I 引物的 5' 端用荧光染料进行标记。反应体系为 25 μL 。含预扩增产物稀释后的 DNA 样品 2 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , dNTPs 0.5 μL , *Pst* I 引物 (5 ng/ μL) 1 μL , *Mse* I 引物 (30 ng/ μL) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , 超纯水 17.5 μL 。选择性扩增 PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ (以后每轮循环温度递减 0.7 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 扩增 12 轮; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 再进行 23 个循环。取选择性扩增后的样品在 ABI PRISM 377 自动测序仪上进行电泳分离检测, 得到 AFLP 的 DNA 指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 DNA 的纯度与完整性检测

采用上述方法提取的 DNA, 浓度介于 200~1 000

ng/ μL , OD₂₈₀/OD₂₆₀ 比值介于 1.78~1.92 之间, 表明 DNA 较纯, RNA 去除完全, 没有蛋白质及酚等物质污染。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示, DNA 条带清楚, 无明显拖尾现象及弥散带, 无 RNA 条带, 也表明该方法提取的基因组 DNA 结构完整, 没有降解, RNA 清除完全。因此, 所提取的 DNA 完全满足 AFLP 分析对 DNA 模板的高质量要求。

2.2 酶切酶连产物的检测

试验选用 *Pst* I/*Mse* I 酶切组合, 并采用酶切连接一步法, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 酶切片段时, 在 250 bp 上下有一均匀的弥散带, 没有发现较大的没有切开的 DNA 片段, 说明 DNA 样品酶切完全, 可以进行人工接头的连接和作为预扩增体系的模板。

2.3 扩增体系的验证

AFLP 扩增体系包括预扩增和选择性扩增 2 个环节。预扩增的目的是为选择性扩增提供大量的模板, 同时对模板起到选择性纯化的作用, 以使选择性扩增能产生清晰、稳定、易重复的条带, 所以预扩增产物的质量直接关系到下面的选择性扩增。影响 PCR 反应的所有因素都是影响预扩增反应的因素, 该试验对影响预扩增反应的关键因子 *Taq* DNA 聚合酶量进行了反复对比研究, 发现在 0.5、0.75、1.0、1.25 和 1.5 U 中 1.0 U 扩增效果最好。用 1.0% 的琼脂糖凝胶对预扩增产物进行电泳检测, 可见在 250~2 000 bp 范围内呈明亮的连续带 (图 3), 表明可较好地应用于下一步的选择性扩增分析。

另外, 在 AFLP 选择性扩增引物组合中, 选择性核苷酸的数量和碱基序列是决定 AFLP 扩增反应产生 DNA 片段丰富程度的关键因素。试验采用了预扩增引物组合, 选择性扩增引物组合 (P+3)/(M+3), 即 3 个选择性碱基来进行杏资源的遗传分析研究。对选扩产物检测结果表明, 选用 (P+3)/(M+3) 引物组合可以得到清晰的电泳图谱 (图 4)。



图 1 部分样品基因组 DNA 电泳图

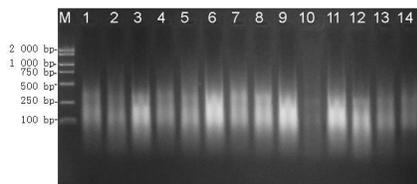


图 2 酶切酶连产物琼脂糖凝胶电泳检测

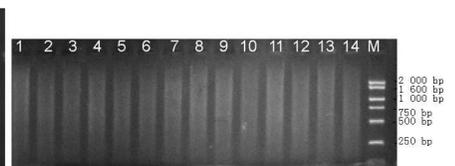


图 3 预扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

2.4 引物的选择和不同引物组合扩增产物的多态性

不同的引物组合不仅在扩增总带数、多态性带数上差异很大, 而且扩增片段的大小范围也有很大的差别, 带的清晰程度、带与带之间的对比度也不同。为此从供试样品中选取 5 个遗传关系较远的样品, 用 64 对引物组

合进行扩增, 对所产生的 AFLP 指纹进行了统计分析, 从中选择多态性丰富、带型较好的 12 对引物组合对所有供试样品进行扩增。

应用优化好的体系, 以 30 个不同来源和类型的杏种质为试材, 选用引物组合 P-G AT/M-CTC 进行了荧光

AFLP 分析(图 4)。可知,扩增出的带纹清晰,密度分布均匀,扩增信号强度基本一致,对分布在 70~500 bp 的条带进行统计,在 30 个品种中共扩增出稳定清晰的带纹 1 669 条,各品种扩增带分布较均匀,扩增带最少的为 45 条,最多的为 72 条。结果表明,该体系具有较高的分辨率和稳定性。可见,荧光 AFLP 选择性扩增带型丰富,多态性高,是研究杏基因组多态性非常高效的一种分子标记技术。

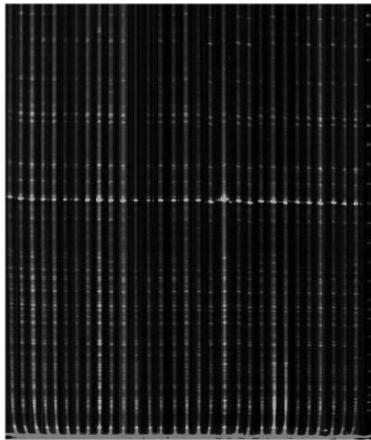


图 4 用 *P-GAT/M-CTC* 引物组合对杏基因组 DNA 扩增的荧光 AFLP 图谱

3 结论与讨论

AFLP 技术关键步骤是获得高质量基因组 DNA,尽量保持分子的完整性,采取各种有效措施以减少降解,纯度要求高。该试验采用改良 CTAB 法提取,在基本提取过程中添加 2%(W/V)PVPP 和 20 μL β-巯基乙醇,可以较彻底地去除杏叶片中所含的多酚、多糖、单宁等物质,提取叶片 DNA 纯度较高,符合 AFLP 分析要求。

限制性内切酶种类要选择适当。利用 AFLP 分析基因组时,一般应用 2 种限制性内切酶在适宜的缓冲系统中对基因组 DNA 进行酶切,其中 1 种是识别 6 个碱基的低频内切酶(常用 *EcoRI*、*PstI* 或 *SacI*),另一种是识别 4 个碱基的高频内切酶(常用 *MseI*、*TaqI*),对富含 AT 的植物基因组进行分析时,大多选用 *PMseI*,因其识别序列为 TTA A。在以往大多植物的 AFLP 分析中常用的酶组合为 *EcoRI* 和 *MseI*,也都获得了很好的酶切效果^[10,11]。试验采用 *PstI/MseI* 组合同样获得了便于 PCR 扩增和凝胶电泳的小片段 DNA(图 2)。*EcoRI* 和 *PstI* 这 2 种不同的核酸内切限制酶,只是切割 DNA 分子产生的粘性末端不同,*PstI* 的识别序列切割后形成 3'-OH 的单链粘性末端,而 *EcoRI* 的识别序列切割后形成 5'-P 的单链粘性末端。因此,在植物的 AFLP 分析中,*EcoRI/MseI* 和 *PstI/MseI* 都是很好的内切酶组合。另外,酶切连接的是否充分,需反复摸索合适的温度和

时间,才能保证酶切连接好,才能扩增出多态性位点。酶切连接过程有酶切连接分步法和酶切连接一步法 2 种,前者步骤较复杂,因此该试验采用酶切酶连一步法于 37℃ 保温 5 h,其结果通过试验验证效果良好。

接下来,筛选合适的引物组合是荧光 AFLP 分析必不可少的步骤。AFLP 引物(包括预扩增引物和选择性扩增引物)的选择主要取决于研究对象基因组的大小。杏基因组大小约为 590 Mb,所以选用 3 个选择性碱基 (P+3)/(M+3)引物组合可以得到清晰的电泳图谱,扩增条带适中,大部分集中在 70~500 bp 范围内(图 3)。不同引物组合的多态性高低、带清晰度、分布均匀度等都有很大差异。荧光 AFLP 与传统的银染法相比有很多的优越性^[12],但荧光染料的价格相对较高,一般要事先对引物的多态性进行选择试验,之后对选出的多态性好的引物对中的 *MseI* 的 5'端进行荧光标记。该试验筛选出适用于杏 AFLP 分析的引物组合有 12 对,分别是

P-GAA/M-CAC、*P-GAA/M-CAG*、*P-GAG/M-CAA*、*P-GAG/M-CAC*、*P-GAT/M-CAA*、*P-GAT/M-CAC*、*P-GAT/M-CAG*、*P-GAT/M-CTG*、*P-GAA/M-CAA*、*P-GAG/M-CAG*、*P-GAT/M-CTC* 和 *P-GAT/M-CTT*。

综上所述,试验经过荧光 AFLP 分析各步骤参数的选择,最终确立了适用于杏 AFLP 分析的技术体系,可以很好地用于后续的品种鉴定、种质资源遗传多样性分析、亲缘关系研究以及分子遗传图谱的构建等多方面的研究。

参考文献

- [1] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 162-166.
- [2] Drlwanger E, Cosson P, Boudehri K, et al. Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit[J]. Tree genetics & genomes, 2007, 3(1): 1-13.
- [3] Geuna F, Toschi M, Bassi D. The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot[J]. Plant Breeding, 2003, 122(6): 526-531.
- [4] Xu D H, Wahyuni S, Sato Y, et al. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing[J]. Genetic resources and crop evolution, 2006, 53(5): 883-889.
- [5] Ayanoglu H, Bayazit S, Inan G, et al. AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 114(4): 263-267.
- [6] 蔡丹英, 范太伟, 滕元文, 等. 甘肃中部梨种质资源的 AFLP 分析[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 298-304.
- [7] 王富荣, 佟兆国, 赵剑波, 等. 桃野生种和地方品种种质资源亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 305-311.
- [8] Wu J, Shu H R, Zhang K C, et al. Development of molecular markers linked to the traits of non-acid/acid fruit of peach[J]. Acta Horticulturae, 2007, 763: 131-137.

石榴 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化

赵丽华^{1,2}

(1. 西昌学院 农业科学学院 四川 西昌 615013; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400715)

摘要: 现利用正交设计 $L_{16}(4^4)$ 探讨 DNA 模板、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、*Taq* DNA 聚合酶对石榴 ISSR-PCR 反应体系的影响, 首次应用加权平均法及百分制对正交实验结果进行评分, 并应用 DPS 数据处理系统进行数据分析; 同时对石榴 ISSR-PCR 最佳反应体系进行退火温度梯度试验。结果表明: 适合石榴的 ISSR-PCR 最优反应体系 (25 μ L) 为: Mg^{2+} 1.75 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.8 mmol/L、DNA 模板 20 ng; 引物 UBC 811 的最适退火温度为 51.2 $^{\circ}$ C, 且最适退火温度因引物而异。

关键词: 石榴; 正交设计; ISSR; 反应体系; 优化

中图分类号: S 665.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)19-0148-05

石榴 (*Punica granatum* L.) 是落叶灌木或小乔木, 目前运用 ISSR 分子标记对石榴进行研究鲜有报道。ISSR (Inter-simple Sequence Repeat) 是一种利用在重复

序列 3' 或 5' 端加 1~4 个随机核苷酸为引物, 对基因组 DNA 进行扩增的分子标记, 具有无需预知基因组背景信息、操作简单、多态性高、重复性好、信息量大、DNA 样品用量少和成本低等优点^[1]。但 ISSR-PCR 反应体系往往受到 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、DNA 模板用量以及退火温度的影响^[2], 且不同物种对反应条件的要求也存在一定的差异^[3], 为了获得多态性高、稳定可靠的试验结果, 应对这些因素进行优化, 选择适宜的退火温度。正交实验具有均衡分散、综合可比及效应明确等特性, 既减小了试验规模, 又使信息损失少, 克服了

作者简介: 赵丽华 (1972-), 女, 在读博士, 副教授, 现从事园艺植物生物技术及遗传育种研究和教学工作。E-mail: 1973zlh@163.com.

基金项目: 四川省教育厅科研基金资助项目 (08zc014); 西昌学院科研课题资助项目 (YJSA0615)。

收稿日期: 2010-06-10

[9] Cachi A M, Wunsch A. Bulk segregant analysis for the identification of molecular markers linked to self-compatibility in 'Cristobalina' sweet cherry [J]. Acta Horticulturae 2009, 814(1): 395-400.

[10] 王永康, 田建保, 王永勤等. 枣树品种品系的 AFLP 分析 [J]. 果树学报 2007, 24(2): 146-150.

[11] Kriehen L, Trifi-Farah N, Marmakchi M, et al. Variability, organization and identification of Tunisian apricot (*Prunus armeniaca* L.) using AFLP markers [J]. Acta Horticulturae 2006, 717: 251-254.

[12] 赵翀, 刘法央, 郭玉露等. AFLP 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(2): 125-129.

Extraction of DNA and Establishment of Fluorescent-AFLP Techniques in Leaves of Apricot

ZHANG Jun-huan, SUN Hao-yuan, YANG Li, WANG Yu-zhu

(Institute of Pology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: The high quality DNA required for construction of AFLP analysis system was isolated with an improved method of CTAB from young leaves of apricot. A fluorescent-AFLP reaction system was constructed for genetic analysis of apricot by optimizing DNA restriction-ligase reaction, pre-amplification and selective amplification. The clear and stable amplification patterns could be obtained from 12 pairs primer combinations with good polymorphism, which were selected from 64 pairs AFLP primer combinations. These results might provide a method based on the fluorescent-AFLP system for the further study in the field of molecular marker in cultivar identification, genetic diversity and genetic relationship in apricot.

Key words: apricot; extraction of DNA; fluorescent-AFLP