

# 石榴 AFLP 反应体系的建立及优化

赵丽华

(西昌学院 农业科学学院, 四川 西昌 615013)

**摘要:**以提取的‘粉红牡丹’石榴叶片基因组 DNA 为材料,对影响 AFLP 反应体系的 *Mse* I/*Eco*RI 酶切时间、预扩增模板 DNA 稀释倍数及程序和选择性扩增模板 DNA 稀释倍数等关键因素进行优化。结果表明:在石榴 AFLP 反应体系为 20  $\mu$ L 双酶切反应体系中,基因组 DNA 为 300 ng 的最佳酶切时间为 6 h;以不稀释 DNA 连接产物为预扩增模板,94℃ 为预扩增反应程序的起始解链温度;以稀释 20 倍预扩产物 DNA 为选扩模板。

**关键词:**石榴;AFLP;体系;优化

**中图分类号:**S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0079-04

石榴(*Punica granatum* L.)为石榴科石榴属落叶灌木或小乔木,原产印度、伊朗、阿富汗等中亚地区,引入中国至今已有 2 000 余年的栽培历史<sup>[1]</sup>;石榴在中国经长期天然杂交和基因突变,以及采用实生、嫁接等多种繁殖方法,产生了复杂多样的品种和类型。目前,国际上还没有建立统一的石榴品种分类方法和分类体系,导致品种混杂、同种异名、同名异种的现象出现,绝大多数品种的系统演化和品种间的亲缘关系也无文献资料可考证<sup>[2-3]</sup>,对准确进行品种资源鉴定和利用带来了困难。尽管各国学者已经用 RAPD、ISSR 等<sup>[4-6]</sup>分子标记对部分石榴进行遗传多样性研究,但利用扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)对石榴种质资源进行研究在国内外报道较少。

AFLP 因具有多态性高、DNA 用量少、无需预知基因组序列信息、稳定性好等优点,已被广泛应用于种质资源遗传多样性研究、遗传图谱构建、辅助选择育种、品种鉴定等多方面的研究。在目前缺乏对石榴基因组序列等信息了解的情况下, AFLP 技术是石榴种质资源鉴定与评价的一种有效手段。但 AFLP 分子标记操作步骤繁琐,对技术要求较高,任何步骤操作不当,都将直接影响试验结果<sup>[7]</sup>。优化石榴 AFLP 反应体系,是进行分析的前提,但目前鲜有文献报道石榴 AFLP 体系优化的结果。该研究对石榴 AFLP 反应体系进行优化,以期建

立稳定的石榴 AFLP 体系,为石榴进行 AFLP 遗传多样性分析、图谱构建、分子标记选择辅助育种等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为山东石榴‘粉红牡丹’,于 2008 年 4 月采自四川会理县农业局石榴品种资源圃。试验于西南大学花卉实验室进行。

试剂:*Eco*RI、*Mse*I、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶购自 NEB, *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL 2000 购自 TaKaRa 有限公司; *Mse* I/*Eco*RI 接头、预扩引物和选择性扩增引物序列参照周延清<sup>[8]</sup>由上海英骏生物技术有限公司合成;亲和硅烷、剥离硅烷购自北京鼎国生物技术有限公司,丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液(Acryl/Bis solution, 29:1, 40%)、尿素[CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]、无水碳酸钠(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)、硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)、硫代硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、甲醛(HCHO)、过硫酸氨[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]等均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及检测 参照赵丽华等<sup>[9]</sup>改良 CTAB 法提取‘粉红牡丹’石榴叶片基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,核酸蛋白分析仪测定 DNA 含量,最后稀释为 100 ng/ $\mu$ L 工作液,置于-20℃冰箱里备用。

1.2.2 基因组 DNA 酶切时间的优化 以山东石榴‘粉红牡丹’基因组 DNA 为材料,用限制性内切酶 *Mse* I、*Eco*RI 进行 DNA 模板双酶切<sup>[10-11]</sup>。20  $\mu$ L 双酶切反应体系组分为:*Mse* I(10 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L、*Eco*RI(20 U/ $\mu$ L)0.25  $\mu$ L、BSA(100  $\mu$ g/mL)0.2  $\mu$ L、NEBuffer(2)2  $\mu$ L、基因组 DNA(100 ng/ $\mu$ L)3  $\mu$ L、加 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积 20  $\mu$ L。分别设定酶切时间为 3、4、5、6、7 h,对照不加内切酶,以 37℃ 恒温水浴进行酶切反应,酶切结束后,65℃

**作者简介:**赵丽华(1972-),女,四川西昌人,博士,副教授,研究方向为园艺植物分子生物学及遗传育种。E-mail:1973zlh@163.com.

**基金项目:**四川省教育厅科研基金资助项目(08zc014);西昌学院研究生课题资助项目(YJSA0615)。

**收稿日期:**2012-06-19

水浴 20 min 灭活内切酶,吸取 10  $\mu$ L 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

1.2.3 酶切产物的连接 将 *Mse* I、*Eco*R I 接头单链在 PCR 仪上进行接头的复性,自然冷却制成双链接头。选取最佳酶切时间酶切 DNA 产物,加接头;20  $\mu$ L 的连接体系为:*Eco*R I 接头 (20 mmol/L) 0.5  $\mu$ L、*Mse* I 接头 (20 mmol/L) 0.5  $\mu$ L、 $10\times T_4$  DNA Ligase Buffer 2.0  $\mu$ L、*T\_4* DNA 连接酶 (40 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L、酶切产物 DNA 15  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积 20  $\mu$ L。混匀,瞬时离心,16 $^{\circ}$ C 恒温过夜连接<sup>[12-13]</sup>,连接产物放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.4 预扩增体系优化 模板 DNA(连接产物)分别不稀释、稀释 10、20 倍后用于预扩增,1 次重复,预扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。25  $\mu$ L 的预扩体系组分为<sup>[14-15]</sup>:*Eco*R I-A 引物 (10 mmol/L) 1  $\mu$ L、*Mse* I-C 引物 (10 mmol/L) 1  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L、 $10\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L、连接产物 DNA 2  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积 25  $\mu$ L。设置 2 个预扩程序,分别为 A、B<sup>[16]</sup>,选取最佳稀释倍数进行扩增,各重复 1 次,分别为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>。程序 A 为:72 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 6 min,10 $^{\circ}$ C hold。程序 B 除去第一步 72 $^{\circ}$ C 2 min,其余步骤与 A 相同。

1.2.5 选择性扩增体系模板浓度优化 选择性扩增采用 25  $\mu$ L 体系。模板 DNA(以 B 程序预扩产物)分别不稀释、稀释 10、20 倍后,以 E-AGG/M-CAA 引物进行选择性扩增,1 次重复。选取预扩产物最佳稀释浓度,分别对 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 预扩产物进行选择性扩增,1 次重复,分别为 A<sub>1.1</sub>、A<sub>1.2</sub>、A<sub>2.1</sub>、A<sub>2.2</sub> 及 B<sub>1.1</sub>、B<sub>1.2</sub>、B<sub>2.1</sub>、B<sub>2.2</sub>。25  $\mu$ L 选择性扩增体系为: Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, *Mse* I 选扩引物 (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, *Eco*R I 选扩引物 (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,  $10\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 模板 DNA (预扩产物) 2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积 25  $\mu$ L。选扩程序为<sup>[17]</sup>: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s (每个循环降低 0.7 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 12 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 23 个循环; 72 $^{\circ}$ C 6 min, 10 $^{\circ}$ C hold。选扩产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,参照明军等<sup>[18]</sup> 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 检测

由图 1 可知,琼脂糖电泳检测所提石榴基因组 DNA 主带清晰,无拖尾现象,点样孔干净,无 RNA 条带,测其 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 为 1.804, DNA 产率为 117.2  $\mu$ g/g, 符合

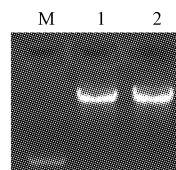


图 1 石榴基因组 DNA 电泳图

注: M 为 DL 2000; 1、2 为‘粉红牡丹’石榴基因组 DNA。

Fig. 1 Electrophoreses of pomegranate genome DNA

Note: M is DL 2000, 1, 2 is pomegranate ‘Fenhongmudan’.

AFLP 技术对基因组 DNA 质量要求<sup>[7]</sup>。

### 2.2 AFLP 体系优化

2.2.1 酶切时间的优化 对石榴基因组进行双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。由图 2 可知, 酶切时间为 3 h 时, 在基因组位置微有发亮, 表明仍有少部分 DNA 没有被酶切; 酶切时间为 4 h 时, DNA 片段从基因组位置到 100 bp 间形成涂抹, 表明进行 4 h 酶切, 不能充分酶切基因组 DNA; 酶切时间为 5 h 时, DNA 片段从 100~1 500 bp 间形成涂抹, 表明进行 5 h 酶切, 不能充分酶切基因组 DNA; 酶切时间为 6、7 h 时, DNA 片段在 100~750 bp 间形成高密度区域, 表明进行 6、7 h 酶切后, 酶切充分, 可以完全消化模板 DNA<sup>[4]</sup>, 且进行 6 h 与 7 h 的酶切, 酶切程度差异不大。对照基因组 DNA 没有拖带, 表明所使用‘粉红牡丹’石榴基因组 DNA 没有降解现象。

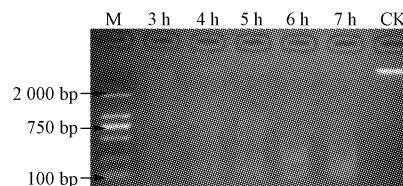


图 2 不同酶切时间的电泳图

Fig. 2 Time of enzyme digestion

2.2.2 预扩增体系模板浓度及扩增程序 由图 3 可知, 不稀释酶切产物的预扩产物 DNA 片段在 750 到 100 bp 间形成高密度区域, 且亮度最高, 表明不稀释酶切产物预扩后 PCR 产物浓度高; 稀释 10 倍酶切产物的预扩产物 DNA 片段在 100~750 bp 间形成较高密度区域, 亮度较低, 表明稀释 10 倍酶切产物的预扩产物浓度较低; 稀释 20 倍酶切产物的预扩产物 DNA 片段在 100~500 bp 间, 且亮度很弱, 表明稀释 20 倍的预扩产物浓度最低。选用酶切产物的最佳稀释倍数, 分别以 A、B 程序进行预扩增, 再用选扩引物 E-AGG/M-CAA 进行选择扩扩增, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 4。由图 4 可知, A、B 程序的预扩产物没有差异; 将 E-AGG/M-CAA 选扩产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测结果见图 5。由图 5 可知, A 程序的 A<sub>1.1</sub>、A<sub>1.2</sub> 比全部 B 程序的多 2 条 DNA 带, 分布在 500 bp 以下, A<sub>2.1</sub>、A<sub>2.2</sub>



比全部 B 程序的多 1 条 DNA 带,但  $A_{1.1}$ 、 $A_{1.2}$ 、与  $A_{2.1}$ 、 $A_{2.2}$  所增加的 DNA 条带位置不同,表明 A 程序能扩增更多的 DNA 条带,但结果不稳定;B 程序扩增的  $B_{1.1}$ 、 $B_{1.2}$ 、 $B_{2.1}$ 、 $B_{2.2}$  扩增的条带比 A 程序的都少,但条带数恒定,表明扩增结果稳定。

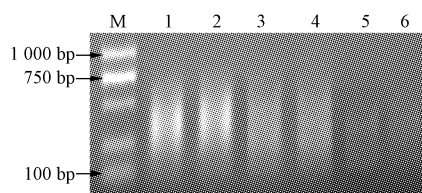


图 3 预扩增产物电泳图

注:1,2 不稀释;3,4 稀释 10 倍;5,6 稀释 20 倍;M 为 DL 2 000。

Fig. 3 Electrophoresis of pre-amplification product

Note:1,2 are not diluted,3,4 are diluted 10 times,5,6 are diluted 20 times ;M is DL 2 000.

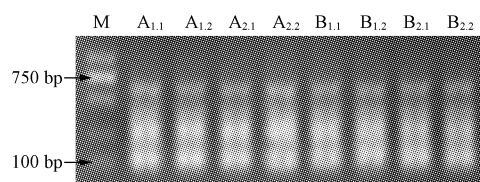


图 4 选择性扩增产物电泳图

注:A 为 A 程序的选扩产物;B 为 B 程序的选扩产物;M 为 DL 2 000。

Fig. 4 Electrophoresis of selective amplification product

Note:A is selective amplification product of A procedure,B is selective amplification product of B procedure;M is DL 2 000.

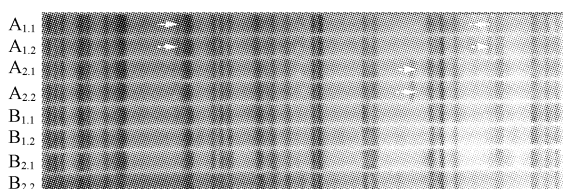


图 5 选择性扩增产物(PAGE)电泳图

注:A 为 A 程序的选择性扩增产物,B 为 B 程序的选择性扩增产物;箭头指示增多条带。

Fig. 5 PAGE electrophoresis of selective amplification product

Note:A is electrophoresis of selective amplification product,B is electrophoresis of selective amplification product;Arrows indicate bands increased.

2.2.3 选择性扩增体系模版浓度优化 将预扩产物分别不稀释、稀释 10、稀释 20 倍后,以 E-AGG/M-CAA 引物进行选择性扩增,产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测结果见图 6。由图 6 可知,6 条泳道的 DNA 条带一样,表明预扩产物不稀释、稀释 10、稀释 20 倍都可以得到稳定的选择性扩增条带,且结果一致。

### 3 结论与讨论

AFLP 技术试验流程较长,对技术要求较高,所以具体操作中容易出现问題。该研究通过对石榴 AFLP 反应体系中几个关键因素进行优化,建立了适合于石榴

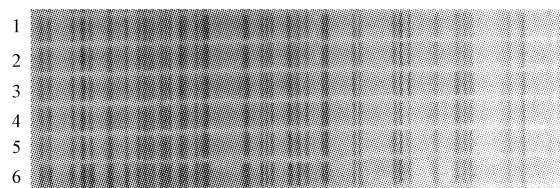


图 6 选择性扩增产物(PAGE)电泳图

注:1,2 为稀释 1 倍;3,4 为稀释 10 倍;5,6 为稀释 20 倍。

Fig. 6 PAGE electrophoresis of selective amplification product

Note:1,2 are diluted 1 times;3,4 are diluted 10 times;5,6 are diluted 20 times.

AFLP 的反应体系,即 20  $\mu$ L 双酶切反应体系中,基因组 DNA 300 ng 的最佳酶切时间为 6 h;以不稀释的连接产物 DNA 为预扩增模板,预扩增程序以 94 $^{\circ}$ C 为起始解链温度;以预扩增产物 DNA 稀释 20 倍后为选扩模板,该体系具有较高的稳定性,可为进行石榴 AFLP 研究奠定基础。

AFLP 反应体系涉及诸多因素,每个因素对整个反应体系都有较大影响。该试验结果表明,①设置不同酶切时间,进行对比试验,石榴基因组 DNA (300 ng) 20  $\mu$ L 双酶切反应体系的酶切时间为 6 h。不同种类的植物由于基因组大小不同,酶切时间长短也有差异<sup>[13]</sup>,酶切时间过短,基因组 DNA 酶切不充分,会造成相应的指纹片断的缺失;酶切时间过长,DNA 内切酶易产生星号(Star)活性,使部分 DNA 降解,造成小片段过多,降低特异性<sup>[8]</sup>。②酶切连接产物模板 DNA 不稀释、稀释 10 倍、稀释 20 倍后的扩增结果不一致,随着稀释的倍数增加,扩增的产物浓度降低;这与田晓俊等<sup>[19]</sup>、欧立军等<sup>[20]</sup> 研究结果一致。可能是双酶切产生 3 种不同的片段,*Mse* I-*Mse* I 片段占总数的 90% 以上,*Mse* I-*Eco*R I 片段仅占 5% 左右,*Eco*R I-*Eco*R I 更少<sup>[7,21]</sup>,当模板溶液被稀释后,扩增的目的片段 *Mse* I-*Eco*R I 浓度随之降低,同时还受 *Mse* I-*Mse* I、*Eco*R I-*Eco*R I 片段的干扰,从而使不同稀释倍数的模板溶液扩增的结果不一致。所以,该试验选取不稀释 DNA 连接产物作为预扩增的模板。③首次在预扩增 PCR 时,A 程序以 72 $^{\circ}$ C 为反应起始温度,以 72 $^{\circ}$ C 进行局部解链,使之与引物互补,此时部分具有 OH-OH 缺口的单链接头仍部分连接在 DNA 片段上,同时进行 DNA 链的延伸,完成链的合成,可增加 DNA 条带数目(图 5);但由于局部接连位置不固定,所以增加的 DNA 条带位置也不固定,不利于 AFLP 技术分析,该试验选取以 B 程序为扩增程序,扩增的 DNA 条带带数恒定,便于分析。④选择性扩增时,预扩产物不稀释、稀释 10、稀释 20 倍得到结果相同,与刘欢<sup>[22]</sup>、李元军等<sup>[23]</sup> 研究结果一致;这是由于 PCR 对模板浓度不敏感,在没有其它干扰的情况下,扩增效果没有差异。

AFLP 体系是一个完整的直线体系,涉及到很多方

面,例如基因组 DNA 的质量、酶切产物连接、PCR 扩增体系、不同的预扩增和选择性扩增的方法等。该研究侧重于酶切时间、预扩增体系模板浓度及扩增程序、选择性扩增体系模板浓度进行试验而优化了石榴 AFLP 反应体系。为了使石榴 AFLP 反应体系更佳,今后还应对 AFLP 体系的其它影响因素进行研究。

### 参考文献

- [1] 张玉星. 果树栽培学各论[M]. 1 版. 北京: 中国农业出版社, 2008:78-86.
- [2] 汪小飞. 石榴品种分类研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007:20-49.
- [3] Stover E, Mercure E W. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise[J]. Hort Science, 2007, 42(5): 1088-1092.
- [4] 卢龙斗, 刘素霞, 邓传良, 等. RAPD 技术在石榴品种分类上的应用[J]. 果树学报, 2007, 24(5): 634-639.
- [5] Ghobadi S, Khoushkhoubi M, Tabatabaei B E S. Phylogenetic relationships among some iranin pomegranate accessions revealed by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers[J]. Iranlan Journal of Horticultural Science and Technology Fall, 2005, 6(3): 111-120.
- [6] Narzary D, Rana T S, Ranade S A. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. Plant Biology, 2010, 12(5): 806-813.
- [7] 曹仪植. 植物分子生物学[M]. 1 版. 北京: 教育出版社, 2004:142-159.
- [8] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2005:2-179.
- [9] 赵丽华, 王先磊. 成熟石榴叶片 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15141-15143.
- [10] 翟文慧, 贾春枫, 周莹, 等. 十字花科蔬菜黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* cv. *campestris*) AFLP 分析体系的建立及优化[J]. 中国农学通报, 2011, 27(22): 168-172.
- [11] Aitken K S, Li J C, Jackson P, et al. AFLP analysis of genetic diversity within *saccharum officinarum* and comparison with sugarcane cultivars[J]. Aust J Agric Res, 2006, 57: 1167-1184.
- [12] Li W, Xing S Y, Yang K Q, et al. Genetic relationships of ornamental cultivars of *Ginkgo biloba* analyzed by AFLP techniques[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(11): 1020-1026.
- [13] Byun S Q, Fang Q, Zhou H, et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 2009, 38(5): 174-175.
- [14] Yu X Y, Li M, Liu Z, et al. A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45: 139-145.
- [15] 张正银, 刘波洋, 陈放, 等. 麻疯树 AFLP 体系的建立与优化[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(2): 280-283.
- [16] 臧德奎, 陈红, 郑林, 等. 木瓜属优良品种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 林业科学, 2009, 45(8): 39-43.
- [17] 赵志常, 胡桂兵, 刘运春, 等. 番荔枝 DNA 的提取和 AFLP 体系的建立[J]. 北方园艺, 2009(10): 44-47.
- [18] 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.
- [19] 田晓俊, 温强, 汪信东, 等. 闽楠、红楠 AFLP 反应体系建立[J]. 林业科技开发, 2009, 23(3): 38-42.
- [20] 欧立军, 黄园, 王俞人, 等. 天门冬 AFLP 反应体系的建立及优化[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 87-90.
- [21] Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 766-777.
- [22] 刘欢. 燕麦 AFLP 标记的遗传多样性分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [23] 李元军, 唐美玲, 于青, 等. 富士苹果 AFLP 体系的优化及其在鉴定早熟芽变中的应用[J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 327-332.

## Establishment of the Optimized AFLP Analysis System for Pomegranate

ZHAO Li-hua

(College of Agriculture Sciences, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

**Abstract:** Taking genome DNA of pomegranate ‘Fenhongmudan’ as material, AFLP reaction system was optimized from time of *Mse* I/*Eco*RI restriction enzyme digest system, template DNA dilution multiple and program of pre-amplification, template DNA dilution multiple of selective amplification. The results indicated that 300 ng genomic DNA was digested completely with 6 hours, the products of ligation was not diluted; starting melting temperature was 94℃ for pre-amplification; the products of pre-amplification was diluted for 20 times.

**Key words:** pomegranates; AFLP; system; optimized