

栓皮栎 AFLP 反应体系的建立

杨 阳,张存旭*,郝丽丽,张文辉

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:以栓皮栎叶片为材料,研究了 AFLP 反应体系中酶切-连接反应的方法与时间、预扩增反应和选择性扩增反应等几个关键因素。建立一套适于栓皮栎基因组的 AFLP 反应体系:基因组 DNA 的提取宜采用改良的 CTAB 法;酶切-连接反应体系采用一步法,其中 DNA 模板用量为 200 ng,酶切-连接反应 4 h;酶切-连接产物用于预扩增反应的最佳稀释倍数为 20 倍;预扩增产物不需要进行稀释直接用作选择性扩增反应。对各环节的效果检测与引物筛选验证表明该体系适合栓皮栎的 AFLP 分析。

关键词:栓皮栎;AFLP;反应体系

中图分类号:S792.18 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)06-0066-04

Establishment of AFLP Reaction System in *Quercus variabilis*

YANG Yang,ZHANG Cun-xu*,HAO Li-li,ZHANG Wen-hui

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The objective of the paper was to establish an AFLP reaction system fitting for *Quercus variabilis*, after systematical study on several crucial aspects involving the process and time of the endonuclease digestion-ligation reaction, the preamplification and selective amplification. The results indicated that the extraction of the genomic DNA should choose the improved CTAB method from the tender leaves of *Q. variabilis*. One-step method, 200 ng DNA dosage and digestion and ligation 4 hours were the best combination for the endonuclease digestion-ligation reaction system. The preamplification reaction was carried out using 20 diluted digestion and ligation products. And the selective amplification was conducted with no diluted preamplification products immediately. The effectiveness test in each step and primer screening test demonstrated that the system was suitable for the AFLP analysis of *Q. variabilis*.

Key words: *Quercus variabilis*; AFLP; reaction system

自 20 世纪 90 年代以来,分子标记技术取得了很大的发展,相比 RAPD、SSR 而言, AFLP(扩增片段长度多态性)具有重复性好、多态性高、灵敏性高等优点^[1],广泛应用于群体遗传多样性、遗传连锁图谱构建、系统发生学、特征序列扩增区及分子标记辅助育种等诸多研究^[2-6]。

栓皮栎(*Quercus variabilis*)是中国特有、具有极高经济和生态利用价值的树种。近年来,人们利

用分子标记技术开展了该树种遗传资源的一些相关研究^[7-8],但不同分子标记技术的原理和所揭示的 DNA 水平上遗传信息有很大不同,每种标记有其独特的特性,综合运用多种标记技术手段能相互辅助从而获得更可靠的结论^[9-10]。本研究拟构建一套适合栓皮栎的 AFLP 反应体系,为进一步开展栓皮栎的遗传多样性、数量性状位点定位、标记辅助育种提供技术方法。

收稿日期:2011-12-08 修回日期:2012-04-13

基金项目:林业公益性行业专项(21004011);西北农林科技大学唐仲英育种基金。

作者简介:杨阳,男,在读硕士,研究方向:林业生物技术。E-mail:yangyang180331@163.com

* 通信作者:张存旭,男,副教授,硕士生导师,主要研究方向:林木遗传育种。E-mail:cunxu@public.xa.sn.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自秦岭国家植物园栓皮栎成林,采摘时间为 4 月下旬,选取栓皮栎单株健康幼嫩叶片,立即放入装有硅胶的密封塑料袋中,置冰盒中保存,带回贮存在-80℃冰箱中待用。

1.2 基因组 DNA 提取及检测

参考 Doyle^[11] 的 DNA 提取方法并加以改良,提取栓皮栎叶片 DNA^[12-13]。得到的 DNA 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,核酸蛋白检测仪测定 DNA 的浓度和纯度。

1.3 AFLP 反应体系

AFLP 反应体系的建立参照 Vos 等的方法^[14],对试验流程和对其多种影响因素、条件进行优化。

1.3.1 酶切连接方法 使用 *EcoR* I 和 *Mse* I (New England Biolabs) 2 种限制性内切酶对 DNA 模板进行双酶切。对酶切连接两步法与一步法进行优化。酶切连接两步法反应体系见表 1,酶切反应条件为:37℃酶切 6 h,65℃灭活 20 min。连接反应条件为:37℃酶切 6 h,65℃灭活 20 min。酶切连接一步法反应体系见表 2,反应条件为:37℃酶切 4 h,65℃灭活 20 min。

表 1 酶切连接两步法反应体系

Table 1 The system of endonuclease digestion and ligation reaction with a two-step system			
酶切反应体系/20 μL		连接反应体系/20 μL	
组分	体积/μL	组分	体积/μL
10× NEB Buffer	2.0	10× NEB	2.0
<i>EcoR</i> I		Ligase Buffer	
DNA Template	2.0	<i>EcoR</i> I adaptor	1.0
<i>EcoR</i> I	0.5	<i>Mse</i> I adaptor	1.0
<i>Mse</i> I	0.5	Digested products	2.0
100× BSA	0.5	T4-DNA Ligase	0.5
ddH ₂ O	14.5	ddH ₂ O	13.5

表 2 酶切连接一步法体系

Table 2 The system of endonuclease digestion and ligation reaction with an one-step method	
组分	体积/μL
10× NEB Buffer	2.0
<i>EcoR</i> I	
10× NEB Ligase Buffer	2.0
<i>EcoR</i> I adaptor	1.0
<i>Mse</i> I adaptor	1.0
DNA Template	1.0
<i>EcoR</i> I	0.5
<i>Mse</i> I	0.5
T4-DNA Ligase	0.5
100× BSA	0.5
ddH ₂ O	11.0

1.3.2 DNA 模板用量 测定提取的栓皮栎 DNA 模板的浓度,用 TE 缓冲液统一标定为 100 ng · μL⁻¹,设置 100、200、300、400、500 ng · μL⁻¹ 和 600 ng · μL⁻¹ 6 个质量浓度的模板 DNA 梯度。用于对酶切连接一步法反应体系中的 DNA 模板用量的优化,筛选最适 DNA 模板用量。

1.3.3 酶切连接一步法体系 设置 2、4、6、8、10 h 和 12 h 6 个时间梯度,对酶切连接一步法反应时间进行优化。

1.3.4 预扩增反应 预扩增反应优化体系见表 3,反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 60 s,72℃延伸 60 s,扩增 30 个循环;72℃延伸 5 min。对酶切连接产物设置 0、10、20、30、40、50 倍 6 个稀释倍数梯度,对酶切连接产物的稀释倍数进行优化。预扩增结果用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 3 预扩增反应体系

Table 3 Pre-amplification reaction system	
组分	体积/μL
10× <i>Taq</i> DNA polymerase buffer	2.0
2.5 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂	2.0
2.5 mmol · L ⁻¹ dNTPs	0.8
E-A/M-C(20 μmol · L ⁻¹)	1.0
Template	2.0
<i>Taq</i> DNA polymerase(1 U · μL ⁻¹)	2.0
ddH ₂ O	10.2

1.3.5 选择性扩增反应 选择性扩增反应优化体系见表 4,反应程序:94℃预变性 5 min;为了增强分辨率,采用温度梯度扩增;第一个循环 94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,后续每个循环的退火温度降低 0.7℃,共 13 个循环;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,扩增循环为 23 个循环;72℃延伸 5 min。对预扩增反应产物设置 0、10、20、30、40、50 倍和 100 倍 7 个稀释倍数梯度,对预扩增反应产物的稀释倍数进行优化。选择性扩增反应产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 4 选择性扩增反应体系

Table 4 Selective amplification reaction system	
组分	体积/μL
10× <i>Taq</i> DNA polymerase buffer	2.0
2.5 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂	2.0
2.5 mmol · L ⁻¹ dNTPs	0.8
E-ANN/M-CNN(20 μmol · L ⁻¹)	1.0
Template	2.0
<i>Taq</i> DNA polymerase(1 U · μL ⁻¹)	2.0
ddH ₂ O	10.2

1.3.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及分析 用含有 7.0 mol · L⁻¹ 尿素的 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电

泳,1 600 V,50 W 恒定功率,对选择性扩增产物预电泳 30 min;选择性扩增产物与甲酰胺上样缓冲液混合 94℃变性 5 min,上样 5 μL 后电泳至载样缓冲液中的指示剂溴酚蓝移动出胶板,约 210 min。电泳结束后对凝胶进行固定、AgNO₃ 染色、显影、再固定,待凝胶室温干燥后照相^[15]。

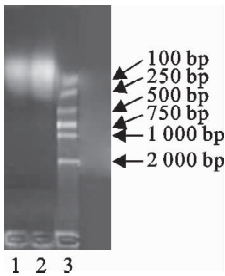
2 结果与分析

2.1 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取的栓皮栎基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.7~1.9 之间,其完整性和质量较好,适用于栓皮栎 AFLP 反应体系。

2.2 酶切连接反应

对酶切连接两步法与一步法研究结果(图 1)表明,两种方法都能对 DNA 进行完全酶切和连接,为了简化试验和减少人为误差,可以采取酶切连接一步法。

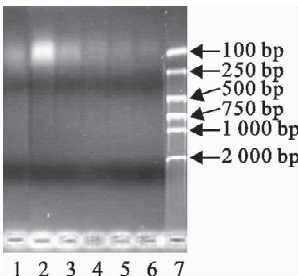


1:两步法;2:一步法;3:DNA Marker 2000

图 1 酶切连接一步法与两步法比较

Fig. 1 Comparison of restriction and ligation products between one-step method and two-step system

对于 DNA 模板的用量,限定限制性内切酶和连接酶的用量,*EcoR* I 10 U,*Mse* I 5 U,T4-DNA ligase 5 U。设定 6 个 DNA 模板的用量进行酶切,经琼脂糖凝胶电泳后结果如图 2。其中在 200 ng 时酶切连接结果表现最好,100 ng 时酶切充分,但可能内切酶使用过量,300~600 ng 浓度时酶切连接均不完全,因此适宜 DNA 模板用量为 200 ng。

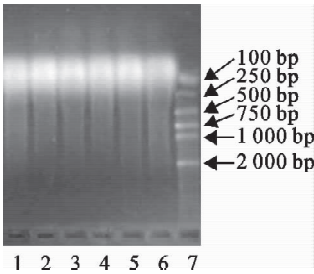


1~6:DNA 用量分别为 100、200、300、400、500、600 ng;7:DNA Marker 2000

图 2 不同 DNA 用量的酶切连接结果

Fig. 2 Result of restriction and ligation products with different template DNA usages

酶切连接一步法时间决定酶切连接是否完全,从而影响预扩增反应的效果。时间梯度试验结果(图 3)可以看出,反应 2、4、6、8、10 h 和 12 h 的结果都一样,酶切连接产物均为小片段,说明酶切连接完全。为了保证酶切连接结果和试验进度,确定酶切连接一步法时间为 4 h。



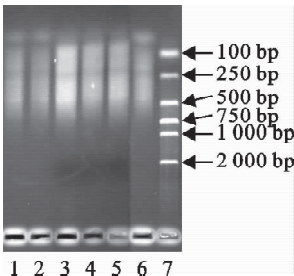
1~6:酶切连接时间分别为 2、4、6、8、10、12 h;7:DNA Marker 2000

图 3 不同时间对酶切连接 DNA 的影响

Fig. 3 Effects of restriction and ligation products with different times

2.3 预扩增反应

对一步法所得的酶切连接产物稀释后进行预扩增,引物采用了预扩增引物组合 E-A 和 M-C,酶切连接产物的不同稀释倍数预扩增结果(图 4)表明,预扩增产物主要集中在 100~750 bp 之间,呈现出弥散状,即“smear”带,稀释 20 倍时条带最亮、最理想。说明预扩增结果良好,酶切连接的结果满足 AFLP 反应体系的要求,可以进行选择性扩增。



1~6:酶切连接产物分别稀释 0、10、20、30、40、50 倍;7:DNA Marker 2000

图 4 不同稀释倍数的酶切连接产物预扩增反应结果

Fig. 4 Result of the preamplification with different diluted restriction and ligation products

2.4 选择性扩增反应

将预扩增按照不同倍数稀释后,用选择性扩增引物组合 E-ANN 和 M-CNN 进行选择性扩增反应,结果(图 5)表明,选择性扩增的条带集中 750 bp 以下,随着稀释倍数的增加,条带的效果呈现减低趋势,但影响不大。说明在选增性扩增反应对 DNA 浓度要求不严格,即预扩增产物的稀释倍数对选择性扩增反应基本无影响。为保证准确性,对预扩增反应产物做不稀释处理以获得最佳效果。

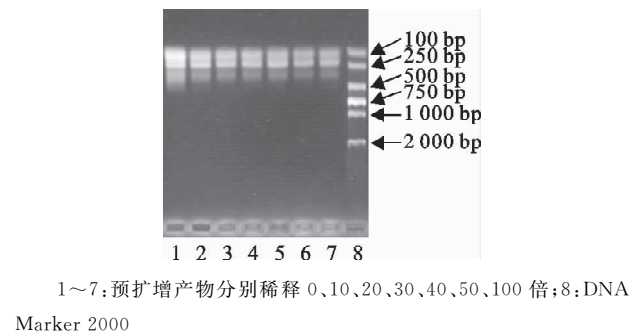


图 5 不同稀释倍数的预扩增产物选择性扩增反应结果

Fig. 5 Result of the selective amplification with different diluted preamplification products

2.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

选择性扩增产物中 DNA 片段多,通过琼脂糖凝胶电泳不能将片段完全分离开,选择 PAGE 序列分析胶能提高分辨率,最高能精确到 1 bp。6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳后银染显色结果如图 6。引物组合为 E-AGG /M-CAA,电泳后显示的条带数量多且清晰,分辨率较高。

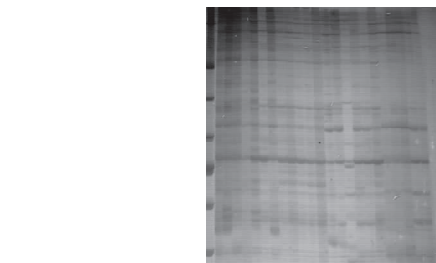


图 6 引物组合 E-AGG /M-CAA 选择性扩增产物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳后银染结果

Fig. 6 The silver-stained results of selective amplification reaction in denaturing polyacrylamide gel (The primer pair: E-AGG /M-CAA)

3 结论与讨论

AFLP 反应体系包括高质量 DNA 的抽提、酶切连接反应体系、预扩增与选择性扩增反应及电泳等主要环节,每个环节对试验都有较大的影响。栓皮栎基因组 DNA 的提取是整个反应体系的第一步,是试验成功的关键。本研究采用改良的 CTAB 法中是配合使用了 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)和 β -巯基乙醇,在粗提 DNA 后加入 RNase A 以除去 RNA 并再次抽提纯化,获得了高质量的 DNA,能满足 AFLP 反应体系的要求。

基因组 DNA 酶切和连接过程中,为了简化并避免影响试验进程,对比酶切连接两步法和酶切连接一步法两种方法,结果表明酶切连接一步法可以保证酶切连接充分完全^[16],但在限制性内切酶和连接酶的选择时需注意反应的最适温度;另外,DNA 模板的用量、酶切时间、内切酶及连接酶的用量之间

的相互影响^[17]。本试验限定内切酶和连接酶的用量,对 DNA 模板的用量和酶切时间研究表明 DNA 模板量过少(<200 ng)时,内切酶、连接酶不能有效的利用;DNA 模板量(≥ 300 ng)过多时酶切连接会不完全,所以 DNA 用量 200 ng 为宜。酶切连接时间短会影响酶切连接效率,既要节约成本,缩短试验周期,也要保证酶切连接完全。本研究发现时间对酶切连接结果影响不大,可能与酶的活性有关。为保证酶切连接结果,确定酶切连接时间为 4 h。

预扩增反应和选择性扩增反应是为了提供大量 DNA 模板,同时对模板起纯化的作用,从而获得更清晰的扩增图谱^[16-18]。酶切连接产物稀释 20 倍时进行预扩增反应,电泳谱带颜色最亮;稀释倍数较高或较低,说明酶切连接产物的浓度偏大或偏小对预扩增反应有一定的影响。选择性扩增的引物 E-ANN /M-CNN,预扩增产物按照不同倍数稀释后进行选择性扩增反应,稀释倍数越高,条带效果略有降低,但不影响最后的结果,说明选择性扩增对预扩增产物的浓度大小要求不敏感。

参考文献:

- [1] HEIDI M M, ANDREW C C. Almost forgotten or latest practice AFLP applications, analyses and advances[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(3): 106-117.
- [2] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants[J]. Mol. Ecol., 2004, 13(5):1143-1155.
- [3] VUYLSTEKE M, MANK R, ANTONISE R, *et al.* Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99(6): 921-935.
- [4] DESPRÉS L, GIELLY L, REDOUTET B, *et al.* Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27(2), 185-196.
- [5] NEGI M S, DEVIC M, DELSENY M, *et al.* Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(1-2): 146-152.
- [6] CERVERA M T, GUSMÃO J, STEENACKERS M, *et al.* Application of AFLP™-based molecular markers to breeding of *Populus* spp. [J]. Plant Growth Regulation, 1996, 20(1): 47-52.
- [7] 董海芳,张存旭. 栓皮栎优树自由授粉子代遗传变异研究[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(3):102-106.
- DONG H F, ZHANG C X. Genetic variation of plus tree open-pollinated progenies in *Quercus variabilis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(3): 102-106. (in Chinese)