

蜡梅 AFLP 分子标记技术体系的建立

赵冰, 张启翔

(北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要: 利用简易 CTAB 法、改良的 CTAB 法和 SDS 法提取蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] 成熟叶和嫩叶的基因组, 并进行了检测比较。结果显示, 改良的 CTAB 法更适合蜡梅基因组 DNA 的提取, 蜡梅叶片的年龄并不影响蜡梅基因组 DNA 的提取; 同时利用 AFLP 分子标记技术, 采用 *MseI*-*EcoR I* 酶切组合, 从 168 对引物中筛选出 10 对带型分布均匀、多态性高且分辨能力强的引物, 分别为: M23E46、M24E46、M25E46、M23E47、M24E47、M41E47、M41E94、M64E94、M64E66 和 M24E75, 并确定了适用于蜡梅 AFLP 反应的最佳酶切连接、预扩和选扩体系, 从而为今后利用 AFLP 分子标记技术研究蜡梅的品种分类和野生居群的遗传多样性分析打下坚实的基础。

关键词: 蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] 品种; DNA 提取; AFLP 反应体系

中图分类号: Q786; S685.99

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)01-0093-05

The Establishment of AFLP Molecule Labeling Technique System of the Wintersweet Cultivars

ZHAO Bing, ZHANG Qi-Xiang

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The methods of CTAB, improved CTAB and SDS were used for genomic DNA isolation of climax leaves and young leaves of Wintersweet cultivars. The results indicated that the methods of CTAB was useful in Wintersweet cultivars genomic DNA isolation, and the leaf age doesn't affect genomic DNA isolation of Wintersweet cultivars. By the amplified fragment length polymorphisms (AFLP) technique, using *MseI*-*EcoR I* enzyme-cut combination, ten pairs of primers (i.e. M23E46, M24E46, M25E46, M23E47, M24E47, M41E47, M41E94, M64E94, M64E66 and M24E75) with high polymorphism and powerful distinctiveness were selected from 168 pairs of primer, and the best pre-expanding and selective expanding system were determined. Our results tentatively established the basis for the research of the cultivar classification and genetic diversity analysis.

Key words: Wintersweet cultivars (*Chimonanthus praecox* (L.) Link); DNA extraction; AFLP reaction system

蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] 指蜡梅科蜡梅属的落叶丛生灌木, 是我国特产的传统名花和特有经济树种, 在我国已有一千多年的栽培历史, 因其花色鲜艳, 花香浓郁, 现已广泛应用于我国的园林绿化中^[1]。AFLP(限制性内切酶片断长度多态性)是荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[2]于 1993 年建立的一种 DNA 多态性的分子标记技术。它结合了 RFLP 和 PCR 的优点, 具有带纹丰富、灵敏度高、稳定性好等优点, 该技术现已被广泛地应用于观赏植物的亲缘关系及遗传多样性研究中, 如梅花 (*Prunus mume*)^[3]、菊花 (*Dendranthema grandiflorum*)^[4]、山茶 (*Camellia japonica*)^[5] 等, 但是有关蜡梅的 AFLP

分析却鲜见报道。因此, 本研究以河南鄢陵的 14 个蜡梅品种为试材, 旨在探讨出适合蜡梅基因组 DNA 提取的方法和建立起蜡梅 AFLP 反应的最佳体系, 从而为下一步的蜡梅品种鉴定及野生居群的遗传多样性分析等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] 14 个供试样品采自河南省鄢陵县园艺场, 每一品种采自 5 个株系, 分别于 2005 年 4 月和 2005 年 10 月取其幼嫩和成熟叶片放于 5 倍于其体积的硅胶中, 干燥后

收稿日期: 2006-05-31, 修回日期: 2006-08-31。

基金项目: 国家十五攻关项目(2004BA525B11)资助。

作者简介: 赵冰(1980-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为园林植物种质资源的调查和核心种质的构建(E-mail: bingbing2003915@163.com)。

室温保存,备用。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备

本实验采用 3 种方法提取蜡梅基因组 DNA, CTAB 法和 SDS 法参照文献[6]和[7]的方法,改良 CTAB 法的具体操作步骤如下:在 2 mL 圆头离心管中加入 1~2 片干燥后的叶片,放入液氮用尖头玻棒迅速研磨成粉末状,加入 700 μL CTAB 缓冲液和 7 μL 的巯基乙醇混匀。65℃水浴 1 h 后置于 4℃冰箱冷却至 15℃以下,然后加入 250 μL 24:1 氯仿/异戊醇,上下混匀,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 300 μL,再次加入 250 μL 24:1 氯仿/异戊醇,上下混匀,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 加入 1.5 mL 离心管中,并加入预冷的异丙醇 200 μL,轻轻上下颠倒混匀。4℃冰箱静置 30 min 以上,沉淀 DNA。13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用无水乙醇洗涤沉淀 2 次,吹干 DNA,让异丙醇和乙醇挥发干净。加入 100 μL dd H₂O(含 1 μL 10 mg/mL 的 RNase)溶解 DNA。37℃水浴 1 h 去除 RNA。再次加入 100 μL 24:1 氯仿/异戊醇以去除未除尽的蛋白和 RNA 酶,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 80 μL 加入 1.5 mL 离心管中,并加入预冷的异丙醇 100 μL,轻轻上下颠倒混匀。4℃冰箱静置 30 min 以上,沉淀 DNA。13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用无水乙醇洗涤沉淀 2 次,吹干 DNA,让异丙醇和乙醇挥发干净。加入 50 μL dd H₂O 溶解 DNA,经检测后将其放入 -20℃ 储存或放入 4℃ 待用。

1.2.2 DNA 浓度与质量测定

用 Bio-RAD SmartspecMT3000 紫外分光光度仪测定样品的 OD 值,以 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 主带质量:5 μL DNA 样品 + 1 μL 溴酚兰上样缓冲液,加样于含溴化乙锭(EB)的凝胶上,在 80 V 恒压下电泳 30~40 min,在紫外凝胶成像系统下观察摄像。

1.2.3 酶切连接

本实验采用 *MseI* 和 *EcoR I* 两种限制性内切酶进行双酶切,然后用 *T₄* DNA 连接酶,将 *MseI* 和 *EcoR I* 接头与酶切片断连接起来,酶切连接一步完成,在 PCR 仪上 37℃ 反应 3 h。构建成预扩增模板 DNA,该模板 DNA 可用于扩增反应,该实验采用 4

种酶切连接体系,每个酶切连接反应体系为 50 μL。酶切连接体系见表 1。

表 1 酶切连接体系
Table 1 Systems of restriction-ligase reaction (μL)

试剂 Reagent	体系 1 System 1	体系 2 System 2	体系 3 System 3	体系 4 System 4
	System 1	System 2	System 3	System 4
基因组模板 DNA(100~500 ng)	5	5	5	5
<i>EcoR I</i> (10 U/μL)	0.5	0.25 U	0.5 U	0.25 U
<i>MseI</i> (10 U/μL)	0.5	0.25 U	0.5 U	0.25 U
<i>EcoR I</i> adaptor(5 pmol/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>MseI</i> adaptor(50 pmol/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
ATP(10 mmol/L)	1.0	1.0	1.0	1.0
10 × NEB buffer 2 缓冲液	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>T₄</i> DNA 连接酶(1 U)	1.0	1.0	0.5	0.5
BSA(10 mg/mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
补足 dd H ₂ O 到总体积为 50 μL				

1.2.4 预扩增

由于 Mg²⁺能与 dNTP 结合而影响 PCR 反应液中游离的 Mg²⁺浓度,因而 MgCl₂ 的浓度在不同的反应体系中应适当调整,优化浓度。一般反应中 Mg²⁺浓度至少应比 dNTP 总浓度高 0.5~1.0 mmol/L。为了探讨蜡梅的最佳预扩增体系,本实验的预扩增体系(每个预扩增反应体系为 20 μL)有 4 种方案(见表 2)。预扩增 PCR 反应程序为:94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 60 s,共 24 个循环。

表 2 预扩增体系方案
Table 2 Systems of preamplification (μL)

试剂 Reagent	体系 1 System 1	体系 2 System 2	体系 3 System 3	体系 4 System 4
	System 1	System 2	System 3	System 4
酶切连接后模板	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Eco-primer</i> (50 ng/μL)	0.6	0.6	0.6	0.6
<i>Mse-primer</i> (50 ng/μL)	0.6	0.6	0.6	0.6
dNTPs(10 mmol/L)	0.4	0.4	0.4	0.4
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.0	1.1	1.2	1.3
10 × PCR buffer	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>Taq</i> -polymerase(5U)	0.2	0.2	0.2	0.2
补足 dd H ₂ O 到总体积为 20 μL				

1.2.5 选择性扩增

本实验的选择性扩增体系(每个扩增反应体系为 20 μL)也采用 4 种方案(见表 3)。选择性扩增 PCR 反应程序为:90℃ 30 s、65~56℃ 30 s,每个循环降低 0.7℃;72℃ 60 s,共 12 个循环。然后 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 60 s,共 24 个循环。

表 3 选扩体系方案

试剂 Reagent	Systems of selective amplification (μL)			
	体系 1 System 1	体系 2 System 2	体系 3 System 3	体系 4 System 4
预扩 10 倍稀释后模板	5.0	5.0	5.0	5.0
Mse-primer (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Eco-primer (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
dNTPs (10 mmol/L)	0.4	0.4	0.4	0.4
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.0	1.1	1.2	1.3
10 × PCR buffer	2.0	2.0	2.0	2.0
Taq-polymerase (5U)	0.2	0.2	0.2	0.2
补足 dd H ₂ O 到总体积为 20 μL				

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测

反应结束后在 20 μL 反应体系中加入 5 μL 加样缓冲液, 95℃ 8 min 后迅速将 PCR 管放到冰上进行变性, 然后置于 -20℃ 冰箱用于电泳检测。本实

验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测。银染后的板晾干后在 X 线胶片观察灯下观察, 选择那些具有清晰、电泳带易计数的引物作为 AFLP 反应的最佳引物。

2 结果与分析

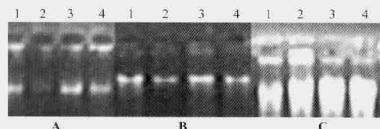
2.1 基因组 DNA 提取结果与检测

本实验采用 3 种方法均能提取蜡梅基因组 DNA, 但是采用改良的 CTAB 法提取的蜡梅基因组 DNA, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 左右(见表 4), 表明蛋白质等杂质去除较干净, DNA 纯度较高; 用 1% 琼脂糖凝胶检测, 提取的 DNA 不含 RNA, 无降解, 点样孔干净, 纯度符合 AFLP 要求(见图 1)。SDS 法和 CTAB 法所获得的 DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 偏低(见

表 4 不同提取方法所得 DNA 的检测结果
Table 4 The detective result of wintersweet cultivars leaves by different isolation methods

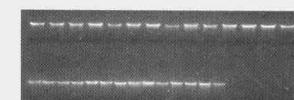
方法 Methods	品种号 No. of cultivars	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 含量 DNA content	Pro 含量 Pro content
改良 CTAB 法 Improved CTAB	1	0.078	0.044	1.7555	3.068	9.8893
	2	0.031	0.074	1.7732	5.5691	15.422
	3	0.044	0.026	1.7333	1.8720	6.1356
	4	0.056	0.031	1.7782	2.3796	6.4426
CTAB 法 Method of CTAB	1	0.054	0.034	1.5771	2.1523	12.182
	2	0.099	0.061	1.6273	4.0418	19.473
	3	0.068	0.043	1.5646	2.7123	15.954
	4	0.072	0.042	1.7072	3.0064	10.912
SDS 法 Method of SDS	1	0.065	0.041	1.6024	2.6258	13.718
	2	0.063	0.044	1.4171	2.3481	21.158
	3	0.073	0.044	1.6575	3.0161	13.116
	4	0.123	0.077	1.6051	4.9799	25.793

表 4), DNA 样品受蛋白污染较严重, 电泳结果点样孔发亮, 而且简易 CTAB 法提取的 DNA 有稍微的降解(见图 1)。实验证明改良的 CTAB 法最适合蜡梅基因组的提取。采用改良的 CTAB 法对 14 个品种的成熟叶和嫩叶进行 DNA 的提取, 琼脂糖凝胶结果表明, 二者所提取的 DNA 并没有明显的区别(见图 2)。



A: SDS 法; B: 改良 CTAB 法; C: CTAB 法
A: SDS methods; B: Improved CTAB methods; C: CTAB methods

图 1 不同提取方法提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 1 DNA electropherograms of different isolation methods



top: The DNA of climax leaves; bottom: The DNA of young leaves

图 2 不同年齡叶片提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 DNA electropherograms of different age leaves

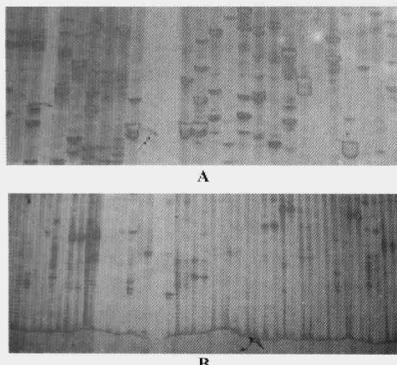
2.2 蜡梅 AFLP 最佳反应体系的建立

酶切连接是否完全直接影响到实验结果的正确性。非完全酶切, 必然造成相应的指纹片断的缺失, 得出不完整的片断信息而失真, 同时也会使大片段增多不便于数带(见图 3:A)。酶切时间也不能过长, 否则会出现 DNA 部分降解, 造成小片段过多, 如图 3:B。对 4 种酶切反应体系的酶切连接产物进行预扩后进行凝胶电泳检测可知, 体系 1 的效果较好,

其在凝胶上呈现均匀的弥散状。

预扩增这一步扩增所用引物不带选择性碱基,通过扩增达到富集DNA的目的,同时通过对预扩增产物的检测,了解酶切和连接的效果,如果前几步反应完全,则预扩增后DNA片段多,在胶上可以看到较长而均匀的宽带,相反若扩增片断少,且集中分布于较小的bp值范围内,则说明双酶切不完全。这样的预扩增产物是不适合进行下一步反应的。对4种

腊梅预扩增反应体系的预扩产物进行凝胶电泳检测发现:体系3的效果较好(见图4)。



A:酶切不完全; B:酶切时间过长
A:Incomplete restriction-ligase; B:Too long restriction-ligase time

图3 不同酶切时间的指纹片断结果
Fig. 3 The fingerprint snippet results of different restriction-ligase time

Fig. 4 Electropherograms of preamplification product

选择性扩增这一步反应与预扩增一样,所不同的是选用的引物带有1~3个选择性碱基,该步的影响因子均与一般的PCR反应相同,其中Mg²⁺的浓度和Taq酶的质量和浓度是最主要的影响因子,本实验对最适于腊梅扩增的Mg²⁺的浓度进行了摸索,发现Mg²⁺的浓度为1.2 mg/mL时扩增效果较好。

2.3 AFLP 引物筛选分析

AFLP技术与RAPD一样,用的是通用型引物,但不是所有的引物组合都能很好的扩增并且多态性高,不同的引物组合对扩增条带有着明显的影响。所以,具体到某一材料,应根据其基因组的具体情况筛选引物组合。

由于缺乏有关腊梅的基因组信息的资料以及相关的腊梅AFLP文献报道,所以选用了如下引物筛选策略:“2+2”、“2+3”、“3+2”和“3+3”的引物组合都选择若干对(见表5),选择2个样品‘黄卷素

表5 引物筛选
Table 5 Table 5 Primer pair selection

Eadaptor	Madaptor																	
	11	12	13	14	15	23	24	25	26	36	41	46	47	57	62	63	64	68
11	+									+	+							
12	+	+								+	+							
13	+	+								+	+							
14	+	+	+	+	+													
38	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43																		
46	+	+				++*	++*	++*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+				++*	++*	++*	+	+	+	++*	+	+	+	+	+	+
62	+	+	+	+	+													
64	+	+	+	+	+													
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
67	+	+	+	+	+													
70	+	+	+	+	+													
75	+	+	+	+	+	+	+	++*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++*	+	+	++*	+	+	+

注:带‘+’的表示本实验进行筛选的168个引物组合;带‘++*’的表示所筛选出的10对扩增较整齐、多态性高的引物组合。

Notes: Marker ‘+’ means 168 filtered primer combination; Marker ‘++*’ means 10 primer combination with orderly amplification, high polymorphism.

心'和'黄卷紫心'为试材筛选引物,共筛选引物组合 168 对以确定合适的引物。从 168 对 AFLP 引物中筛选出了 10 对多态性较高、带型质量较好、分辨率较高的引物。其引物序号分别为:M23E46、M24E46、M25E46、M23E47、M24E47、M41E47、M41E94、M64E94、M64E66 和 M24E75,10 对引物的扩增结果见表 6。由表 6 可以看出,选出的 10 对引物的多态位点比例均在 50% 以上。由引物筛选结果可知,"2+2"的引物组合条带较少,多态性不丰富,"3+3"和"3+2"的引物组合产生的条带较多,不利于统计;而"2+3"的引物组合产生的条带粗细适中,多态性强分辨率高,且条带分布均匀。因此本实验主要选取具有 2 个选择性核苷酸与 3 个选择性核苷酸的引物组合。由引物筛选实验还可以知道,预扩产物稀释的倍数(本实验设置了 0 倍、5 倍、10 倍、20 倍共 4 个稀释梯度)对选择性扩增没有大的影响。

表 6 引物序列和扩增结果

Table 6 Sequences and amplification results of twenty primers

引物序号 Primer code	选择碱基 Selective nucl.	扩增位点 Amplification locus	多态性位点 Polymorphism locus	多态性位点比例(%) Polymorphism locus proportion
M64E66	GAC-GAT	38	21	55.3
M24E46	TC-CAA	44	27	61.3
M24E75	TC-GTA	52	31	59.6
M41E94	AGG-TTT	34	21	61.7
M64E94	GAC-GAT	47	28	59.5
M23E46	TA-ATT	40	22	55.0
M23E47	TA-CAA	32	20	63.6
M25E46	TG-ATT	41	24	59.1
M25E47	TG-CAA	39	23	57.8
M41E47	AGG-CAA	56	31	54.9

3 讨论

AFLP 技术结合了 RFLP 和 RAPD 技术的优点,它即有 RFLP 的高度稳定性,又具有 RAPD 的多态性高的特点,本实验中这两个特点得到了充分验证。但 AFLP 操作过程繁琐,所用药品和仪器较多,每一步反应都密切相关。其中 DNA 的提取这一步是整个实验的关键所在。蜡梅叶片含糖成分比起紫薇、

芍药等植物相对较少,这在某种程度上降低了蜡梅叶片 DNA 的提取难度。但由于北京现在还没有蜡梅品种资源圃,因此从外地采样再带回北京的叶片其 DNA 提取的质量则稍差于新鲜叶片提取出的 DNA,因此采用何种方法提取 DNA 从而把这种差别降到最小,是蜡梅 DNA 提取的关键。本实验在提取 DNA 的过程中,采用两次抽提来充分去除直接影响扩增中 *Taq* 酶活性的氯仿、异戊醇等物质。同时在去除 RNA 后,又增加一次抽提过程,以去除残存的 RNA 酶蛋白,保证 DNA 的高纯度。

多态性和稳定性好的引物是进行全部基因组扩增的成败关键,尤其是种内的扩增,因为种内的个体除自然变异外,其基因型没有太大的差异,所以没有多态性强、稳定性好的引物很难区别个体内的差异,故需要在大量的引物中筛选才能得到理想的结果。本实验采用了 168 对引物作为初选引物,筛选出了 10 对适合蜡梅基因组扩增的引物,同时又摸索出了适宜蜡梅基因组扩增的最佳酶切、预扩和选扩体系,所有这些工作都为今后进行蜡梅品种的分子鉴定和蜡梅野生居群的遗传多样性分析提供了很有益的资料。

参考文献:

- [1] 张若惠,刘洪涛.世界蜡梅[M].北京:中国科学技术出版社,1998.
- [2] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting[P]. European Patent Application 94102629.7 (Publication No.05348A1) Paris: European Patent Omce, 1993.
- [3] 明军.梅花 DNA 指纹图谱的建立与研究[D].北京:北京林业大学图书馆,2002.
- [4] 周春玲,戴思兰.菊属部分植物的 AFLP 分析[J].北京林业大学学报,2002,24(5):71-76.
- [5] 唐绍清,杜林方,王燕.山茶属金花茶组金花茶系的 AFLP 分析[J].武汉植物学研究,2004,22(1):44-48.
- [6] Pich C. Schubert method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics [J]. Nucleic Research, 1993, 21(14):3328-3332.
- [7] Tai T H, Tanksey D D. Rapid isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Mol Biol, 1990, 8(4):229-303.