

• 遗传快报 •

AFLP 分析中多态性扩增产物的回收、克隆及鉴定^①

李传友^② 伏健民 金德敏 翁曼丽 王斌^③

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 本研究在摸索和优化了水稻 AFLP 分析体系的基础上, 发展了多态性 AFLP 产物的高效克隆方法。特异 AFLP 扩增产物直接从变性聚丙烯酰胺凝胶上分离纯化, 再经过一至二轮 PCR 扩增, 即可高效地克隆于 pGEM[®]-T easy vector 系统中。本实验利用该方法成功地克隆了水稻温敏核不育等位突变系 5460S 和 5460F 间的 4 个多态性 AFLP 产物, Southern blotting 分析证明其中 3 个产物在水稻基因组中为单拷贝序列, 另一个为低拷贝序列。AFLP 技术强有力的多态性检出能力再结合多态性扩增产物的高效克隆方法, 为寻找与目标基因紧密连锁的分子标记提供了有力工具。

关键词 水稻, AFLP, 分子标记

中图分类号 Q943

Recovery, Cloning and Identification of Polymorphic AFLP Products

LI Chuanyou FU Jianmin JIN Demin WENG Manli WANG Bin

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstracts An efficient method for cloning DNA fragment from denaturing polyacrylamide gels was developed to allow the isolation of specific bands obtained from amplified fragment length polymorphism (AFLP) products. After isolation and purification from the thin denaturing polyacrylamide gels, specific AFLP products were successfully cloned after one or two rounds of PCR reamplification. Using this method 4 polymorphic AFLP products between a pair of rice allelic lines differing for thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) gene were cloned and it was confirmed that 3 of the AFLP products represented single copy sequences and the other 1 represented low copy sequence in rice genome.

Key words Rice, Amplified fragment length polymorphism(AFLP), Molecular marker

DNA 指纹技术(DNA fingerprinting technique)在遗传连锁图的绘制及鉴定与目标基因连锁的分子标记中起着重要的作用。从原理上目前已发展起来的 DNA 指纹技术主要分为两类: 即传统的以 Southern 杂交为基础的 RFLP 技术和以聚合酶链式反应(PCR)为基础的一系列分子标记技术, 其中以 RAPD 技术为代表, 在应用过程中 RFLP 和 RAPD 技术表现出各自的优缺点。RFLP 技术结果稳定, 重复性好, 但其多态性检出率很低; RAPD 技术简便易行, 多态性检出率高, 但对实验条件很敏感, 实验结果的重复性和可靠性较差。AFLP 是新近发展起来的一项 DNA 指纹技术^(1,2), 它从原理上结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择性地扩增而揭示多态性。在 AFLP 反应中, 酶切后的 DNA 片段被连上通用的接头(Adapter)顺序作为 PCR

① 本研究是 863 高技术项目(BH-01-02-02-02)研究内容的一部分。

② 李传友, 男, 28 岁, 博士研究生, 专业方向为植物分子生物学。

③ 通讯联系人。

扩增的模板, 这样接头顺序及其临近的内切酶识别位点就成为扩增反应中引物的结合位点。选择性扩增的引物是在接头顺序和内切酶识别位点的基础上加上一定数目(1~3个)的选择性碱基, 只有那些与引物的选择性碱基严格配对的 DNA 片段才能被扩增出来。扩增产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳而显示多态性^(3,4)。AFLP 技术自 1995 年公开发表以来, 以其稳定性和强有力的多态检出率而受到分子生物学家们的关注, 迅速得到了广泛应用, 本实验室在国内率先开展了这方面的研究^(4,5)。

作为新一代的 DNA 指纹技术, AFLP 能够检测 DNA 样品间的细微差别而显示多态性, 这些多态性 AFLP 产物经分离和克隆后, 能够在辅助育种和更深入的遗传学研究中发挥更大的作用。本研究在摸索和优化了水稻 AFLP 分析体系的基础上, 发展了水稻 AFLP 产物中多态性 DNA 片段的回收、再扩增和克隆的方法。这套方法用于玉米、小麦及苹果 AFLP 产物的回收及克隆同样也是行之有效的。

1 材 料 和 方 法

1.1 植物材料

所用实验材料为水稻光敏核不育基因的一对等位突变系 58S 和 58F 及水稻温敏核不育基因的一对等位突变系 5460S 和 5460F。

1.2 方法

DNA 的提取 按照 McCouch⁽⁶⁾ 等方法进行。

AFLP 分析 基本按照 Vos^(2,3) 等发表的方法进行。选择性扩增产物走 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

AFLP 多态性片段的回收及克隆 电泳结束后, 凝胶与 X-光片精确定位, 作好标记并根据信号强度不同分别压片曝光 3~4 天。曝光后, 把 X-光片与凝胶重新定位, 用锋利的刀片切下含有多态性 AFLP 扩增产物的凝胶。回收的凝胶溶于 400 μ l 高盐溶液(20% ethanol, 1 mol/L LiCl 和 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中, 室温放置 24 小时, 65 $^{\circ}$ C 温育 2 小时, 无水乙醇沉淀 DNA 并溶于 20 μ l TE。取 5 μ l 回收的 DNA 为模板, 用与选择性扩增时相同的引物按下列程序 94 $^{\circ}$ C 30", 56 $^{\circ}$ C 30", 72 $^{\circ}$ C 60" 扩增 40 个循环。

重新扩增后的 AFLP 多态性 DNA 片段用 Gene clean 回收, 并按厂家的说明克隆于 pGEM[®]-T easy vector (Promega Corp. Cat. No. A1360)中。

Southern 杂交分析 以克隆到的 AFLP 产物为探针进行 Southern 杂交, 检查所克隆到的 DNA 片段是否来自水稻基因组并初步鉴定其拷贝数和利用价值。

2 结 果 与 分 析

2.1 水稻光敏及温敏核不育等位突变系的 AFLP 分析

在用识别序列为 6 碱基的内切酶 *Eco*RI 和识别序列为 4 碱基的内切酶 *Mse*I 酶切基因组 DNA, 选择性扩增中引物 3'末端都带有 3 个选择性碱基的条件下, 水稻 AFLP 扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可显示 25~50 条清晰的条带。实验中采用 4 个 *Eco*RI 引物和 8 个 *Mse*I 引物(共 32 个引物组合)进行了 AFLP 分析, 大约观察到了 1 000 个 AFLP 位点。多数引物组合没有能够在 5460 S 和 5460 F 间检测出多态性, 但在 *Eco*RI+ACA/*Mse*I+CAT 这一引物组合中, 我们观察到了 4 条多态性 DNA 片段, 其中 1 条为 5460 S 的扩增产物所特有, 命名为 AF1; 另外 3 条为 5460 F 的扩增产物所特有, 命名为 AF2, AF3 和 AF4 (图 1)。

理论上讲, 等位突变系的基因组间除目标基因所在座位的局部区域外, 其余绝大部分是相同的。因此, 在等位突变系间表现多态性的分子标记就极有可能与目标基因连锁。AFLP 技术能够检测出 DNA 样品间的细微差别, 它与等位突变系相结合是寻找与目标基因紧密连锁的分子标记的有效手段。我们所检测到的等位突变系 5460 S 和 5460 F 间的多态性 AFLP 产物极有可能转变成为与温敏核不育基因连锁的分子标记。

2.2 多态性 AFLP 产物的回收及重新扩增

用锐利的玻璃刀片切下含有多态性 DNA 片段的聚丙烯酰胺凝胶并分离纯化其中的 DNA。但由此得到的 DNA 量甚微,而且可能含有非特异的片段,难以直接用于克隆。因此,我们以回收到的 DNA 为模板,按 AFLP 分析中选择性扩增的引物及 PCR 条件重新扩增这些多态性 DNA 片段。如图 3(A)所示,AF1、AF3 和 AF4 的扩增结果很理想,扩增产物为一条与模板大小一致的单一带,而 AF2 却扩增出分子量大小不同的两条带,这极有可能是在从聚丙烯酰胺胶上回收 DNA 时污染了非目的条带造成的。根据图 1 中 AF1、AF2、AF3、AF4 的相对分子量大小,不难判断重新扩增产物中高分子量的带为目的条带,回收该条带并再次扩增,图 3(B)显示了第二轮扩增的结果。



图 1 用引物组合 E-ACA/M-CAT 扩增的水稻光敏及温敏核不育等位突变系的 AFLP 图谱
箭头示差异条带; A. 农垦 58S; B. 农垦 58F;
C. 5460S; D. 5460F。



图 2 克隆 AFLP 产物的拷贝数测定
水稻基因组 DNA (A. 5460 S, B. 5460 F) 经 *EcoRI* 酶切、Southern 转移,然后分别用不同的 AFLP 产物为探针进行杂交。1. AF1; 2. AF2; 3. AF3; 4. AF4; M. DNA 分子量标准 II (λ DNA/*Hind*III)。

2.3 多态性 DNA 片段的克隆及 Southern 杂交分析

重新扩增后的多态性 DNA 片段用 Gene clean 回收,并按厂家的说明克隆于 pGEM[®]-T easy vector (Promega Corp. Cat. No. A1360) 中,图 4 为插入片段的酶切验证结果。这样我们就成功地克隆了用 AFLP 分析检测到的等位突变系 5460S 和 5460F 之间的 4 条多态性 DNA 片段。这些多态性 DNA 片段极有可能成为与温敏核不育(TGMS)基因连锁的分子标记。为了证实克隆到的 DNA 片段确实来自水稻基因组并检测其拷贝数和利用价值,以克隆的插入片段为探针针对 *EcoRI* 酶解后的 5460S 和 5460F 的基因组 DNA 做 Southern 杂交(图 2),结果表明,4 个克隆片段确实来自水稻基因组 DNA,而且 AF1、AF3、AF4 为单拷贝序列,AF2 为低拷贝序列。

3 讨 论

作为一种新的 DNA 指纹技术,不仅应具有强有力的多态性检测能力,而且它所揭示的多态性 DNA 产物应能够被高效地克隆,以获得有用的分子标记用于辅助育种、常规 PCR 诊断和更深入的遗传学研究。AFLP 技术在检测多态性的能力方面已得到认可,但多态性 AFLP 产物的回收及克隆方法却少见报道。按照本文介绍的方法,特定 AFLP 条带可以有效地从聚丙烯酰胺凝胶上回收,再经一至两轮扩增,即可成功克隆。本实验成功地克隆了温敏核不育等位突变系 5460S 和 5460F 间的 4 个多态性 AFLP 标记,随后的 Southern 杂交分析表明其中 3 个在水稻基因组中为单拷贝序列,另一个为低拷贝序列,目前正在深入研究这些 AFLP 标记与温敏核不育基因的连锁关系及遗传距离,推测这些 AFLP 标记将会在水稻温敏不育系的辅助选择及温敏不育基因的定位克隆中发挥

重要作用。本文所介绍的 AFLP 扩增产物的回收、重新扩增及克隆方法应用于小麦、玉米、苹果等植物 AFLP 分析中也同样是行之有效的。AFLP 技术强有力的多态性检测能力再结合高效的多态性产物的克隆方法,为分子生物学家寻找与目标基因紧密连锁的分子标记提供了不可多得的工具。

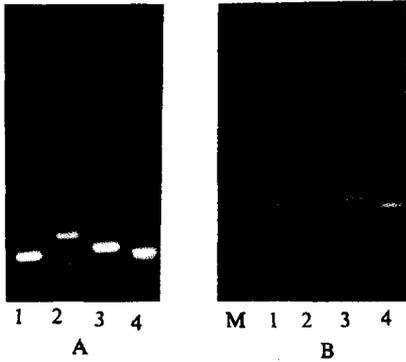


图3 4个多态性 AFLP 产物的重新扩增图谱
A. 第一轮扩增; B. 第二轮扩增; M. DNA 分子量标准II (λ DNA/*Hind*III)。



图4 AFLP 产物克隆的 *Eco*RI 酶切图谱
用 T-easy vector 系统克隆 5460S 和 5460F 间的 4 个多态性 AFLP 产物, M. DNA 分子量标准II (λ DNA/*Hind*III)。

参 考 文 献

- 1 Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 94202629.7 (publication No. 05348A1). Paris: European Patent Office, 1993
- 2 Vos P, Hogers R, Blecker M *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 1995, 23(21):4407~4414
- 3 王 斌, 翁曼丽, 谢纬武, 伏健民. AFLP 的原理及其应用. 杂交水稻, 1996, 5: 27~30
- 4 翁曼丽, 谢纬武, 伏健民, 王 斌. 新一代的分子标记技术——AFLP. 应用与环境生物学报, 1996, 2(4): 424~429
- 5 王 斌, 郑洪刚, 翁曼丽等. AFLP 标记在水稻多态性研究中的应用. 中美农业科技与发展研讨会论文集. 北京: 中国农业出版社, 1996, 46~48
- 6 McCouch S R, Kochert G, Yu Z H *et al.* Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet., 1988, 76: 815~829

1997-11-13 收稿, 1998-01-05 修回。

基因聚合提高了水稻对白叶枯病的抗性^①

郑康乐^② 庄杰云

王 汉 荣

(中国水稻研究所, 杭州 310006)

(浙江省农业科学院, 杭州 310021)

摘 要 研究了含有单个抗性基因的水稻近等基因系和抗性基因聚合品系对浙江省白叶枯病菌 4 个主要小种的抗性, 单个基因对这些小种的抗性均不高, 对新近流行的小种大多感病; 基因聚合品系对这些小种的抗性普遍提高, 说明基因聚合是培育具有持久抗性品种的有效策略。

关键词 水稻, 白叶枯病, 近等基因系, 基因聚合, 持久抗性

中图分类号 Q943

^①亚洲水稻生物技术协作网 (Asia Rice Biotechnology Network) 资助项目。

^②郑康乐, 男, 53岁, 研究员, 专业方向为生物技术。