

龙眼 AFLP 银染体系的建立与优化

李冬波, 朱建华, 李鸿莉, 黄凤珠, 李江舟, 潘丽梅

(1. 广西农业科学院园艺研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西大学农学院, 广西南宁 530004)

摘要 [目的] 优化龙眼 AFLP 银染体系中的影响因素。[方法] 以 23 份龙眼品种和 2 份龙眼近缘植物龙荔为试材, 通过对扩增片段长度多态性 (AFLP) 反应体系中的几个影响因素 (DNA 提取、酶切与连接、电泳与银染) 进行研究, 建立起龙眼 AFLP 银染分析体系。[结果] 用紫外分光光度计检测样品 DNA 质量和浓度, 发现提取的 DNA 吸光度 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 左右, A_{260}/A_{230} 的比值大于 2.0, 说明所提取的 DNA 样品纯度较高, 无蛋白质或盐类的污染。酶切与连接中采用 37℃ 水浴 5 h, 然后转入 65℃ 水浴 2 h 的方法能保证酶切充分, 又能防止酶切过度。电泳和银染时用 4℃ 预冷的显影液进行显影, 可以降低显影速度。[结论] 采用该技术体系得到的 AFLP 指纹式样清晰, 重复性强, 适宜用作龙眼品种鉴别和遗传多样性分析。

关键词 AFLP; 龙眼; 银染

中图分类号 Q949.755.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00893-02

Establishment and Optimization of Suitable Silver-stained AFLP Reaction System in Longan

LI Dong-bo et al. (Horticulture Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract [Objective] The research aimed to optimize some factors affecting silver-stained AFLP reaction system of longan. [Method] With 23 longan cultivars and 2 longi genetic-related with the longan plant as the tested materials, the amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis system was established through studying some factors affecting the AFLP analysis systems such as quality of DNA extraction, the restriction enzyme digestion-ligation system, gel electrophoresis and silver-staining. [Result] When the DNA quality and concentration in samples were determined by ultraviolet spectrophotometer, it was found that the ratio of DNA absorbency at A_{260}/A_{280} nm was about 1.8 and that at A_{260}/A_{230} nm was over 2, showing that the purity of the extracted DNA sample was higher without protein or salts pollution. In the restriction enzyme digestion-ligation system, using water bath first at 37℃ for 5h then at 65℃ for 2h could not only make full restriction enzyme digestion and but also control excess restriction enzyme digestion. During gel electrophoresis and silver-staining, using the developer precooled at 4℃ for development could reduced the developing rate. [Conclusion] Using this AFLP reaction system could get a repeatable AFLP fingerprints with high definition, so it is suitable for cultivar identification and genetic diversity analysis in longan.

Key words AFLP; Longan; Silver-staining

龙眼属无患子科 (Sapindaceae) 龙眼亚种 (*D. longan* ssp. *Longan*) 龙眼属 (*Dioscarpus* Lour.), 当今国内外栽培的龙眼品种都属于该亚种中的龙眼变种 (*var. longan*)^[1]。关于龙眼的栽培起源、种质资源、栽培生理等方面已有了较深入的研究^[2-4], 但对不同品种之间的亲缘关系研究较少, 这方面研究不仅能为品种起源和系统进化提供依据, 而且能为龙眼优良新品种选育工作提供理论依据^[5-7]。AFLP 即扩增片段长度多态性, 是基于 RFLP 和 PCR 相结合的 DNA 分析技术。与其他技术相比, AFLP 具有稳定性好、多态性丰富且无需预知基因组序列信息等优点, 已被广泛应用于分子生物学研究^[8]。但 AFLP 技术和设备要求较高, 几乎全使用同位素标记和荧光标记的试剂盒, 价格昂贵, 不易推广^[9-10]。笔者介绍的 AFLP 法以较为敏感的银染法代替同位素和荧光标记法, 具无放射性、成本适中、重复性好、灵敏度高等优点, 适于龙眼的分子标记研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验材料取自广西农科院科技示范园龙眼种质资源圃, 其中包括 14 份原产于广西的龙眼品种 (单株), 2 个原产于广东和 3 个原产于福建的龙眼品种, 3 个泰国龙眼品种、1 个热带生态型龙眼单株和 2 个龙荔属单株。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的制备。 DNA 提取参见文献 [11]。

1.2.2 AFLP 流程。 DNA 的酶切与连接。取总 DNA 250

ng, 加入 3 U EcoRI 和 3 U MseI (MBI Fermentas) 限制性内切酶 (反应体积为 20 μ l, 2 \times TangoTM Buffer), 先在 37℃ 水浴 5 h, 然后转入 65℃ 水浴 2 h, 完全酶切后加入 20 μ l 连接混合液 [5 pmol EcoRI, 50 pmol MseI 接头, 1 U T4 DNA 连接酶, 2X Ligation Buffer], 将混合液置于 22℃ 连接过夜。连接后 70℃ 灭活 10 min, 再用 ddH₂O 将其稀释 10 倍作为 PCR 扩增的底物。连接产物的预扩增。AFLP 接头和引物设计均按 Vos 等 (1995) 报道的方法进行, 由上海生工合成。预扩增引物 EA 为: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'; MC 为: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'。预扩增在 20 μ l PCR 反应体系中, 含有 30 ng EA 引物, 30 ng MC 引物, 4 μ l 酶切连接产物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq 酶 TaKaRa LA Taq, 宝生物工程有限公司, 下同, 1 \times PCR 缓冲液。20 个 PCR 反应体循环参数为: 94 (30 s) - 56 (30 s) - 72 (1 min)。产物稀释 30 倍, 作为下一步 PCR 扩增的模板。选择性扩增。在 20 μ l PCR 反应体系中含有 4 μ l 预扩增产物, 30 ng E+3 (带 3 个选择性碱基) 引物, 30 ng M+3 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq 酶, 1 \times PCR 缓冲液。第一个循环参数为 94 (30 s) - 65 (30 s) - 72 (1 min), 此后每个循环复性温度下降 0.7℃, 共计 13 个循环, 然后 94 (30 s) - 56 (30 s) - 72 (1 min) 运行 23 个循环。

1.2.3 扩增产物的电泳检测。 PAGE 胶制备。按照上的方法制备。电泳分离。将胶板擦净并固定于电泳槽上, 加入 1 \times TBE 缓冲液, 50 W 预电泳 30 min, 使胶板温度上升到 50℃ 左右再进行电泳。在选择性扩增产物中加入等体积的上样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.005% 二甲苯青 FF, 0.005% 溴酚蓝), 95℃ 变性 3 min 后立即冰浴冷却, 上样 5 μ l, 50 W 恒压电泳, 当二甲苯青 FF 跑过 2/3 胶

基金项目 广西科学基金项目 (桂科自 0728070, 桂科自 0339023 和广西农科院科技发展基金 2005001Z)。

作者简介 李冬波 (1979-), 男, 湖北宜城人, 硕士, 究研实习员, 从事果树种质资源和栽培技术研究。

收稿日期 2007-11-29

板时终止电泳。染色。电泳完后取下胶板,把粘附有凝胶的玻璃板浸入1.5 L 固定液中(10 % 冰乙酸),轻轻摇动至指示剂消失为止,然后用去离子水漂洗短胶板2 次,每次3 min。洗毕,转至1.5 L 染色液中(0.1 % AgNO_3 , 0.056 % HCHO) 中轻轻摇动染色30 min。取出胶板,在去离子水中迅速漂洗5 ~10 s,马上转入到1.5 L 预冷(4 ℃) 的显影液中,轻轻摇动至条带清晰可见后倒入终止液(10 % 冰乙酸) 停止显影,然后用蒸馏水漂洗5 min,室温下自然晾干,用扫描仪扫描保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 的质量检测 经检测发现提取的DNA 吸光度 A_{260}/A_{280} 在1.8 左右, A_{260}/A_{230} 大于2.0,表明所提取的DNA 样品纯度较高,无蛋白质或盐类的污染。再用1% 琼脂糖凝胶电泳检测DNA 的完整性,由图1 可见,提取的DNA 长度都在21 Kb 以上(Marker 为 DNA/ Hnd + EcoR Marker,最大片段长度为21 227 bp),DNA 完整度较好,没有降解,适宜用作 AFLP 分析。

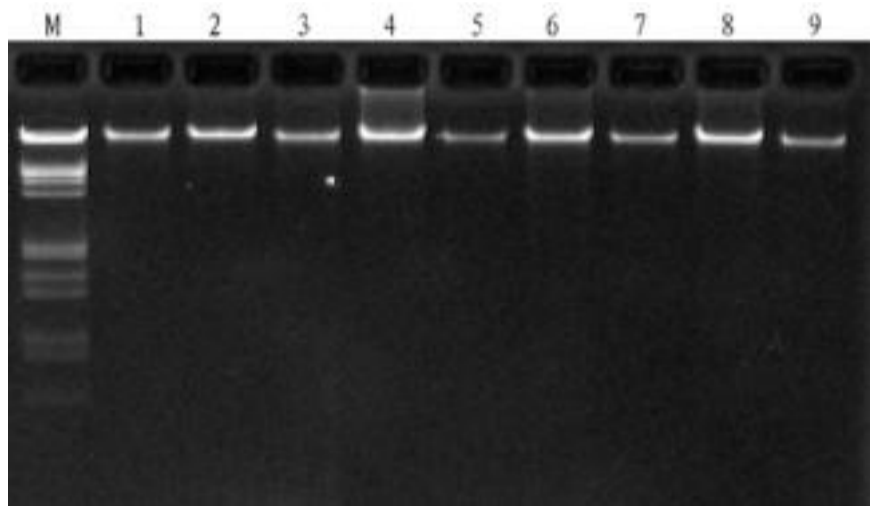


图1 部分DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 The results of agarose electrophoresis for DNA

2.2 AFLP 反应流程

2.2.1 DNA 的酶切与连接。酶切质量是决定 AFLP 成功与否的关键,该试验所用的 MBI Fermentas 公司产的内切酶 EcoRI 要求在 $2 \times \text{Tango}^{\text{TM}}$ Buffer 条件下酶切才没有星活性,反应适宜温度为37 ℃,而 MseI 需在65 ℃ 条件下酶切,因此酶切与连接采用两步法进行。先采用37 ℃ 水浴5 h,然后转入65 ℃ 水浴2 h,这样即能够保证酶切充分,又能防止酶切过度。结果表明,该方法重复性好,两次处理的结果一致(图2)。连接反应对时间要求不高,一般采用22 ℃ 连接过夜。

2.2.2 预扩增和选择性扩增。因为 AFLP 反应要经过两次 PCR 扩增,产物会成指数性倍数增加,所以确定合适的稀释倍数是进行预扩增和选择性扩增的关键。如果稀释倍数太小,模板DNA 浓度就会过大,电泳条带粗,影响分辨率,且容易出现假阳性;但如果稀释倍数过大,模板DNA 浓度就会太低,电泳谱带太弱,影响统计分析。预扩增是在连接后进行,一般稀释10 倍左右即可;而选择性扩增由于经过预扩增,产物呈指数性倍数增加,所以稀释30 倍左右进行比较适宜。

2.3 电泳和银染 电泳和染色是获得高质量图片的关键。AFLP 反应的电泳需要时间长,电泳时要求各个样品间的指示剂溴酚蓝和二甲苯青都分别在同一水平线上。电泳时若胶板温度不均匀,泳道间常会发生弯曲等现象,影响以后的观察。为了使样品电泳时在胶板上保持均匀,可以在上样前采用预电泳的方法使胶板达到恒定的温度,再进行电泳分析。

显影是银染的关键,通常采用10 ℃ 预冷的显影液,此时显影速度快且背景浅,但由于 AFLP 反应条带数目多,片段差异大,显影时通常是胶板上部大片段先显色,下部小片段显色较慢,显影颜色偏淡,因此该试验用4 ℃ 预冷的显影液进行显影,这样可以降低显影速度,将下部显色较慢的部分放在显影液中多显影一段时间,使上下都能均匀显色(图3)。此外对染色后漂洗时间,一般5 s 左右,漂洗时间太短,凝胶表面的银离子没有洗去,显影时背景很深;漂洗时间太长,与DNA 结合的银离子也被洗去,显影很浅甚至没有条带出现。

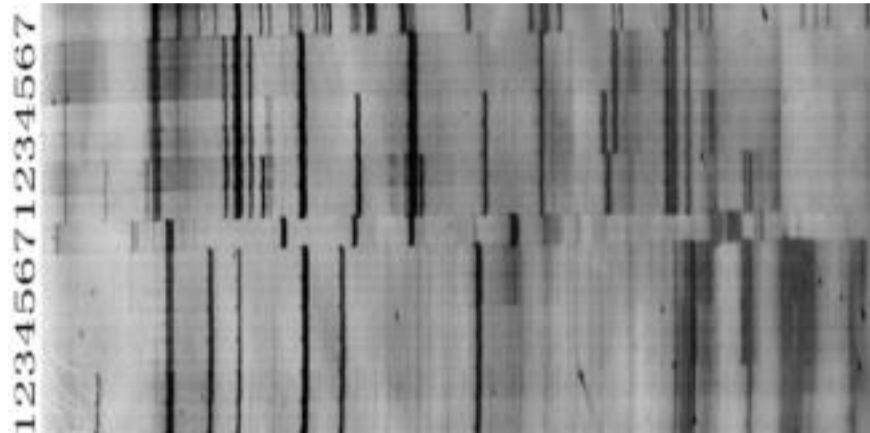


图2 部分 AFLP 结果(1=2,3=4,5=6,7 为龙荔)

Fig.2 The results of some AFLP(1=2,3=4,5=6,7 indicates longji)

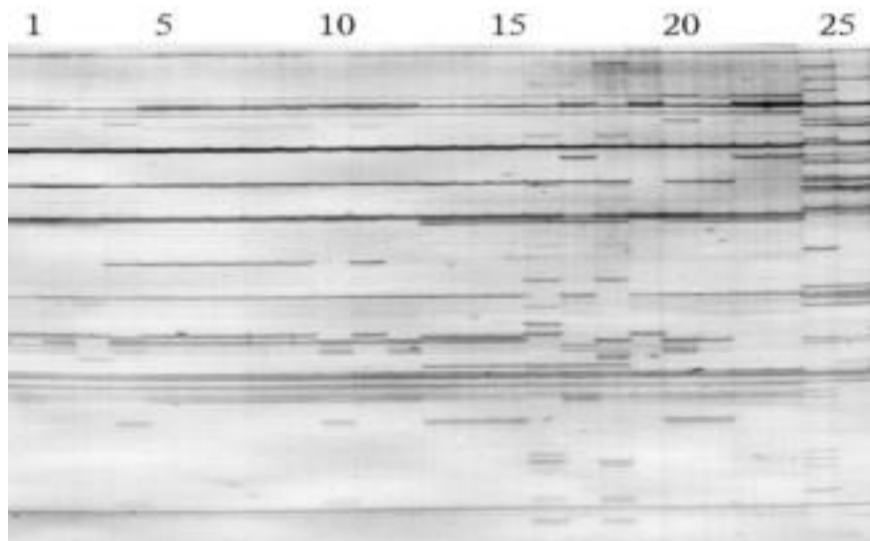


图3 23 个龙眼和2 个龙荔品种的 AFLP 指纹图谱(E ATG/M CAQ)

Fig.3 AFLP fingerprinting of 23 longan cultivars and 2 longji cultivars (E ATG/M CAQ)

3 讨论

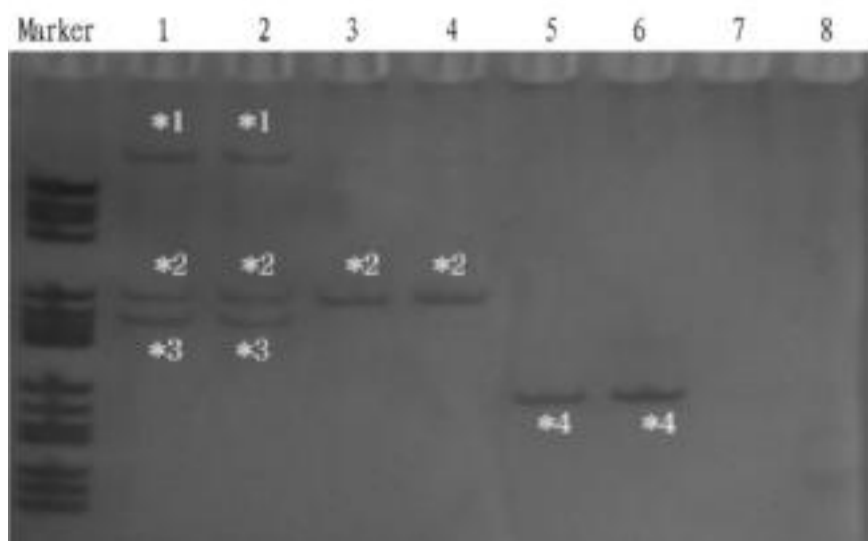
AFLP 作为一种新兴的迅速发展的分子标记技术,具有稳定性高、重复性好、不需要了解材料的基因背景等显著优点;银染法实验成本低、无放射性危害、操作简便、结果可直接观察、试验周期短,两者对实验设备要求不是很高,适宜一般分子生物实验室进行遗传分析。但是 AFLP 银染步骤较多,对技术要求较高,应注意以下几点:

(1) 进行 AFLP 分析所用的DNA 须完整且纯度高。AFLP 分析对DNA 质量要求较高, DNA 长度一般应在20 Kb 以上,吸光度 A_{260}/A_{280} 在1.8 左右较适宜,同时必须除去DNA 样品中的酚类等杂质,否则DNA 不能酶切或酶切不彻底,不能进行PCR 扩增或者PCR 扩增后条带的假阳性高且重复性差。

(2) DNA 酶切必须彻底。酶切质量是决定 AFLP 成功与否的关键,酶切时间过短,酶切不完全,常产生假阳性;酶切过量,又会造成过度酶切,无法连接,产生假阴性。酶切与连

(下转第907 页)

从图1 可以看出,电泳条带清晰,相同性别电泳条带数完全一致;不同性别电泳条带数和片段大小完全不同,因此可以从电泳结果中清楚区分雌雄性别。对比预期结果,SRY 基因扩增雄性 Y 染色体的特异片段,而雌性个体无扩增条带,二者完全一致;AMEL 引物扩增雌性个体 DNA 实际电泳条带数和理论条带数一致,而雄性结果不一致,这可能与非特异性扩增有关。



注: * 1 为 650 bp, * 2 为 270 bp, * 3 为 210 bp, * 4 为 110 bp;泳道 1~4 为 AMEL 引物,5~8 为 SRY 引物;1,2,5,6 为雄性,3,4,7,8 为雌性。

Nte: * 1 indicates 650bp, * 2 indicates 270bp, * 3 indicates 210bp, * 4 indicates 110bp;Lanes 1~4 indicate AMEL primer, 5~8 indicate SRY primer;1,2,5,6 indicate male;3,4,7,8 indicate female.

图1 AMEL 和 SRY 引物扩增结果

Fig.1 Electrophoresis map of PCR amplification results by AMEL and SRY primers

3 讨论

AMEL 基因编码一种高度保守的蛋白质,该基因位于哺乳动物的 X 和 Y 染色体上,其等位基因外显子具有相同的基因序列,但其内含子序列不同^[2]。因此,由 X 和 Y 染色体决定性别的哺乳动物,雌性(XX)个体具有两种相同的 AMEL 基因,而雄性(XY)则具有两种不同的 AMEL 基因^[4]。Y 染色体

(上接第 894 页)

接通常有两步法和一步法,理论上只要内切酶和连接酶的反应温度和缓冲液合适,两种方法都可进行。该试验表明,不同公司的限制性内切酶的反应温度和对缓冲液的要求不同,因此选用限制性内切酶和连接酶时应选用同一公司的产品。

(3) 电泳时胶板应当保持适当的温度。由于 AFLP 反应条带数目多,片段差异大,因此电泳时间长,要求电泳时胶板散热均匀并能保持适当的温度。电压过低,温度上升缓慢,电泳需要时间长,条带易扩散;电压过高,胶板热量散失不均匀,出现“微笑效应”,都对结果产生不良影响。为了保证胶板温度,AFLP 反应电泳前应当预电泳一段时间,并且采用恒功率电泳分离。此外由于银染很敏感,任何污染都会降低效果甚至失败,因此在试验过程中每一步操作必须严格,以保证 AFLP 分析的稳定性与高效性。

参考文献

[1] 邱武陵,章恢志.中国果树志:龙眼枇杷卷[M].北京:中国林业出版

上的 AMEL 基因在第 1 内含子有一小段的缺失,可用特异性引物同步扩增 X-Y 染色体 AMEL 基因序列,使之产生不同的 DNA 片段,从而可以判断性别。目前,根据 AMEL 基因的这一特点设计引物并采用 PCR 技术进行性别鉴定的有日本黑熊、牛和人类。结果表明,AMEL 基因可用于判定 XY 染色体动物的性别。

性别鉴定方法的研究无疑为胚胎早期性别鉴定和性别控制提供了技术手段,但是作为一种理想的胚胎性别鉴定或者性别控制的方法必须具备很多优点,如准确性好、对胚胎损伤小、鉴定成本低、简单快速等。PCR 技术的不断发展和更新可以满足以上特点,但在实际生产中的应用又受到取样和 PCR 过程中各种因素的影响。

该实验中 AMEL 引物对雄性的实际扩增条带数与理论条带数不同,出现这一现象的原因可能和错配有关。在实验过程中,笔者对 AMEL 基因 PCR 程序的 4 个不同退火温度(56、58、60、62)、镁离子浓度和 DNA 模板浓度进行了优化,但仍然存在这种非特异性扩增。

该实验应用 SRY 特异性引物作为 AMEL 基因的对照,二者检验结果完全一致。相对 SRY 基因对性别的判定,AMEL 基因具有很多优点。AMEL 基因在哺乳动物高度保守,基因拷贝数一致,扩增效果稳定,不需要像 SRY 基因那样在检测时设置内标,雌雄动物扩增片段大小和数目具有显著差异,因此电泳易于区分。从该实验结果来看,AMEL 基因比 SRY 基因具有更高的灵敏性。

参考文献

- [1] 徐营,杨利国,郭爱珍,等.性别鉴定基因 SRY 的研究进展[J].生物技术通报,2002(1):30-32.
- [2] FERRELLI B, BRENG B. X and Y chromosome specific variants of the androgen gene allow sex determination in sheep (Ovis aries) and European red deer (Cervus elaphus) [J]. BMC Genetics, 2005, 6(1): 6-16.
- [3] PHUA AC, ABDULLAH RB, MOHAMED Z. A PCR based sex determination method for possible application in Caprine Gender selection by simultaneous amplification of the Sry and Anh X Genes [J]. Journal of Reproduction and Development, 2003(49): 307-311.
- [4] 邱武陵,章恢志.中国果树志:龙眼枇杷卷[M].北京:中国林业出版社,1996:1-43.
- [5] 朱建华,彭宏祥,苏伟强,等.广西龙眼种质资源研究及品种选育[J].亚热带植物科学,2002(增刊):44-47.
- [6] 柯冠武.福建主栽龙眼品种花、果形态观察初报[J].福建果树,1986(1):9-11.
- [7] 柯冠武,黄进华,邵小华.龙眼各品种花粉形态及系统位置[J].园艺学报,1988,15(2):109-114.
- [8] 刘舒芹,沈德绪,林伯年.龙眼品种过氧化物酶与多酚氧化酶同工酶分析及其亲缘关系[J].园艺学报,1988,15(4):217-221.
- [9] 林同香,陈振光,戴思兰,等. RAPD 技术在龙眼品种分类中的应用研究[J].植物学报,1998,40(12):1159-1165.
- [10] 易干军,谭卫萍,霍合强,等.龙眼品种(系)遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J].园艺学报,2003,30(3):272-276.
- [11] HEIER VOS, RENE HOGERS, MARJO BLEEKER, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [12] 易干军,霍合强,蔡长河.荔枝 AFLP 分析体系的建立[J].果树学报,2002,19(6):361-364.
- [13] 杨凯,宋婉,张春庆,等.荧光标记 DNA 扩增片段长度多态性方法的改进[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(2):256-258.
- [14] 李冬波,李江舟,朱建华.适宜 AFLP 分析的龙眼基因组 DNA 提取方法[J].西南农业学报,2007,20(3):478-480.
- [15] J. 萨姆布鲁克.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002.