

# 小麦条锈菌 AFLP 体系的优化

张妍 康晓慧 (西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳621002)

**摘要** [目的] 优化小麦条锈菌 AFLP 体系。[方法] 以小麦条锈菌大田混合菌系为材料, 采用改良 CTAB 法提取 DNA, 探索酶切、PCR 过程, 优化小麦条锈菌 AFLP 体系, 并从 64 对引物中筛选出稳定、高效的引物组合。[结果] 改良 CTAB 法有较好的破壁效果, 所提 DNA 纯度高, 条带清楚, 无污染, 适合 AFLP 操作。酶切 3.0、3.5 h 的效果相同, 扩出的片断在 100 ~ 2 000 bp, 可进行预扩。Taq DNA 聚合酶为 0.5 U 时, 电泳图中出现了较亮的条带, 片断大小在 100 ~ 2 000 bp。16 对引物组合可以扩增出较稳定的条带。[结论] 优化的小麦条锈菌 AFLP 体系为: 25.0 μl 酶切体系, 37 °C 酶切 3.0 h, 10.0 μl 连接体系在 22 °C 条件下连接过夜, 连接产物、预扩产物分别按 1:10、1:30 的比例用 ddH<sub>2</sub>O 稀释后用于预扩和选择性扩增。

**关键词** 小麦条锈菌; AFLP; 反应体系; 引物

中图分类号 S435.121.4<sup>+</sup>1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)02-0227-02

## Optimization of the AFLP System of Wheat Strip Rust

ZHANG Yan et al (College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621002)

**Abstract** [Objective] The study aimed to optimize AFLP system of wheat strip rust. [Method] With field mixed fungus strains of wheat strip rust as materials, DNA was extracted by improved CTAB method to explore the restriction enzyme digestion and PCR courses and optimize the AFLP system of wheat strip rust. And the stable and high-efficiency primer combinations were screened out from 64 pairs of primers. [Result] The improved CTAB method had better effect on breaking cell wall, the extracted DNA had higher purity without pollution and the strip was clear. It was suitable for AFLP operation. The effects of restriction enzyme digestions for 3.0 and 3.5 h were same, the sizes of amplified fragments were in 100 ~ 2 000 bp and could be pre-amplified. When Taq DNA polymerase was 0.5 U, the brighter smear appeared in electrophoretogram with fragment size in 100 ~ 2 000 bp. The relatively stable strips could be amplified from the 16 pairs of primer combinations. [Conclusion] The optimized AFLP system of wheat strip rust was as follow: digestion with 25.0 μl restriction enzyme system for 3.0 h at 37 °C, joining with 10.0 μl joinase system for a night at 22 °C, using joining and preamplification products diluted by ddH<sub>2</sub>O according to the ratio of 1:10 and 1:30 resp. in the preamplification and selective amplification.

**Key words** Wheat strip rust; AFLP; Reaction system; Primer

小麦条锈病是由小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* sp. tritici)引起的一种叶部病害, 是小麦生产上最严重的病害之一。由于小麦条锈菌可由气流传播, 其传播距离可达几千千米<sup>[1]</sup>, 因此, 给小麦条锈病的防治带来了很大的困难。传统的毒性分析虽然可以提供关于寄主选择作用的影响和抗病基因有效性的直接信息, 但是不能反映毒性演化和系统演化机制, 而利用分子标记技术可以解决这一问题。AFLP 是一种稳定、快速、有效的分子标记技术<sup>[2]</sup>, 已被广泛用于基因定位、遗传图谱构建和遗传多样性分析等领域<sup>[3]</sup>。郑文明等<sup>[4]</sup>用 AFLP 对中国小麦条锈菌主要流行菌系进行了指纹分析, 对供试菌系的进化关系作了初步推断, 并证明 AFLP 适合于小麦条锈菌的遗传多样性分析。笔者以小麦条锈菌夏孢子为材料, 通过对酶切、PCR 过程的摸索, 优化小麦条锈菌 AFLP 反应体系并从 64 对引物中筛选出几对稳定、高效的引物组合。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试菌。条锈菌为大田混合菌系。

1.1.2 仪器。PCR 扩增仪、垂直电泳槽、水平电泳槽、电泳仪、紫外分光光度计、凝胶成像系统。

1.1.3 试剂。Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、EcoR 和 Mse (NEB 公司)、琼脂糖、聚丙烯酰胺等。

### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取。采用改良 CTAB 法, 缓冲液配方(100 ml): 2.5 g D 山梨醇, 1.0 g 十二烷基肌氨酸钠, 0.8 g CTAB,

4.7 g NaCl, 0.8 g EDTA, 10 ml Tris (1 ml/L, pH 值 8.0), 1 g pvp。

1.2.2 酶切连接与预扩增模板的制备。用 EcoR 和 Mse 酶对 DNA 样品进行双酶切, 后用 EcoR 和 Mse 接头连接, 制备预扩增反应模板。

1.2.3 选择性扩增。各选用 8 个 EcoR 和 Mse 引物, 组合成 64 对选扩引物, 其序列如下: E+TA、E+TT、E+TG、E+TC、E+AG、E+AT、E+AC、E+AA、M+TT、M+TA、M+TC、M+TG、M+AA、M+AT、M+AC、M+AG。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳。选择 6% PA 胶, 上样量 6 ~ 7 μl, 电泳温度 50 °C 左右, 80 W 恒功率电泳 2 h 后银染检测。

## 2 结果与分析

2.1 DNA 模板的质量 将所提 DNA 用 0.8% 琼脂糖检测后发现条带清楚, 无其他污染, 适合 AFLP 操作(图 1)。

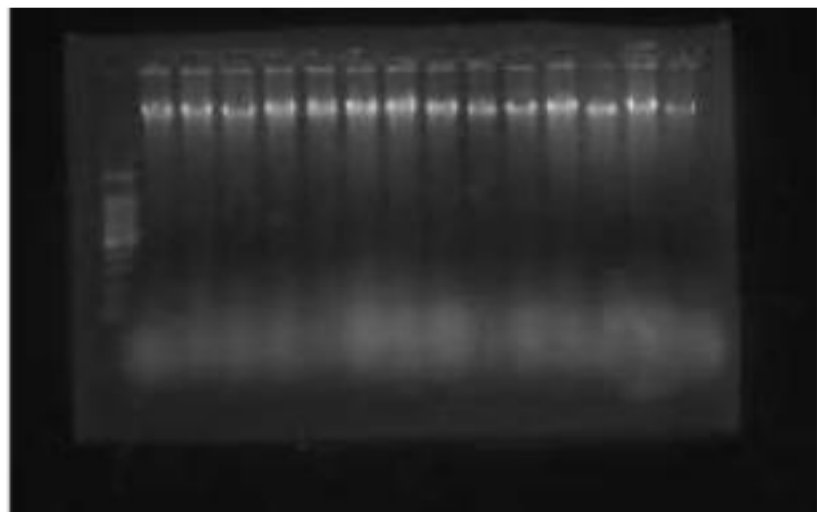
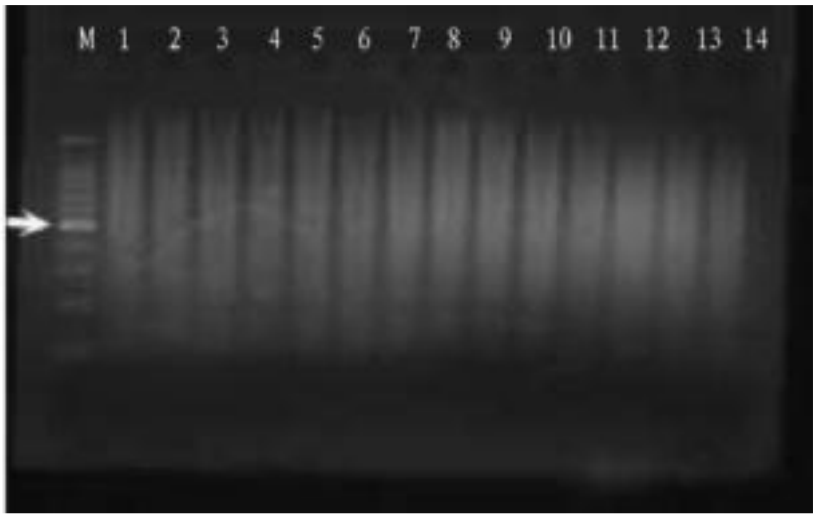


图 1 小麦条锈菌基因组 DNA 电泳图谱

## Fig. 1 Electrophoresis pattern of genomic DNA from wheat strip rust

2.2 酶切连接时间的影响 实验采取了 3 种酶切时间梯度, 2.5、3.0、3.5 h。用相同的引物预扩后可以看出, 在 3 种时间内两种酶都对 DNA 进行了酶切, 但 2.5 h 不能对其酶切完

全,推测其预扩片段较大,在2 000 bp 以上。而3.0、3.5 h 效果相同,扩出的片段在100 ~2 000 bp,可进行预扩(图2)。

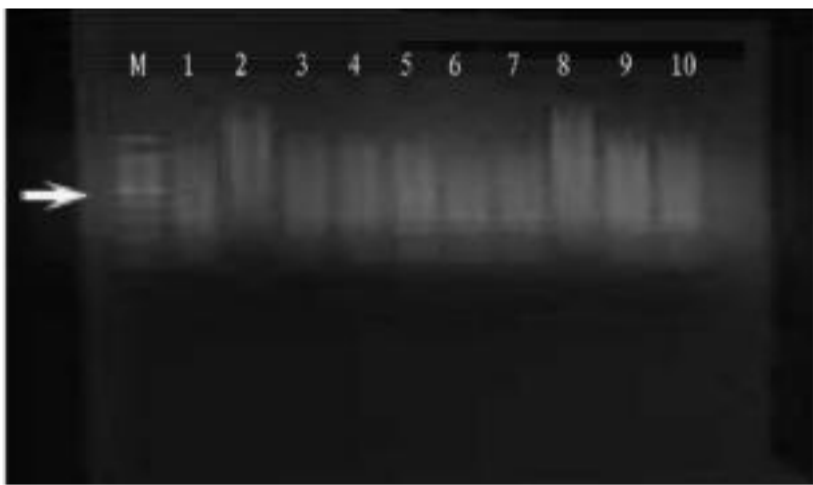


注:1~5 为酶切2.5 h;6~10 为酶切3.0 h;11~14 为酶切3.5 h。  
Nte:1~5 means enzyme digestion for 2.5 h;6~10 means enzyme digestion for 3.0 h;11~14 means enzyme digestion for 3.5 h.

图2 DNA 经不同时间酶切后的预扩产物

Fig. 2 The products of pre-amplification on DNA under different enzyme digestion time

**2.3 Taq DNA 聚合酶对扩增结果的影响** 设定4 个 Taq DNA 聚合酶浓度梯度:0.3、0.4、0.5、0.6 U。从图3 可见,当 Taq DNA 聚合酶为0.3、0.4 U 时,其条带较淡,即扩出的片段太少,且可能存在扩不出的现象;当为0.5 U 时,出现了较亮的条带,且片段大小在100 ~2 000 bp;而浓度进一步加大时,扩增产物从点样孔开始拖尾,片段过大,影响后续操作。



注:1~2 为0.3 U;3 为0.4 U;4~7 为0.5 U;8~10 为0.6 U。  
Nte:1~2.0.3 U;3.0.4 U;4~7.0.5 U;8~10.0.6 U.

图3 不同 Taq DNA 聚合酶浓度选扩电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern for the products of PCR amplification under different Taq DNA polymerase concentration

**2.4 引物筛选** 图4 显示,M+ TT/ E+ TG、M+ TA/ E+ TA、M+ TC/ E+ TA 等引物可以扩增出较稳定的条带(表1)。



图4 同一菌种不同引物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 4 Polyacrylamide electrophoresis pattern for the products of same strain amplified by different primers

表1 筛选出的引物组合及其扩增出的总条带数

Table 1 The screened primer combinations and total bands amplified

引物组合 Primer combinations	扩增总条数 Total bands amplified	引物组合 Primer combinations	扩增总条数 Total bands amplified
M+ TT/ E+ TG	15	M+ TG/ E+ TA	13
M+ TA/ E+ TA	10	M+ TG/ E+ TG	16
M+ TC/ E+ TA	19	M+ TG/ E+ TC	15
M+ TC/ E+ TG	19	M+ TG/ E+ AG	15
M+ TC/ E+ TC	17	M+ TG/ E+ AT	10
M+ TC/ E+ AT	22	M+ TG/ E+ AC	18
M+ TC/ E+ AC	17	M+ TG/ E+ AA	17
M+ TC/ E+ AA	18	M+ AT/ E+ TC	17

## 2.5 小麦条锈菌 AFLP 体系的优化

**2.5.1 酶切。**体系25.0  $\mu$ :锈菌总DNA (100 ng/  $\mu$ ) 3.0  $\mu$ , EcoR (20 U  $\mu$ ) 0.5  $\mu$ , Mse (10 U  $\mu$ ) 0.5  $\mu$ , 10  $\times$  NEB Buffer 2.5  $\mu$ , 10  $\times$  BSA 0.25  $\mu$ , 37  $^{\circ}$ C 酶切3.0 h, 70  $^{\circ}$ C 钝化20 min。

**2.5.2 连接。**在25.0  $\mu$  酶切产物中加入如下10.0  $\mu$  连接体系: EcoR 接头(10 pmol/  $\mu$ ) 1.0  $\mu$ 、Mse I 接头(10 pmol/  $\mu$ ) 1.0  $\mu$ 、T4 连接酶1.0  $\mu$ 、10  $\times$  ligase Buffer 2.5  $\mu$ , 于22  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,70  $^{\circ}$ C 钝化20 min。

**2.5.3 模板DNA 片段的预扩增。**预扩体系为25.0  $\mu$ , 连接产物按1:10 的比例用ddH<sub>2</sub>O 稀释后用于预扩增反应, EcoR (100 ng/  $\mu$ ) 1.0  $\mu$ , Mse (100 ng/  $\mu$ ) 1.0  $\mu$ , 10  $\times$  PCR Buffer (Mg<sup>+</sup>free) 2.5  $\mu$ , MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.6  $\mu$ , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ , 连接产物5.0  $\mu$ , Taq 酶(5 U  $\mu$ ) 0.1  $\mu$ 。

PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性2 min, 56  $^{\circ}$ C 退火30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸1 min, 30 个循环, 4  $^{\circ}$ C 保存。

**2.5.4 模板DNA 片段的特异性扩增。**选扩体系为25.0  $\mu$ , 预扩产物按1:30 的比例用ddH<sub>2</sub>O 稀释后用于选扩反应, 选扩体系除引物不同外, 其余同预扩增。

PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性2 min, 94  $^{\circ}$ C 变性30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火30 s (-0.7  $^{\circ}$ C/循环), 72  $^{\circ}$ C 延伸1 min, 13 个循环, 94  $^{\circ}$ C 变性30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸1 min, 24 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸1 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

## 3 小结与讨论

在 AFLP 操作过程中, DNA 的纯度是对其影响最大的因素, 只有获得高纯度的 DNA 才能保证实验的顺利进行, 改良 CTAB 法有较好的破壁效果, 可获得较高纯度的 DNA。由于小麦条锈菌孢子中富含色素, 提取的 DNA 可能呈褐色, 因此在提取时需要用氯仿多次抽提。

在进行酶切连接及 PCR 操作时要保持环境的洁净, 且一定要在冰上进行。PCR 反应液可先在大管中混匀后再分装到几个小管中, 这样可保证反应条件一致, 减少误差。

## 参考文献

- [1] 李振歧, 曾士迈. 中国小麦锈病 M. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] VOS P, HOGERS R, BLEEDER M et al. A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting: European, 94206029.7 (Publication No. 0534858) [P]. 1993:1405.
- [4] 郑文明, 刘峰, 康振生, 等. 中国小麦条锈菌主要流行菌系的 AFLP 指纹分析 [J]. 自然科学进展, 2000, 6(10): 532-537.