

菠菜 AFLP 反应体系初探

梅 焱^{1,2}, 侯雷平¹, 崔艳玲², 陈海丽², 孟淑春²

(1. 山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801; 2. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘要: 提取菠菜嫩叶 DNA, 运用改良 CTAB 法提取 6 份菠菜品种的 DNA, 对 AFLP 反应体系的 DNA 用量、酶切连接、预扩、选扩等试验条件进行了优化分析, 初步建立适合于菠菜作物的 AFLP 反应体系。结果表明: ①在 PCR 仪中酶切的效果比水浴的要好, 酶切反应对酶切时间和 DNA 的浓度要求不敏感。②菠菜 AFLP 预扩选扩体系的反应体积为 20 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL , *Taq*-polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL 最佳。为菠菜 AFLP 分子标记的品种亲缘关系鉴定和遗传育种等提供一定的理论基础。

关键词: 菠菜; AFLP; 影响因子

中图分类号: S636.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0111-05

Optimization and Establishment of AFLP Analying System in Spinach (*Spinacia oleracea* L.)

MEI Yi^{1,2}, HOU Lei-ping¹, CUI Yan-ling², CHEN Hai-li², MENG Shu-chun²

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China)

Abstract: In this study total genetic DNA from tender leaves of Spinach (*Spinacia oleracea*) was extracted with improved CTAB. An AFLP (amplified fragment length polymorphism) analysis system was established by optimizing the concentration of template DNA, DNA restriction reaction, ligase reaction, pre-amplification and selective amplification. The results were obtained as follows: ①The effect of restriction enzyme was better in PCR instrument than in waterbath, and the reaction time and the concentration of DNA were not sensitive to restriction enzyme. ②The best reaction system in 20 μL total volume contained Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL and *Taq*-polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL . This paper provided a method for further study in the field of genetic relative analysis of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) varieties and genetic breeding.

Key words: Spinach (*Spinacia oleracea* L.); AFLP; Influencing factors

AFLP 分子标记技术结合了 RFLP 技术和 RAPD 技术的特点, 既克服了 RAPD 可靠性低、重复性差的缺点, 又避免了 RFLP 操作复杂和安全等问题^[1,2]。它具有很好的重复可靠性和 PCR 技术的高效性^[2,3], 目前已被广泛应用在遗传图谱的构建^[4,5], 基因定位及其克隆^[6,7], 物种的遗传多样性分析^[8], 种质和种子纯度的鉴定^[9]等方面, 是一种高效、安全、可靠、投入少的分子标记。

菠菜, 别名波斯草, 是藜科菠菜属一年生或二年生草本, 原产波斯, 2000 年前已有栽培, 中国最晚在

唐代已有菠菜的栽培。菠菜以叶片及嫩茎供食用, 含有丰富维生素 C、胡萝卜素、蛋白质以及铁、 β 胡萝卜素、维生素 B6、叶酸、钙、磷等矿物质。但目前我国菠菜的研究还相对薄弱, 在分子育种中的研究更是较少, 从我国菠菜栽培品种现状来看, 由于没有系统地进行研究, 各地品种比较混杂, 难于进行合理分类, 优良品种材料愈益难求已经成为菠菜育种的严重障碍。巨大的市场潜力和较落后的资源基础性研究进展形成了突出的矛盾, 不利于菠菜的推广与发展。而且菠菜在分子生物学方面的研究进展远远

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 北京市科技新星计划项目(2008B37); 国家科技支撑计划项目(2007BAD85B02, 2008BADA6B03); 北京市人事局留学人员科技活动市级重点资助项目(20080006); 北京市政府购买科技服务项目(20080901)

作者简介: 梅 焱(1982-), 男, 山西太原人, 在读硕士, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

通讯作者: 孟淑春(1973-), 女, 北京人, 副研究员, 主要从事蔬菜种质资源和遗传育种研究。

落后于十字花科、茄果类、瓜类。因此本试验首次将 AFLP 标记技术引入到菠菜育种当中,尝试建立菠菜的 AFLP 分子标记体系并进行调试,期望为今后的菠菜研究和改良提供一些方法和研究基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菠菜种质材料 6 份:前卫 433F8、美 C-2、福将、虎耳菜、ア二ナ和法国菠菜,由北京市农林科学院蔬菜研究中心菠菜育种课题组提供。

本试验所用试剂: *Pst* I 10 U/ μ L, *Mse* I 10 U/ μ L, T4 DNA ligase 4 U/ μ L, 10 \times Buffer, BSA 10 mg/mL(NEB 公司); *Pst* I adapter, *Mse* I adapter, *Pst* I -03, *Mse* I -02, *Pst* I -76, *Mse* I -52(上海生工); 10 \times PCR Buffer (free Mg^{2+}), $MgCl_2$ 25 mmol/L, *Taq*-polymerase 5 U/ μ L(TakaRa 公司); Marker I (100 ~ 600 bp), Marker II (100 ~ 1 200 bp), dNTPs 2.5 mmol/L(TianGen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和浓度检测 本试验采用改良后的 CTAB 法^[10,11]提取菠菜叶片基因组 DNA。采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度。

1.2.2 AFLP 体系的建立和关键影响因子的调试 菠菜 AFLP 反应体系和基本程序参照周兴文等^[12]和黄文坤等^[13]的方法进行。

1.2.2.1 酶切与连接 采用 *Pst* I 和 *Mse* I 进行双酶切,设计水浴锅和 PCR 仪两种酶切与连接环境。为了确立合适的 DNA 用量和酶切连接时间,做了不同处理试验。分别对稀释 10, 20, 40, 80, 160 倍的 DNA 稀释液进行 3, 6, 9, 12, 15 h 的酶切与连接处理。

1.2.2.2 预扩增 在扩增反应体系中, Mg^{2+} 、dNTPs 和 *Taq*-polymerase 是重要的限制性因素,其用量直接关系到扩增效果^[14],因此在预扩增反应体系中对这 3 个因素设置了不同的梯度试验:反应体系 20 μ L, Mg^{2+} 浓度为 25 mmol/L, 试验中设置 5 个梯度: 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 μ L; dNTPs 浓度为 2.5 mmol/L, 试验中设置 5 个梯度 0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ L; *Taq*-polymerase 浓度为 5 U/ μ L, 用量设置 6 个梯度: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μ L。10 \times PCR Buffer free Mg^{2+} 2.0 μ L, *Pst* I -03 (50 ng/ μ L) 0.6 μ L, *Mse* I -02 (50 ng/ μ L) 0.6 μ L, 加入酶切连接后模板 5.0 μ L, 最后用 ddH₂O 补足。

反应结束后,把预扩增产物进行稀释设置 5 个梯度为: 10, 20, 40, 80, 160 倍。

1.2.2.3 选择性扩增 在选择性扩增反应体系中,

同样对 Mg^{2+} 、dNTPs 和 *Taq*-polymerase 的用量设置了不同的梯度试验:反应体系 20 μ L, Mg^{2+} 浓度为 25 mmol/L, 试验设置 5 个梯度: 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 μ L; dNTPs 浓度为 2.5 mmol/L, 试验中设置 5 个梯度 0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ L; *Taq*-polymerase 浓度为 5 U/ μ L, 用量设置 6 个梯度: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μ L。10 \times PCR Buffer free Mg^{2+} 2.0 μ L, *Pst* I -76 (50 ng/ μ L) 1 μ L, *Mse* I -52 (50 ng/ μ L) 1 μ L, 加入预扩增产物稀释液 5.0 μ L, 最后用 ddH₂O 补足。

反应结束后,在选择性扩增产物中加入 1/2 体积的变性上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青), 94 $^{\circ}$ C 变性 6 min 后,立即放入冰水混合物中,防止产物复性。用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶 80 W 恒功率预电泳 36 min 点样,在 70 W 恒功率电泳 2 h 左右(具体电泳时间根据选扩产物大小而定),银染显色,比较扩增结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度检测

提取的 DNA 溶于 50 μ L 的 ddH₂O, 分别取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

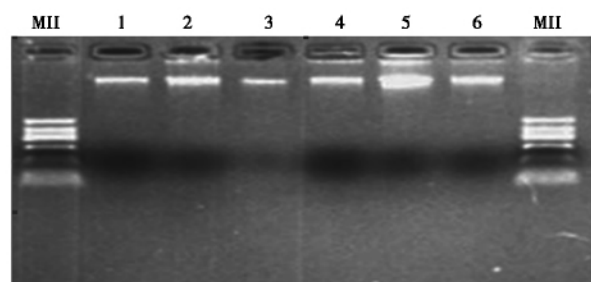


图 1 CTAB 法提取的菠菜 DNA(1.2%) 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 1.2% Agarose gel electrophoresis of DNA from *Spinacia germplasm*s isolated by CTAB method

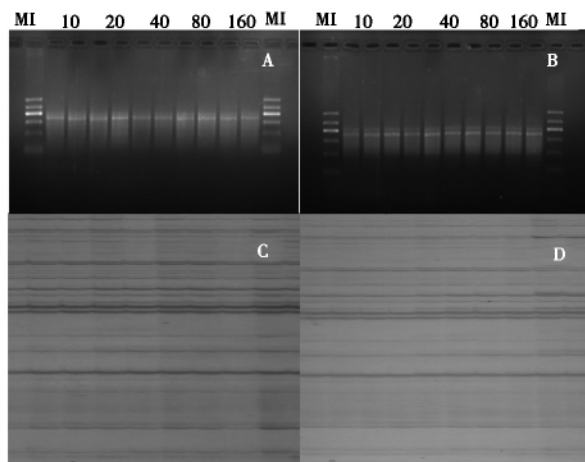
把以上 DNA 原液稀释 50 倍经过分光光度计测定①前卫 433F8, ②美 C-2, ③福将, ④虎耳菜, ⑤ア二ナ, ⑥法国菠菜浓度分别为 81.6, 104.5, 56.36, 88.2, 167.1, 98.5 ng/mL。

高质量的基因组 DNA 的制备和避免降解是 AFLP 成功的关键。在制备过程中要特别注意避免核酸酶及各种失活物质的污染^[14]。本研究得到的基因组 DNA(图 1) 条带均一性好, 没有拖尾, 说明 DNA 质量高, 完整性好, 适合做 AFLP 分析。选取 DNA 浓度适宜的高代自交系(自交 8 代)菠菜材料前卫 433F8 的 DNA 进行后续试验。

2.2 酶切连接反应条件摸索

在水浴和 PCR 两种条件下分别对稀释 10, 20, 40, 80, 160 倍的 DNA 稀释液进行酶切连接(6 h)反

应,由于酶切连接产物浓度过低,不易检测,因此进行预扩增和选择性扩增反应进行检测。取 4 μL 的预扩产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(1.2%),然后用引物组合 *Pst* I-76 和 *Mse* I-52 对预扩产物进行选择性的扩增反应,用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,经银染显色,比较扩增结果。每份样品设 2 次重复。

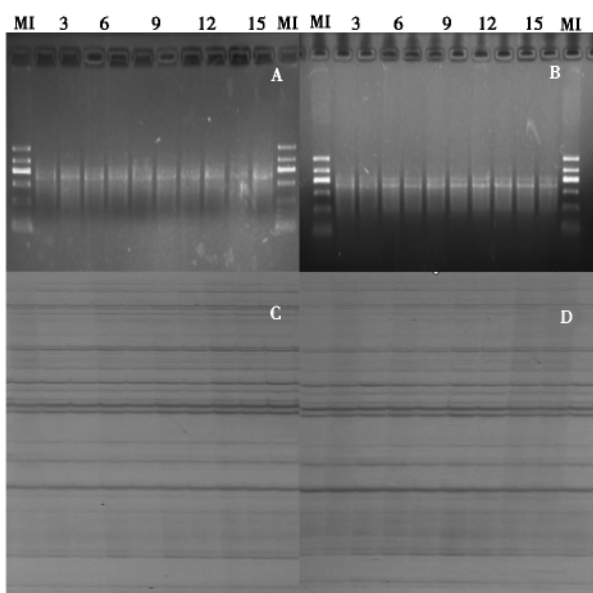


A. PCR 条件下的酶切连接产物; B. 水浴条件下的酶切连接产物; C. A 图的产物选扩的结果; D. B 图的产物选扩的结果。

A. The product of restriction enzyme and ligation in PCR; B. The product of pre-selective restriction enzyme and ligation in water bath; C. the selective amplification result of A; D. the selective amplification result of B.

图 2 不同 DNA 浓度酶切连接时间 6 h 的效果

Fig. 2 The results of restriction enzyme and ligation in different DNA concentrations



A. PCR 条件下酶切连接的产物; B. 水浴条件下酶切连接的产物; C. A 图产物选扩的结果; D. B 图产物选扩的结果。

A. The product of restriction enzyme and ligation in PCR; B. The product of restriction enzyme and ligation in water bath; C. The selective amplification of A; D. The selective amplification of B.

图 3 模版 DNA 稀释 40 倍的条件下酶切连接处理不同时间的结果比较

Fig. 3 The restriction enzyme and ligation result of DNA template diluted by 40 times in different treatment

图 2 结果表明:①DNA 浓度对酶切连接效果影响不大,稀释 10 倍和稀释 160 倍,两种处理作对比没有明显差别,导致这种现象的原因在于 AFLP 是基于 PCR 基础上的技术,要在 PCR 仪上经过预扩增和选择性扩增两次扩增,即模版在 PCR 仪中进行了指数型的扩增,对于模版的浓度要求不严格。②酶切连接条件比较试验结果显示,在 PCR 仪中酶切连接效果比水浴中效果好,产生的条带更为清晰。

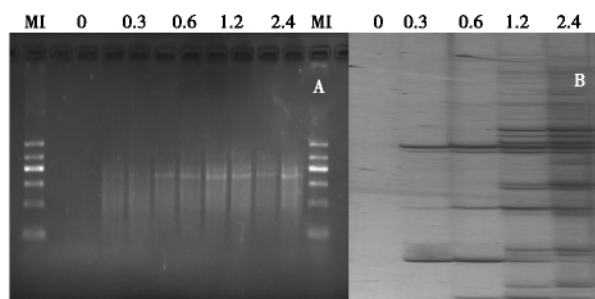
图 3 结果显示:①酶切连接时间对反应效果影响不大,原因有两方面,一方面酶切连接反应对时间要求不敏感,另一方面是进行了预扩增检测,这个过程只需要少量模版就能产生大量复制,极大地减弱了各个不同酶切连接时间的效果差异。②在 PCR 仪中酶切连接效果要比水浴中效果好。这和图 2 的试验结果是相吻合的,是对其进一步的说明和验证。

上述两个试验表明:①在相同的 DNA 浓度和相同的酶切连接时间下,PCR 条件比水浴条件的酶切连接效果好。②酶切连接对于反应时间(3 ~ 15 h 范围内)和 DNA 稀释倍数(在 10 ~ 160 倍范围内)不敏感。根据试验结果,考虑到经济高效,DNA 稀释液稀释倍数为 80 倍,酶切连接时间为 6 h 的反应条件最为理想。

2.3 预扩增和选择性扩增体系摸索

2.3.1 预扩增和选择性扩增中 Mg^{2+} 用量的调试

Mg^{2+} 浓度通常被认为是影响 PCR 扩增效率的一个潜在的重要因素。优化 PCR 条件时,选择合适的 Mg^{2+} 浓度是首要的步骤^[15]。在扩增反应体系中, Mg^{2+} 直接影响到 *Taq*-polymerase 的活性,选择最佳的 Mg^{2+} 浓度不仅有利于酶活性的提高从而增加扩增片段的产率,而且对于反应特异性,引物的退火,模板和 PCR 产物的解链温度以及引物二聚体的形成等均有影响^[16]。 Mg^{2+} 浓度过低时,扩增产物减少甚至没有产物; Mg^{2+} 浓度过高时,非特异性扩增明



A. 预扩结果; B. 选扩结果。

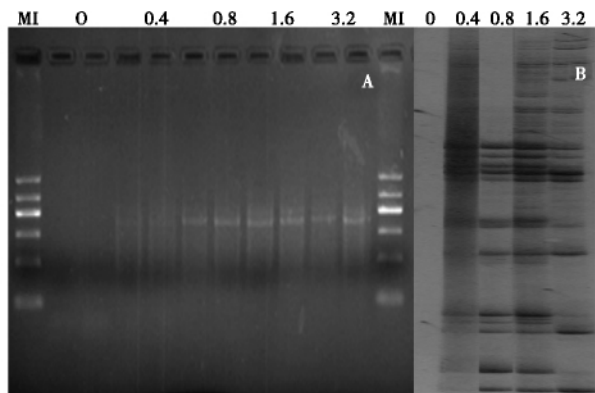
A. The results of pre-selective amplification;
B. The results of selective amplification.

图 4 不同 Mg^{2+} 用量的预扩和选扩结果

Fig. 4 The results of pre-selective amplification and selective amplification in different concentrations of Mg^{2+}

显增加(图4)。根据电泳结果,在 20 μL 体系中 Mg^{2+} (25 mmol/L) 用量 1.2 μL 时扩增效果最佳。

2.3.2 预扩和选扩中 dNTPs 用量的调试 dNTPs 为核苷酸 A、U、G、C 的混合物,它的主要作用在于延伸的过程中,以碱基互补原则在引物引导和 *Taq*-polymerase 的作用下合成与模板链互补的目的序列(是扩增反应的原材料),从而达到扩增的目的。所以 dNTPs 的量过少就会由于缺少合成目的片段的原料影响反应产物的合成,过多又会降低反应特异性,产生假阳性。由图 5 可见,20 μL 体系中 dNTPs (2.5 mmol/L) 用量 1.6 μL 较为适宜。



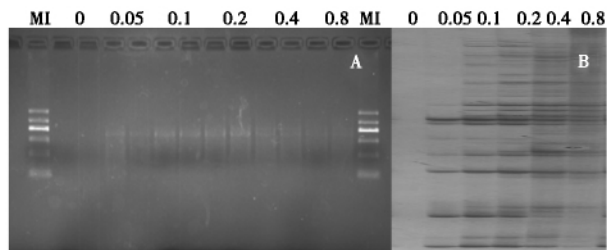
A. 预扩结果; B. 选扩结果。
A. The results of pre-selective amplification;
B. The results of selective amplification.

图 5 不同 dNTPs 用量的预扩和选扩结果

Fig. 5 The results of pre-selective amplification and selective amplification in different concentrations of dNTPs

2.3.3 预扩和选扩中 *Taq*-polymerase 用量的调试

Taq-polymerase 是 PCR 反应的核心,没有目的片段就不能延伸,反应也就不能进行,但是 *Taq*-polymerase 过多会出现非特异性扩增和涂抹带或者地毯样带。试验结果显示,在 20 μL 体系中 *Taq*-polymerase (5 U/ μL) 的量 0.2 μL 为最佳(图 6)。



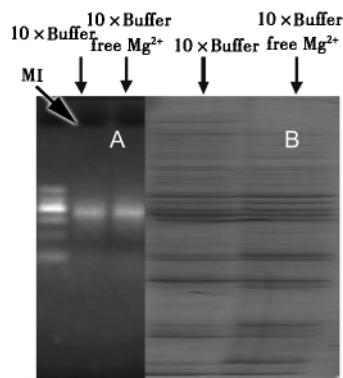
A. 预扩结果; B. 选扩结果。
A. The results of pre-selective amplification;
B. The results of selective amplification.

图 6 不同 *Taq*-polymerase 用量的预扩和选扩结果

Fig. 6 The results of pre-selective amplification and selective amplification in different concentrations of *Taq*-polymerase enzyme

2.3.4 预扩和选扩中缓冲液的选择 在 AFLP 反应体系中,常用的缓冲液是 10 \times Buffer free Mg^{2+} ,

Mg^{2+} 是通过浓度为 25 mmol/L MgCl_2 溶液的形式加入到体系中,而普通的 10 \times Buffer 是含有 Mg^{2+} 的,而且离子浓度为 15 mmol/L。但是经试验,无论使用哪种缓冲液,只要保证体系中加入 Mg^{2+} 的量一样,其扩增效果是相同的(图 7)。



A. 预扩产物检验; B. 选扩产物检验。
A. The results of pre-selective amplification;
B. The results of selective amplification.

图 7 AFLP 缓冲液的选择

Fig. 7 Selecting Buffer for AFLP

2.3.5 选扩中预扩液稀释倍数的调试 图 8 结果显示:预扩增产物稀释倍数对选择性扩增效果没有明显的影响,这进一步说明 AFLP 反应对于模板浓度是不敏感的。因此从节约材料考虑,本试验选择预扩增产物稀释 80 倍。

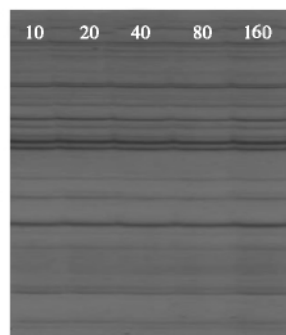


图 8 不同稀释倍数预扩液的选扩结果

Fig. 8 The results of selective-amplification with pre-selective amplification silutins of with different dilution

3 结论与讨论

AFLP 标记是基于 PCR 反应的基础上进行的一种选择性扩增限制性片段的方法。其引物是通用的,这对于一些研究基础薄弱、已知序列较少的物种来说具有很大的应用前景,如本试验所涉及到的菠菜。如果应用根据基因序列设计引物的标记方法,如 SSR, SNP 等,在引物设计时会遇到很大的困难,可以设计的引物少,而且引物的多态性不理想等问题。而 AFLP 在一定程度上可以解决这两方面的问题。首先, AFLP 多态性高,一般来说每个选扩产物

经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可检测到的标记数为 40 ~ 70 个,而且重复性好,结果较为可靠。其次, AFLP 所使用的引物是有选择性碱基的,对扩增产物有限制,所以它的重复性会相对较高。

综合上述试验结果,首次建立了适合菠菜基因组 DNA 的 AFLP 反应体系,并对关键影响因子进行了初步摸索和调试:酶切连接在 PCR 仪中进行,DNA 稀释液稀释倍数为 80 倍,酶切连接时间为 6 h。

预扩增反应体系为 20 μL , 10 \times Buffer free Mg^{2+} 2.0 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL , *Pst* I-03 (50 ng/ μL) 0.6 μL , *Mse* I-02 (50 ng/ μL) 0.6 μL , *Taq*-polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL , 酶切连接原液 5.0 μL , ddH₂O 8.8 μL 。

选择性扩增反应体系为 20 μL , 10 \times Buffer free Mg^{2+} 2.0 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL , *Pst* I-76 (50 ng/ μL) 1.0 μL , *Mse* I-52 (50 ng/ μL) 1.0 μL , *Taq*-polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL , 预扩稀释液 5.0 μL , 预扩稀释液的稀释倍数为 80 倍, ddH₂O 8.0 μL 。

本试验在综合前人研究结果的基础上,分析 AFLP 的技术特点,以菠菜基因组 DNA 为材料进行了 AFLP 体系摸索和重要影响因子调试,扩增出清晰可辨且适量的电泳条带。由此可见,经本研究摸索调试后建立的 AFLP 体系对于菠菜基因组分析是稳定有效的,同时该技术体系也为 AFLP 分子标记技术在菠菜遗传分析中的广泛应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 杨友才,周清明,尹晗琪,等.烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J].中国农业科学,2006,39(11):2194-2199.
- [2] 许磊,李宏博,林荣杓,等.大白菜的适宜 AFLP-*Pst* I /*Mse* I 引物组合[J].华北农学报,2009,24(4):96-101.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [4] Voorrips R E, Jongerius M C, Kanne H J. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of Brassica oleracea by means of RFLP and AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(1): 75-82.
- [5] 黄晓梅,许向阳,李景富,等.番茄分子遗传图谱构建和晚疫病抗性基因簇 *ph-3* 的 QTL 分析[J].中国农业科学,2009,42(10):3571-3580.
- [6] 许勇,欧阳新星,张海英,等.与西瓜野生种质抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记[J].植物学报,1999,41(9):952-955.
- [7] Julio E, Verrier J L, Dorlhac de Borne F. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 335-346.
- [8] 徐志红,徐永阳,刘君璞,等.甜瓜种质资源遗传多样性及亲缘关系研究[J].果树学报,2008,25(4):552-558.
- [9] 滕彩珠,刁英,易继碧,等.魔芋种质资源的全 AFLP 分析[J].氨基酸和生物资源,2006,28(4):33-35.
- [10] 李元军,唐美玲,于青,等.富士苹果 AFLP 体系的优化及其在鉴定早熟芽变中的应用[J].园艺学报,2009,36(3):327-332.
- [11] 孟淑春,张海英,郑晓鹰,等.大白菜基因组 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J].分子植物育种,2008,6(2):370-376.
- [12] 周兴文,杨秋生,李永华,等.牡丹基因组 AFLP 银染反应体系的建立和优化[J].河南农业大学学报,2006,40(6):602-606.
- [13] 黄文坤,郭建英,万方浩,等.紫茎泽兰 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J].武汉植物学研究,2006,24(6):498-504.
- [14] 焦浈,孙营,李娜,等.禾本科作物基因组分析体系的建立及优化[J].华北农学报,2007,22(4):108-111.
- [15] 宋春艳,楚鹰,陈明杰,等.基于 CEQ 遗传分析仪的 AFLP 条件的优化试验[J].食用菌,2006(3):14-15.
- [16] 曹仪植.植物分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2002:132-133.