

# 黄瓜 AFLP 反应体系的建立

张桂华<sup>1</sup>, 杜胜利<sup>1</sup>, 鞠秀芝<sup>3</sup>, 韩毅科<sup>1</sup>, 马德华<sup>1</sup>, 王 鸣<sup>2</sup>

(1. 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192;

2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**以 24 个不同类型的黄瓜高代自交系为试材, 通过对扩增长度多态性(AFLP)反应体系中的几个关键参数进行优化, 建立了适合于黄瓜的 AFLP 反应体系。结果表明, 用于酶切的基因组 DNA 以 300 ng 为宜, 预扩增产物的稀释倍数以 30 倍为宜, 选择性扩增引物的选择性碱基的数目以“2+3”组合为宜。采用优化好的体系, 引物组合 P12M12 在供试材料中共扩增出稳定清晰的带纹 35 条, 其中多态性带 4 条。

**关键词:**黄瓜; 扩增片段长度多态性; DNA 指纹图谱

**中图分类号:** S642.201 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2004)02-0010-03

## Construction of AFLP Analysis System in Cucumber

ZHANG Gui-hua<sup>1</sup>, DU Sheng-li<sup>1</sup>, JU Xiu-zhi<sup>3</sup>, HAN Yi-ke<sup>1</sup>, MA De-hua<sup>1</sup>, WANG Ming<sup>2</sup>

(1. Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China; 2. Department of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 3. Department of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analysis system was established with 24 cucumber self-bred lines. Several factors, include the quantity of genome DNA for cutting, the diluted times of pre-amplifications and the number of selective nucleotide in primer, were optimized. With the optimized system, the AFLP fingerprinting of 24 cucumber materials amplified by primer combination P12M12 have been obtained, which had 35 clear bands, and 4 of them were polymorphic.

**Key words:** Cucumber; AFLP system; DNA fingerprinting

AFLP 技术是由 Zabeau 和 Vos 于 1993 年发明的<sup>[1]</sup>。AFLP 标记是选择性扩增基因组 DNA 酶切片段所产生的扩增产物的长度多态性, 该技术自问世以来, 就以其带纹丰富、DNA 用量少、灵敏度高、快速高效等优点在多种作物、多种领域得到广泛应用<sup>[2~4]</sup>。但对于其关键技术参数, 如用于酶切-连接的基因组 DNA 的量、预扩增以及预扩产物的稀释倍数、选择性扩增引物的选择性碱基的数目等, 则因作物不同而有所差异。黄瓜是一种重要的蔬菜作物, 对其基础理论以及重要经济性状进行分子水平的研究, 是对其进行进一步改良的一条新途径。目前, 有关黄瓜的 AFLP 分析鲜见报道, 且未曾在黄瓜

AFLP 反应体系的研究。因此, 本研究以黄瓜 24 个高代自交系为试材, 旨在建立适合黄瓜的 AFLP 反应体系, 为进行黄瓜遗传连锁图谱构建、分子标记等研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

24 个黄瓜高代自交系。

### 1.2 试验方法

1.2.1 黄瓜基因组 DNA 提取 黄瓜基因组 DNA 提取采用改良后的 CTAB 法<sup>[5]</sup>。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 反应基本程序参照文

收稿日期: 2003-09-12

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2003AA207110); 天津市重大攻关项目(003122011-1)

作者简介: 张桂华(1972-), 女, 河北冀州人, 博士, 主要从事作物分子标记方面的研究工作。

献[6]。

1.2.3 AFLP 反应体系中关键步骤的优化

用于酶切 - 连接的基因组 DNA 的量 采用 *Pst*I 和 *Mse*I 两种限制性内切酶进行酶切。在 50  $\mu$ L 酶切 - 连接体系中分别加入 100,200,300,400,500 ng 基因组 DNA, 比较不同量 DNA 经酶切和 AFLP 扩增后效果。

预扩增以及预扩产物的稀释倍数 预扩增完成后,取 5  $\mu$ L 预扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离。将剩余的预扩增产物分别稀释 15 倍、20 倍、30 倍、40 倍后,取 4  $\mu$ L 进行选择扩增,比较扩增结果。

选择性扩增引物的选择性碱基的数目 分别采用“2+2”,“2+3”和“3+3”引物组合进行 AFLP 反应,反应结束后在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染显色,比较不同引物组合的扩增效果。

2 结果与讨论

2.1 用于酶切的基因组 DNA 的量

基因组 DNA 的酶切和连接是后续预扩增和选择性扩增的基础,若酶切不完全,则不能充分反映 DNA 中酶切位点和酶切片段长度的多态性。因此,基因组 DNA 的完全酶切是多态性得以检出的根本保证,而影响酶切是否完全的一个重要因素就是用于酶切的 DNA 的量。量过多,容易导致酶切不完全,过少,则模板浓度太低。

本研究比较了基因组 DNA 不同用量的酶切效果,结果表明,400,500 ng 基因组 DNA 酶切后,最终得到的谱带少,且谱带多集中于测序胶的上部;以 100,200 ng 基因组 DNA 用于酶切时,预扩增后得到的模板浓度低;取 300 ng 进行酶切,则既可酶切完全,又能在预扩增后得到合适浓度的模板。因此,确定在 50  $\mu$ L 酶切 - 连接体系中以 300 ng 基因组 DNA 为宜。

2.2 预扩增

扩增成败的另外一个关键因素是预扩增产物的分子量大小范围以及预扩增以后产物的稀释倍数。预扩增的目的是为选择性扩增提供大量的模板,同时对模板起到选择性纯化的作用,因此预扩增引物一般只含有一个选择性碱基或不含选择性碱基(本研究采用不含选择性碱基),选择性能较差,因此大量的扩增产物在琼脂糖凝胶中往往形成连续的一片,即通常所说的“smear”状。理论上预扩增产物的

分子量大小应在 1 500 bp 以下,大部分产物集中在 400 bp 左右。图 1 为本研究中 300 ng 基因组 DNA 经酶切 - 连接和预扩增后的电泳图片,由图可以看出,本研究结果符合 AFLP 分析的要求。

预扩增产物稀释多少倍后才能在随后的选择性扩增中得到很好的结果,这是非常重要的一个因素。本研究中将预扩增产物分别稀释 15 倍和 20 倍后用于随后的选择性扩增,电泳谱带均呈不同程度的“smear”状,不能看到清晰的带纹;稀释 40 倍后,电泳谱带暗淡,不利于谱带的读取;而稀释 30 倍后,带纹清晰,扩增信号强度基本一致,因此确定以稀释 30 倍为宜。

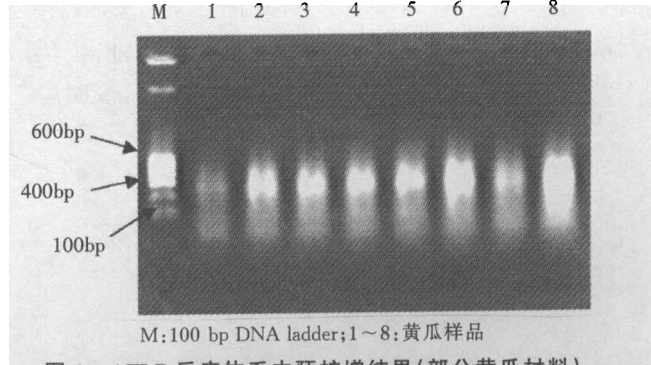


图 1 AFLP 反应体系中预扩增结果(部分黄瓜材料)

2.3 选择性扩增引物的选择性碱基的数目

选择性扩增引物的选择性碱基数直接影响扩增位点的多少,选择性碱基数目越少,扩增的位点数越多;选择性碱基数目越多,则扩增的位点数越少。条带数过多或过少,都不利于多态性的检测。本试验

表 1 不同选择性碱基数目的引物组合的扩增效果

引物组合		扩增的总谱带数	平均每个引物的谱带数
“2+2”	P19M19	67	69.4
	P22M22	66	
	P23M23	71	
	P24M24	71	
	P25M25	72	
“2+3”	P11M35	53	49.4
	P12M39	46	
	P13M33	54	
	P14M36	50	
	P14M38	44	
“3+3”	P32M59	21	22.4
	P33M59	19	
	P34M34	26	
	P35M33	20	
	P35M34	26	

对“2+2”、“2+3”、“3+3”组合进行了比较研究,由表1可以看出,“2+2”组合平均每个引物扩增出的谱带数为69.4条;“2+3”组合平均每个引物扩增出的谱带数为49.4条;“3+3”组合平均每个引物扩增出的谱带数为22.4条。采用“2+2”组合虽然获得了较多的信息,但条带密集,不利于读取;“3+3”组合条带稀疏,信息量太小;“2+3”组合条带之间的距离相对较大,便于观察,便于目标片段的分离。因此本试验确定黄瓜 AFLP 反应体系中选择性扩增引物的选择性碱基的数目以“2+3”最为合适。

#### 2.4 24个黄瓜高代自交系的 AFLP 分析

应用优化好的黄瓜 AFLP 反应体系对 24 个黄瓜高代自交系材料进行了 AFLP 分析,结果如图2所示。由图2可以看出,扩增出的带纹清晰,扩增信号强度基本一致,扩增条带密度分布均匀,说明以上

建立的 AFLP 反应体系适合进行黄瓜 AFLP 分析。该引物组合在 24 个材料间共扩增出 35 条稳定、清晰可辨的带纹,其中 4 条表现多态。

### 3 结论

综合以上试验结果表明:在 50  $\mu$ L 酶切连接体系中,取 300 ng 黄瓜基因组 DNA 进行双酶切(*Pst*I-*Mse*I)和接头连接,然后取 4  $\mu$ L 酶切连接产物进行预扩增(预扩增体系为 20  $\mu$ L),预扩增产物稀释 30 倍后,采用“2+3”选择性扩增引物组合用于选择性扩增可以得到很好的扩增效果。

#### 参考文献:

- [1] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprinting [P]. European Patent Application, Publication NO.0534 858A1, 1993.
- [2] 邵映田,牛永春,朱立煌,等.小麦抗条锈病基因 Yr10 的 AFLP 标记[J]. 科学通报, 2001, 46(8): 669-672.
- [3] Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G, et al. Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene Lr13 in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Genet and Breed, 2000, 54: 193-198.
- [4] Yang W, Weaver D B, Nielsen B L, et al. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in PeKing [J]. Plant Breeding, 2001, 120: 73-78.
- [5] 张桂华. 黄瓜白粉病抗性相关基因的分子标记研究 [D]. 陕西:西北农林科技大学, 2003.
- [6] Vos P, Hongers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.

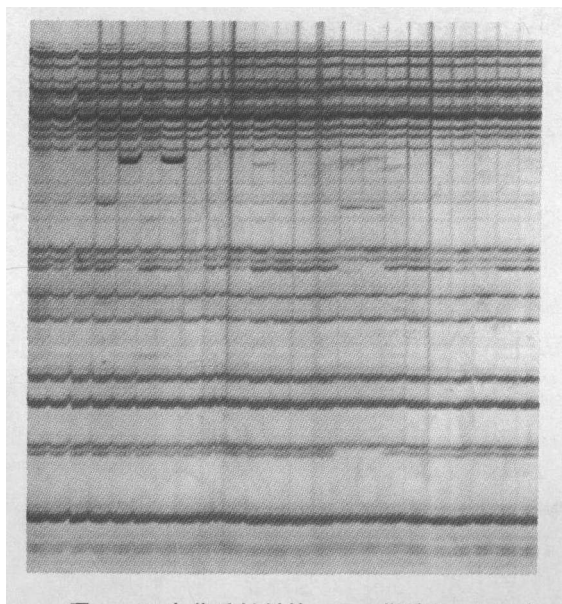


图2 24个黄瓜材料的 AFLP 指纹(P12M12)