ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报·2007, 22(4):108-111

# 禾本科作物基因组 AFLP 分析体系的建立及优化

焦 浈, 孙 营, 李 娜, 秦广雍

(郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 以禾本科作物小麦为出发材料, 通过优化 AFLP 选择性扩增步骤的 4 个限制性因素: $Mg^{2+}$ 浓度、dNTP 浓度、引物浓度和预扩产物稀释倍数, 确立 AFLP 最佳反应体系为: 预扩增产物稀释 20 倍吸取 2 μL 做为选择性扩增模板, 混合 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.4 μmol/L 选扩引物、1U Ex Taq 进行选择性扩增。应用该体系分析水稻和玉米两大类禾本科作物基因组 DNA 样品, 同样取得理想结果, 扩增出清晰可辨且适量的电泳条带。该技术体系为 AFLP 分子标记技术在禾本科作物遗传分析中的广泛应用奠定了基础。

关键词: AFLP; 选择性扩增; 禾本科作物; 小麦; 水稻; 玉米

中图分类号: S51 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0108-04

# Establishment and Optimization of AFLP System for Gramineous Crop Genome

JIAO Zhen, SUN Ying, LI Na, QIN Guang-yong

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** After studying the four factors of selective amplification, $Mg^{2+}$ concenctration, dNTP concenctration, primer concenctration and dilution times of pre-amplified product, the optimized system of AFLP for wheat was built: taking 2 μL of 20 times dilution of preamplification products as amplification template, adding 0.4 μmol/L of selective primer combinations, 1.5 mmol/L of $MgCl_2$, 0.2 mmol/L of dNTPs and 1U of Ex Taq polymerase. The AFLP system was confirmed by analyzing the genomic DNA of maize and rice. The results laid a foundation for broadly using the AFLP technology in genetic analysis of gramineous crops.

**Key words:** AFLP; Selective amplification; Gramineous crop; Wheat; Rice; Maize

扩增片断长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)技术是 1993 年由 Zabeau[1] 发现, 并由 Vos 发展起来的一项专利技术。其原理是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 限制性酶切片段[2]。AFLP 实质是 RFLP 和 RAPD 相结合的产物, 既具有 RFLP 的稳定性, 又有 RAPD 的灵敏性。多态性极其丰富, DNA 用量少, 检测效率高, 可靠性好, 重复性高, 是一种十分理想的分子标记。该技术目前已广泛应用于禾本科作物遗传图谱构建[3,4]、标记和定位目的基因[5,6]、种质资源鉴定[7,8]及遗传多样性分析[9,10]等研究领域, 有着广阔的应用前景。

由于 AFLP 技术涉及到基因组 DNA 的提取、限制性酶切、接头连接、预扩增、选择性扩增、凝胶电泳以及染色等诸多步骤, 应用中, 往往要花费大量的时间、药品及精力, 如果能够优化并确立一种广适性的 AFLP 技术体系将会大大减少前期的摸索性工作, 同时可以加快 AFLP 技术的推广应用。本研究室对 AFLP 各步骤进行体系优化研究时发现, 选择性扩增对最终试验结果影响最大。因此, 本研究以小麦为出发材料, 重点研究选择性扩增步骤的限制因素, 筛选出最佳反应体系, 从而为禾本科作物 AFLP 分子标记分析提供一种有效的技术体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 基因组 DNA 材料来源 小麦材料为豫麦 52 号, 水稻材料为香稻 1 号, 玉米材料为郑单 14 号。

1.1.2 主要试剂及产地 植物基因组 DNA 快速提

收稿日期: 2007-03-24

基金项目: 国家自然科学基金(10505018); 河南省自然科学基金(511030400)

作者简介: 焦 浈(1976-), 女, 河南新乡人, 博士, 副教授, 主要从事小麦遗传育种研究。

取试剂盒(北京鼎国)。酶类: *Eco*R Ⅰ(Promega)、*Pst* Ⅰ(Promega)、*Mse* Ⅰ(上海生工)、$T_4$ DNA 连接酶(Promega)、Ex Taq DNA 聚合酶(大连宝生物)。接头及引物由北京奥科生物合成。

选择性扩增引物为 *Eco*R Ⅰ+ACT, *Pst*Ⅰ+AAC, *Mse*Ⅰ+CAG, *Mse*Ⅰ+CTA, *Mse*Ⅰ+CTT。

**1.2　试验方法**

1.2.1　基因组 DNA 的提取　使用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒, 每个材料提取 15 个单株的基因组 DNA, 然后从每个单株 50 μL DNA 溶液中取出 5 μL 混成基因池, 做为 AFLP 分析的模板。

1.2.2　基因组 DNA 的检测　用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的质量。

1.2.3　限制性内切酶酶切与接头连接　选用 *Eco*R Ⅰ和 *Mse*Ⅰ双酶切小麦基因组 DNA, 选用 *Pst*Ⅰ和 *Mse*Ⅰ双酶切水稻、玉米基因组 DNA, 然后用 T4 DNA 连接酶将 *Eco*R Ⅰ、*Pst*Ⅰ、*Mse*Ⅰ接头与酶切片段连接起来, 做为预扩增的模板。

1.2.4　预扩增　以酶切连接产物为 DNA 模板, 用 *Eco*R Ⅰ、*Pst*Ⅰ和 *Mse*Ⅰ预扩引物进行预扩增。

1.2.5　选择性扩增　选用 *Eco*R Ⅰ+ACT 和 *Mse*Ⅰ+CAG 引物组合进行选择性扩增, 对 $Mg^{2+}$ 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度以及模板 DNA 的浓度设置梯度(表 1), 优化选择性扩增体系。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 筛选出最佳的浓度配比。

表 1　选择性扩增体系优化的变量梯度

**Tab.1　Regent concentration using for optimizing selective amplification**

| | $Mg^{2+}$ 浓度 / (mmol/L) $Mg^{2+}$ concentration | dNTPs 浓度 / (mmol/L) dNTPs concentration | 引物浓度 / (μmol/L) Primer concentration | 预扩产物稀释倍数 Dilute times of pre-amplified product |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.1 | 0.05 | 0.06 | 5× |
| 2 | 0.3 | 0.10 | 0.1 | 10× |
| 3 | 0.5 | 0.15 | 0.2 | 20× |
| 4 | 1.0 | 0.20 | 0.3 | 30× |
| 5 | 1.5 | 0.25 | 0.4 | 40× |
| 6 | 2.0 | 0.30 | 0.5 | 50× |
| 7 | 2.5 | | 0.6 | |
| 8 | 3.0 | | | |

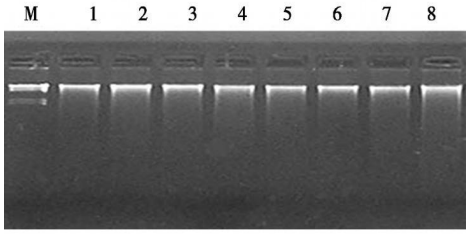
1.2.6　凝胶电泳　选择性扩增产物首先经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 证实是否有产物以及产物分子量的大概范围。然后进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.7　银染显色　参照文献[2]的方法并稍做改进。

## 2　结果与分析

**2.1　基因组 DNA 的质量**

高质量基因组 DNA 的制备和避免降解是 AFLP 成功的关键, 因为 AFLP 方法经过限制性酶切、预扩增后, 模板被纯化, 浓度显著提高, 所以对 DNA 浓度没有过高要求。但是如果模板 DNA 不纯会造成限制性酶切不完全, 从而产生不真实的多态性条带, 使试验结果失去真实性。因此, 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。本研究得到的基因组 DNA(图 1), 条带均一性好, 没有拖尾, 亮度相近, 说明 DNA 质量高, 完整性好, 适合做 AFLP 分析。




M. Marker; 1~8. 小麦单株基因组 DNA

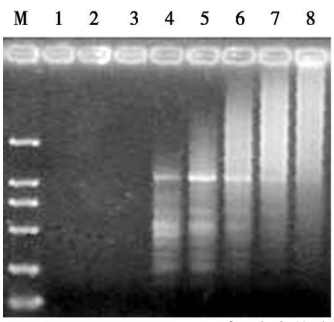
1~8 represent genomic DNA of single wheat plant

图 1　进行 **AFLP** 分析的小麦基因组 **DNA** 电泳图谱

**Fig.1　Pattern of wheat genomic DNA for AFLP analysis**

**2.2　$Mg^{2+}$ 浓度对选择性扩增的影响**

在扩增反应体系中, $Mg^{2+}$ 直接影响到 Taq DNA 聚合酶的活性, 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[11]。$Mg^{2+}$ 浓度过低时, 扩增产物减少甚至没有产物; $Mg^{2+}$ 浓度过高时, 非特异性扩增明显增加(图 2)。根据电泳结果, 确定 1.5 mmol/L $Mg^{2+}$ 为最佳浓度。




M. DNA Marker DL2000; 1~8: $Mg^{2+}$ 浓度依次为 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

1~8 represent different concentration of $Mg^{2+}$

图 2　不同 **$Mg^{2+}$** 浓度的选扩图谱

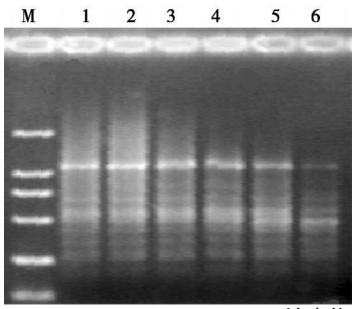
**Fig.2　Pattern of selective amplification using different concentration of $Mg^{2+}$**

**2.3　dNTPs 浓度对选择性扩增的影响**

dNTPs 浓度对扩增的影响效应与 $Mg^{2+}$ 正相反, dNTPs 浓度过低时, 造成非特异性扩增增加; dNTPs 浓度过高时, 扩增产物会逐渐减少(图 3)。根据电泳结果, 确定 0.2 mmol/L dNTPs 为最佳浓度。

**2.4** 选择性扩增引物浓度对选择性扩增的影响

一般认为,引物浓度越高,PCR 的扩增效率也越高。图4 表明,较低的选扩引物浓度得到的扩增产物较少,而随着选扩引物浓度的增加,扩增产物逐渐增多,但当引物浓度过高时,扩增出的片段会急剧变小,出现非特异性扩增。因此确定 0.4 μmol/L 选扩引物为最佳浓度。

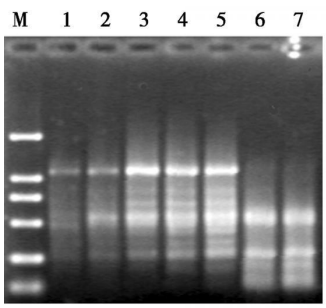



M. DNA Marker DL2000; 1~ 6. dNTPs 浓度依次为 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mmol/L

1- 6 represent different concentration of dNTP

图 **3** 不同 **dNTPs** 浓度的选扩图谱

**Fig. 3 Pattern of selective amplification using different concentration of dNTP**

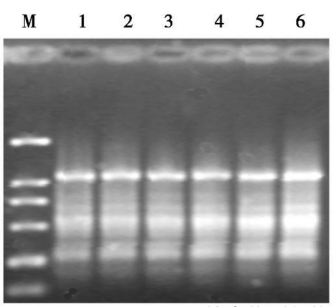



M. DNA Marker DL2000; 1~ 7. 引物浓度依次为 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μmol/L

1- 7 represent different concentration of primer

图 **4** 不同引物浓度的选扩图谱

**Fig. 4 Pattern of selective amplification using different concentration of primer**




M. DNA Marker DL2000; 1~ 6. 预扩产物稀释倍数依次为 5, 10, 20, 30, 40, 50 倍

1- 6 represent different dilute times of pre-amplified product

图 **5** 预扩产物稀释不同倍数的选扩图谱

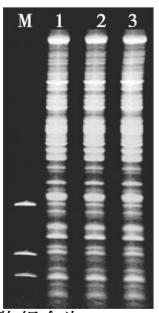
**Fig. 5 Pattern of selective amplification using different concentration of pre-amplified product**

**2.5** 模板 **DNA** 的浓度对选择性扩增的影响

因为 AFLP 对模板 DNA 质的要求远高于量,所以,模板 DNA 的量在数十倍的范围内变动都不会影响到扩增的结果。正如图 5 所示,预扩产物在稀释 5~ 50 倍作为模板进行选扩时,得到的扩增结果基本上一致,因此选择常用的稀释 20 倍作为模板。

**2.6** 条件优化后小麦 **AFLP** 分析体系的确立

通过对 AFLP 体系选择性扩增条件的优化选择,确立了适合于小麦基因组的 AFLP 反应体系。扩增产物首先经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳证实是否有产物,然后用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳及银染。银染显色后,每个泳道可呈现出 30~ 50 条谱带,条带清晰可辨,能检测到的片段大小在 200~ 1 500 bp 之间,结果如图6。AFLP 反应体系如下:




选扩引物组合为 *E*-ACT/*M*-CAG

M. Marker; 1~ 3. 豫麦52 号

Selective amplified primer combination is *E*-ACT/*M*-CAG; 1- 3 Yumai 52

图 **6** 小麦 **AFLP** 指纹图谱

**Fig. 6 The AFLP fingerprint of wheat**

2.6.1 限制性酶切反应体系(20 μL) $H_2O$ 12.9 μL, *Eco*R I Buffer H 1 μL, BSA(100×) 0.1 μL, *Mse* I Buffer R 1 μL, *Eco*R I(12 U/μL) 0.5 μL, *Mse* I(10 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA 4 μL。反应条件:混匀离心数秒, 37℃ 3 h, 80℃灭活 10 min, 4℃保存。

2.6.2 接头连接反应体系(20 μL) $H_2O$ 6.5 μL, *Eco*R I 接头(5 μmol/L) 1 μL, *Mse* I 接头(50 μmol/L) 1 μL, 10× $T_4$ Ligase Buffer 1 μL, $T_4$ Ligase(3 U/μL) 0.5 μL, 酶切产物 10 μL。反应条件:混匀离心数秒, 16℃ 12 h, 70℃ 10 min, 4℃保存。

2.6.3 预扩增反应体系(25 μL) $H_2O$ 14.8 μL, 10× Ex Taq Buffer 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2 μL, $MgCl_2$(25 mmol/L) 1.5 μL, *Eco*R I 预扩引物(5 μmol/L) 1 μL, *Mse* I 预扩引物(5 μmol/L) 1 μL, Ex Taq(5 U/μL) 0.2 μL, DNA 连接产物 2 μL。反应条件:混匀离心数秒, 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 80 s(30cycles); 72℃ 5 min; 4℃。

2.6.4 选择性扩增 预扩增产物用无菌水稀释 20 倍,作为选择性扩增的模板。

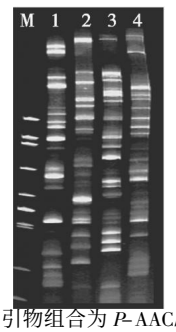
反应体系(25 μL): $H_2O$ 12.8 μL, 10× Ex Taq Buffer 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2 μL, $MgCl_2$(25

mmol/L) 1.5 μL, *Eco*R I 选扩引物(5 μmol/L) 2 μL, *Mse I* 选扩引物(5 μmol/L) 2 μL, *Ex Taq*(5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA 2 μL。

反应条件: 混匀离心数秒, 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 80 s (touch down0.7℃, 12cycles); 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 80 s (23cycles); 72℃ 5 min。

**2.7　AFLP 分析体系在水稻、玉米基因组遗传分析上的应用**

选用限制性内切酶 *Pst*I 和 *Mse*I 对香稻 1 号、郑单 14 号基因组 DNA 进行双酶切, 利用上文优化后确立的 AFLP 体系进行分析。6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 该体系同样适合于水稻、玉米的分析工作, 可以扩增出清晰可辨且适量的电泳条带(图 7)。




1, 2. 选扩引物组合为 *P*-AAC/*M*-CTA;
3, 4. 选扩引物组合为 *P*-AAC/*M*-CTT
M. Marker; 1, 3. 香稻 1 号; 2, 4. 郑单 14 号
Selective amplified primer combination of lane 1 and 2 is *P*-AAC/*M*-CTA; that of lane 3 and 4 is *P*-AAC/*M*-CTT; 1 and 3 represent Xiangdao No. 1; 2 and 4 represent Zhengdan No. 14

图 7　水稻、玉米 **AFLP** 指纹图谱

**Fig. 7　The AFLP fingerprint of rice and maize**

## 3　结论

AFLP 分子标记技术由于具有一次检出位点数多[12], 再现性好的特点[13], 早期经常被用来构建作物遗传图谱[3,4], 后来更广泛应用于禾本科作物进化[14]、群体遗传学[9,10]等研究。但这些研究使用的 AFLP 分析体系却不尽相同, 不利于该技术的推广应用。本试验在综合前人试验结果的基础上, 分析 AFLP 的技术特点, 首先以小麦基因组 DNA 为材料进行了 AFLP 体系优化, 同时将优化后的体系应用于水稻、玉米两大类禾本科作物基因组分析, 均得到较佳的试验结果, 扩增出清晰可辨且适量的电泳条带。由此可见, 经本研究优化建立的 AFLP 体系对于禾本科作物基因组分析是稳定有效的, 同时该技术体系也为 AFLP 分子标记技术在禾本科作物遗传分析中的广泛应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting[P]. Munich: European Patent Office, Publication 0-534-858-A1, 1993.

[2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.

[3] Qi X, Lindhout P. Development of AFLP markers in barley[J]. Molecular and General Genetics, 1997, 254: 330-390.

[4] Barbosa M M, Federizzi L C, Milach S C K, *et al*. Molecular mapping and identification of QTL's associated to oat crown rust partial resistance[J]. Euphytica, 2006, 150: 257-269.

[5] 张　超, 徐如宏, 思彬彬, 等. 用 AFLP 标记来自偏凸山羊草的抗条锈病新基因 *YrG*775[J]. 中国农业科学, 2006, 39(4): 673-678.

[6] Deng Zhi-yong, Zhang Xiang-qi, Wang Xian-ping, *et al*. Identification and molecular mapping of a stripe rust resistance gene from a common wheat line Qz180[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(2): 236-241.

[7] John R L, Paolo D, Robert M D K, *et al*. DNA profiling and plant variety registration III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms[J]. Euphytica, 1998, 102: 335-342.

[8] Bacon C D, Bailey C D. Taxonomy and conservation: a case study from *Chamaedorea alternans*[J]. Annals of Botany, 2006, 98(4): 755-763.

[9] Manifesto M M, Schlatter A R, Hopp H E, *et al*. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers[J]. Crop Science, 2001, 41: 682-690.

[10] 高世斌, 荣廷昭, 李晚忱, 等. 19 个玉米自交系的数量性状和 AFLPs 的遗传差异比较研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 24-27.

[11] 曹仪植. 植物分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 132-133.

[12] Breyne P, Rombaut D, Van Gysel A, *et al*. AFLP analysis of genetic diversity within and between Arabidopsis thaliana ecotypes[J]. Molecular and General Geneicst, 1999, 261: 627-634.

[13] Jones C J, Edwards K J, astaglione S C, *et al*. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a net work of European laboratation[J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 381-390

[14] Martos V, Royo C, Rharrabti Y, *et al*. Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain throughout the 20th century[J]. Field Crops Research, 2005, 91: 107-116.