

麻疯树AFLP体系的建立与优化*

张正银 刘波洋 陈放 唐琳**

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

摘要 为了建立麻疯树AFLP (Amplified fragment length polymorphism)反应体系及筛选出扩增条带丰富的引物,以17份来自不同地方的麻疯树的幼嫩叶片为试材,对影响AFLP分析的关键因素包括DNA的提取质量和浓度、*Mse*I/*Eco*RI酶切反应时间和浓度、银染方法等进行了研究,从64对引物组合中筛选出适合麻疯树的引物.结果表明,改良的CTAB方法提取的DNA质量比较好.建立了一种适于麻疯树AFLP的优化体系:模板DNA的用量为400 ng,酶切反应时间为3 h,筛选出了8对适合麻疯树扩增条带多、多态性强的引物.最终建立了适用于麻疯树的AFLP反应体系,并筛选出适合麻疯树的引物,为今后利用AFLP标记技术进行麻疯树的遗传多样性分析提供了标准化程序.图5 表2 参15

关键词 AFLP; 麻疯树; 银染体系; DNA提取

CLC Q949.753.503

Establishment of the Optimized AFLP Analysis System for *Jatropha curcas**

ZHANG Zhengyin, LIU Boyang, CHEN Fang & TANG Lin**

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The optimized AFLP (Amplified fragment length polymorphism) analysis system was established for *Jatropha curcas*. 17 lots of young leaves of *J. curcas* from different habitats were used to comparatively study and analyze their essential factors influencing the results of AFLP, including the quality and concentration of the extracted DNA, reaction time and concentration of enzymes *Eco*RI/*Mse*I and silver staining DNA in denaturing polyacrylamide gel. The results indicated that the extracted DNA by the improved CTAB method was good in quality; the dosage of template DNA was 400 ng; the reaction time of enzyme digestion was 3 h; the products of preamplification should be diluted for 10 times; and eight pairs of primers were selected from 64 pairs by screening repeatedly. By using the AFLP reaction system, primers suitable to *J. curcas* were screened out. Those results provide fundamentals for further molecular studies on *J. curcas* using AFLP marker. Fig 5, Tab 2, Ref 15

Keywords AFLP; *Jatropha curcas*; silver staining system; DNA extraction

CLC Q949.753.503

AFLP (Amplified fragment length polymorphism)标记是1992年由荷兰科学家Zabeau和Vos等在PCR和RFLP技术的基础上发展起来的一种DNA指纹分析技术,结合了RAPD标记多态性检测率高和RFLP标记稳定性好的优点.此项技术对于基因组多态性检测不需要预先知道该基因组的序列特征,易于标准化,检出的多态位点不仅能覆盖整个基因组,而且具有稳定性好、谱带丰富、DNA用量少和灵敏度高特点^[1]. AFLP一经产生后,便在树木的数量性状定位、种质资源鉴定、遗传连锁图谱构建、群体遗传结构及多样性研究、演化及亲缘关系研究等方面得到广泛的应用^[2].

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)属于大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属(*Jatropha*),为落叶灌木或小乔木,原产于热带美洲,分布于热带亚热带地区,在热带地区以绿篱的方式被广泛栽培,其种子对人类和动物具有毒性.麻疯树是一种抗旱耐瘠的多用途速生树种,是生产生物能源、生物农药的重要

原料,也是干热河谷地区荒山造林的好树种.麻疯树种子含油量高,种子油经过加工可生产柴油,其作为新型生物能源中的佼佼者,具有广泛的开发利用前景^[3,4].目前,尽管已经用SPAR^[5]、ISSR^[6-8]、RAPD^[8-10]等技术对麻疯树的遗传多样性进行了研究,但仍存在一些问题,由于研究手段的局限性及居群材料的不同,造成对麻疯树遗传多样性的评价也不一致^[5-9].因此,本研究利用AFLP技术对所收集的17份国内外麻疯树种质进行遗传多样性分析,以期建立起麻疯树AFLP体系的标准化程序及对麻疯树进行辅助育种.

1 材料与试剂

1.1 材料

本研究所用材料为采自国内外不同地区的麻疯树种质,见表1.

1.2 试剂与仪器

试剂:*Eco*RI、*Mse*I购自Biolabs, T₄ DNA ligase、*rTaq*酶、dNTPs购自TaKaRa(大连)有限公司.*Mse*I/*Eco*RI接头和引物由Invitrogen公司合成.亲和硅烷、剥离硅烷购自北京鼎国生物技术有限责任公司.其他试剂均为国产分析纯.

收稿日期: 2008-11-25 接受日期: 2008-12-15

*教育部博士点基金(No. 20060610015)资助 Supported by the Ph. D. Program Foundation of Ministry of Education of China (No. 20060610015)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangl66@sina.com)

表1 麻疯树种质来源
Table 1 Source locations of the *J. curcas* accessions

编号 No.	采集地点 Collection site	生长状态 Growth status
1	贵州贞丰 Zhenfeng, Guizhou	种子萌发 Seed germination
2	贵州册亨 Ceheng, Guizhou	种子萌发 Seed germination
3	四川攀枝花市 Panzhihua, Sichuan	种子萌发 Seed germination
4	四川西昌市 Xichang, Sichuan	山区 Mountain area
5	海南罗东 Luodong, Hainan	种子萌发 Seed germination
6	海南八所 Basuo, Hainan	种子萌发 Seed germination
7	海南海口市 Haikou, Hainan	种子萌发 Seed germination
8	云南丽江市 Lijiang, Yunnan	公路边 Roadside
9	云南永胜县 Yongsheng, Yunnan	公路边 Roadside
10	广西田阳县 Tianyang, Guangxi	公路边 Roadside
11	广西隆林县 Longlin, Guangxi	公路边 Roadside
12	马里 Mali, Africa	苗圃 Nursery
13	布基纳法索 Burkina Faso, Africa	苗圃 Nursery
14	印度尼西亚 A.B.A.B, Indonesia, Asia	苗圃 Nursery
15	印度尼西亚 LAMPVN LAMPVN, Indonesia, Asia	苗圃 Nursery
16	缅甸 Burma, Asia	种子萌发 Seed germination
17	老挝 Laos, Asia	种子萌发 Seed germination

仪器: Bio-Rad (MC013208) PCR扩增仪, Gene Genius Bio-imaging System凝胶成像仪, 北京六一仪器厂生产的DYCZ-20C型垂直电泳系统, UV-VIS Spectrophotometer (Tu-1901)型紫外分光光度仪。

2 方法

2.1 基因组DNA提取与DNA质量检测

采用改良CTAB法进行DNA的提取^[11]。取1 μ L总DNA进行1%的琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统检测DNA质量。然后用紫外分光光度仪分别测定其在260 nm、280 nm处的OD值。最后统一调整DNA浓度为200 ng/ μ L⁻¹。

2.2 麻疯树AFLP体系的建立

AFLP实验流程按Vos, P^[12]的方法进行, 略有修改。

2.2.1 基因组DNA的限制性酶切 选用EcoRI、MseI酶切组合来研究麻疯树的DNA多态性水平。样品DNA模板设计5个等次即100、200、300、400、500 ng。为了获得麻疯树基因组DNA双酶切的最佳时间, 将反应液混匀后置于37 $^{\circ}$ C分别酶切1、2、3、4 h以及酶切过夜。

2.2.2 接头连接 取20.9 μ L经过酶切的DNA样品, 加入EcoRI接头、MseI接头以及T₄DNA连接酶于16 $^{\circ}$ C连接过夜。一部分稀释10倍作为预扩增模板。

2.2.3 预扩增反应 取连接稀释后的DNA 3 μ L, 用EcoRI、MseI预扩增引物, rTaq酶进行预扩增。然后将预扩增产物稀释5、10、15、20倍置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.2.4 选择性扩增 分别取稀释5倍、10倍、15倍和20倍的预扩增产物各3 μ L进行选择性扩增。

2.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染参照文献[13~15]方法, 并稍做修改。

2.2.6 选择性引物筛选 筛选适于麻疯树的AFLP引物, 对64 (8 \times 8)对AFLP核心引物组合依次测试, 比较指纹图谱的清晰度与多态性。

3 结果与分析

AFLP技术步骤繁多, 需经总DNA提取、酶切连接、预扩增、选择性扩增、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染等一系列的步骤, 任何的不当操作都会直接影响实验的结果。

3.1 模板DNA的提取

首先, 提取高质量的DNA是实验成功的前提。高质量的DNA既要求DNA分子具备完整性, 又要符合严格的纯度要求。若DNA断裂, 酶切片断的结果显然不能代表真实的DNA结构, 指纹图谱的可靠性就会降低甚至完全不能反映真实的情况。所以, 模板DNA的制备是非常重要的一个环节。提取麻疯树DNA采用改良CTAB法, 在液氮研磨麻疯树幼嫩叶片的同时加入少量的PVP可有效防止多酚的氧化, 水浴后用氯仿:异戊醇(24:1)抽提两遍, 所得DNA进行1%琼脂糖凝胶电泳, 结果如图1所示: 1~3道均为麻疯树DNA, 所得的DNA完整, 没有杂带, 可用作后续试验, 说明改进CTAB法可用于麻疯树DNA的提取。而且, 经过测定, 改良CTAB提取的麻疯树DNA的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值在1.8左右, 说明经改良的CTAB法所提DNA纯度是很高的, 可以用来进行麻疯树AFLP分析。

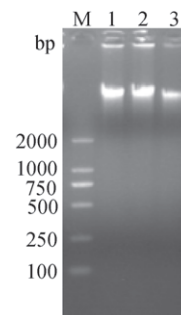


图1 DNA琼脂糖凝胶电泳检测
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA samples
1~3道均为麻疯树DNA Lanes 1~3: Extracted DNA from *J. curcas*

3.2 模板DNA浓度的确定

由于AFLP技术对模板浓度不敏感, 在一定模板浓度范围内都能得到理想的结果^[12], 所以从节约的目的出发, 确定一个能得到满意结果的酶切模板浓度即可。酶切时设计了DNA的量100、200、300、400、500 ng共5个梯度, 酶切结果如图2。从图2可以看出, DNA 100 ng、200 ng的酶切产物十分少, 其余则都获得了较为理想的酶切片段。所以麻疯树AFLP分析DNA模板用量以300~500 ng为宜, 太少其产物的量不够, 太多则容易导致酶切不充分。考虑到经济的因素, 确定麻疯树AFLP反应体系最佳的DNA用量为400 ng。

3.3 酶切时间对酶切反应的影响

AFLP结果的准确性主要取决于DNA酶切的彻底性和接头连接的充分性, 基因组DNA是否被完全酶切影响着最终结果。如果DNA酶切不完全, 酶切片段覆盖不了整个基因组, 反映的不是真实的多态性, 也就难以建立真实的分子指纹图谱。酶切时间的长短是影响模板DNA能否酶切充分和完全的一个重要因素, 不同种类的植物由于基因组大小不同, 酶切时间长短也有差异。经1%琼脂糖凝胶电泳后的结果如图3: 1~4道分别为酶切1、2、3、4 h产物, 5道为酶切过夜产物, 其带型都相同, 说明1 h就能将麻疯树DNA切开。随着时间进

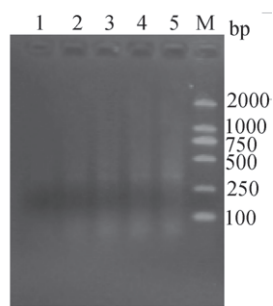


图2 DNA双酶切检测

Fig. 2 Detection of DNA double enzymes digestion

1~5道的DNA量依次为100、200、300、400、500 ng

Lanes 1~5: Digestied DNA of 100, 200, 300, 400 and 500 ng, respectively

一步延长, 酶切产物的分子量越来越小, 浓度也就越来越大. 由此可见, 适当增加酶切时间, 可以提高酶切效果. 但是时间过长, 势必延长整个试验周期. 为了节省时间并且保证双酶切的充分, 确定酶切时间为2~3 h. 双酶切充分后, 进行连接.

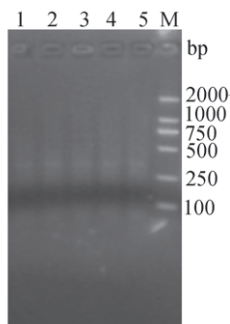


图3 DNA不同双酶切时间的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of DNA double enzyme digestion at different times

1~4道分别为双酶切1、2、3、4 h产物; 5道为双酶切过夜产物

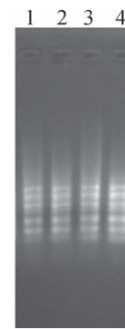
Lanes 1~4: Products of enzyme digestion from 1, 2, 3, 4 h, respectively; Lane 5: Products of enzyme digestion after one night

3.4 预扩增产物稀释倍数的影响

由于预扩增引物3'端只带有一个选择性碱基, 其选择扩增性能较差, 因此大量的扩增产物在琼脂糖凝胶中往往形成连续的弥散带, 需进一步进行选择性的扩增. 预扩增反应产物进行稀释后用作选择性扩增反应的模板, 用M-CAT/E-ACA引物组合进行选择性的扩增, 其产物琼脂糖凝胶电泳结果如图4, 1~4道的模板分别为稀释20、15、10、5倍的预扩增产物. 从图5中可看出, 稀释5、10、15、20倍的预扩增产物都可以得到比较稳定的选择性扩增条带. 虽然AFLP对DNA的浓度要求不严格, 但低于 $1 \times 10^{-12} \text{ g } \mu\text{L}^{-1}$ 时得到的AFLP指纹样式往往不可靠^[2], 因此确定预扩增产物的稀释倍数为10倍.

3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染

在选择性扩增后, 用5%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后银染. 在整个银染过程中都需要注意水温. 在电泳结束后的第一次固定中(尤其在冬季), 必须使水温达到一定温度, 否则显影时会出现整个胶板发黄现象, 固定效果不好. 同时在显影时也要控制显影液的温度(一般为 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右), 否则室温下(夏季)会造成显影后胶板下部的条带发虚. 掌握好染色

图4 不同稀释倍数的模板的选择性扩增产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of the selective amplification products with different diluted templates

1~4道分别为以稀释20、15、10、5倍的预扩增产物为模板的选择性扩增产物 Lanes 1~4: The selective amplification products of the preamplification products of diluted by 20, 15, 10, 5 times respectively as template

后漂洗时间和显色时间, 在染色结束后的漂洗时间不要超过10 s, 否则显影时造成“白板”或者染色较浅, 不易分辨. 部分银染结果如图5, 该图为第2次引物筛选银染结果, 可见条带清晰、丰富.

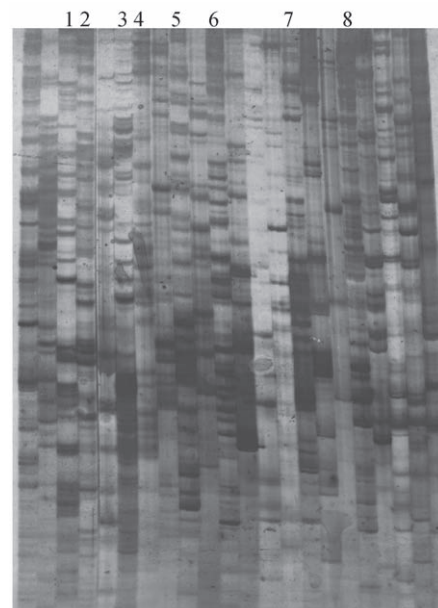


图5 第2次引物筛选银染结果

Fig. 5 Silver-staining result of the second screened primers
1~8道为筛选出的8对引物 Lanes 1~8: The screened out 8 pairs of primer

3.6 选择性引物的筛选

对一个个体的DNA, 用64对引物进行扩增, 筛选出22对扩增条带丰富且多态性较好的引物. 再用所有个体的混合DNA, 用这22对引物进行复筛, 得到8对扩增条带丰富、均匀、多态性好的引物(表2). 第2次引物筛选结果见图5, 图中标号1~8为所筛选出的引物, 与表2中的引物相对应.

4 小结

由于AFLP实验流程较长, 步骤较多, 涉及因素也较多, 所以具体操作中容易出现. 为了成功建立麻疯树AFLP体系, 在实验中必须严格按实验流程操作, 特别应注意以下几

表2 筛选出的8对选择性扩增引物
Table 2 List of 8 pairs of screened primers

编号 No.	Mse I 引物 Primer	EcoRI 引物 Primer
1	M-CAG	E-AAG
2	M-CAA	E-ACT
3	M-CTG	E-ACA
4	M-CAA	E-ACC
5	M-CAT	E-ACA
6	M-CAG	E-AGG
7	M-CAT	E-AGG
8	M-CTA	E-AAG

点: ① DNA的质量是体系建立成功的前提. 所以提取材料最好选用幼嫩部分, 为了防止多酚氧化, 在液氮研磨时应加入少量的PVP. ② 掌握好酶切和连接时间. AFLP结果的准确性主要取决于DNA酶切的彻底性和接头连接的充分性, 所以, 酶切要彻底, 连接要充分. ③ PAGE胶的制备中, 玻璃板必须洗干净, 以免产生气泡而影响点样和观察. 同时, 胶的厚薄要均匀, 否则条带易倾斜, 同时显影时也会造成条带出现时间不一致. ④ 在整个银染过程中要注意温度对结果的影响, 尤其在冬季, 低温下所用试剂醋酸、甲醛溶液等会发生聚合, 降低活性, 会严重影响试验结果. ⑤ 要掌握好染色后漂洗时间和显影时间, 在染色结束后的漂洗时间不要超过10 s.

综上所述, 我们成功建立了适用于麻疯树的AFLP体系, 为以后利用AFLP技术对麻疯树进行遗传多样性研究提供了标准化的程序, 以及对麻疯树进行辅助育种.

References

- Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting: European patent, 0534 858B1. 1993-03-31
- 周延清. DNA分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005
- Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. *Biomass & Bioenergy*, 2000, **19**: 1~15
- Kumar A, Sharma S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Ind Crops & Products*, 2008, **28**: 1~10
- Ranade SA, Srivastava AP, Rana TS, Srivastava J, Tuli R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass & Bioenergy*, 2008, **32**: 533 ~540
- He W (何伟), Guo L (郭亮), Wang L (王岚), Yang W (杨威), Tang L (唐琳), Chen F (陈放). ISSR analysis of diversity of *Jatropha curcas* L. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (4): 466~470
- Xiang ZY (向振勇), Song SQ (宋松泉), Wang GJ (王桂娟), Chen MS (陈茂盛), Yang CY (杨成源), Long CL (龙春林). Genetic diversity of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) collected from southern yunnan, detected by inter-simple Sequence Repeat (ISSR). *Acta Bot Yunnanica* (云南植物研究), 2007, **29** (6): 619~624
- Basha SD, Sujatha M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 2007, **156**: 375~386
- Ram SG, Parthiban KT, Kumar RS, Thiruvengadam V, Paramathma M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol*, 2008, **55**: 803~809
- Sun Q (孙晴), Xu Y (徐莺), Yan F (颜钊), Chen F (陈放). Factors in RAPD analysis of *Jatropha curcas* L. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2002, **8** (3): 259~261
- 彭学贤. 植物分子生物技术应用手册. 北京: 化学工业出版社, 2006. 60~67
- Vos P, Hogers R, Blecker M, Reijmans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, **23** (21): 4407~4414
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl Biochem & Biotechnol*, 1993, **42**: 181~188
- Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protocols*, 2007, **2** (11): 2649~2654
- Byun SQ, Fang Q, Zhou H, Hickford JGH. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 2009, **385**: 174~175