

隐性核不育芝麻 AFLP 反应体系的优化

杨敏敏 刘红艳 左 阳 赵应忠

中国农业科学院油料作物研究所/农业部油料作物生物学重点开放实验室, 武汉 430062

摘要 以芝麻细胞核雄性不育系 95ms-5 为材料,对 AFLP 反应体系中的酶切连接、预扩增和选择性扩增中的关键性因素进行了优化。结果表明,在模板 DNA 质量浓度为 200 ng/ μ L、37 $^{\circ}$ C 酶切连接 6 h 的情况下,预扩增中最佳 Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L,dNTP 最佳浓度为 0.3 mmol/L,*Taq* 酶量以 0.5 U 为宜,预扩增引物终浓度为 0.4 mmol/L;选择性扩增中,预扩增产物稀释 10 倍后,以 Mg^{2+} 0.8 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、*Taq* 酶 1.0 U、选扩引物 0.6 mmol/L 为宜。

关键词 油料作物; 芝麻; AFLP; 反应体系; 优化

中图分类号 S 565.350.353 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0667-04

芝麻(*Sesamum indicum* L.)属于胡麻科胡麻属植物,是我国重要的优质油料作物之一。扩增片段长度多态性(AFLP)是限制性片段长度多态性(RFLP)与随机扩增多态性(RAPD)相结合的一种分子标记技术,AFLP 标记具有不需要预先知道基因组背景、多态位点丰富、灵敏度高和重复性好等优点,因此被称为最有力的分子标记^[1-2]。自 1995 年以来,该技术已被广泛应用于植物分子遗传图谱的构建和重要性状基因定位^[3-5]、植物遗传结构和遗传多样性分析^[6-7]、分子标记辅助选择育种^[8-11]。AFLP 作为目前最有发展前景的标记技术之一,在芝麻上 AFLP 分子标记的优化,国内还未见报道。本试验在前人研究工作的基础上,对芝麻 AFLP 分子标记体系进行优化,为进一步开展芝麻分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

芝麻隐性细胞核雄性不育系 95ms-5,由中国农科院油料作物研究所培育。

1.2 方 法

1)模板 DNA 的制备与检测。采用改良 CTAB 法提取 DNA;参照陆光远等^[12]的方法,用水溶性的

PVP 代替水不溶的 PVPP,在提取之前向提取液中加入 1% β -巯基乙醇,以防止植物组织中酚类的氧化。DNA 沉淀用无水乙醇代替异丙醇,并同时加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠。DNA 浓度和质量用 1%琼脂糖胶检测,同时用 NanoDrop 微量分光光度计(DN2000)定量测定 DNA 的浓度和 *D* 值,根据测定值将样品质量浓度稀释到 200 ng/ μ L,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2)预扩增反应。预扩增反应体系:总体积为 10 μ L,连接产物 2.00 μ L,10 \times Buffer 1.0 μ L、25 mmol/L Mg^{2+} 0.8 μ L、10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, *Taq* DNA Polymerase 0.5 U,引物 P0/MC (50 mg/L)各 0.4 μ L 作为基础体系。采用单因素试验设计进行优化。

单因素设计优化:对 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶和引物浓度分别设 5 个浓度梯度(表 1),每次改变预扩体系中的 1 个因素,以确定该因素对 AFLP 预扩增结果的影响。

预扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min;10 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

3)选择性扩增反应及其优化。预扩增产物稀释一定倍数后进行选择性扩增,选择性碱基数为 3。

收稿日期:2011-05-18

基金项目:国家科技支撑计划项目(2009BADA8B04),国家芝麻产业技术体系(CARS-15-1-03),湖北省自然科学基金重点项目(2010-35)和中国农业科学院油料作物研究所所长基金项目(1610172011007)

杨敏敏,硕士,实习研究员,研究方向:芝麻分子生物技术, E-mail: yangminminyls@sina.com

通讯作者:赵应忠,研究员,研究方向:芝麻遗传育种, E-mail: yingzhzh@public.wh.hb.cn

表 1 预扩增各因素处理方案

Table 1 Different treatments of pre-amplification factors				
因素 Factor	25 mmol/L Mg ²⁺ / (mmol/L)	10 mmol/L dNTPs/ (mmol/L)	Taq DNA polymerase/ U	10 mmol/L 引物 P0/Mc/ (mmol/L)
1	0.4	0.1	0.5	0.2
2	0.6	0.2	1.0	0.4
3	0.8	0.3	1.5	0.6
4	1.0	0.4	2.0	0.8
5	1.2	0.5	2.5	1.0

反应体系为:总体积 10 μ L,稀释后的预扩增产物为 2.00 μ L,10 \times Buffer 1.0 μ L,25 mmol/L Mg²⁺ 0.8 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L,Taq DNA Polymerase 5 U,引物 P02/M10(10 mmol/L)0.4 μ L 作为基础体系。采用单因素试验设计进行优化。

单因素设计优化:同预扩增方案。

选择性扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C (每个循环降 0.7 $^{\circ}$ C)30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,13 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,26 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min;10 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

表 2 选择性扩增各因素处理方案

Table 2 Different treatments of selective amplification factors					
因素 Factor	稀释倍数 Diluted times	25 mmol/L Mg ²⁺ / (mmol/L)	10 mmol/L dNTPs/ (mmol/L)	Taq DNA polymerase/ U	10 mmol/L 引物 P0/Mc/ (mmol/L)
1	2.5	0.4	0.1	0.5	0.2
2	5	0.6	0.2	1.0	0.4
3	10	0.8	0.3	1.5	0.6
4	15	1.0	0.4	2.0	0.8
5	20	1.2	0.5	2.5	1.0

4)PAGE 电泳及银染检测。反应结束后,选择性扩增产物与上样缓冲液[体积分数为 98%甲酰胺;10.0 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),pH 8.0;体积分数为 0.25%溴酚蓝;体积分数为 0.25%二甲苯青]等体积混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后迅速将 PCR 管置于冰上待用。恒定功率 80 W 预电泳 10 min 后,取 4 μ L 变性液加到 6%聚丙烯酰胺凝胶中电泳 70 min。经凝胶固定、银染、显影,得到 AFLP 扩增的 DNA 谱带。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取与检测

CTAB 法提取的芝麻叶片 DNA 经过琼脂糖凝胶电泳检测,条带十分清晰明亮且无拖尾、背景干扰

等现象,表明蛋白质等杂质去除较干净,纯度较高。经测定,吸光度 D_{260}/D_{280} 比值在 1.8~1.9 之间;用量为 200 ng。

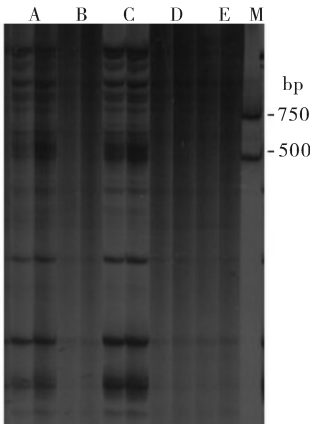
2.2 预扩增体系优化

试验结果表明,Mg²⁺ 的浓度从 0.4 到 1.0 mmol/L,扩增弥散带逐渐变亮;但增加至 1.2 mmol/L,弥散带反而变暗。高 Mg²⁺ 浓度有增加非特异扩增的趋势,使产物不稳定,因此确定最佳 Mg²⁺ 的浓度为 1.0 mmol/L。

反应体系中 dNTPs 浓度为 0.3、0.4 mmol/L 时,扩增弥散带都比较亮,产物量比较稳定,弥散带均匀。因此,综合考虑试验成本和扩增效率,选择 dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L。Taq 酶酶量为 0.5、1.0 U 时,扩增产物稳定,弥散带均匀;Taq 酶酶量为 1.5、2.0、2.5 U 时,预扩增产物不稳定。因此,选择 Taq 酶酶量 0.5 U。引物浓度为 0.4 mmol/L 时条带最清晰明亮,因此确定预扩增引物浓度为 0.4 mmol/L。

2.3 选择性扩增体系优化

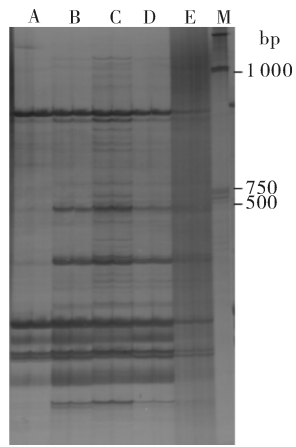
对预扩增产物稀释倍数及选择性扩增反应各因素进行优化试验。将预扩增产物稀释后进行 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果显示:预扩增产物稀释 10 倍时(图 1),条带最清晰;选择性扩增体系中各关键因素的最适用量为 Mg²⁺ 0.8 μ L(图 2)、dNTP 0.2 μ L、Taq 酶 1.0 U、选扩引物 0.6 μ L。



M. DL 2 000 marker; A、B、C、D、E. 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 倍 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 times.

图 1 不同稀释倍数的选择性扩增

Fig.1 Different selective amplification results with different dilution multiple

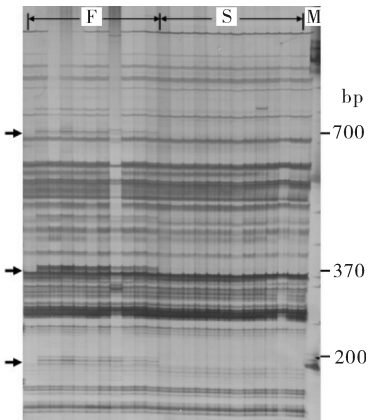


M, DL 2 000 marker; A, B, C, D, E. 0. 4, 0. 6, 0. 8, 1. 0, 1. 2 mmol/L.

图 2 不同 Mg^{2+} 浓度选择性扩增
Fig.2 Selective amplification by using different concentration of Mg^{2+}

2.4 最佳反应体系的确定及应用

综合试验结果,初步确立了适合芝麻的 AFLP 反应体系。以芝麻小凡 13 为材料,对最佳反应体系进行验证。由图 3 可以看出,利用该优化体系,扩增后谱带稳定,多态性条带丰富,为芝麻 AFLP 分子标记分析等后续的研究工作奠定基础。



M, DL 2 000 marker; F, 可育株 Fertile plants; S, 不育株 Sterile plants.

图 3 选择性扩增结果

Fig.3 Results of selective amplification by primer

因此,采用 CTAB 法提取的 DNA 质量较好,酶切的基因组 DNA 以 200 ng 为宜,37 °C 条件下酶切时间为 6 h 较理想;预扩增产物的稀释倍数以 10 倍为宜;在 10.0 μ L 预扩反应体系中 Mg^{2+} 的浓度为 1.0 mmol/L, dNTP 浓度为 0.3 mmol/L, *Taq* 酶量为 0.5 U, 引物浓度为 0.4 mmol/L;在 10.0 μ L 选扩反应体系中 Mg^{2+} 的浓度为 0.8 mmol/L,

dNTP 浓度为 0.2 mmol/L, *Taq* 酶量为 1.0 U, 引物浓度为 0.6 mmol/L。

3 讨 论

基因组 DNA 的质量是进行 AFLP 分析成败的决定性因素,因此分离到高质量的基因组 DNA 至关重要^[13]。芝麻叶含有较多的糖分,特别容易褐化。本研究在 CTAB 法的基础上进行改良,加入 PVP 和 β -巯基乙醇,有效地防止了芝麻 DNA 的酚类氧化;在 DNA 沉淀之前加入 1/10 体积 3 mol/L NaCl,有效地去除凝胶状物质^[14],获得较高质量芝麻基因组 DNA。

目前,酶切—连接反应的“一步法”和“两步法”均有报道^[15],在本试验中多次比较了这 2 种方法,结果发现“一步法”完全可以得到供 AFLP 研究的理想模板,同时缩短了实验周期,提高了工作效率^[16]。

用氢氧化钠显影,显色速度快,背景为淡黄色, DNA 条带为棕褐色,对比明显,条带清晰可见。显影过程中发现显影液对温度比较敏感,显影液温度过低会导致显影不充分,谱带不清晰,甚至分子质量较小的 DNA 片段显不出来;显影液温度过高则胶面颜色暗黑,背景污浊;影响统计,夏天需放入 -4 °C 冰箱中备用;冬天显影液需要在显影之前温水预热 15~20 min。银染液需用棕色瓶装入备用,不需预热或冷藏。

酶切时模板以 200 ng 为宜,酶切时间为 6 h。预扩是一承上启下的步骤,既可以检测酶切和连接的效果,又可以对选择性扩增模板起到纯化的作用。预扩产物的稀释倍数对于选择性扩增的成败非常重要,本研究中稀释 10 倍后的电泳谱带清晰,便于读取,其他稀释倍数下的扩增条带数目少、不清晰且扩增结果不稳定。

参 考 文 献

[1] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
[2] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及应用 [J]. 杂交水稻, 1996 (5): 27-30.
[3] 贾建航, 李传友, 邓启云, 等. 用 AFLP 标记快速构建遗传连锁图谱并定位一个新基因 *tms5* [J]. 植物学报, 2003, 45 (5): 614-620.

[4] 黄秦军,苏晓华,黄烈健,等. 美洲黑杨×青杨木材性状 QTLs 定位研究[J]. 林业科学,2004,40(2):55-60.

[5] 谭晓风,冯晓黎,胡芳名,等. 银杏 16 个主要栽培品种的分子鉴别[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):35-39.

[6] BARRETT B A,KIDWEEL K K. AFLP-based genetics diversity assessment among wheat cultivars from the pacificnorth wheat[J]. Crop Science,1998,38:1261-1271.

[7] 王淑霞,胡运乾,周浙昆. 灰背栎遗传多样性和遗传结构的 AFLP 指纹分析[J]. 云南植物研究,2005,27(1):49-58.

[8] 王晓梅,宋文芹,刘松,等. 利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记[J]. 南开大学学报:自然科学版,2001,34(1):5-9.

[9] 张智俊,谭晓风,陈永忠. 油茶总 RNA 及 mRNA 的分离与纯化[J]. 中南林学院学报,2003,23(2):76-81.

[10] 陈永忠,张智俊,谭晓风. 油茶优良无性系的 RAPD 分子鉴别[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):44-49.

[11] 温强,叶金山,雷小林,等. 油茶 ISSR 体系建立及优化[J]. 中南林学院学报,2006,26(6):22-26.

[12] 陆光远,杨光圣,傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育基因的 AFLP 标记[J]. 作物学报,2004,30(2):104-105.

[13] 易干军,霍合强,蔡长河,等. 适于 AFLP 分析用的荔枝 DNA 提取方法[J]. 华南农业大学学报,1999,20(3):123-124.

[14] 顾蔚,魏南玉,代立娟,等. 华中五味子干燥材料 DNA 提取方法的研究[J]. 生物技术,2007,17(6):25-27.

[15] 雷永,廖伯寿,王圣玉. 花生 AFLP-银染体系的建立与优化[J]. 花生学报,2003,3(2):301-305.

[16] 刘秀菊,任俊云,宗绪晓,等. 蚕豆 AFLP 技术体系的建立与优化[J]. 植物资源学报,2007,8(2):153-158.

Optimization of AFLP reaction system
in recessive-male sterile *Sesamum indicum* L.

YANG Min-min LIU Hong-yan ZUO Yang ZHAO Ying-zhong
*Oil Crops Research Institute,CAAS/Key Laboratory of Oil Crop
Biology of the Ministry of Agriculture,Wuhan 430062,China*

Abstract Key factors affecting the digestion-ligation,pre-amplification and selective amplification in amplified fragment length polymorphism(AFLP) analysis in sesame (*Sesamum indicum* L.) were optimized. Results showed that the best protocol was 200 ng/ μ L template DNA,digestion-ligation at 37 $^{\circ}$ C for 6 h,1.0 mmol/L Mg^{2+} ,0.3 mmol/L dNTP,0.5 U *Taq* DNA polymerase in the pre-amplification system and pre-amplification products diluted by 10 times,1.0 mmol/L Mg^{2+} ,0.2 mmol/L dNTP,and 1.0 U *Taq* DNA polymerase,0.6 mmol/L primers in the selective amplification.

Key words oil crops; *Sesamum indicum* L.; AFLP; reaction system; optimization

(责任编辑:杨锦莲)