

荧光标记 DNA 扩增片段长度多态性方法的改进

杨 凯^{1)*} 宋 婉²⁾ 张春庆³⁾ 贾继增¹⁾

(¹⁾ 中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; ²⁾ 北京林业大学生物学院, 北京 100083; ³⁾ 山东农业大学农学系, 济南 200000)

摘要 采用常规 PCR 试剂和合成的接头和引物, 其中 *Mse*I 引物为荧光标记物 FAM 标记, 并对扩增片段长度多态性 (AFLP) 程序进行了改进, 优化了 PCR 反应和电泳条件, 建立了一个新的、有效的反应体系, 降低了实验费用, 经比较实验结果与 AFLP 荧光标记试剂盒的实验效果一致。

关键词 自动测序, 荧光标记引物, 扩增片段长度多态性 (AFLP)

学科分类号 Q 503

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是 RFLP 与 PCR 相结合的一种技术, 该技术由 Zabeau 等 1992 发明, 并于 1993 年获得欧洲专利局专利, 专利权归属荷兰 Keygene 公司. 它具有快速、可靠、稳定、信息量大、无序列特异性等特点, 被广泛应用于构建高密度遗传图谱、鉴定作物品种纯度、绘制指纹图谱等研究^[1].

利用自动测序仪 (ABI-377) 可以使用多色荧光标记的 AFLP 引物, 在同一反应中可较传统方法得到更多信息. 同时在电泳时加入标记的内标 (分子质量标准品), 可以消除泳道间的电泳差异, 从而增加检测的精度. 自动测序仪的使用增加了 AFLP 的检测精度和自动化程度.

目前在自动测序仪上使用比较多的 AFLP 指纹图谱试剂盒是 PE 公司系列优化生产的试剂盒之一, 已在多种植物中应用, 但价格相对较高.

本实验选用常规 PCR 试剂和合成的标记引物来取代试剂盒, 并对实验仪器、实验步骤和条件进行了优化, 对简化实验步骤、降低实验成本进行了摸索, 使实验效果与使用试剂盒的实验效果基本一致.

1 材料和方法

1.1 材料

引物和接头: 由上海申工公司合成.

*Eco*RI-00: 5'-GACTGCGTACCAATT ;
*Eco*RI-ACT: 5'-GACTGCGTACCAATTACT ;
*Eco*RI-ACA: 5'-GACTGCGTACCAATTACA ;
*Eco*RI-AAC: 5'-GACTGCGTACCAATTAAAC ;
*Eco*RI-ACC: 5'-GACTGCGTACCAATTACC ;

*Eco*RI-AGC: 5'-GACTGCGTACCAATTAGC ;
*Eco*RI-AAG: 5'-GACTGCGTACCAATTAAAG ;
*Eco*RI-AGG: 5'-GACTGCGTACCAATTAGG ;
*Eco*RI-ACG: 5'-GACTGCGTACCAATTACG .
*Mse*I-00: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA ;
FAM-*Mse*I-CAA: FAM-GATGAGTCCTGAGTAA ;
FAM-*Mse*I-CAC: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACAC ;
FAM-*Mse*I-CAG: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACAG ;
FAM-*Mse*I-CAT: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACAT ;
FAM-*Mse*I-CTA: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACTA ;
FAM-*Mse*I-CTC: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACTC ;
FAM-*Mse*I-CTG: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACTG ;
FAM-*Mse*I-CTT: FAM-GATGAGTCCTGAGTAACTT .
*Mse*I接头 0: 5'-GACGATGAGTCCTGAG ;
5'-TACTCAGGACTCAT .
*Eco*RI接头: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC ;
5'-AATTGGTACGAGTCTAC .

Taq, dNTP 购于北京华美公司. *Mse*I、*Eco*RI 为 New england Biolabs 公司产品. 枣 (*Jijube*) DNA 由北京林业大学宋婉博士提供. 荧光标记物 FAM 和内标购于 PE 公司.

1.2 AFLP 方法

依照 KeyGene 公司和 PE 公司 AFLP 实验程序并改进 (AFLPTM Plant Mapping Protocol, PE Applied Biosystems, AFLP Protocol for Public Release, KeyGene, Version 2.1, March 1994.).

1.3 电泳及荧光检测

检测在 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪上进

* 通讯联系人.

Tel: 010-62186654, E-mail: yangkai@ht.rol.cn.net

收稿日期: 2000-04-24, 接受日期: 2000-06-07

行, 样品的处理和检测过程依 PE 公司所提供的方法进行.

2 结果和讨论

2.1 AFLP 实验方法的改进

2.1.1 酶切连接: 由于接头上没有内切酶的切点, 所以本实验选用酶切连接在同一反应进行的方法, 使用与 *Mse* I 配套的 10 × NEB 缓冲液, 此时 *Mse* I 具有 100% 的活性而 *Eco*RI 具有 75% 的活性, 所以可适当增加 *Eco*RI 的用量; 反应体积降低到 20 μL, 可以减少实验费用. 由于反应过程中有一些水分蒸发, 同时 DNA 样品中可能有反应干扰物的存在, 所以反应体积不宜低于 20 μL. 经过多次实验对比, 没有发现用这种方法与 KeyGene 和 PE 公司的酶切、连接方法在结果上存在差异.

酶切、连接反应总体积 20 μL, 其中成分为: 基因组 DNA 200 ~ 300 ng; 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); 10 mmol/L MgAc, 50 mmol/L KAc, 5 mmol/L DDT, 50 mg/L BSA, *Mse*I 2 单位; *Eco*RI 3 ~ 40 单位; 1 pmol/L *Mse*I 接头; 1 pmol/L *Eco*RI 接头; 1 mmol/L ATP; T4 DNA 连接酶 1 单位. 25 °C 反应 12 h. 产物-20 °C 保存, 备用.

2.1.2 预扩增: 预扩增 PCR 溶液含: 10 mmol/L

Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L KCl, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, 30 ng *Mse* I -00 引物, 30 ng *Eco*RI -00 引物, Taq 酶 1 单位, 5 μL 酶切连接产物 (大约含 50~80 ng DNA 模板). 混匀后, 进行 PCR 反应, 扩增条件为 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s; 25 个循环. 产物稀释 20 倍后可在-20 °C 条件下保存 2~3 个月.

2.1.3 选择扩增: 选择扩增 PCR 反应液含: 稀释后的预扩增产物 5 μL, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L KCl, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, 12.5 ng FAM-*Mse* I 引物, 3 ng *Eco*RI 引物, Taq 酶 1 单位. 混匀后, 进行 PCR 反应, 扩增条件为 94 °C 30 s, 65 °C 30 s (每循环减低 0.7 °C), 72 °C 60 s, 15 个循环; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s, 20 个循环; 60 °C 20 min. 扩增产物 4 °C 保存, 备检测用.

由于使用 AFLP 检测的样品的基因组大小不同, 对小基因组采用 *Mse* I / *Eco*RI 酶切, 对大基因组采用 *Mse* I / *Pst* I (Sse I) 酶切的方式, 为满足不同酶切的 DNA 样品在自动测序仪 (ABI-377) 上的 AFLP 检测, 本实验使用 FAM 标记的 *Mse* I 引物, 从实验效果上看, 与试剂盒标记 *Eco*RI 引物的效果一致 (图 1). 但标记 *Mse* I 引

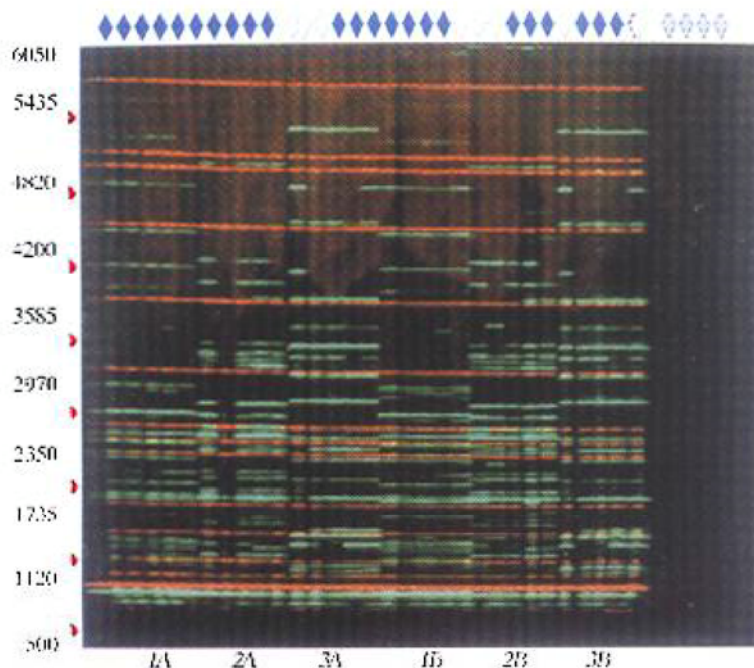


Fig.1 The compare of the effects of AFLP

A: The effects of AFLP kits (PE Biosystem); B: The effects of AFLP by using synthesized fluorescent labeled primers; 1A, 1B: Primers: *Eco*RI-ACC, FAM-*Mse* I-CAA; 2A, 2B: Primers: *Eco*RI-ACC, FAM-*Mse* I-CAI; 3A, 3B: Primers: *Eco*RI-AAG, FAM-*Mse* I-CCC; There are 5 varieties in each group, there are: Gogodon, Dabaling, Langfayuzhuo, Mavizao, Huzhichizao

物也有其不足之处,在选择扩增时它要比标记 *EcoRI* 引物多用 5 倍的量. 即便如此购买标记物合成标记的 *Mse I* 引物,其他 PCR 试剂选用常规试剂,也可使实验费用较使用试剂盒降低 15~20 倍.

2.2 PCR 扩增仪的比较和电泳条件的优化

实验中使用了 PE-9600、PE4800 和 MJ PTC-100、PTC-200 几种 PCR 仪,没有发现使用不同仪器进行 PCR 扩增导致实验结果有明显差别.

因为 AFLP 需要两次 PCR 反应,所以对 PCR 的要求很高,在实验中发现实验效果主要取决于选择扩增,其中引物量是影响实验结果的关键因素之一,如果电泳检测时发现背景较深,可考虑降低引

物量和 Taq 酶的用量来改进实验效果.

在使用 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪检测荧光标记 AFLP 样品时,发现电泳时上槽缓冲液使用 0.5 X TBE 缓冲液,下槽缓冲液使用 1 X TBE 缓冲液,2500 V 恒压电泳,效果较上、下槽都使用 1X TBE 缓冲液效果好.

电泳加样时内标的用量可以减少一半,对实验结果没有明显影响,本文照片的内标用量为实验指导用量的三分之一.

参 考 文 献

- 1 Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23 (21): 4407~4414

An Improved Method of Fluorescent Labeled Amplified Fragment Length Polymorphism

YANG Kai^{1)*}, SONG Wan²⁾, ZHANG Chun-Qing³⁾, JIA Ji-Zeng¹⁾

¹⁾ Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute Crop of Germplasm Research (ICGR), Beijing 100081, China;

²⁾ College of Biological Science, Beijing Frost University, Beijing 100083, China; ³⁾ Department of Agricultural Science, Shandong Agricultural University, Jinan 200000, China)

Abstract A new and efficient reaction system has been set up, in which the *Mse I* primers were fluorescent labeled for auto-sequencer. PCR reagents and primers and adapters of *Mse I* and *EcoRI*, which were synthesized, the AFLP protocol has been modified, and reaction and electrophoresis conditions were optimized, the results obtained can be comparable to that of AFLP fluorescent labeled AFLP kits with less cost.

Key words auto-sequencer, fluorescent labeled, amplified fragment polymorphism (AFLP)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62186654, E-mail: yangkai@ht.rol.cn.net

Received: April 24, 2000 Accepted: June 7, 2000