

适于 AFLP 分析用的荔枝 DNA 提取方法*

易干军¹ 霍合强¹ 蔡长河¹ 邱燕萍¹ 黄自然² 陈大成³

(1 广东省农业科学院果树研究所, 广州, 510640; 2 华南农业大学蚕桑系; 3 华南农业大学园艺系)

DNA Isolation Procedure for AFLP Amplification Reaction of Litchi

Yi Ganjun¹ Huo Heqiang¹ Cai Changhe¹ Qiu Yanping¹ Huang Ziran² Chen Dacheng³

(1 Pomology Research Institute, Guangdong Academy of Agric. Sci., Guangzhou, 510640;

2 Dept. of Sericulture, South China Agric. Univ.; 3 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ.)

关键词 荔枝; DNA; AFLP

中图分类号 S 667.1

Key words Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.); DNA; AFLP

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 具有共显性表达, 不受环境影响, 无复等位效应, 带纹丰富, DNA 用量少, 灵敏度高, 快速高效, 重复性好等优点. AFLP 被认为是最有效的分子标记方法, 近年来发展很快, 在芒果、鳄梨 (Pieter et al, 1995) 等果树上均有研究. 然而有关荔枝 AFLP 分析却少见报道. AFLP 反应程序主要包括模板 DNA 制备, 酶切片断及凝胶电泳分析 3 个步骤, 其中高分子组成基因组 DNA 的成功制备和避免部分分解是 AFLP 成功的关键. 传统的 DNA 提取方法包括以下几种: ①碱法; ②CTAB; ③SDS 法. 其中碱法多用于质粒 DNA 的快速提取, CTAB 法是较为经典的提取方法, 多用于 RFLP 操作中的提取 DNA, 而 SDS 法是最为常用的方法, 多用于 RAPD 操作中 DNA 提取, 然而荔枝叶片含有许多单宁、酚及色素物质, 这些物质使得 DNA 提取变得复杂化, 因此, 本试验试图探索出一套适于荔枝 AFLP 分析的 DNA 提取方法.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究材料均取自广东省农科院果树研究所国家荔枝种质资源圃, 分别为惠东四季荔、玉麒麟、解放红、怀枝、妃子笑、高州糖驳、野生 9 号、野生 10 号共 8 个品种 (单株), 取其嫩叶提取 DNA.

1.2 试剂

A) DNA 提取液: $w(\text{CTAB}) = 2\%$; 100 mol/L Tris-HCl pH 8.0; 20 mol/L EDTA; 1.4 mol/L NaCl. B) DNA 沉降液: $w(\text{CTAB}) = 1\%$; 10 mol/L EDTA; 50 mol/L Tris-HCl pH 8.0. C) TE: 10 mol/L Tris-HCl pH 8.0; 1 mol/L EDTA. D) RNAase: 10 mg/mL, RNAase 配制: 10 mol/L Tris-HCl pH 7.5 + 15 mol/L NaCl 1 mL 中溶 10 mg RNAase, 并煮沸 15 min.

1.3 DNA 提取

(1) 将冷冻磨成粉末的材料 (约 3 g) - 移入 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 的 DNA 提取液 (A) 在 55°C 温育 1 h, 并每 10 min 摇 1 次. (2) 加入 20 mL 氯仿-异戊醇 (24:1), 混匀至奶状 25°C, 10 000 r/min 离心 10 h. (3) 收取上清液. (4) 重复 (2) 和 (3), 而后加入 2 倍体积的沉降液并在室温下放置 30 h. (5) 25°C, 6 000 r/min 离心 10 h.

1999-01-29 收稿 易干军, 男, 33 岁, 助理研究员, 硕士

* 国家自然科学基金 (39700101) 和广东省自然科学基金 (970678) 资助项目

(6)收集沉淀,用2 mL TE溶解,加入4 mL冰乙醇,并置于-20℃过夜。(7)4℃8 000 r/min离心20~30 h。(8)用 $\varphi = 75\%$ 乙醇漂洗5~10 h,然后离心(重复1次)。(9)用400 μL TE溶解,然后加入1 μL RNAase(10 mg/mL),摇匀至DNA完全溶解。(10)加 $\rho = 5 \text{ mol/L}$ NaCl 25 mL,且加入900 μL 冰乙醇,然后离心。(11)除去乙醇,适当风干,溶解DNA于40 μL TE中。

此方法在柑桔、水稻中提取效果较好,但在荔枝中提取到的DNA为深褐色,甚至难以得到DNA,本试验在提取液中加入抗酚类氧化褐变物质,各处理如下:提取液中加入50 mmol/L β -巯基乙醇;提取液中加入 $w = 5\%$ 水溶性PVP(鲜样);提取液中加入5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$;提取液中加入10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 。

1.4 DNA质量检测

提取的DNA以蒸馏水稀释20倍,在紫外分光光度计上读取260和280 nm的 D_λ ,同时进行AFLP分析,AFLP分析采用Gibcol公司提供的试剂盒,用同位素 ^{32}P 进行标记。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法对荔枝DNA提取的影响

SDS法和传统CTAB法不适宜荔枝DNA提取,其氯仿抽提后样液颜色为深褐色,且不能得到DNA沉淀,从试验结果得知,在所使用的抗氧化剂中,以10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 效果较好,可提取的DNA量少色浅,质量较好,可见 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 是荔枝DNA提取的最佳抗氧化剂。在此基础上,笔者进一步探讨了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的最佳使用浓度。

2.2 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的优化

在提取缓冲液中分别添加不同量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$,观察对提样过程中的颜色变化,沉淀多少,颜色和 D_{260}/D_{280} 比值,从试验结果得知: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 加量越大,氯仿抽提后样液颜色由绿褐色变为浅红绿色,最终沉淀出的DNA颜色也逐渐减轻,变为白色或透明状,但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 使用量越多,DNA量越少, D_λ 值显示,当 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 添加量为15 mmol/L时,其DNA纯度较高,在含20 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的情况下, D_{260}/D_{280} 达2.0以上,可能是RNA含量较高。因此,笔者认为15 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 为进行荔枝DNA提取的最佳浓度。

2.3 AFLP分析结果

应用CTAB+15 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 提取了8个荔枝品种(单株)的DNA,并进行了AFLP分析,所用引物对EcoRI ACC+MseI CAT,从所得结果可看出,8个荔枝品种(单株)AFLP分析结果条带清晰,多态性极好,可见用上述方法提取的DNA质量好,纯度高,适于进行AFLP分析。

许多研究者认为DNA中含有少量的RNA和蛋白质不会影响扩增,但是一些多糖、多酚、单宁及色素等会严重影响DNA聚合酶的活性(Uta et al, 1993),干扰引物与模板的结合,从而导致扩增失败,本实验采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 作为抗氧化剂,成功克服了DNA褐变的问题,获得了很好的AFLP分析结果。

为防止酚物质的氧化,通常在提取液中加入一定量的抗氧化剂,如在柑桔、油菜等中加入BME(也防止DNA链断裂并重聚为二聚物),在梨DNA提取液中加入Vc(胡春根等,1998),在菊花DNA提取液中加入PVP等,但笔者发现 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 更适宜于荔枝DNA提取,可见不同种类的DNA提取,需要的抗氧化剂不完全相同。

致谢 本文得到彭成绩研究员指导,谨此致谢。

参 考 文 献

- 胡春根,郝玉.1998.RAPD分析用的梨DNA提取方法.遗传,20(4):31~33
 Pieter Vos.1995.AFLP:a new technique for DNA fingerprinting.Nucleic Acids Research,23(21):4407~4414
 Uta P,Zngo S.1993.Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenols.Nucleic Acids Res,21(14):3328~3330

【责任编辑 柴 焰】