

一种适合 AFLP 分析的油茶 DNA 提取方法*

黄永芳¹ 廖国春² 吴雪辉¹ 安 星¹ 阮瑶瑶¹ 谭裕开¹

(1. 华南农业大学经济林研究中心 广东广州 510642; 2. 广东省肇庆市林业科学研究所)

摘要 以油茶的成熟叶片为材料提取 DNA, 40 个样品用改良的提取纯化方法成功提取出适用于 AFLP 分析的高质量 DNA, OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~2.0 之间, 可以用于 AFLP 反应。该方法打破了仅能用幼嫩叶片作为提取材料的限制, 具有更广泛的适用性和重要的实用性。

关键词 油茶 DNA 提取 AFLP 反应

中图分类号: S794.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-4427(2009)01-0023-04

DNA Extraction of AFLP Reaction System for *Camellia oleifera*

Huang Yongfang¹ Liao Guochun² Wu Xuehui¹

An Xing¹ Ruan Yaoyao¹ Tan Yukai¹

(1. Center for No-timber Forest Research, South China Agriculture University, Guangzhou, 510642;

2. Zhaoqing Forestry Research Institute, Guangdong)

Abstract DNA of samples was extracted and purified from mature leaves, 40 samples were succeed to extracted high quality DNA by using reformative extraction method. OD_{260}/OD_{280} value is between 1.7 and 2.0, DNA is suitable for AFLP reaction. This method has broken the limitation of using tender leaves only for DNA extraction, which has wider range applicability and great practical significance.

Key words *Camellia oleifera* Abel, DNA extraction, AFLP reaction

油茶(*Camellia oleifera* Abel)属山茶科,是我国南方主要的木本食用油料树种,在我国的栽培历史悠久^[1]。目前,我国油茶的研究主要限于栽培与常规育种,着重进行传统的油茶良种选育和推广^[2]。要提高油茶的竞争力,打破油茶育种周期长、见效慢的限制,必须借助油茶分子生物学的研究手段,然而,我国在这方面的研究很少,这一现状亟待改变。

目前,已有学者对油茶进行了 RAPD 分子标记、ISSR 分子标记的研究^[3-8],这些研究为今后开展油茶的分子标记辅助育种打下了良好的基础。然而,油茶 AFLP 分子标记的研究可以说是刚刚起步。进行分子标记的研究,首先要解决提取 DNA 的问题。对于 AFLP 而言,模板 DNA 的制备是非常重要的一个基础环节,它的好坏直接关系着试验的成败。本研究拟探索出一套适用于油茶 AFLP 分子标记的 DNA 提取和纯化的方法,为 AFLP 分子标记在油茶上的应用突破第一道难关。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自广东、广西、湖南等省选育出的油茶优良无性系。为了打破仅能用幼嫩叶片作为提取材料

* 基金项目:广东省自然科学基金项目(06025809),国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD18B0204)。

第一作者简介:黄永芳(1963-),女,广西博白人,教授,主要从事经济林和森林培育的教学和科研工作。

的限制,本试验以成熟叶片为材料。采新鲜无病虫害成熟叶片,放入密封袋中,加入 1: 20(W/W)的变性硅胶后,封口,带回实验室进行提取,提取后剩余的叶片存放于超低温冰箱。共采集了个 40 无性系,见表 1。

表 1 油茶试验材料

代号	名称	代号	名称	代号	名称	代号	名称	代号	名称
A1	湘林 97	A10	湘林 11	A18	岑软 11	A30	东风 3 号	GX2	桂系 2
A2	湘林 67	A11	湘林 18	A21	岑软 2	A35	茶陵 529	GX3	桂系 3
A3	湘林 78	A12	湘林 156	A22	岑软 24	A36	白市 4 号	GX11	桂系 11
A5	湘林 15	A13	湘林 4	A23	岑软 1	三 4	三门江 4	GX22	桂系 22
A6	湘林 5	A14	湘林 210	A24	赣石 83-4	三 15	三门江 15	GX23	桂系 23
A7	湘林 183	A15	湘林 1	A25	赣兴 46	三 24	三门江 24	GX24	桂系 24
A8	湘林 29	A16	湘林 27	A26	赣 70	三 56	三门江 56	GL12	桂林 12
A9	湘林 190	A17	湘林 34	A28	赣 447	三 87	三门江 87	GL15	桂林 15

1.2 DNA 提取与纯化

本研究将常规 CTAB 和 SDS 提取方法结合,在此基础上,增加一些有效去除多糖、多酚的步骤,并进行适当的组合、改进。具体方法如下:

(1)称取 1 g 经变性硅胶干燥后的叶片,液氮中迅速磨成粉末,立即转入 50 mL 离心管中,加入 20 mL 65℃ 预热的抽提液 I (2% CTAB,2 M NaCl,100 mM Tris-HCl pH 8.0,20 mM EDTA pH 8.0,5% PVP,使用前加入 2% β-巯基乙醇),轻摇混匀,65℃ 水浴震荡 2 h;

(2)在离心管中加入 20 mL 氯仿: 异戊醇(24: 1),置于脱色摇床上轻摇混合 15 min,4 000 rpm 离心 15 min;

(3)取上清液转入新离心管中,加入 1 mL 10% CTAB 溶液,轻摇混匀,加入 10 mL 氯仿: 异戊醇(24: 1),于脱色摇床上轻摇混合 15 min,4 000 rpm 离心 15 min;

(4)取上清液转入新离心管中,加入等体积异丙醇,温和混匀,室温放置 30 min,4 000 rpm 离心 15 min,去上清液,沉淀用 10 mL 高盐 TE(含 10 μL 10 mg · mL⁻¹ RNase A)于 55℃ 彻底溶解后,再水浴 1 h;

(5)缓慢加入 20 mL 无水乙醇,轻轻混匀,4 000 rpm 离心 15 min,去上清液,用 70% 乙醇漂洗沉淀 2 次,向沉淀中加入 5 ~ 10 mL 抽提液 II (0.5% SDS,1 M NaCl,10 mM Tris-HCl pH 8.0,1 mM EDTA pH 8.0,2% PVP,使用前加入 2% β-巯基乙醇),轻摇至沉淀完全溶解,加入 10 mL 氯仿: 异戊醇(24: 1),于脱色摇床上轻摇混合 15 min,4 000 rpm 离心 15 min;

(6)取上清液转入新离心管中,缓慢加入 2 倍体积无水乙醇,轻轻混匀,4 000 rpm 离心 15 min,去上清液,用 70% 乙醇漂洗沉淀 2 次,沉淀于室温晾干后,加入 100 ~ 200 μL 1 × TE 溶解,-20℃ 保存。

1.3 DNA 质量检测

采用 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量,紫外吸收法检测 DNA 纯度^[9-10]。

1.4 AFLP 分析方法

AFLP 反应体系和反应条件参考 Van der Lee 的方法改进^[11]。酶切体系 30 μL,包含基因组 DNA 80 ng, EcoR I 10 U, Mse I 10 U,37℃ 酶切 8 h。连接体系 40 μL, Mse I 接头 10 U, EcoR I 接头 10 U, T4 连接酶 20 U,22℃ 连接 10 h 以上。酶切、连接产物稀释 20 倍用于预扩增。

预扩体系 20 μL,包括引物组合 E0、M0 各 5 μM, Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 3.75 μM, 稀释 20 倍的酶切连接产物 5 μL。预扩增反应程序为 95℃ 4 min;95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 2 min,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

选择性扩增体系 25 μL,包括 E + 3 和 M + 3 引物各 10 μM、Taq DNA 聚合酶 1 U、dNTP 3.75 μM、稀释 30 倍的预扩产物 2 μL。选扩反应程序为 95℃ 4 min;95℃ 30 s,65℃ 45 s,72℃ 2 min,退火温度每循环一次降低 0.7℃,13 个循环;95℃ 30 s,56℃ 45 s,72℃ 2 min,24 个循环;72℃ 延伸 10 min。

产物采用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳预检测,60 g/L 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法进行分离和检测。

2 结果与分析

结果表明,此法获得的样品 DNA 的凝胶电泳图谱主带明显,为一条亮而清晰的主带(见图1)。紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~2.0 之间(见表2),由此可初步推知所提取的 DNA 完整性较好。而仅用 CTAB 法或者 SDS 法提取的 DNA 条带模糊,拖带严重(图2)。提取的 DNA 经选择性扩增,最终能获得清晰明亮的条带(见图3,图4)。本试验中采用的适用于 AFLP 的油茶 DNA 的提取方法是可行的。



图1 样品总 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图谱

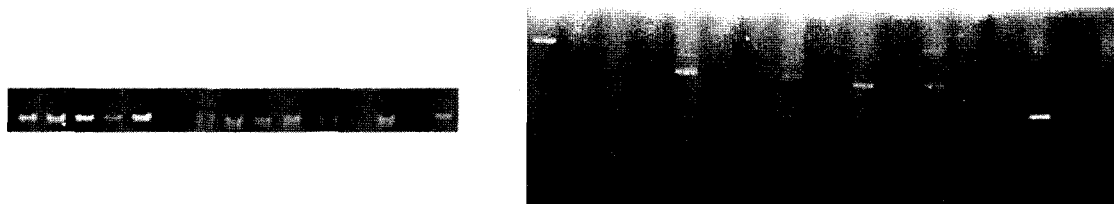


图2 双提取液法(左边5个泳道)、CTAB 法(中间5个泳道)、SDS 法(右边5个泳道)提取 DNA 效果对比

图3 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳预检测, 选择性扩增图谱

表2 油茶 DNA 的 OD 值检测结果

样品号	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	样品号	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
A1	0.0817	0.0477	1.7128	A24	0.0395	0.0220	1.7727
A2	0.1433	0.0733	1.9550	A25	0.0075	0.0039	1.9231
A3	0.0942	0.0527	1.7875	A26	0.0134	0.0075	1.7867
A5	0.0724	0.0389	1.8612	A28	0.0872	0.0460	1.8913
A6	0.0583	0.0303	1.9241	A30	0.0941	0.0531	1.7755
A7	0.0494	0.0257	1.9222	A35	0.0239	0.0128	1.8672
A8	0.0623	0.0358	1.7402	A36	0.0682	0.0371	1.8383
A9	0.0175	0.0095	1.8421	三4	0.0768	0.0425	1.8071
A10	0.0276	0.0154	1.7922	三15	0.0478	0.0265	1.8038
A11	0.0198	0.0112	1.7679	三24	0.0254	0.0142	1.7887
A12	0.0146	0.0077	1.8961	三56	0.0953	0.0522	1.8257
A13	0.0159	0.0092	1.7283	三87	0.0101	0.0057	1.7719
A14	0.0179	0.0101	1.7723	GX2	0.0625	0.0332	1.8825
A15	0.0035	0.0019	1.8421	GX3	0.0082	0.0045	1.8222
A16	0.0400	0.0200	2.0000	GX11	0.0092	0.0054	1.7037
A17	0.0175	0.0094	1.8617	GX22	0.0188	0.0107	1.7570
A18	0.0077	0.0041	1.8780	GX23	0.0611	0.0347	1.7608
A21	0.0071	0.0038	1.8684	GX24	0.0824	0.0453	1.8190
A22	0.0138	0.0078	1.7692	GL12	0.0917	0.0495	1.8525
A23	0.1135	0.0640	1.7734	GL15	0.0109	0.0061	1.7869

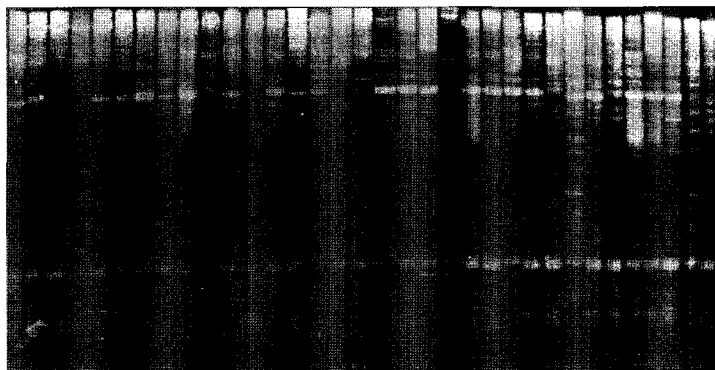


图4 60g/L 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳—银染,选择性扩增图谱

3 讨论

3.1 AFLP 分子标记技术对 DNA 模板的质量要求较高,模板的质量将影响充分酶切及以后的连接扩增反应,应避免其它 DNA 污染和抑制物质的存在。油茶叶片革质化程度高,蜡质层厚,纤维、酚类物质和色素含量很高,所以油茶 DNA 提取材料的选取显得尤为重要。很多研究表明, DNA 基因组提取时选取新生叶效果最好,色素物质干扰少,容易研磨;老叶含纤维、酚类等物质太多,研磨时很难成粉末状,导致最后几乎得不到 DNA,电泳检测时很微弱^[12]。因此,一般选取油茶幼嫩叶片作为提取材料较好。然而,有时候不一定能获得嫩叶,考虑到使试验具有更广泛的适用性,本试验采用成熟叶片为材料进行提取,但这无疑加大了获得高纯度 DNA 的难度。用于 AFLP 分析的 DNA 模板,提取之后,一般都要经过纯化^[13-15],才能满足 AFLP 对 DNA 质量要求。本方法最大的特点是采用了双提取液提纯,然而,最大的缺点也在于此,耗费大量的试剂和时间,今后有望在该方法的基础上作进一步改进,探索出更为高效的提取方法。

3.2 本试验采用大样法提取基因组模板,并且采用多次离心有效的去除杂质,但这无疑增加了成本,耗费更多时间,因此如改为挑出 DNA 沉淀,这不仅能使 DNA 沉淀和其他杂质分开,而且 DNA 沉淀在松散状态下漂洗,可以洗去黏附在上面的大部分色素^[16],这样得到的 DNA 质量会更高。由于油茶叶片杂质的含量非常高,不建议采用小样法提取适用于 AFLP 分析的油茶 DNA 模板。

参考文献

- [1] 庄端林. 中国油茶[M]. 北京:中国林业出版社,2008.
- [2] 黄永芳,陈锡沐,庄雪影,等. 油茶种质资源遗传多样性分析[J]. 林业科学,2006,42(4):38-43.
- [3] 张云,黄儒珠,刘大林,等. 油茶随机扩增多态 DNA 条件的研究[J]. 福建林业科技,2003,30(2):5-8.
- [4] 陈永忠,张智俊,谭晓风,等. 油茶优良无性系的 RAPD 分子鉴别[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):41-45.
- [5] 黄永芳,陈锡沐,雷治国,等. 油茶种质资源 RAPD 分析 I. DNA 提取和 PCR 扩增条件建立[J]. 河南农业科学,2004(12):22-25.
- [6] 黄永芳,吴雪辉,陈锡沐,等. 引物对油茶种质资源聚类分析结果的影响[J]. 河南农业科学,2005(10):37-41.
- [7] 温强,叶金山,雷小林,等. 油茶 ISSR 反应体系建立及优化[J]. 中南林学院学报,2006,26(6):22-26.
- [8] 温强,雷小林,叶金山,等. 油茶高产无性系的 ISSR 分子鉴别[J]. 中南林业科技大学学报,2008,28(1):39-43.
- [9] 刘欢,赵桂琴,耿小丽,等. 燕麦 AFLP 反应体系的建立与优化[J]. 草业科学,2008,25(2):84-89.
- [10] 孟庆文,崔卫东,白光红,等. 红景天种内遗传多样性分析 AFLP 方法建立[J]. 新疆农业科学,2008,45(1):88-92.
- [11] Van der Lee T, De Wite I, Drenth A, et al. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*[J]. Fungal Genetics and Biology, 1997,21(3):278-291.
- [12] 李江舟. 广西龙眼遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[D]. 南宁:广西大学,2007.
- [13] 李冬波,李江舟,朱建华. 适宜 AFLP 分析的龙眼基因组 DNA 提取方法[J]. 西南农业学报,2007,20(3):478-480.
- [14] 王富荣,赵剑波,章镇,等. 适于 AFLP 分析用的桃成熟叶片 DNA 提取方法[J]. 果树学报,2006,23(4):638-641.
- [15] 谢让金,邓烈. 一种适合 AFLP 分析的柑橘 DNA 提取方法[J]. 生物技术,2007,17(6):27-28.
- [16] 熊光明,梁国鲁,阎勇,等. 适用于 AFLP 分析用的柑橘 DNA 提取方法[J]. 果树学报,2002,19(4):267-268.