

this method can be used for various researches.

Key Words: Silica Total RNA

AFLP-银染法检测植物基因组多态性*

张峰 宋文芹 陈瑞阳**

(南开大学生物系 天津 300071)

扩增性酶切片长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism,简称 AFLP)是 1992 年由 Zabeau 等人发明的一项新的 DNA 指纹技术。该方法结合了 RFLP(Restricted Fragment Length Polymorphism)技术与 PCR 技术的特点,其基本原理是:将植物的总体 DNA 用一定的限制酶消化后,和特定的人工接头连接,然后用特异性引物进行扩增,最后通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增片段的多态性。

AFLP 技术虽然刚产生不久,却受到了广泛的重视。它较其他的 DNA 指纹技术,如 RFLP、RAPD、SSR,具有检测的多态性多,对模板浓度不敏感,扩增结果稳定,不需要了解序列信息的优点^[1,2]。该技术现已广泛用于拟南芥^[3]、水稻^[4]、大麦^[5]、马铃薯^[6]、番茄^[7]等植物的高密度遗传图谱的构建、分子标记的筛选,以及遗传多样性的研究,是目前一种比较理想的 DNA 指纹技术。

但是,目前 AFLP 技术一般采用同位素标记的方法进行检测,由于放射性同位素操作不便,而且曝光时间长,限制了该方法的推广。本文采用银染的方法检测扩增产物,取得了很好的效果。而且使用银染法能够降低试验成本,缩短试验周期,提高了 AFLP 技术的实用性。

材料和方法

1. 材料

玉米种子:父本获唐黄,母本黄野 4 号,杂种一代唐抗 5 号;父本八苏,母本 DB 丹,杂种一代黄玉 5 号;杂交种沈丹 7 号,掖单 13 号,农大 60,津鲜 1 号,冀单

17,都是由天津市种子公司提供。番茄总体 DNA 由 AFLP 试剂盒(购自 GIBCO-BRL 公司)提供。菜花种子由天津农科院蔬菜研究所提供。

2. 玉米、菜花总体 DNA 的提取

采用 Murray 等人^[8]的方法。取 0.2g 新鲜植物叶片,在液氮中研成粉末,加入 2ml CTAB 提取缓冲液[0.7mol/L NaCl,1%CTAB(十六烷基溴化铵),50mmol/L Tris-HCl pH8.0,10mmol/L EDTA],充分混匀,56℃保温 30 分钟,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。加等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。再加等体积氯仿/异戊醇(24:1)混匀,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。加入等体积 CTAB 沉淀缓冲液(1% CTAB,10mmol/L EDTA,50mmol/L Tris-HCl pH8.0)。室温放置 30 分钟,3000rpm 离心 5 分钟收集沉淀。晾干沉淀后,溶于 400 μ l 1mol/L NaCl 中,再加入 2 倍体积无水乙醇,-20℃沉淀半小时,12000rpm 离心 15 分钟收集沉淀,75%乙醇洗涤沉淀,室温晾干,溶于 50 μ l TE(50mmol/L Tris-HCl pH8.0,10mmol/L EDTA)中。加入 2%(v/v)RNase(10mg/ml)除去 RNA。0.7%琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量。

3. AFLP

AFLP 试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司,操作步骤如下:

(1) 总体 DNA 限制性酶切反应 在 25 μ l 反应体系中含有 5 μ l 5 \times 酶切反应缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH7.5,50mmol/L MgAc₂,250mmol/L KAc),250ng 总体 DNA,2.5U EcoRI 酶,2.5U MseI 酶,37℃酶切 3 小时。

(2) 接头连接 限制性酶消化后,再加入 1 μ l T4 DNA 连接酶(1unit/ μ l),24 μ l 接头混和液(0.4mmol/L ATP,10mmol/L Tris-HCl pH7.5,10mmol/L

*天津科委科技攻关资助项目。

**通讯联系人。

L MgAc₂, 50mmol/L KAc, 5pmol EcoRI 接头, 50pmol MseI 接头), 37℃; 连接过夜。接头序列见表 1。

(3) 预扩增 取 5μl 连接产物, 加入 40μl 预扩增混和液 (150ng MOO 引物, 150ng EOO 引物, 0.25 mmol/L dNTPs), 5μl 10×PCR 缓冲液 (200mmol/L Tris-HCl pH 8.4, 15 mmol/L MgCl₂, 500mmol/L KCl)。进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃ 30 秒, 56℃ 1 分钟, 72℃ 1 分钟, 共进行 20 个循环。引物序列见表 1。

(4) 选择性扩增 将预扩增产物稀释 10 倍后, 取 5μl, 加入 0.18μl EcoRI 引物 (27.8ng/μl), 4.5μl MseI 引物 (6.7ng/μl, 1mmol/L dNTPs), 2μl 10×PCR 缓冲液 (200mmol/L Tris-HCl pH8.4, 15mmol/L MgCl₂, 500mmol/L KCl), 1u Taq 酶, 补水至 20μl。PCR 反应条件为: 94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟, 以后每个循环复性温度减 0.7℃, 共计 13 个循环。然后 94℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟, 再进行 23 个循环。所用引物序列见表 1。

4. 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

配制 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶 (6% 丙烯酰胺, 0.32% 甲叉丙烯酰胺, 7mol/L 尿素, 1×TBE), 采用国产 DF-6 型电泳槽 (购自北京东方特力科贸中心), 恒功率 30W 预电泳 30 分钟。将扩增产物加入等体积的上样缓冲液 (98% 甲酰胺, 10mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝) 95℃ 变性 5 分钟后, 立即转移冰浴中冷却, 然后每个样品 4μl 上样至凝胶上, 恒功率 30w, 电泳 2 小时。

5. 银染

参照《现代分子生物学技术》^[9]提供的方法。

(1) 凝胶制备 用热水加洗涤剂清洗短玻璃和长玻璃, 并用干净的吸水纸浸透 95% 乙醇, 擦洗玻璃, 晾干备用。配制 1ml 粘和硅烷溶液 [95% 乙醇, 0.5% 冰醋酸, 5μl Binding Silane (购自 promega 公司)]. 然后用吸水纸浸透 1ml 粘和硅烷溶液, 均匀地涂满长玻璃。4—5 分钟后, 用干净的吸水纸浸透 95% 乙醇轻轻沿一个方向擦洗玻璃, 并重复 3 次。同时, 用浸透剥离硅烷

(sigmacote, 购自 Sigma 公司) 的吸水纸均匀地涂满短玻璃, 5—10 分钟后用干净的吸水纸擦去多余的剥离硅烷, 用这种方法处理玻璃后, 凝胶能够牢固地附着在长玻璃上, 便于以后银染操作。硅化后的玻璃, 用 0.3mm 的边条装配好, 并用医用胶布将底边和侧边封牢, 用夹子夹紧备用。灌胶时将板 40 度倾斜放置, 用 50ml 注射器将配好的凝胶溶液 40ml (40ml 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 200μl 10% 过硫酸胺, 50μl TEMED) 连续灌入, 注意要避免出现气泡。灌满后将板水平放置, 并插入梳子。凝胶应在 30 分钟内聚合, 过长时间不聚合说明试剂质量较差, 会影响电泳结果, 应更换试剂。凝胶聚合 2 小时后即可使用。

注意上述操作必须戴上橡胶手套进行。

(2) 银染显色反应 电泳结束后, 将两块玻璃小心分开, 把附着于长玻璃上的凝胶放入 10% 的乙酸中固定, 直至溴酚蓝颜色褪尽。然后用双蒸水洗涤三次, 每次两分钟, 空干水后, 转至染色液 (2g 硝酸银, 3ml 37% 甲醛溶于 2L 双蒸水中) 中染色 30 分钟, 在用双蒸水洗涤 5—6 秒, 转至显影液 (60g 碳酸钠, 3ml 37% 甲醛, 400μl 10% 硫代硫酸钠溶于 2L 双蒸水中) 显色, 至电泳条带清晰, 加入等体积 10% 乙酸停影。将凝胶用双蒸水洗涤后, 自然干燥。

上述过程毋需在暗室进行, 除显影外均在室温下操作。显影液需冷却至 10—12℃, 以降低染色后的背景。

结 果

本文分别对玉米、菜花、番茄进行了 AFLP 银染分析 (结果见图版), 它们均得到清晰的 AFLP 指纹图谱, 扩增带的数目为 30—60 条, 扩增片段大小主要在 80—600bp 之间。而且不同玉米品种的电泳谱带各不相同。完全可以用于品种鉴定。

表 1 引物及接头序列

| | |
|-----------|----------------------------|
| EcoRI 接头 | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' |
| | 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' |
| MseI 接头 | 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' |
| | 3'-TACTCAGGACTCAT-5' |
| 预扩增引物 E00 | 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' |
| 预扩增引物 M00 | 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' |
| 引物 E-AAC | 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' |
| 引物 E-ACC | 5'-GACTGCGTTACCAATTCACC-3' |
| 引物 M-CAC | 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3' |

讨 论

AFLP 作为一项新的指纹技术,它同 RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 一样,都是以 PCR 扩增为基础,这样仅需要很少量的 DNA 样品就可以进行多态性分析。但和 RAPD 技术相比,AFLP 具有稳定性好,重复性强的特点,Zabeau 等人^[1]已进行了一百万个反应,足以证明这一点。它的另一个特点是多态性强,^[3]几乎每一个 AFLP 的引物组合都可以扩增出具有多态性的片段,因此,它比 RAPD 所需要筛选的引物数要少得多。

但是 AFLP 的最后检测一般要使用同位素 ($\gamma^{32}\text{P}$ 或 $\gamma^{33}\text{P}$) 进行引物标记,这就需要相应的防护措施以及配套的仪器设备,因此,大大提高了 AFLP 技术的成本。而且同位素曝光一般需要几天的时间,实验周期比较长,这就限制了 AFLP 的推广应用。目前,利用银染等非放射性方法代替放射性同位素法检测 AFLP 的报道还不多见^[10]。

本实验利用银染的方法,获得了清晰的 DNA 指纹图谱。而且,利用银染的方法不需要特殊的实验设备和防护措施,从电泳到得到最后的银染结果仅需半天时间,大大缩短了实验周期。另外,经过硝酸银染色后的凝胶自然干燥后可以长期保存,而且对于特异性的谱带可直接从胶上准确地切出,然后进一步扩增和克隆,从而得到特异性的 DNA 分子标记。

我们的研究表明,将银染技术与

AFLP 技术结合起来,能降低实验成本,提高实验效率,便于该技术在植物育种、分子标记筛选和高密度遗传图的构建中广泛应用。

摘 要

本文采用银染法代替同位素标记法,分别对玉米、菜花、番茄进行了 AFLP 分析。结果表明用银染法同样可得到清晰的 AFLP 指纹图谱,而且银染法具有无放射性,操作简便,实验成本低,实验周期短的优点。

关键词: AFLP 银染 玉米 菜花 番茄

参 考 文 献

- [1] Vos P., et al., 1995, *Nucleic Acids Research*, **23**(21):4407-4414.
- [2] Powell W., et al., 1996, *Molecular Breeding*, **2**:225-238.
- [3] 翁跃进, 1996, *遗传*, **18**(6):29-31.
- [4] Mackill D. J., et al., 1996, *Genome*, **39**:969-977.
- [5] Pakniyat H., et al., 1997, *Genome* **40**:332-341.
- [6] Meksem K., et al., 1995, *Mol. Gen. Genet.*, **249**:74-81.
- [7] Thomas C. M., et al., 1995, *The Plant Journal*, **8**(5):785-794.
- [8] Murray M. G., et al., 1980, *Nucleic Acids Research*, **8**(19):4321-4325.
- [9] 卢圣栋, 1993, 《现代分子生物学技术》, 高等教育出版社.
- [10] Yong Gu Cho, et al., 1996, *Genome*, **39**:373-378.

AFLP SILVER STAINING METHOD DETECTING THE POLYMORPHISM IN PLANT GENOME

ZHANG Feng SONG Wen Qin CHEN Rui Yang
(Biology Department, Nan Kai University, Tianjin, 300071)

ABSTRACT

In this paper, we made use of silver-staining detection method instead of isotope labelling method for AFLP anal-

ysis in maize cauliflower and tomato. The result shows that using silver staining method can get the clear DNA fingerprinting pattern. Moreover, compared with isotope labelling method, it combines the advantages of non-radioactivity, easy operation, low cost, and saving time.

Key words: AFLP Silver staining Maize Cauliflower Tomato

名词讨论

affinity 与 avidity

在专业文献中,常见到“affinity”及“avidity”这两个表示“亲和”意思的词汇。如 Ashkenazi 在他的文章 Immunoadhesins^[1]中这样写到:“可溶性受体在临床上的应用是有效的,而它与 IgG 融合后则有更多优点,如延长半衰期、提高 avidity 及 affinity”,这里 affinity 与 avidity 的意思显然是有所区别的。国内有人这样写道:“丝状噬菌体载体(单链丝状噬菌体和噬菌粒)包括基因Ⅰ的单价系统和基因Ⅵ的多价系统。前者可筛选高亲和力(affinity)抗体,后者可筛选高亲和力(avidity)抗体^[2]”,显然这两个“高亲和力”要表达的意思应该也是不同的,但即使附有英文,该句意思还是颇费理解的。那么,到底 affinity 与 avidity 的真正区别在哪里呢?

国内大多数词典趋向把 affinity 译成“亲和力”,也有译为“亲和”,如 affinity chromatography 译为“亲和层析”,affinity ligand 译为“亲和配体”等,还有译为“亲和势”等^[3-5]。较为权威的《英汉辞海》^[6]译为“亲和力,亲和势,指抗体与抗原的结合强度”。

avidity 的译法大多与 affinity 相似,译为“亲和力”的最多,还有译为“活动性”^[4],有的则干脆把 avidity 与 affinity 等同起来^[5]。《英汉辞海》则解释为“抗体的一种特性,即抗体加强其与抗原结合的速度和牢固度的性质”。

国外^[7]对这两个词的翻译分别为—affinity,吸引力,指导致某种原子与其他分子结合的力量;avidity,1. 对某物有一强吸引力,2. 指抗体结合抗原的能力。

Molecular Biology of The Cell^[8]这样写道:“抗体对一个抗原决定簇的 affinity,指单拷贝的抗原决定簇与单个抗原结合位点的结合力量,与抗原结合位点的数量无关,如果一个抗原有多拷贝的相同抗原决定簇与多价抗体结合,则其结合力将大大提高…一个多价

抗体与一个多价抗原的总结合力就用 avidity 来表示。一个 IgM 分子因有 10 个结合位点,它与多价抗原的 avidity 要比只有 2 个结合位点的 IgG 强达 10⁴ 之多…由于 IgM 的高 avidity,所以在免疫早期,尽管产生的 IgM 抗体每个结合位点的 affinity 都很低,但却能发挥有效的免疫应答。”

很清楚,affinity 指单拷贝的抗原决定簇与单拷贝的抗原结合位点(Fab)的结合,这种结合不依赖于结合位点的多少,也不强调结合力的强弱及牢固程度,只重视“结合”这个过程,而 avidity 则只能指多个抗原决定簇与多个 Fab 结合成一种稳固的分子,特别强调强结合力及牢固程度。也就是说,抗原与抗体分子间的“avidity”,首先必须“affinity”,而许多单拷贝的抗原决定簇与单拷贝 Fab 结合后才能构成“avidity”,尽管其各自的结合力都可能不强。

通过以上分析,我们不妨把 affinity 译为“亲和力”,avidity 译为“高亲和力”或“总亲和力”,似乎更贴切这两个词的真正含义,这样我们就不难理解本文开始所举两个例子中 affinity 与 avidity 的意思了。

(黄建生 任大明 复旦大学遗传学研究所 200433)

参 考 文 献

- [1] Ashkenazi A et al., 1993, *Intern Rev Immunol*, 10:220.
- [2] 胡志伟, 1996, 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1:9.
- [3] 新英汉词典编写组, 1985, 新英汉词典, 上海译文出版社, 上海, p. 20.
- [4] 陆谷孙主编, 1993, 英汉大词典, 上海译文出版社, 上海, p. 29, 110.
- [5] 颜元叔主编, 1996, 时代双解大词典, 世界图书出版公司, 广州, p. 33, 118.
- [6] 王国亿主编, 1990, 英汉辞海, 国防工业出版社, 北京, p. 84, 353.
- [7] F. A. DAVIS Company. 1989, *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary*, USA 48, 172.
- [8] Alberts B et al., 1994, *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition, Garland Publishing Inc., Newyork & London, p. 1213.