

大豆 DNA 扩增片段长度 多态性 (AFLP) 研究^{*}

田清震¹ 盖钧镒^{1*} 喻德跃¹ 贾继增²

(1. 南京农业大学大豆研究所 农业部国家大豆改良中心, 南京 210095;
2. 中国农科院品种资源研究所 农业部作物品种资源重点实验室, 北京 100081)

摘要 本文研究 AFLP 技术在大豆上的应用, 在改进大豆种子 DNA 提取方法的基础上, 比较同位素与银染检测方法的效果, 筛选适宜于大豆 AFLP 分析的酶切和引物组合, 从而建立了适用于大豆指纹图谱快速鉴定的 AFLP 操作程序, 并对我国野生大豆和栽培大豆代表性材料进行了 AFLP 分析。

关键词 大豆; DNA 提取; 扩增片段长度多态性 (AFLP); 银染检测

近年来, 大豆种质资源研究中应用的分子标记大体可以分为两大类。一类是以分子杂交为基础的 RFLP 技术, 另一类是以 PCR 反应为基础的各种 DNA 分子标记, 包括有 DAF AP- PCR RAPD SSR AFLP 等技术。作为一种有效的分子标记, RFLP 最先被应用到大豆遗传研究中 (Apuya 等 1988)^[1]。但是从建立品种指纹图谱来看, RFLP 技术单个探针信息量少, 鉴别效率不高^[2]。RAPD 技术以其快速简单的优点被用来鉴别大豆种质^[3, 4], 但由于所采用引物 T_m 值较低, 扩增结果易受外界条件的影响。SSR 标记在大豆种质研究中应用也较多^[5, 6], 其多态性远远高于 RFLP 标记, 但一次性检测的位点也有限。因此, 发展一种既能高度揭示遗传变异多样性, 又相对操作简单的分子标记, 对于大豆指纹图谱研究具有重要的意义。

分子标记 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 是由 Zabeau 和 Vos (1993) 发明的^[7, 8]。它基于对基因组 DNA 进行双酶切, 片段末端连接上一个接头, 经一个与接头和邻接酶切位点相匹配的引物进行 PCR 选择性扩增, 而后用变性聚丙烯酰胺凝胶分离扩增产物。这种方法结合了 RFLP 可靠性和 PCR 高效性的优点, 已经成功地应用于大豆遗传图谱构建与遗传多样性研究中^[9, 10, 11]。但是该方法受专利保护, 分析试剂盒十分昂贵, 还需要同位素操作, 用叶片提取 DNA 手续较多, 也影响到分析的效率, 因此有必要建立适用于大豆的优化操作程序。

本研究旨在探索大豆种子提取 DNA 并用于 AFLP 分析的可能性, 比较银染与同位素技术在检测效率上的相对效果, 筛选适用于大豆的酶切和引物组合, 完善大豆指纹分析

* 国家“九五”重点科技项目 (No. 9601401064)

** 通讯联系人

收稿日期 1999-08-02 Received on Aug. 2, 1999

的 AFLP 技术, 为大豆材料真实性和纯度检验、种质亲缘关系的研究提供方法

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料选自东北、黄淮海和南方各生态区, 包括野生大豆 31 份, 栽培大豆 61 份, 栽培大豆还包括不同播种季节类型。全部材料由国家大豆改良中心种质库 (南京) 提供

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

关于大豆 DNA 的提取, 前人多采用叶片提取的方法。McDonald 等 (1994)^[12]对 DNA 提取法进行了改进, 从玉米、大豆、棉花等种子中提出质量较高的 DNA。但是, 作者在用该法提取大豆样品, 尤其野生大豆时, 由于色素及酚类、醌类等多糖类杂质较多, 得到的 DNA 呈淡红、红色, 十分粘稠, 溶解困难, 260/280 比值较低, 而且降解严重, 这样会影响 DNA 样品的酶切效果。因此, 本研究在 McDonald 等基础上作了改进, 详见结果部分。

1.2.2 AFLP 实验程序

AFLP 实验程序按照文献^[7], 多态性的检测采用银染法与同位素法。

(1) 引物的标记 (同位素检测): 标记混合液 (适合 10 个 DNA 样品) 包括 EcoRI 引物 (25ng μ l) 1.0 \times T₄ 多聚核苷酸激酶 Buffer 0.5 μ l, T₄-多聚核苷酸激酶 (10U μ l) 0.1 μ l, [γ -³³P] ATP (10Ci/ml) 1.0 μ l, Amersham) 0.5 μ l, H₂O 2.9 μ l 36.8 $^{\circ}$ C 下标记至少 3 个小时。

(2) 酶切: 每个样品酶切混合液包括: DNA (300ng μ l) 2.5 μ l MseI 3 单位, EcoRI 3 单位, 10 \times RL Buffer (50mM Tris HAc, pH 7.5, 50mM Mg Ac, 250mM K Ac, 25mM DTT, 250ng μ l BSA) 2 μ l 250 μ g μ l BSA 0.2 μ l, 加 H₂O 至 20 μ l 36.8 $^{\circ}$ C 下酶切 3.5 小时。

(3) 连接: 酶切完成的每个样品, 加入 10 μ l 如下的反应液: MseI 接头 (50pmol μ l) 1.0 μ l EcoRI 接头 (50pmol μ l) 1.0 μ l 60mM ATP 0.3 μ l T₄-DNA 连接酶 (3U μ l) 0.5 μ l 10 \times RL Buffer 0.5 μ l H₂O 1.7 μ l, 室温下连接至少 3 小时。MseI、EcoRI 的切点及接头序列如下所示

MseI adapter

EcoRI adapter

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

3'-CTGACGCATGGTTAA-5'

(4) 预扩增: 取 4 μ l 连接完成的 DNA 样品, 加入 16 μ l 如下混合液: MseI 引物 (M00, GATGAGTCCTGAGTAA, 50ng μ l) 0.6 μ l EcoRI 引物 (E00, GACTGCGTACCAATTC, 50ng μ l) 0.6 μ l 10 \times PCR Buffer (100mM Tris, pH 8.3, 15mM MgCl₂, 50mM KCl) 2.0 μ l 30mM Mg²⁺ 1.0 μ l Taq 酶 (5U μ l) 0.1 μ l dNTP (25mM) 0.16 μ l 及 H₂O 13.54 μ l 混合后, 在如下 PCR 条件下扩增: 首先 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 而后按照 95 $^{\circ}$ C 30 秒—56 $^{\circ}$ C 30 秒—72 $^{\circ}$ C 60 秒, 循环 31 次。预扩增完成后, 用 H₂O 稀释 15 倍, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(5) 选择性扩增: 取 5 μ l 稀释的预扩增混合液, 加入 13 μ l 如下反应液: EcoRI 引物 (50ng μ l) 0.6 μ l MseI 引物 (50ng μ l) 0.6 μ l 25mM dNTP 0.18 μ l Taq 酶 (5U μ l) 0.

16 μ l 10 \times PCR Buffer 2.0 μ l 30mM Mg²⁺ 1.0 μ l H₂O 10.0 μ l,混合后按如下 PCR程序扩增: 首先 95 $^{\circ}$ C 2分钟,而后按照 95 $^{\circ}$ C 40秒—65 $^{\circ}$ C 40秒(每循环降低 0.7 $^{\circ}$ C)—72 $^{\circ}$ C 60秒,循环 12次,再按照 95 $^{\circ}$ C 40秒—56 $^{\circ}$ C 40秒—72 $^{\circ}$ C 60秒,循环 30次。

(6)结果检测: 扩增后的样品中加入 3 μ l Loading Buffer(98% 甲酰胺, 10mM EDTA, pH 8.0, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲酚蓝), 95 $^{\circ}$ C 变性 5分钟,而后立刻冰浴中冷却,在 85W 下用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5小时,分离扩增产物。同位素检测时,选择分子磷屏压片,2天后用 BAS-2000磷屏仪(Fuji Photo Film Company Ltd, Japan)扫描检测。银染检测程序,参照文献[13]。

1.3 统计分析

为了比较不同检测方法及不同引物组合的效果,本研究采用以下指标:

- 1)引物组合分析位点数 指某一引物组合分析时所出现条带的总数;
- 2)多态性位点百分率 用多态性位点(条带)占所分析位点(条带)的百分数表示;
- 3)平均遗传多样性 采用 Shannon和 Weaver(1949)信息指数来表示:

$$H_{av} = - \sum (P_i \cdot \log_2 P_i) / n$$

其中, H_{av} 为某一群体在所分析位点上的平均遗传多样性, P_i 为某 AFLP条带在群体中出现的频率, n 为所分析位点数。

- 4)鉴别效率 (IR, Identification rate):

IR指引物组合可以区分的材料占供试材料的百分数。

2 结果与分析

2.1 大豆种子 DNA提取方法的改进

本研究在 McDonald等(1994)^[12]提取 DNA方法的基础上,作了以下改进:

(1)栽培大豆取半粒或单粒种子,野生大豆可取 1—2粒种子,以确保 DNA样品的纯度;

(2)取干种子,无须在液氮条件下研磨,即可保证 DNA的完整性;

(3)尽可能除尽种皮,减少种皮中所含杂质对 DNA质量的影响;

(4)提高 SDS提取液的浓度,由 1—2% 提高到 4%,以增加 DNA产量;

(5)第一次离心采用 10,000转/秒,以后离心速度降为 3000转/秒,以防止 DNA的降解;

(6)加入高浓度(3M)的盐离子(KAC),以去除多糖类及色素等杂质,对于野生大豆,还加入 PVP或巯基乙醇,以防止酚类、醌类物质对 DNA的降解;

(7)增加酚:氯仿抽提步骤,然后再用氯仿进一步抽提,以除去杂质和多余的酚;

(8)加 0.2 μ l 的 10 μ g/ μ l RNaseA,在 4 $^{\circ}$ C 下过夜,以除去 RNA,并进一步抽提,防止 RNA对酶切的影响。

通过多次探索,本研究优化了从大豆干种子中提取 DNA的方法,经过 Agarose凝胶电泳检测、紫外分光光度计(LKB Ultraspec-III型,Pharmacia)测定, DNA没有降解, 260/280比值均在 1.8左右,将样品浓度调整至 300ng/ μ l左右,完全适合于大豆 AFLP分析。

本研究单粒野生大豆提取的 DNA 量约为 3– 20^μg,单粒栽培大豆提取的 DNA 量约为 10– 200^μg,而一次预扩增仅需 DNA 100ng 左右,所以完全满足测定所需。与叶片提取方法相比较,直接从种子中提取 DNA,不需发芽、光照培养、液氮研磨等过程,可以提高种子的检验效率。

2.2 多态性引物的筛选

通过比较 MseI – SdaI、MseI – PstI、MseI – EcoRI 不同酶切组合的效果,发现 MseI – EcoRI 较容易找到多态性引物组合,而且具有较高的多态性。为了用少量的引物组合揭示丰富的多态性,首先选取 M 引物为 2 个选择性碱基和 E 引物也为 2 个选择性碱基的引物组合(简称“2+ 2”),初步选出有一定多态性的组合,在此基础上,进一步将两端选择碱基相同的有一定多态性的“2+ 2”引物组合重新组合,组成两端选择碱基不同的“2+ 2”引物组合,而后将多态性较强的“2+ 2”引物一端分别加上第三个选择性碱基,筛选多态性较高、谱带质量好的“2+ 3”或“3+ 2”引物组合,最后进一步筛选“3+ 3”引物组合。这种引物选择过程较随机,筛选目的性强,选择效率高。本研究以 6 个栽培大豆为材料,利用银染方法检测,共计对 218 对 EcoRI 和 MseI 引物组合进行了筛选(表 1)。

表 1 大豆 AFLP 分析引物组合效率表

Table 1 The efficiency of primer combinations selected for AFLP analysis in soybean

引物组合 Primer combination	筛选引物数 No. of selected primer pairs	平均总带数 Average No. of total bands	平均多态性条带数 Average No. of polymorphic bands	多态性百分率 Polymorphic percentage	非特异扩增引物数 Non- specific amplification primers
“2+ 2”	43	54.78	12.50	0.2362	35
“2+ 3”	122	46.92	7.44	0.1620	22
“3+ 2”	15	47.61	5.50	0.1239	5
“3+ 3”	38	45.31	10.08	0.2133	2

研究结果表明,在大豆中采用“2+ 2”引物组合虽然多态性百分率较高,但大多数带型分布较密,或弥散严重,非特异扩增较多;采用“2+ 3”和“3+ 2”引物组合,除个别引物组合外,大多数多态性百分率较低;采用“3+ 3”引物组合,产生的带纹在 50– 110 之间,容易得到分布均匀的引物组合,多态性百分率也较高。因此本研究主要采用“3+ 3”引物组合,辅之以部分“2+ 3”引物组合。但“3+ 3”引物组合的筛选需在“2+ 2”及“2+ 3”和“3+ 2”的基础上进行,因而需要更多工作量的积累。最后选出 17 对多态性百分率较高、且带型丰富的引物组合,用于供试材料 AFLP 分析(见下文),表明在所有供试材料中也是有效的。

2.3 AFLP 不同检测方法的比较

本研究用两对引物组合建立了大豆银染法与同位素法 AFLP 指纹图谱。图 1 为引物组合 M- ACT/E- CGA 分析时,两种方法得到的指纹图谱。图 1 表明,同位素法检测结果上下条带较均匀清晰,银染法检测时上部条带清晰度较高,下部分辨率相对较差,因而银染法只能识别泳道大部分,同位素则可以识别整个泳道。若在银染技术方面作进一步改进,使整个泳道都比较清晰,银染法在条带识别方面还有潜力。银染法和同位素法由于总体分辨能力不同,在一些弱带的判别上有一定出入,但对二者作全面的比较,检测到的主要条带是相同的(见图 1)。表 2 汇总了二对引物组合的分析数据,从可判别统计的条带情

况来看,银染法和同位素法检测的总带数相近,但同位素法多态性条带、多态性百分率较

表 2 AFLP同位素与银染检测方法比较

Table 2 A comparison between isotope labeling and silver- staining method in AFLP analysis

引物组合 Primer combination	总带数 No. of total bands		多态性带 No. of polymor- phic bands		多态性百分率 Polymorphic percentage		H _{av}	
	同位素 Isotope labeling	银染 Silver- staining	同位素 Isotope labeling	银染 Silver- staining	同位素 Isotope labeling	银染 Silver- staining	同位素 Isotope labeling	银染 Silver- staining
M- ACT/E- CGA	82	82	30	29	36. 59	35. 37	0. 1857	0. 2009
M- GGA/E- CGA	78	77	27	26	34. 62	33. 77	0. 1689	0. 2086
平均 Average	75. 0	79. 5	28. 5	27. 5	35. 61	34. 57	0. 1773	0. 2047

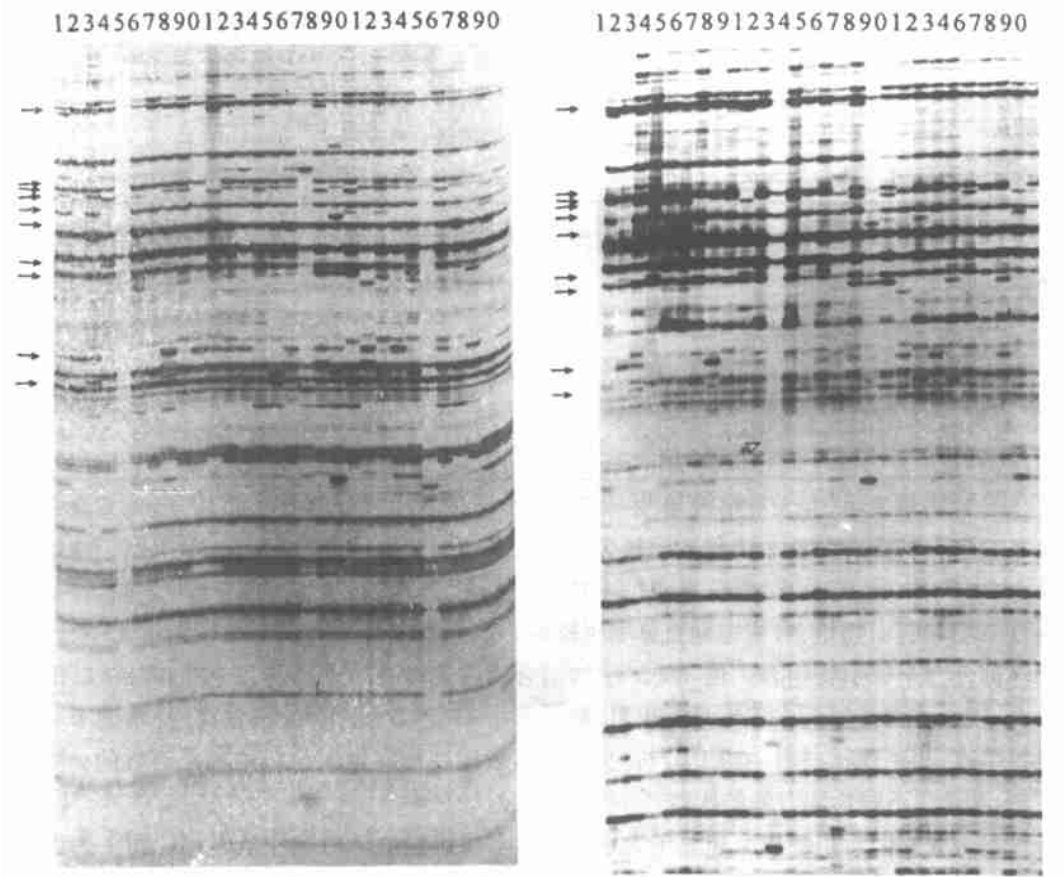


图 1 大豆银染法(左)与同位素标记法(右)的 AFLP指纹比较(引物组合 M- ACT/E- CGA)

Fig. 1 Comparisons of AFLP fingerprints between silver- staining (left) and isotope labeling (right) method

注: 左边材料代号 1- 30; 右边材料代号 1- 30 (缺 10, 25)。

Note: The accession code of the left figure is from 1 to 30; the code of the right is from 1 to 30, lacking 10 and 25. 高,而银染法平均遗传多样性 (H_{av})和有效等位基因的数目和略高于同位素法。鉴于银染法结果与同位素基本相似,可以避免放射性同位素使用,而且经济快速,因而银染法

AFLP是可以广泛应用的

2.4 不同引物组合 AFLP多态性比较

利用 17对引物对 92份材料进行 AFLP银染分析,共得到 1,287条带,分布范围在 35- 720bp之间,其中有 348条多态性条带,多态性百分率平均为 27. 08%。从鉴别材料的效率来讲,引物组合 M- GGA/E- CGA(代号 15)、M- CTC/E- ACT(11)、M- GGA/E- GGC(16)、M- CTC/E- CGA(12)、M- CG/E- CGA(3)的总体鉴别效率较高,这些引物组合可以在大豆品种鉴别时参考采用。而从引物组合所揭示的平均位点多样性程度来看,引物组合 M- CTC/E- ACT(11)、M- CG/E- CGA(3)、M- GGA/E- CGA(15)、M- ACT/E- CGA(4)、M- CAT/E- ACT(7)等揭示的遗传多样性程度较高,多态性百分率也较高,这些引物组合用作大豆遗传多样性研究较为理想(表 3)。可见,评价一个引物组合的有效程度,依研究目的不同而有一定差别,在实际应用时应根据具体研究目的进行选择。

表 3 不同引物组合 AFLP银染法鉴别大豆种质的效果

Table 3 Identification efficiency of primer combinations in AFLP analysis with silver staining method

代号 Code	引物组合 Primer combination	总带数 No. of total bands	多态性带 No. of poly- morphic bands	多态性百分率(%) Polymorphic percentage	鉴别效率(%) Identification rate	Hav
1	M- AG/E- GGA	56	10	17. 86	35. 87	0. 1298
2	M- CG/E- AGA	65	15	23. 08	67. 39	0. 1467
3	M- CG/E- CGA	65	29	44. 62	86. 96	0. 2177
4	M- ACT/E- CGA	82	29	35. 37	83. 70	0. 2009
5	M- ATT/E- CGA	85	16	18. 82	65. 22	0. 1261
6	M- ATT/E- GGA	89	30	33. 71	79. 35	0. 1769
7	M- CAT/E- ACT	74	24	32. 43	84. 78	0. 1945
8	M- CGA/E- ACT	68	18	26. 47	30. 44	0. 0668
9	M- CGG/E- CGA	70	8	11. 43	33. 70	0. 0657
10	M- CGG/E- GGC	81	17	20. 99	27. 17	0. 0774
11	M- CTC/E- ACT	79	29	36. 71	96. 74	0. 2493
12	M- CTC/E- CGA	75	23	30. 67	92. 39	0. 1872
13	M- GGA/E- ACT	95	26	27. 37	79. 35	0. 1556
14	M- GGA/E- AGG	52	12	23. 08	55. 44	0. 1427
15	M- GGA/E- CGA	77	26	33. 77	100. 00	0. 2086
16	M- GGA/E- GGC	109	24	22. 02	93. 47	0. 1260
17	M- GGA/E- TGA	65	12	18. 46	53. 26	0. 1337
	合计 Total	1287	348	456. 86	1165. 23	2. 6055
	平均 Average	75. 7	20. 5	27. 08	68. 54	0. 1533

3 讨论

关于大豆 DNA 的提取,前人多采用叶片提取的方法 McDonald 等 (1994)^[12]从种子中提取 DNA 的步骤较为简单,但用于大豆时,提取的样品质量常不符合 AFLP 分析的要求。为此,本试验进一步优化了从大豆干种子中提取 DNA 的方法,提高了种子检验的效率。

不同的酶切组合和引物组合,扩增结果不相同,本实验通过比较不同酶切组合,发现 EcoH - Msd 酶切时更容易找到多态性引物组合,而且具有较高的多态性。本研究还证实“3' 3'引物组合用于大豆 AFLP 分析较为理想,同时找到了多对理想的引物组合,可以用于大豆种质的指纹分析研究。

通常 AFLP 检测需要使用放射性同位素标记,而且,一般认为,同位素法比银染法更灵敏,尤其使用 ³³P 标记效果较好^[14]。本研究证实,用同位素 ³³P 检测所得到的带型上下较为均匀,分辨率较高;银染法带型较粗,对不同分子量的条带染色深浅不甚一致,容易出现分辨率上高下低的情况,因而需要更多的技巧。本研究通过比较还证实,银染法与同位素法除在一些弱带判别上有一定出入外,所得到的带型基本一致。在实际应用中,不同方法的检测效率是与研究者所掌握的技术水平和熟练程度紧密联系的。只要充分掌握各个技术环节,银染法可以在避免放射性污染、降低成本的同时,同样得到分辨率较高的指纹图谱。

总之,本研究建立的 AFLP 分析体系,在得到稳定清晰的指纹图谱前提下,可使由大豆种子到 AFLP 指纹图谱鉴定结果的整个过程缩短到 2-3 天,极大地提高了分析效率。这对于建立大豆品种标准指纹图谱,大豆品种真实性及纯度检验,对于保护育成品种的知识产权和育种家的权益,促进大豆种质创新及分子标记育种,都有重要的实际意义。

参 考 文 献

- 1 Apuya, N., R., B. L. Frazer, P. Keim et al. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 75: 889~ 901
- 2 Keim, P., R. C. Shoemaker, and R. G. Palmer. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 77: 786~ 792
- 3 Mienie, C. M. S., M. A. Smit, P. J. Pretorius. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of South African soybean cultivars. *Field Crops Res.*, 1995, 43: 43~ 49
- 4 Zhang, J., M. B. McDonald, P. M. Sweeney. Soybean cultivar identification using RAPD. *Seed Sci. & Technol.*, 1996, 24: 589~ 592
- 5 Jiang, R. W., M. S. Akkaya, A. A. Bhagwat, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.*, 1995, 90: 43~ 48
- 6 Maughan, P. J., M. A. Saghai Maroof, G. R. Buss. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, 1995, 38: 715~ 723
- 7 Vos, P. R., Hogers, M., Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23(21): 4407~ 4414

- 8 Zabeau M. and Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number 92402629. 7; Publication number 0535858 A1. European Patent Office, Paris. 1993
- 9 Keim, P., J. M. Schupp, S. E. Travis, et al. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. Crop Sci., 1997, 37: 537~ 543
- 10 Maughan, P. J., M. A. S Maroof, G. R. Buss, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet., 1996, 93: 392~ 401
- 11 Powell, W., M. Morgante, C. Andre, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 1996, 2: 225~ 238
- 12 McDonald, M. B., L. J. Elliot, P. M. Sweeney. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. Seed Sci & Technol., 1995, 22: 171~ 176
- 13 Bassam, B. J., G. Caetano - Anolles, P. M. Gresshoff. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 1991, 196: 80~ 83
- 14 Van Toai, T. T., J. Peng and S. Martin. Optimization of silver-staining AFLP technique for soybean. Soybean Genet. Newsl., 1996, 23: 206~ 209

A STUDY ON AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP) IN SOYBEAN^{*}

Tian Qingzhen¹ Gai Junyi^{1*} Yu Deyue¹ Jia Jizeng²

(1. Soybean Research Institute, Nanjing Agriculture University; National Center of Soybean Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing, 210095; 2. Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Science; Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Beijing, 100081)

Abstract In the present paper, improvement of the DNA extraction from dry soybean seed, comparison between the silver staining and isotope labeling methods, and exploration of the endoenzyme and primer combinations suitable for AFLP analysis in soybeans were presented. Based on this, a simple and fast procedure suitable for soybean AFLP analysis was established, and the representative accessions of *G. soja* and *G. max* from various ecological areas in China were examined by using the suggested procedure.

Key words Soybean; DNA extraction; Silver-staining inspection; AFLP (amplified fragment length polymorphism)

* National Key Science and Technology Project No. 960140106

* * Author for correspondence