

大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 荧光 AFLP 分析体系的建立及优化

仝颜丽¹, 李海东¹, 王玲², 王波³, 郑明刚³

(1. 日照职业技术学院, 山东 日照 276826; 2. 青岛大学, 山东 青岛 266061; 3. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生态中心, 山东 青岛 266061)

摘要: 以大泷六线鱼为材料, 通过对DNA提取质量和浓度、EcoR I /Mse I 酶切反应时间、Mg²⁺浓度、dNTPs浓度、引物浓度以及选择性扩增中预扩增产物稀释倍数等关键因素进行研究, 建立并优化了大泷六线鱼荧光AFLP分子标记反应体系。用优化的反应体系, 筛选到10对适合大泷六线鱼的引物, 为今后利用AFLP标记技术进行大泷六线鱼的遗传多样性研究提供了标准化程序。

关键词: 大泷六线鱼; AFLP; 分子标记; 反应体系

中图分类号: P735; S917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2011)06-0668-06

Establishment and optimization of fluorescence-based AFLP markers for *Hexagrammos otakii*

TONG Yan-li¹, LI Hai-dong¹, WANG Ling², WANG Bo³, ZHENG Ming-gang³

(1. Rizhao Polytechnic, Rizhao 276826, China; 2. Qingdao University, Qingdao 266061, China;

3. The First Institute of Oceanography, Qingdao 266061, China)

Abstract: In this study, we optimized the main factors influencing the results of AFLP, including the quality and concentration of the extracted DNA, reaction time of enzymes EcoRI/MseI digestion, and the concentration of Mg²⁺, dNTPs, selective primer and the dilute multiple of pre-amplification production were also optimized in selective amplification reaction system. Ten pairs of primers were identified from eighty-one pairs of primers by optimizing the AFLP reaction system. The result established a strong foundation for the AFLP analysis of *H. otakii* which provided a standardized program for studying genetic diversity of *H. Otakii*.

Keywords: *Hexagrammos otakii*; fluorescence-based AFLP markers; reaction system

大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 又名欧式六线鱼, 俗称黄鱼, 隶属于鲉形目 (*Scorpaeniformes*)、六线鱼科 (*Hexagrammidae*)、六线鱼属 (*Hexagrammos*)。大泷六线鱼属冷温性近海底层鱼类, 主要分布于我国山东和辽宁等地的近海多岩礁海区以及日本、朝鲜及俄罗斯远东诸海^[1]。六线鱼为沿岸浅海定居性鱼类, 耐低温、适应能力较强、肉味鲜美, 深受国内沿海地区人民的喜爱, 已被列为我国名贵海水养殖对象。目前对该鱼的研究多集中于其生物学、育苗和营养方面^[2-4], 遗传多样性方面的研究还未见报道。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 标记是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 在 PCR 和 RFLP 技术的基础上发展起来的一种 DNA 多态性检测方法, 具有 RAPD 和 RFLP 技术的双重优点。AFLP 对基因组的多态性检测不需要预知该基因组的序列特征, 易于标准化, 被认为是一种理想有效的分子标记技术, 现已被广泛应用于遗传多样性分析、品系分析、生态分析等诸多方面^[6]。在海洋生物领域, AFLP 技术已在栉孔扇贝^[7]、虹鳟^[8]、日本对虾^[9]、大黄鱼^[10]等生物中得到了应用, 但是在 大泷六线鱼 中的研究还未

收稿日期: 2010-08-19; 修订日期: 2011-03-07

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (201009); 国家农业科技成果转化资金项目 (2009-511-208)。

作者简介: 仝颜丽 (1989—), 女, 山东菏泽市人, 主要从事海洋生物基因工程研究。电子邮箱: tong111222333@yeah.net。

通讯作者: 郑明刚, 电子邮箱: zmg@fio.org.cn。

见报道。

针对不同的试验材料, 建立合适的 AFLP 反应体系对于试验结果显得尤为重要。本研究通过对大泷六线鱼荧光 AFLP 反应体系进行优化, 建立了适合大泷六线鱼的荧光 AFLP 分析体系, 为大泷六线鱼的遗传多样性分析及种质资源的保护提供支持。

1 材料与试剂

1.1 实验材料

本实验所用大泷六线鱼取自青岛近岸水域, 实验样品液氮速冻后置-80℃冰箱保存。

1.2 试剂与仪器

EcoR I、Mse I (NEB), T4 DNA ligase (MBI), Taq 酶 (TaKaRa), Mse I / EcoR I 接头 (上海生工), 荧光引物 (上海生工), GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems), Hi-Di Formamide (Applied Biosystems), 超微量分光光度计 (GEHC), PCR 扩增仪 (Bio-Rad), DL2000 marker (TaKaRa), 凝胶成像分析仪 (SYNGENE), ABI3130 genetic analyzer (Applied Biosystems), Bullet Blender 快速组织细胞破碎仪 (Next Advance)

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

采用改进的蛋白酶 K 消化法进行 DNA 的提取: 取-80℃冷冻保藏的肌肉组织 100 mg, 用灭菌的双蒸水冲洗干净, 用吸水纸将表面的水吸干, 置于 1.5 mL 离心管。加入 450 μ L 裂解缓冲液 (4.5 μ L 10 mmol/L Tris-HCl pH=8.0; 90 μ L 100 mmol/L EDTA pH=8.0 和 355 μ L 双蒸水), 于细胞破碎仪将组织破碎, 加入 10% SDS 150 μ L、Proteinase K 7.5 μ L 混匀, 55℃消化 (上下缓慢颠倒数次以充分消化至澄清 (约 3~5 h), 加入 150 μ L NaCl (5mol/L) 混匀, 8 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清。加入等体积预冷的异丙醇, 混匀, -20℃放置 30 min, 6000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 70%乙醇 (600~800 μ L) 洗涤 2~3 遍。500 μ L 双蒸水溶解上述沉淀, 加等体积饱和酚液, 缓慢来回颠倒混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 吸取上层水相, 加等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 缓慢颠倒混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 吸取上层水相, 加等体积氯仿: 异戊醇=24: 1 缓慢颠倒混匀

10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清。上清中加入 1/10 体积 2 mol/L NaAc 和 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20℃放置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min 去乙醇, 500 μ L 70%乙醇洗涤沉淀, 风干加适量双蒸水溶解。取 3 μ L DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 用核酸超微量分光光度计进行定性定量分析。

2.2 酶切体系的优化

酶切反应采用 EcoRI 和 MseI 双酶切组合, 酶切体系为: 10 $\times$ NEB buffer 5 μ L, 100 $\times$ 牛血清白蛋白 (BSA) 0.5 μ L, EcoRI-HF (20 U/ μ L) 1 μ L, MseI (10 U/ μ L) 1 μ L, 模板 DNA 用量 2 μ g 加双蒸水至 50.0 μ L。37℃水浴 1 h, 2 h, 4 h, 6 h 以优化酶切时间, 65℃水浴 20 min, 使酶失活。1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

2.3 接头连接体系

酶切产物加入已退火的 EcoRI 接头和 MseI 接头以及 T4 DNA 连接酶于 16℃过夜连接。连接体系如下: 酶切产物 20.0 μ L, T4 Ligase (3 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 $\times$ T4 Ligase buffer 0.5 μ L, EcoRI 接头 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, MseI 接头 (100 μ mol/L) 0.5 μ L, 加双蒸水至 25.0 μ L。

2.4 预扩增反应体系

以连接产物作为模板进行预扩增反应。预扩增反应体系为: 10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.4 μ L, E + A (10 mmol/L) 0.6 μ L, M + C (10 mmol/L) 0.6 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ L, 连接产物 2 μ L, 加 ddH₂O 至总体积为 20 μ L。扩增程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 20 个循环; 72℃ 10 min。预扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 选择性扩增反应体系及其优化

参照预扩增产物的粗略浓度稀释一定倍数后作为选扩模板, 选扩引物为 E+3/M+3 引物组合, 其中 E+3 为荧光标记引物。选扩反应体系为: 预扩增产物稀释液 5 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.6 μ L, 选择性扩增引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μ L, 加 ddH₂O 至总体积为 20 μ L。作者就对选扩结果影响较大的 4 个因素进行了优化 (表 1)。对其中一个因素优化时, 保持其它因素不变, 比较不同处理结果对扩增结果的影响。

表 1 PCR 反应体系中各因素处理方案
Tab. 1 Different treatments of PCR systems

影响因素	处理或终浓度
预扩增产物稀释倍数	5, 10, 20, 30, 50
dNTPs 终浓度/mmol.L ⁻¹	0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30
引物终浓度/ μ mol.L ⁻¹	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5
Taq 酶用量/U	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5
MgCl ₂ 终浓度/mmol.L ⁻¹	1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50

扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65~56 °C (每个循环降 0.7 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 12 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min。选扩产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确定扩增片段大小范围, 用于后续荧光检测。

2.6 PCR 产物的荧光检测

选取扩产物 0.5 μ L, 加 0.25 μ L 内标 (GeneScan TM-500 LIZ1 Size Standard), 9.25 μ L 去离子甲酰胺 (Hi-Di Formamide), 混匀后加入 96 孔板, 置于 PCR 仪 95 °C 变性 3 min, 立即冰浴 5 min。利用 POP-7™ 分离胶在 ABI-3130xl 自动遗传分析仪上对扩增结果进行分析。用相应的 Run moduLe 进行电泳, 并接收荧光信号。所得光谱数据用遗传图谱 4.0 软件 (GeneMapper 4.0 software) 进行分析。

3 结果与分析

3.1 模板 DNA 的提取

模板 DNA 的制备是非常重要的一个环节, 若 DNA 发生断裂, 酶切结果显然不能代表真实的 DNA 结构, 实验数据不能反映真实的情况。本实验采用改进的蛋白酶 K 消化法进行三次抽提以最大限度的除去杂蛋白, 提取结果经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰明亮 (图 1)。经微量分光光度计测定, 各样品 A260/A280 ≥ 1.80 , A260/A230 ≥ 2.0 , 表明样品纯度较高, 蛋白质等杂质去除较干净, 可以用来进行大泷六线鱼 AFLP 分析。

3.2 酶切时间对酶切反应的影响

基因组 DNA 酶切质量是决定 AFLP 成功与否的关键, 酶切不充分, 所得片段不能涵盖整个基因组导致所得多态性不真实, 因此要对酶切体系进行优化。酶切时间是影响酶切质量的一个重要因素, 不同实验材料因基因组的大小不同, 酶切时间长短也有所差异。本试验用两个不同的样品作为模板进

行酶切。酶切产物经 1% 琼脂糖电泳检测 (图 2), 随着酶切时间的延长, 酶切片段越小浓度越大, 酶切 6 h 所得片段均匀分布在 500 bp 以下, 由于酶切片段在 500 bp 以下时, 在 AFLP 反应中能被优先扩增, 且扩增产物能在凝胶中很好的分离开, 便于多态性的检出。因此本试验酶切时间选择 6 h。

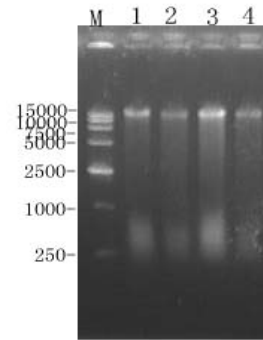


图 1 DNA 琼脂糖电泳检测 (1-4 道均为大泷六线鱼 DNA)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA

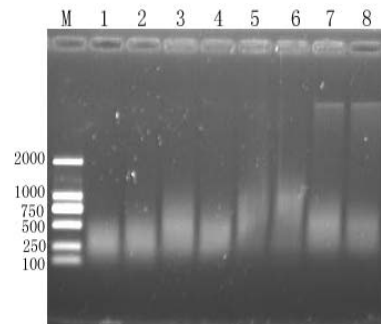


图 2 基因组双酶切电泳检测结果

(M: DNA Marker; 1, 2: 酶切 6 h; 3, 4: 酶切 4 h; 5, 6: 酶切 2 h; 7, 8: 酶切 1 h; 奇数, 偶数分别代表不同样品的模板)

Fig. 2 Result of double enzyme digestion at different reaction times

3.3 预扩增体系结果分析

预扩增的质量直接影响选择性扩增的结果, 本实验设置的反应体系经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 3): 其弥散带主要分布在 100~750 bp 之间, 稀释后可作为选择性扩增的模板。

3.4 AFLP 选择性扩增反应体系的优化

3.4.1 预扩增产物的用量对选择性扩增的影响
AFLP 对模板浓度要求不高, 在浓度相差 1000 倍的范围内, 得到的结果基本一致, 但当模板浓度低于 $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时得到的 AFLP 结果往往不可靠^[11]。1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测结果也显示, 一定范围内, 浓度对选择性扩增的结果影响不大, 如图依次是以稀释 5、10、20、30、50 倍预扩产物作为选择

性扩增的模板得到的谱带, 其大小都处在 500 bp 以下。通过比较, 本试验选择预扩增产物稀释 30 倍作为选择性扩增的模板。

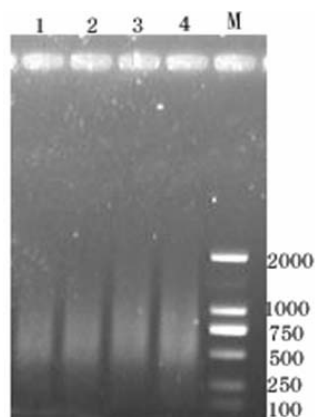


图 3 预扩增产物电泳检测

(M: Marker 1~4 为不同样品的预扩增产物)

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of pre-amplification productions

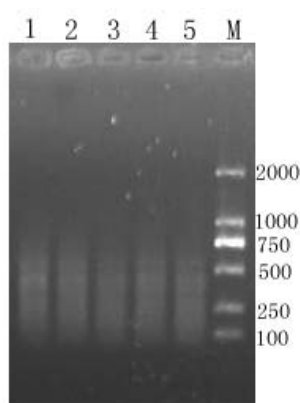


图 4 不同稀释倍数预扩增产物的选择性扩增产物电泳检测

(M: Marker 1~5: 分别为稀释 5, 10, 20, 30, 50 倍的预扩增产物为模板的选扩产物)

Fig. 4 Detection of the selective amplification products with different diluted templates

3.4.2 dNTPs 对选择性扩增的影响 dNTPs 作为扩增产物的原料对扩增效率有密切的影响, dNTPs 浓度过高时会使碱基的错误掺入率增高, 而过低时又会降低 PCR 产率, 本实验的优化结果表明, dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L 时扩增产物清晰且稳定。

3.4.3 引物浓度对选择性扩增的影响 引物浓度对扩增效率也具有很大的影响, 浓度偏高时易出现错配现象且会增加引物二聚体的合成量, 而偏低时扩增出的条带少, 由图可知: 当引物终浓度为 0.1~0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增条带少不利于多态性的研究, 当引物浓度为 0.4~0.5 $\mu\text{mol/L}$ 扩增条带虽然多

但非特异性条带较多影响结果的真实性, 而引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时条带较多且稳定, 因此最佳引物终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.4.4 Taq DNA 聚合酶用量对选择性扩增的影响 Taq DNA 聚合酶催化 PCR 产物的合成, 其用量过大合成效率较高但易引起错配而用量过低会降低 PCR 产物的合成量, 因此, 优化 Taq DNA 聚合酶用量对 PCR 产物的合成量非常重要。当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 时, 扩出的条带少, Taq DNA 聚合酶用量为 1.5~2.5 U 时, 非特异性条带较多, 而当 Taq DNA 聚合酶用量为 1 U 时, 结果较好, 条带较多且稳定。所以选择 Taq DNA 聚合酶用量为 1 U。

3.4.5 MgCl_2 浓度对选择性扩增的影响 MgCl_2 通过影响 Taq DNA 聚合酶的活性影响选扩结果且对引物和模板的结合及特异性也具有一定的影响^[12], MgCl_2 浓度过高时非特异性条带较多, MgCl_2 浓度过小时影响 Taq DNA 聚合酶的活性扩出的条带少或无扩增产物, 在本扩增体系选择 MgCl_2 浓度为 0.200 mol/L。

3.5 大泷六线鱼 AFLP 优化反应体系的验证

本研究为验证 AFLP 优化体系的可靠性, 以 E+AGG/M+CGA 为选择性引物对不同的大泷六线鱼样品进行选择性扩增, 扩增产物用 ABI3130 自动遗传分析仪进行检测 (部分峰谱如图 5 所示)。结果表明不同样品峰谱清晰, 且主要集中在 100~350 bp 范围内, 说明优化的 AFLP 体系能产生较为理想的结果。

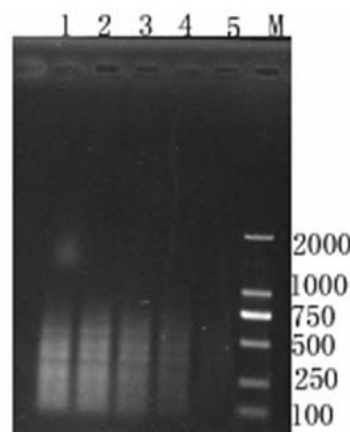


图 5 不同引物浓度的选择性扩增结果检测

(M: Marker 1~5 分别为引物 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时的选择性扩增产物)

Fig. 5 Detection of the selective amplification products with different primer concentrations

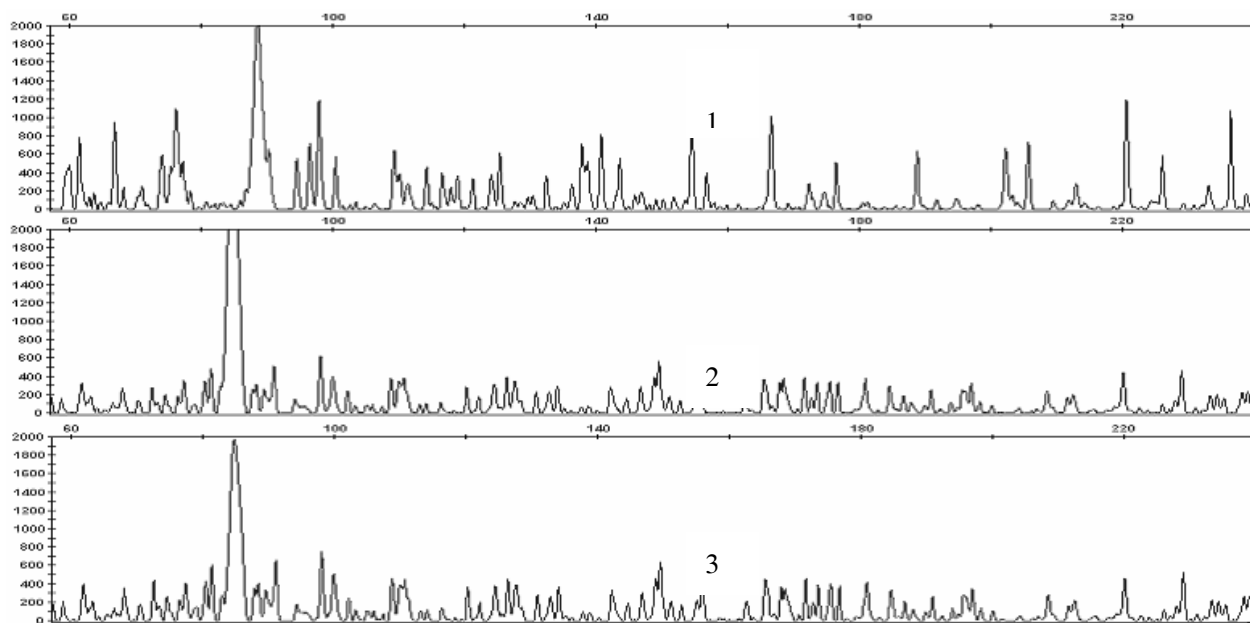


图 6 不同个体的毛细管电泳检测结果

(1—3 代表不同个体在同一选扩引物 E+AGG/M+CGA 下经基因图谱分析软件分析得到的电泳峰谱)

Fig. 6 Capillary electrophoresis of different individuals

4 讨 论

AFLP 是 4 大分子标记 (AFLP、SSR、RAPD、RFLP) 中公认的最有效的分子标记技术, 具有标记多态性强、鉴定灵敏度高、稳定性强、重复性高等诸多优点, 是各物种遗传标记的主要应用技术。

AFLP 操作过程较复杂, 影响结果的因素较多, 不同的材料存在差异, 因此笔者针对大泷六线鱼对影响其结果的几个重要因素进行了优化以期得到真实且准确的结果。高纯度的基因组是 AFLP 成功的最基础条件, 本研究采用改进的蛋白酶 K 消化法将抽提次数增加到三次, 提取的基因组 DNA 纯度较高, 各样品 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$, $A_{260}/A_{230} \geq 2.0$, 符合 AFLP 技术对基因组的要求。酶切质量直接影响后续扩增的成功与否, 50 μL 酶切体系中 2 μg 模板, 酶切 6 h 为宜。预扩反应是对限制性酶切片段的初步筛选即起到对选扩模板纯化的作用, 预扩产物的质量对后续选扩影响较大。本试验就预扩产物的稀释倍数对选扩结果的影响进行了优化, 优化结果显示: 一定范围内稀释倍数选扩结果影响不大。对于大泷六线鱼稀释 30 倍得到的选扩产物符合预期要求, 选扩片段大多处在 500 bp 以下, 亮带主要集中在 100~350 bp。对选择性扩增体系的优化得到了针对大泷六线鱼的最佳体系即: 预扩增产

物 30 倍稀释液 5 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL , 选择性扩增引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.6 μL , Taq DNA 聚合酶 1 U, MgCl_2 (25 mmol/L) 1.6 μL , 加 ddH₂O 至总体积为 20 μL 。该体系得到的选扩产物稳定且清晰便于观察。

本研究中, 采用 F-AFLP (Fluorescent AFLP) 分子标记技术, 用荧光染料代替传统的放射性同位素来标记引物, 从而得到荧光染料标记的片段, 然后用先进的 ABI3130 遗传分析仪进行片段多态性的检测, 该方法和放射性同位素及银染法技术相比, 具有高灵敏度、更为快速准确、易于操作且易标准化, 可获得更多的信息, 且省时省力效率又高, 还可以避免直接用肉眼观察造成的误差, 其结果也更客观。

综上所述, 本研究建立了适合大泷六线鱼基因组 DNA 的 AFLP 反应体系, 为以后利用 AFLP 技术对大泷六线鱼进行遗传连锁图谱构建、群体遗传结构及多样性研究等方面的应用奠定了基础, 以及对其他鱼类的相关研究具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] 唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护 [M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [2] 叶青. 青岛近海欧氏六线鱼食性的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 1992, 4: 51-54.

- [3] 吴立新, 秦克静, 姜志强, 等. 大泷六线鱼人工育苗初步试验 [J]. 海洋科学, 1996, 4: 32-34.
- [4] 王书磊, 姜志强, 苗治欧. 大连海区大泷六线鱼生物学指标的季 节变化 [J]. 水产科学, 2005, 24(5): 1-3.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger- printing [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [6] Vantoai T T, Peng J, Martin S K S. Using AFLP markers to determine the genomic contributions of parents to populations [J]. Crop Science, 1997, 37: 1370-1373.
- [7] Roa A C, Maya M M, Duque M C, et al. AFLP analysis of relationships among cassava and other Manihot speices [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 741-750.
- [8] 潘洁, 包振民, 赵洋, 等. 栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性 分析 [J]. 高技术通讯, 2002, 12: 78-82.
- [9] Young W P, Wheller P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. Genetics, 1998, 148: 839-850.
- [10] Moore S S, Whan V, Davis G P, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicas* [J]. Aquaculture, 1999, 173: 19-32.
- [11] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井大黄鱼 AFLP 指纹多态 性的研究 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198-201.
- [12] Sambrook J, David W R. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出 版社, 1993.