



中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2347—2014

刚竹属 DNA 扩增片段长度多态性 (AFLP) 分析方法

Method of DNA amplification fragment length polymorphism (AFLP)
for *Phyllostachys* bamboo

2014-08-21 发布

2014-12-01 实施

国家林业局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准的附录为规范性附录。

本标准由全国竹藤标准化技术委员会(SAC/TC 263)提出并归口。

本标准起草单位：国际竹藤中心、北京林业大学、中国林业科学研究院亚热带林业研究所。

本标准主要起草人：李雪平、高志民、牟少华、陈敏、袁金玲。

刚竹属 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP) 分析方法

1 范围

本标准规定了刚竹属(*Phyllostachys*)竹种的 DNA 提取、酶切、连接、扩增实验步骤及采用的仪器设备。

本标准适用于刚竹属竹种 DNA 多态性的分析。

2 试剂

2.1 所用化学试剂如没有特殊说明,均为分析纯。

2.2 DNA 提取液: 1 mol/L Tris-HCl pH8.2、细胞裂解液(1 mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25 mol/L EDTA pH8.0, 5 mol/L 氯化钠, 2% CTAB)与 5% SLS 按 5:5:2 混合,在使用前加入亚硫酸钠至终浓度为 0.02 mol/L。

2.3 三氯甲烷:异戊醇=24:1。

2.4 异丙醇。

2.5 70%乙醇:70 mL 无水乙醇加蒸馏水定容到 100 mL。

2.6 5 mol/L 氯化钠:称取 29.22 g 氯化钠,用蒸馏水溶解后定容到 100 mL。

2.7 0.5 mg/mL 溴化乙锭:称取 5 mg 溴化乙锭,用蒸馏水溶解后定容到 10 mL。

2.8 变性缓冲液:去离子甲酰胺 50 mL,EDTA(0.5 mol/L,pH=8.0)1 mL,二甲苯青 FF 0.125 g,溴酚蓝 0.125 g。

2.9 10×TBE:Tris 108.0 g,硼酸 55.0 g,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)40 mL,定容到 1 000 mL。

2.10 40%丙烯酰胺溶液:2.0 g 甲叉双丙烯酰胺,38.0 g 丙烯酰胺混合加水定容到 100 mL。

2.11 10%过硫酸胺溶液:1.0 g 过硫酸胺加水定容到 10 mL。

3 仪器

3.1 PCR 仪(具有 touchdown 功能,温度精度±0.2 ℃)。

3.2 移液器。

3.3 4 ℃低温离心机(max 14 000 r/min 以上)。

3.4 水浴锅。

3.5 电泳仪(可满足 DNA 测序)。

3.6 紫外分光光度计。

3.7 分析天平。

3.8 摇床。

4 试验步骤

4.1 DNA 提取

按照附录 A 的方法提取和检测竹子基因组 DNA。电泳检测 DNA 主带完整、平均分子量>20 kb;

纯度为 $1.8 < OD_{260} / OD_{280} < 2.0$ 。

4.2 酶切反应

对所选样品采用 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切：

酶切体系 (20 μ L) 为：10 \times 酶切缓冲液 2 μ L；*EcoR* I (10 U/ μ L) 0.4 μ L；*Mse* I (10 U/ μ L) 0.4 μ L；模板 DNA 200 ng；加超纯水至 20 μ L。

酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C，3 h；反应结束后 65 $^{\circ}$ C 10 min 使内切酶失活。

4.3 连接反应

接头序列参照附录 B。

反应体系 (20 μ L) 为：10 \times T4 缓冲液 2 μ L；*EcoR* I 接头 (50 μ mol/L) 1 μ L；*Mse* I 接头 (50 μ mol/L) 1 μ L；T4 DNA 连接酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L；酶切产物 10 μ L；加超纯水至 20 μ L。

连接反应条件为：4 $^{\circ}$ C 过夜。

4.4 预扩增反应

预扩增引物参照附录 B。

反应体系为：10 \times 缓冲液 2 μ L；dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μ L；Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L；预扩增引物 E_{00} (20 μ mol/L) 0.5 μ L；预扩增引物 M_{00} (20 μ mol/L) 0.5 μ L；连接模板 2 μ L；加超纯水至 20 μ L。

PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 45 s；50 $^{\circ}$ C 复性 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，26 个循环。

4.5 选择性扩增反应

选择性扩增引物参照附录 B。

反应体系为：10 \times 缓冲液 2 μ L；dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μ L；Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L；选择性扩增引物 E_{primer} (20 μ mol/L) 1 μ L；选择性扩增引物 M_{primer} (20 μ mol/L) 1 μ L；模板 DNA 2 μ L (预扩增产物稀释 20 倍)；加超纯水至 20 μ L。

PCR 扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 35 s，65 $^{\circ}$ C 复性 35 s (每循环降低 0.7 $^{\circ}$ C)，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，12 个循环；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，56 $^{\circ}$ C 复性 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，23 个循环。

4.6 变性

将 20 μ L 变性缓冲液加入 PCR 反应产物，95 $^{\circ}$ C 变性 5 min。

4.7 制胶和电泳

按附录 C 进行。

4.8 染色

按附录 D 进行。

4.9 数据统计

选取电泳平板上清晰可辨的电泳条带，在相同片段位置上，以“1”和“0”分别记录条带的有无，制作 1/0 矩阵。

附 录 A
(规范性附录)
DNA 的提取及检测

A.1 DNA 提取

- A.1.1 取 0.1 g 幼嫩叶片,于液氮中迅速研磨成粉末,快速移至 1.5 mL 离心管中,置于冰上。
- A.1.2 加入 65 ℃ 预热的 DNA 提取液 650 μL,在 65 ℃ 水浴中保温 40 min~60 min,期间颠倒混匀 2 次。
- A.1.3 加入 650 μL 三氯甲烷/异戊醇(24 : 1),在室温下混匀,13 000 rpm 离心 10 min。
- A.1.4 吸取 430 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中,用三氯甲烷/异戊醇重复抽提 1 次。
- A.1.5 吸取 350 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,于 -20 ℃ 放置 30 min。
- A.1.6 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。
- A.1.7 加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,在超净工作台内风干。
- A.1.8 加入 200 μL 超纯水溶解 DNA。
- A.1.9 加入 200 μL 5 mol/L 氯化钠,混匀后加入 2 倍体积的无水乙醇,沉淀 20 min。
- A.1.10 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。
- A.1.11 加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,在超净工作台内风干。
- A.1.12 用 40 μL 超纯水溶解 DNA,存于 -20 ℃ 备用。

A.2 DNA 质量及浓度检测

- A.2.1 在紫外分光光度计上读取 OD_{260} 和 OD_{280} ,计算 OD_{260}/OD_{280} 。
- A.2.2 根据下面公式计算 DNA 浓度。
- $$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/mL})=50\times OD_{260}\text{的读数}\times\text{稀释倍数}$$
- A.2.3 用 1%琼脂糖电泳检测 DNA 分子量大小。

LY/T 2347—2014

附 录 B
(规范性附录)
扩增引物和接头

引物和接头序列见表 B.1。

表 B.1 引物和接头序列

接头	序列(5'-3')
<i>Eco</i> R I 接头 1	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>Eco</i> R I 接头 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I 接头 1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>Mse</i> I 接头 2	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物	序列(5'-3')
E_{00}	GACTGCGTACCAATTC
M_{00}	GATGAGTCCTGAGTAA
选择性扩增引物 $E_{\text{primer}}/M_{\text{primer}}$	序列(5'-3')
E43A	GACTGCGTACCAATTCATAA
E43C	GACTGCGTACCAATTCATAC
E43G	GACTGCGTACCAATTCATAG
E43T	GACTGCGTACCAATTCATAT
E44A	GACTGCGTACCAATTCATCA
M51CC	GATGAGTCCTGAGTAACCACC
M51CG	GATGAGTCCTGAGTAACCACG
M51CA	GATGAGTCCTGAGTAACCACA
M51GA	GATGAGTCCTGAGTAACCAGA
M51GC	GATGAGTCCTGAGTAACCAGC
M51GG	GATGAGTCCTGAGTAACCAGG

已验证的引物组合：E43A/M51CA、E43A/M51CC、E43A/M51GA、E43A/M51GC、E43A/M51GG、E43C/M51CA、E43C/M51CC、E43C/M51CG、E43G/M51GA、E43G/M51GC、E43T/M51CG、E44A/M51GA、E44A/M51GC、E44A/M51GG。

附 录 C
(规范性附录)
制胶及电泳

C.1 制胶溶液配制(玻璃板规格 35 cm×45 cm)

将 6 mL 10×TBE 和 27 g 尿素混合加超纯水定容到 51 mL,加入 9 mL 40%的丙烯酰胺溶液,160 μL 10%过硫酸胺和 60 μL TEMED(4 °C 保存),混匀后立即灌胶。此为一块胶用量。

C.2 灌胶

C.2.1 亲水玻璃处理

C.2.1.1 洗净玻璃板。

C.2.1.2 亲水剂制备:3 mL 95%酒精,5 μL 亲水硅烷,15 μL 冰醋酸混合。此为一块板用量。

C.2.1.3 玻璃风干后,用 2 mL 95%的酒精轻轻涂搽玻璃板。

C.2.1.4 干燥 5 min,用纸巾将亲水剂在玻璃板上涂匀。

C.2.1.5 干燥 5 min,用 2 mL 95%的酒精再轻轻涂搽玻璃板(以均一方向),然后在垂直方向再涂搽一遍。

C.2.1.6 晾干 10 min。

C.2.2 疏水玻璃处理

C.2.2.1 洗净玻璃板。

C.2.2.2 玻璃板风干后,用 2 mL 95%的酒精轻轻涂搽玻璃板。

C.2.2.3 干燥 5 min,换手套,用纸巾浸疏水硅烷,均匀涂搽玻璃板。

C.2.2.4 干燥 5 min,用 2 mL 95%的酒精再轻轻涂搽玻璃板(以均一方向),然后在垂直方向再涂搽一遍。

C.2.2.5 晾干 10 min。

C.2.3 将亲水玻璃板放在水平的泡沫垫上,亲水面向上,将两个胶条平行分置于其较长的两边,然后轻轻放上疏水玻璃,疏水面向下。用夹子夹住固定。

C.2.4 用胶带密封齐边,留出凹边。

C.2.5 将有凹边的一端垫高 15°~20°,将新配制的制胶液用注射器从一边均匀灌入,胶中不留气泡。

C.2.6 及时将梳子平直边从凹口插入胶液中。

C.2.7 胶聚合时间控制在 2 h~4 h。

C.3 电泳

C.3.1 向电泳槽(35 cm×45 cm)底盒注入 400 mL 1×TBE 缓冲液,在上盒注入 1 600 mL 0.5×TBE 缓冲液。

C.3.2 轻轻拔掉梳子,固定玻璃于电泳仪上,补充上盒缓冲液没过凹边,用移液器冲洗凹口缝隙,90 W 预电泳 30 min。

C.3.3 预电泳完毕后断开电源,再次冲洗缝隙,然后将梳子齿端插入凹口缝隙,其齿尖端轻轻的插进胶中,以构成点样孔。

C.3.4 上样 3.0 μL~4.5 μL。

C.3.5 90 W (维持电泳温度不超过 50 °C)电泳,直到浅蓝色的指示带距离底端 1/5 处。

LY/T 2347—2014

附 录 D
(规范性附录)
银 染 程 序

D.1 各组分配方(现配现用)

固定液:200 mL 酒精+14 mL 冰醋酸+1 800 mL 重蒸水。

银染液:3.0 g 硝酸银+2 000 mL 重蒸水。

显影液:30.0 g 氢氧化钠+8 mL 37%甲醛+2 000 mL 重蒸水。

D.2 银染步骤

D.2.1 固定:取合适的塑料盒,倒入 2 000 mL 新配制的固定液,40 r/min~60 r/min 轻轻摇动 20 min。

D.2.2 冲洗:用 2 000 mL 重蒸水彻底冲洗胶板 3 次。

D.2.3 染色:加入 2 000 mL 染色液,40 r/min~60 r/min 摇动染色 30 min。

D.2.4 冲洗:用重蒸水冲洗胶板不超过 5 s。

D.2.5 显影:把胶板快速转移到 2 000 mL 显影液中,40 r/min~60 r/min 摇动,直至带纹出现。

D.2.6 冲洗:用重蒸水冲洗 2 次。

D.2.7 胶的干燥:室温下自然干燥 24 h 以上。

D.2.8 试验结果记录:拍照,记录条带。