

# 菜薹荧光微卫星锚定片段长度多态性 (MFLP) 技术体系的建立

郭培国<sup>1,\*</sup>, 李荣华<sup>1</sup>, 张 华<sup>2</sup>, 郑岩松<sup>2</sup>, 黄红弟<sup>2</sup>, 夏岩石<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广州大学生命科学学院, 广州 510006; <sup>2</sup>广州市农业科学研究院, 广州 510308)

选用 16 个菜薹 (菜心) 品种作材料, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 荧光引物 M13-F-IRDye 700 购自美国 LICOR 公司, 其序列为 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'; SSR 锚定引物、加尾 SSR 锚定引物、*MseI* 接头、预扩增和选择性扩增引物均由上海生物工程有限公司合成, 用于 PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、*MseI* 限制性内切酶、*T4* DNA 连接酶等试剂购自上海生工生物工程有限公司。根据 MFLP 的基本原理, 调节酶切反应、预扩增和选择性扩增的条件, 运用琼脂糖凝胶电泳检测预扩增效果, 利用 LICOR 4300 DNA 遗传分析仪进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测选择性扩增产物。

经过多次摸索和探讨, 建立了适合于菜薹的荧光 MFLP 技术体系, 主要方法如下。(1) 酶切反应: 酶切反应液总体积为 30  $\mu\text{L}$ , 包括菜薹 DNA ( $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 3.0  $\mu\text{L}$ , *MseI* 酶 ( $10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  反应缓冲液 3.0  $\mu\text{L}$ , 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下酶切 2 h, 之后在 80  $^{\circ}\text{C}$  条件下保温 20 min 终止反应。(2) *MseI* 接头制备: 取 *MseI* 接头 1 ( $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 *MseI* 接头 2 ( $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 62  $\mu\text{L}$ , 混均后在 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 取出后放在操作台上冷却 20 min, 作为下步反应的 *MseI* 接头。(3) 连接: 反应总体积为 40  $\mu\text{L}$ , 包括 *MseI* 酶切产物 30  $\mu\text{L}$ , *MseI* 接头 1  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  反应缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , *T4* DNA 连接酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 6.8  $\mu\text{L}$ , 在 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 5 h, 产物作预扩增模板。(4) 预扩增: 反应总体积为 30  $\mu\text{L}$ , 含预扩增模板 6  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ , SSR 锚定引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ , *MseI* 选择性引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR 缓冲液 3.6  $\mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 0.9  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 25 个 PCR 循环 (94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min)。(5) 选择性扩增: 10  $\mu\text{L}$  反应体积, 含选择性扩增模板 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.15  $\mu\text{L}$ , 加尾 SSR 锚定引物 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR 缓冲液 1.2  $\mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 0.3  $\mu\text{L}$ , M13 荧光引物 ( $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ; 选择性扩增的 PCR 程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  (每个循环下降 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ) 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 9 次, 再按 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 循环 25 次。

按此体系操作 16 个菜薹材料预扩增产物在 300~900 bp 区域呈明显的弥散带, 表明预扩增效果好; 16 个菜薹品种的选择性扩增结果显示 MFLP 荧光图谱清晰, 多态性条带丰富可辨, 表明该技术体系适用于菜薹材料的基因分型。

**关键词:** 菜薹; 荧光 MFLP; 技术体系的建立

**中图分类号:** S 634.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) S-2541-01

**收稿日期:** 2011-07-20

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30871526); 广州市科技支撑项目 (2009Z1-E801)

\* E-mail: guopg@gzhu.edu.cn; Tel: 020-39366911