

蔡志翔,沈志军,严 娟,等. 桃甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术体系的建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):43-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.012

桃甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术体系的建立

蔡志翔,沈志军,严 娟,马瑞娟,俞明亮

(江苏省农业科学院园艺研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:为建立适合桃的甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism,简称 MSAP)反应体系,以桃 PCM-1R、PCM-1G 为材料,对 MSAP 技术中的关键因素进行优化。结果表明,500 ng 基因组 DNA 用 *EcoR* I、*Hpa* II 或 *Msp* I 各 10 U(0.5 μ L,2 000 U/mL),37 $^{\circ}$ C 保温 12 h,即可酶切完全;25 μ L 选择性扩增体系中,含有 2 μ L 10 倍稀释的预扩增产物、各 1 μ L 上下游引物、2.5 μ L 10 \times *Taq* buffer、2.5 μ L dNTP mix(各 0.2 mmol/L)、2.5 μ L 25 mmol/L *MgCl*₂、0.25 μ L *Taq* DNA 聚合酶。在该体系下选用 256 对引物对桃叶片进行甲基化模式分析,经筛选获得 23 对扩增条带清晰、重复性好的引物,PCM-1R、PCM-1G 总甲基化率分别为 28.0%、25.7%。

关键词:桃;DNA 甲基化;MSAP;体系优化

中图分类号: S188;S662.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0043-03

DNA 甲基化是真核细胞基因组主要的修饰方式之一,DNA 甲基化特别是胞嘧啶甲基化具有表观遗传效应和突变效应,与基因表达调控、细胞分化、基因组印记、性染色体失活及细胞记忆等生物学过程密切相关^[1-4]。1995 年,Vos 等首次将随机扩增多态性与限制性内切酶片段长度多态性 2 种分子标记有机结合^[5],建立了扩增片段长度多态性分析技术。1997 年,Gonzalzo 等已经尝试用随机引物和对甲基化敏感不同的同裂酶 *Hpa* II、*Msp* I 来进行甲基化分析^[3]。Xiong 等于 1999 年首次证明甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism,简称 MSAP)是一种可靠的检测植物 DNA 甲基化的方法^[6],它操作相对便捷,可检测出样品

DNA 中大量甲基化位点,因多态性高、引物设计简单等优点而被广泛应用。目前,MSAP 方法在脐橙^[7]、萝卜^[8]、杂交籼稻^[9]、橡胶树^[10]、苹果^[11]等多种植物中都有应用,但在桃的相关研究中尚未见应用报道。PCM-1R(叶片紫红色)、PCM-1G(叶片绿色)为 PCM-1(叶片紫红-绿杂色)的无性繁殖后代植株,本研究以这 2 个植株为试验材料,建立桃 MSAP 体系,并进行引物筛选,以期为进一步研究桃 DNA 甲基化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PCM-1R、PCM-1G,由国家果树种质南京桃资源圃提供。

1.2 仪器与试剂

主要仪器有 Biometra T-Gradient PCR 仪、Eppendorf 5810R 冷冻离心机、BioRad 电泳仪等。

主要试剂:*EcoR* I、*Msp* I、*Hpa* II,New England BioLabs;*Taq* DNA 聚合酶,Thermo Scientific;其他试剂为国产或进口分

收稿日期:2015-10-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31101517);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)5034]。

作者简介:蔡志翔(1979—),男,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事桃种质资源收集、保存、评价工作。Tel:(025)84390855;E-mail:czx1y05@163.com。

transformation of sorghum using an improved *in vitro* regeneration system[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2007,91(2):155-164.

[23] Wernicke W, Brettell R. Somatic embryogenesis from sorghum bicolor leaves[J]. Nature,1980,287(5778):138-139.

[24] Masteller V J, Holden. The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum[J]. Plant Physiol,1970(45):362-364.

[25] Cai T S, Barbara D, Larry B. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghum[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1987,9(3):245-252.

[26] 石永顺,石太渊,王艳秋,等. 抗生素对高粱茎尖再生的影响及再生体系的建立[J]. 杂粮作物,2004,24(2):78-79.

[27] 林 凤,张春宇,王洪岩,等. 抗生素对高粱茎尖再生的影响及再生体系的建立[J]. 中国生态农业学报,2005,13(2):74-76.

[28] 张明洲,崔海瑞,舒庆尧,等. 高粱茎尖再生体系及其遗传转化影响因子的研究[J]. 核农学报,2006,20(1):23-26.

[29] 刘宣雨,刘树君,宋松泉. 建立甜高粱高频、高效再生体系的研究[J]. 中国农业科学,2010,43(23):4963-4969.

[30] 赵利铭,刘树君,宋松泉. 甜高粱再生体系的建立[J]. 植物学通报,2008,25(4):465-468.

[31] 丛靖宇,董婷婷,刘国军,等. 甜高粱组织再生研究[J]. 作物杂志,2011(3):24-28.

[32] Smith R H, Bhaskaran S, Schertz K. Sorghum plant regeneration from aluminum selection medium[J]. Plant Cell Report,1983,2(3):129-132.

[33] 棚维言,葛玉红,冯斗等. 不同基因型甜高粱愈伤组织与丛生芽诱导条件优化[J]. 南方农业学报,2011,42(6):586-590.

[34] 卫志明,许智宏. 高粱原生质体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯,1989(6):45-48.

[35] 石太渊,杨立国. 基因型和培养基对高粱幼穗离体培养的影响[J]. 国外农学:杂粮作物,1995(4):27-29.

析纯。接头及引物由英潍捷基公司合成,详见表 1。

表 1 接头和引物序列		
类别	名称	序列(5'→3')
接头	<i>Eco</i> R I - adapter I	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>Eco</i> R I - adapter II	AATTGGTACGCAGTC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I - adapter I	GATCATGAGTCTGCT
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I - adapter II	CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物	EA	GACTGCGTACCAATTCA
	H/MT	ATCATGAGTCTGCTCGGT
选择性扩增引物	E + A **	GACTGCGTACCAATTCA + **
	H/M + T **	ATCATGAGTCTGCTCGGT + **

注:“**”表示 A、T、C、G 的任意 2 个碱基。

1.3 试验方法

1.3.1 桃叶片 DNA 提取 桃叶片 DNA 提取参照王富荣等改良 CTAB 法^[12]。

1.3.2 桃 MSAP 双酶切体系优化 20 μL 体系:500 ng 模板 DNA,2 μL 10 × NEB Buffer (*Eco*R I/*Msp* I 使用 NEB4,*Eco*R I/*Hpa* II 使用 NEB1),内切酶 *Eco*R I/*Msp* I 或 *Hpa* II 用量分为 1、5、10、20 U 4 种,用去离子水补足体积至 20 μL。体系混匀后置于 Biometra T - Gradient PCR 仪上,分别于 37 ℃ 温育 4、8、12、16、20 h,80 ℃ 失活 20 min,取 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,筛选出最佳酶切时间、最佳内切酶用量。

接头连接后进行预扩增。25 μL 预扩增体系:2.5 μL 10 × *Taq* buffer,2.5 μL dNTP mix (各 0.2 mmol/L),0.5 μmol/L 预扩增引物 E + A、H/M + T,2 μL 模板 DNA (连接产物稀释 10 倍),2.5 μL 25 mmol/L MgCl₂,0.25 μL 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶,用去离子水补足至 25 μL。扩增程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,36 个循环;72 ℃ 15 min。

1.3.3 桃 MSAP 选择性扩增及引物的筛选 采用 E + A **/H/M + T ** 引物组合。分别将预扩增产物稀释 5、10、20、50 倍,对选择性扩增模板浓度进行优化。反应体系与预扩增反应体系相同,扩增程序:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s(每次循环降低 0.7 ℃),72 ℃ 1 min,共 13 个循环;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 23 个循环;72 ℃ 延伸 15 min。

用优化后的体系对 E + A **、H/M + T ** 共 256 对引物进行筛选。产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 选择性扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,95 ℃ 变性 10 min,用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳;银染参照梁宏伟等的方法^[13]。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA

琼脂糖凝胶电泳结果显示,所提基因组 DNA 主带清晰(图 1)。经紫外分光光度测定,结果显示 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.7~1.9 范围内,说明 DNA 纯度高,蛋白质、多糖及酚类含量极少,满足 MSAP 分析对 DNA 的要求。

2.2 桃 MSAP 双酶切体系优化

基因组 DNA 经不同用量的内切酶双酶切,再用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。由结果可知,对于 20 μL 体系、500 ng 模板 DNA,1 U 内切酶用量酶切不完全,5、10、20 U

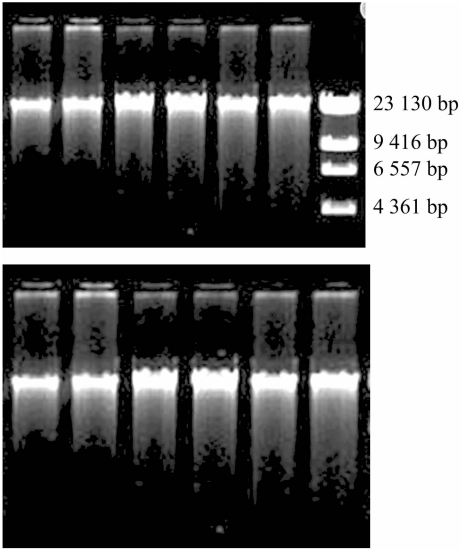


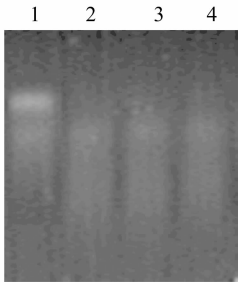
图1 DNA 琼脂糖检测结果

内切酶用量目测酶切完全,条带差异不大。由于即使极少量的不完全酶切也会影响后续试验,因此为彻底排除不完全酶切对后续试验的影响且尽可能节约酶用量,对于 20 μL 体系、500 ng 模板 DNA 选用 10 U 内切酶。

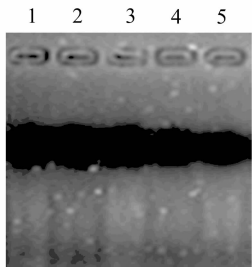
基因组 DNA 经不同酶切时间酶切,1% 琼脂糖电泳检测结果显示,对于 20 μL 体系、500 ng 模板 DNA、10 U 内切酶用量条件,不同酶切时间的效果表现为,酶切时间为 4 h 时,酶切不完全,8、12、16、20 h 基本酶切充分且无明显差异(图 3),为在保证酶切完全的前提下节省酶切时间,选择酶切时间为 12 h。

2.3 桃 MSAP 选择性扩增体系优化

选择性扩增产物于变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,结果表明,以 20 倍稀释 DNA 为模板扩增条带更清晰,且小分子量条带较易分辨,因此确定使用 20 倍稀释的预扩增产物为模板进行选择性的扩增。



1~4 号泳道内切酶用量分别为 1、5、10、20 U
图2 双酶切条件下不同内切酶用量的酶切效果

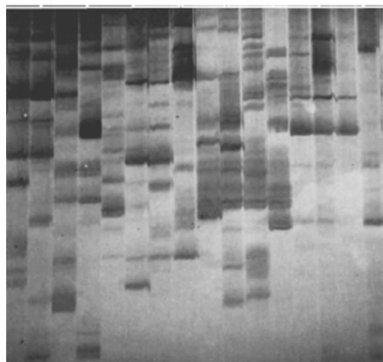


1~5 号泳道酶切时间分别为 4、8、12、16、20 h
图3 双酶切条件下不同酶切时间的酶切效果

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果初步分析

用256对MSAP选择性扩增引物对桃PCM-1R、PCM-1G的叶片DNA样品进行全基因组甲基化分析,筛选出23对条带清晰、丰富且重复性好的引物组合(图4)。扩增出200~1 000 bp的位点397个,其中PCM-1R、PCM-1G半甲基化位点分别为44、38个,分别占全部位点的11.1%、9.6%;全甲基化位点分别为67、64个,分别占全部位点的16.9%、16.1%;总甲基化率分别为28.0%、25.7%,PCM-1R略高于PCM-1G。

EM EH EM EH EM EH EM EH
G R G R G R G R G R G R G R



EM—*EcoR* I/*Msp* I 酶切后扩增产物; EH—*EcoR* I/*Hap* II 酶切后扩增产物; G—PCM-1G; R—PCM-1R

图4 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

3 结论与讨论

DNA在含有多糖、酚类和蛋白质的情况下容易造成酶切失败,体现在聚丙烯酰胺凝胶电泳胶版上端大分子片段多且背景加深^[14],因此高质量的DNA是MSAP成功的基础。一般来说,十二烷基硫酸钠(SDS)法提取的DNA会有较多的多糖,使DNA呈胶冻状,而CTAB法提取纯化可基本除去多糖。桃叶片中糖及酚类物质含量较多,因此本试验采用王富荣等改良CTAB法提取基因组DNA^[12],虽然产量略低,但有效去除了蛋白质、多糖及酚类杂质,保证了DNA的质量。

限制性内切酶单位定义:在合适的温度下,完全消化1 μg DNA底物所需的酶量定义为1个单位(1 U)。在这个单位定义中,有几个不确定因素:首先是底物,不同的酶单位定义选择的底物可能不同;其次是限制性内切酶在底物DNA上酶切位点的个数。酶单位定义要求完全消化,底物上某个酶的酶切位点数量的多少,直接影响该酶的单位定义。因而在进行酶切时,用1 U酶消化1 μg DNA的通常做法是很不科学的,这也导致在实际工作中,要进行多次试验才能确定最合适的酶切条件。

研究表明,由于MSAP使用的同裂酶只能识别“CCGG/GGCC”位点的胞嘧啶甲基化,而不能对“CCGG/GGCC”位点以外的胞嘧啶甲基化进行修饰,获得的结果与基因组中实际的甲基化水平可能存在差异^[15]。但由于约90%的甲基化修饰位于“CpG”二核苷酸或“CpNpG”三核苷酸重复区内,因此多数研究者认为“CCGG/GGCC”位点的甲基化修饰比例能够客观反映植物基因组甲基化修饰水平^[16]。

不同物种或同一物种的不同生长期、不同生长环境DNA甲基化水平有很大的差异,如脐橙甲基化率为4.7%~

15.0%^[7],苹果甲基化率为16.28%~21.77%^[11],半夏多倍体复合体甲基化率为54%~58%^[17],不同生态区同一基因型烟草甲基化率相差5.78个百分点^[18]。本试验中的PCM-1R、PCM-1G均为3年生植株,且种植于同一田块,基本上可以排除生长环境与树龄对试验结果的影响。

参考文献:

- [1] Rossi V, Motto M, Pellegrini L. Analysis of the methylation pattern of the maize opaque-2 (*O₂*) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the *O₂* B-Zip protein and other endosperm factors can bind to methylated target sequences[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(21): 13758-13765.
- [2] Jablonka E, Lamb M J. The changing concept of epigenetics[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 981(981): 82-96.
- [3] Gonzalgo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation[J]. *Mutation Research*, 1997, 386(2): 107-118.
- [4] Tariq M, Paszkowski J. DNA and histone methylation in plants[J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20(6): 244-251.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [6] Xiong L Z, Xu C G, Saghai - Maroof M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(3): 439-446.
- [7] 洪柳, 邓秀新. 应用MSAP技术对脐橙品种进行DNA甲基化分析[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(11): 2301-2307.
- [8] 柳李旺, 宋贤勇, 龚义勤, 等. 萝卜MSAP体系优化与抽薹过程中MSAP分析[J]. *江苏农业科学*, 2006(6): 203-206.
- [9] 彭海, 江光怀, 张静, 等. 中国杂交水稻DNA甲基化多样性与遗传稳定性[J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(1): 45-53.
- [10] 吴春太, 李维国, 黄华孙. 橡胶树MSAP反应体系的建立及其对无性系DNA的甲基化分析[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(9): 141-144.
- [11] 吕晓婷, 赵春梅, 王爱华, 等. 苹果MSAP技术体系的优化及其应用[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(22): 287-292.
- [12] 王富荣, 赵剑波, 章镇, 等. 适于AFLP分析用的桃成熟叶片DNA提取方法[J]. *果树学报*, 2006, 23(4): 638-641.
- [13] 梁宏伟, 王长忠, 李忠, 等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1379-1382.
- [14] 曹喜兵, 赵改丽, 范国强. 泡桐MSAP体系建立及引物筛选[J]. *河南农业大学学报*, 2012, 46(5): 535-541.
- [15] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(17): 3640-3659.
- [16] Reyna - López G E, Simpson J, Ruiz - Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 253(6): 703-710.
- [17] 薛梅, 陈成彬, 陈力, 等. 半夏多倍体复合体基因组DNA甲基化状态的MSAP分析[J]. *中草药*, 2008, 39(11): 1713-1716.
- [18] 李辉, 孙焕良, 李德芳. 不同生态区同一基因型烤烟表观遗传的MSAP分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 32-36.