

Multiplex - CAPS 技术及其在番茄遗传鉴定中的应用

王孝宣¹ 杜永臣¹ 朱德蔚¹ Luigi Monti² S. Grandillo²⁽¹⁾ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ⁽²⁾ CNR-IMOF, Research Institute for Vegetable and Ornamental Plant Breeding, Portici 80055, Italy)

摘要: 应用 Multiplex - PCR 和 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) 原理研究建立了 Mutiplex - CAPS 技术。该技术包括: (1) 在 PCR 扩增反应体系加入 2 对、3 对或多对核苷酸引物, 经 30~40 个扩增循环后得到每对引物的特异扩增片段; (2) 应用同一种限制性内切酶消化这些不同引物经扩增后获得的特异片段; (3) 琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭染色检测酶切片段长度的多态性。利用该技术对番茄 (*Lycopersicon esculentum*) TA517 及其近等基因系的分析表明, Multiplex - CAPS 能同时检测 2 个、3 个或多个 CAPS 标记的多态性, 其效果等同于每个 CAPS 标记的多态性的叠加, 重复性好, 分析效率高, 降低成本数倍。

关键词: 番茄; 分子标记; Multiplex - CAPS; CAPS; Multiplex - PCR;

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0673-05

RFLP、AFLP 图谱可为更精密的分子图谱构建、新的基因定位以及分子标记辅助育种奠定基础。但 RFLP 技术需要大量的资金投入和放射性标记步骤, Southern 吸印、DNA 探针制备、Southern 杂交都是复杂的操作, 而且需要较长的时间, 同时要求大量高质量的 DNA。AFLP 技术虽然只需要少量的 DNA, 但也需要放射性标记步骤、较长的时间和较大的资金投入^[1], 因此在构建分子图谱、分子育种及 QTL 分析时, 为了降低成本和提高效率, 一些 RFLP 标记、AFLP 标记和 COS (Conserved Ortholog Set) 标记被转换为 CAPS 标记, 其主要步骤是对上述标记使用的克隆进行测序, 根据序列的信息设计一对引物, 用该引物对基因组进行特异扩增, 再用特异的限制性内切酶消化, 电泳检测酶切产物的多态性, 如果多态性与上述标记相符合, 即获得了 CAPS 标记。即便如此, CAPS 的分析成本仍然很高。作者在将 RFLP 和 COS 标记转为 CAPS 标记的过程中发现一些 CAPS 标记分享同一种限制性内切酶。根据 Multiplex - PCR 在同一扩增反应中应用不同引物对能同时扩增相应序列的优点, 以及多个 CAPS 标记分享同一限制性内切酶的事实, 本研究结合 Multiplex - PCR 和 CAPS 的优点, 建立了 Mutiplex - CAPS 技术, 并用该技术对番茄 TA517 及其近等基因系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄 TA517、E6203, 二者杂交后代的 12 个近等基因系。TA517 由普通番茄 (*Lycopersicon esculentum* cv. E6203) 与多毛番茄 (*L. Hirsutum*) LA1777 杂交后分离而得, 含有来自于多毛番茄第 4 染色体底部的 50 cM DNA 片段^[2,3], 02P68、02P69、02P70、02P71、02P72、02P73、02P74、02P75、02P76、02P77、02P78、02P79 由 TA517 与 E6203 杂交后再经过多代自交而得, 每个近等基因系含有 TA517 上来源于多毛番茄 LA1777 第 4 染色体上的一小片段。

对照品种 TA517 和 E6203 各种植 30 株, 每个近等基因系材料种植 10 株, 采取完全随机区组排列, 当植株长至 8 叶期时, 提取幼嫩叶片中的 DNA 进行分析, DNA 提取方法同参考文献 [4]。

1.2 Multiplex - CAPS 检测

收稿日期: 2003 - 02 - 24; 修回日期: 2003 - 07 - 25

基金项目: 中国-意大利农业科学院科技合作项目

1.2.1 Multiplex - CAPS 试验步骤的优化 在一系列 CAPS 试验中, 发现一些 CAPS 标记分享同一种限制性内切酶, 如标记 T1203, T1546, TG22, T708 等分享限制性内切酶 Hinf I, TG163 和 T974 分享限制性内切酶 Rsa I, 考虑到 Multiplex - PCR 在同一扩增反应中应用不同引物对能同时扩增相应序列的优点, 本试验试图综合 Multiplex - PCR 和 CAPS 技术的优点。首先对单对引物 (CAPS) 和多对引物 (Multiplex - CAPS) PCR 扩增体系中的 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA 浓度、退火温度以及限制性内切酶进行优化, 在这些试验基础上, 优化的扩增反应体系包括:

对照单对引物 PCR 扩增体系为 50 ng 模板 DNA、2.5 μ L 10 \times PCR buffer (Perkin elmer)、250 μ mol/L dNTPs、1.25 U Taq DNA 聚合酶、3.5 mmol/L Mg^{2+} (最终浓度), 每个引物的浓度为 0.2 μ mol/L, 最终体积为 25 μ L; 对于多对引物 Multiplex - CAPS 其 PCR 扩增体系与 Multiplex - CAPS 基本相同, 仅仅是 Mg^{2+} 浓度降低到 2.5 mmol/L。

优化的 PCR 循环为: 先 92 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 40 个扩增循环 92 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 最后一个加尾步骤 72 $^{\circ}$ C 5 min。

琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 2% 琼脂糖凝胶 (TAE 缓冲液), 每样品加 5 μ L PCR 产物, 3 μ L 上样缓冲液, 溴化乙锭染色。如果 PCR 产物与预期结果一致, 就对 PCR 产物用限制性内切酶消化。限制性内切酶反应体系为 1.5 μ L 限制性内切酶缓冲液, 0.2 μ L 限制性内切酶, 3.3 μ L ddH₂O, 10 μ L PCR 产物。

限制性酶消化反应为 37 $^{\circ}$ C 4 h。3% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物, 每样品加 15 μ L 酶切产物, 3 μ L 上样缓冲液, 溴化乙锭染色。

1.2.2 番茄 TA517 的 12 个近等基因系 Multiplex - CAPS 分析 加入 2 对和 3 对引物的 PCR 与限制性内切酶的组合为: TG163 + T974 - Rsa I; 用 TG163 - Rsa I 和 T974 - Rsa I 作对照, TG22 + T1546 + T1203 - Hinf I, 用 T1203 - Hinf I; T1546 - Hinf I; TG22 - Hinf I 作对照。

对 TA517 的 12 个近等基因系进行 Multiplex - CAPS 分析的引物和限制性内切酶组合为: TG163 + T974 - Rsa I, TG22 + T1546 - Hinf I, TG22 + T1203 - Hinf I。

本试验所用的 RFLP 和 COS 标记的序列来自于美国 Cornell 大学, 应用 Primer3 程序设计引物, 引物由 Genelab 公司合成。引物序列为:

TG163: 上游引物 5'-TCCAGTCCTTGATCTCCCTG-3', 下游引物 5'-TTCCGCATGAAAATGAACTG-3';
TG22: 上游引物 5'-TTAAGCAATGCAGCACAACC-3', 下游引物 5'-GTGCTCGAGGCCAGAAGTAG-3';
T1546: 上游引物 5'-TCAAAGAAAGACGGAGGAGG-3', 下游引物 5'-AAAGGCACGCTCTCGTTCT-3';
T974: 上游引物 5'-CGCCTTTCACAGAAAACCAT-3', 下游引物 5'-ACTTGCAAAATCAAGGGTTCG-3';
T1203: 上游引物 5'-TGCAAGCATTGACTTTGTCAT-3', 下游引物 5'-CCTTGGGATCAGTGCATCTT-3'。

2 结果与讨论

2.1 Multiplex - CAPS 技术的建立

图 1 为加入引物 T974、TG163 的 PCR 结果和同时加入这两个引物的 Multi-PCR 结果, T974 和 TG163 经 PCR 扩增后分别得到一条分子量为 390 bp 和分子量为 1 800 bp 的谱带, 同时加入引物 T974 和 TG163 经扩增后得到两条谱带, 这两条谱带表现为 T974 和 TG163 两引物的特征谱带的叠加, 分子量分别为 390 bp 和 1 800 bp。

引物 T974 和 TG163 的 PCR 产物经过限制性内切酶 Rsa I 消化后, 在番茄 E6203 和 TA517 之间表现出多态性。引物 T974 的 PCR 产物经消化后在番茄 TA517 中得到 2 条谱带, 其特征谱带的分子量为 200 bp, 番茄 E6203 经消化后得到 2 条谱带, 其特征谱带的分子量为 290 bp。引物 TG163 的 PCR 产物经消化后在 E6203 和 TA517 之间出现多态性, TA517 消化后得到 2 条谱带, 特征谱带的分子量为 1 600 bp, E6203 消化后得到 3 条谱带, 特征谱带的分子量为 900 bp 和 700 bp。同时加入 TG163 和 T974 两引物对

的 PCR 产物, 经 *Rsa* I 消化后其多态性在 TA517 和 E6203 之间表现为这两个引物多态性的完全叠加。

图 2 为加入引物 TG22、T1546、T1203 的 PCR 扩增反应结果和同时加入这 3 个引物的 Multi - PCR 反应结果以及利用限制性内切酶 *Hinf* I 消化后的结果。表明, 加入 3 个引物的 PCR 产物为 3 个单独引物 PCR 产物的叠加, Multi - PCR 产物经 *Hinf* I 消化后的多态性也表现为 3 个单独引物多态性的叠加。

上述结果表明, 当不同的 CAPS 标记分享同一种限制性内切酶时, 可利用 Multiplex-PCR 方法扩增出各个引物的相应序列, 经同一种限制性内切酶消化后检测其多态性, 其效果等同于每个 CAPS 标记的多态性的叠加, 本研究将这种技术定名为 Multiplex - CAPS 技术。

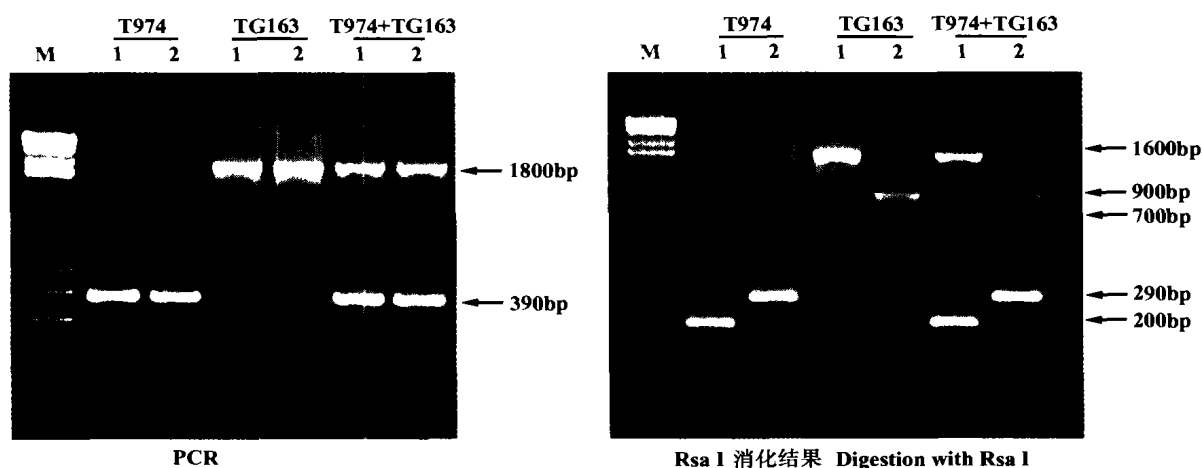


图 1 引物 T974、TG163 及 T974 + TG163 的 PCR 扩增和限制性内切酶 *Rsa* I 消化结果

1. 番茄 TA517; 2. 番茄 E6203; M. Marker.

Fig. 1 The PCR amplified profile and digestion with *Rsa* I using primer pair T974, TG163 and both of them

1. Tomato TA517; 2. Tomato E6203; M. Marker.

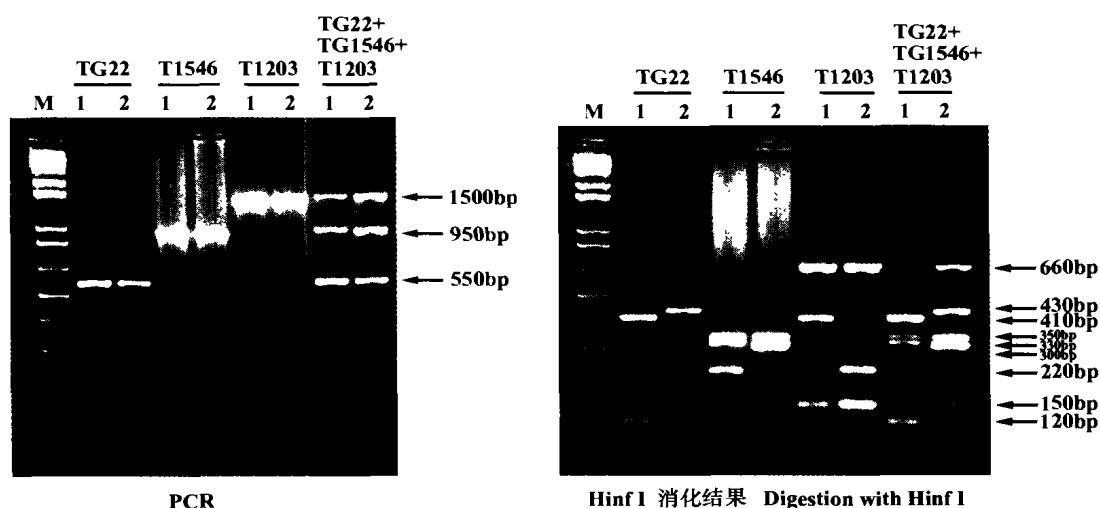


图 2 引物 TG22、T1546、T1203 及 TG22 + T1546 + T1203 的 PCR 扩增和限制性内切酶 *Hinf* I 消化结果

1. 番茄 TA517; 2. 番茄 E6203; M. Marker.

Fig. 2 The PCR amplified profile and digestion with *Hinf* I using primer pair TG22, T1546, T1203 and both of them

1. Tomato TA517; 2. Tomato E6203; M. Marker.

2.2 Multiplex - CAPS 技术对番茄 TA517 及其近等基因系的遗传鉴定

图 3 为利用引物 T974 和 TG163 对 TA517 的 12 个近等基因系的 Multiplex - CAPS 分析结果, 表明同时加入两个引物的 PCR 酶切产物的多态性表现好, 与预期结果一致^[3]。

为验证 Multiplex - CAPS 的可靠性, 用引物对 TG22、T1546 和 T1203 并用限制性内切酶 *Hinf* I 对

TA517 的 12 个近等基因系进行了同样的试验, 结果如图 4、图 5。同时加入 T1203 和 TG22 以及同时加入 T1203 和 T1546 引物对 TA517 的 12 个近等基因系的 Multi-CAPS 分析表明, 两个引物酶切后的多态性表现为单个引物多态性的叠加, 并与预期结果一致^[3]。

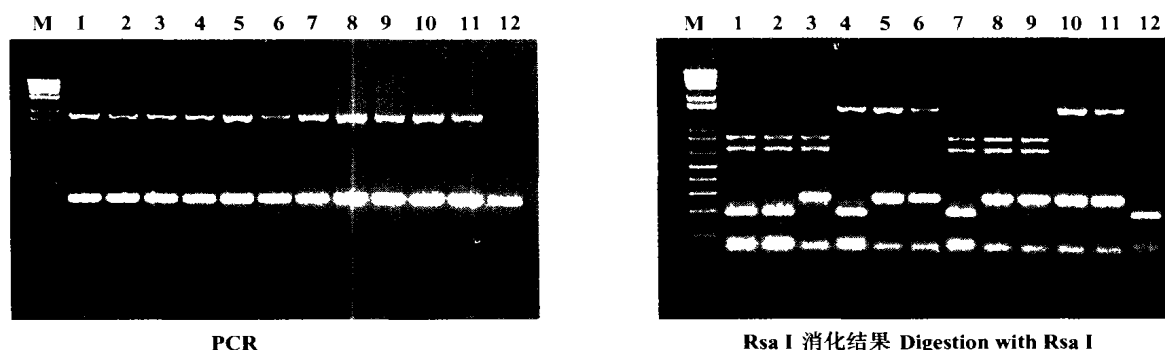
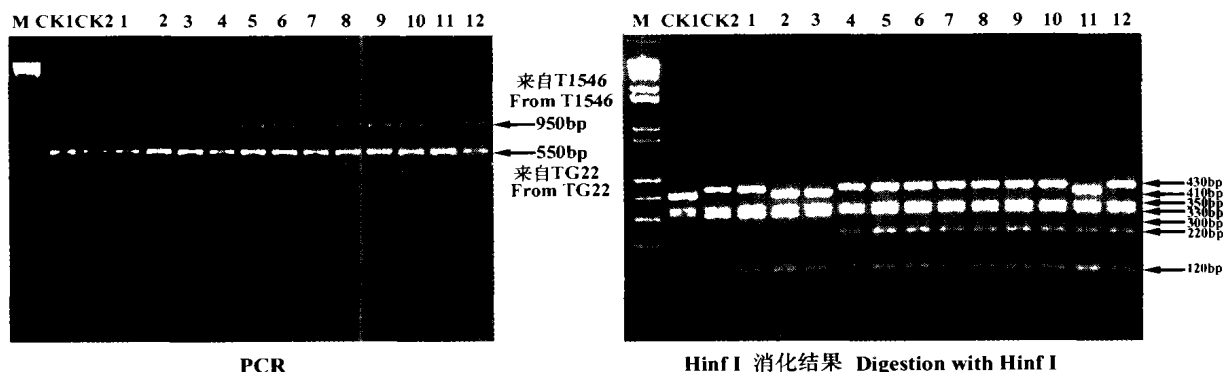


图 3 利用 T974 和 TG163 对 TA517 的 12 个近等基因系的 Multi-CAPS 分析结果

M. 1 kb plus; 1-12. 分别为番茄 TA517 的 12 个近等基因系。

Fig. 3 The Multi-CAPS result of 12 sub-NILs of TA517 using primer pair T974 and TG163

M. 1 kb plus. 1-12. Represent 02P68, 02P69, 02P70, 02P71, 02P73, 02P74, 02P75, 02P76, 02P77, 02P78, 02P79, 02P72.



PCR

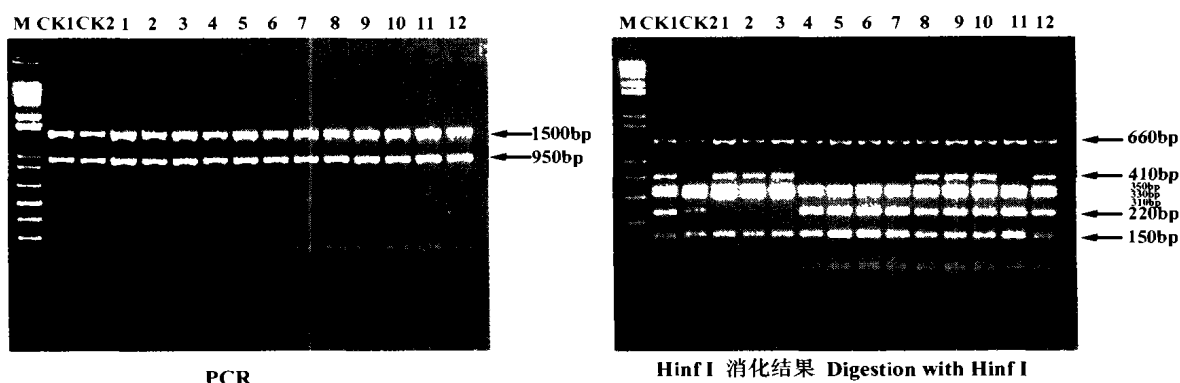
Hinf I 消化结果 Digestion with Hinf I

图 4 利用 TG22 和 T1546 对 TA517 的 12 个近等基因系的 Multi-CAPS 分析结果

M. 1 kb plus; CK1. 番茄 TA517; CK2. 番茄 E6203; 1-12. 分别为番茄 TA517 的 12 个近等基因系。

Fig. 4 The Multi-CAPS result of 12 sub-NILs of TA517 using primer pair TG22 and T1546

M. 1 kb plus; CK1. TA517; CK2. E6203; 1-12. Represent 02P68, 02P69, 02P70-02P79 respectively.



PCR

Hinf I 消化结果 Digestion with Hinf I

图 5 利用 T1546 和 T1203 对 TA517 的 12 个近等基因系的 Multi-CAPS 分析结果

M. 1 kb plus; CK1. 番茄 TA517; CK2. 番茄 E6203; 1-12. 分别为番茄 TA517 的 12 个近等基因系。

Fig. 5 The Multi-CAPS result of 12 sub-NILs of TA517 using primer pair T1546 and T1203

M. 1 kb plus. CK1. TA517; CK2. E6203; 1-12. Represent 02P68, 02P69, 02P70-02P79 respectively.

综上, Multiplex - CAPS 方法综合了 Multiplex - PCR 与 CAPS 的优点, 与单个引物对 CAPS 标记相比, 提高了分析效率, 数倍地降低了成本, 因此可用于番茄的分子图谱构建及分子标记辅助育种。考虑到作物双链 DNA 和限制性核酸内切酶的一般性, 理论上该技术也可以广泛应用于其它作物。Multiplex - CAPS 的缺点在于: (1) 和 CAPS 一样需要知道 DNA 的序列信息, 再根据序列设计相应的引物, 同时 Multiplex - CAPS 需要获得每个 CAPS 的限制性内切酶信息; (2) Multiplex - CAPS 的 PCR 反应体系需要进行优化, 且分子量相近的谱带在普通的电泳过程中难以分开。QIAGEN 公司最近推出了新的 PCR Buffer, 该 Buffer 含有 NH_4^+ 和 K^+ , 由于 NH_4^+ 和 K^+ 对扩增反应体系的平衡作用, 用此 Buffer 能同时扩增出 2 ~ 8 个不同的引物对^[5], 如果利用类似 Buffer, 再用聚丙烯酰胺凝胶电泳提高酶切产物的分辨率, 可以克服 Multiplex - CAPS 的缺点。

参考文献:

- 1 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1994. 43
- 2 Yuval Eshed, Dani Zamir. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 1995, 141: 1147 ~ 1162
- 3 Monforte A J, Friedman E, Zamir D. Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: deductions about natural variation and implications for germplasm utilization. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 572 ~ 590
- 4 Theresa M Fulton, Julapark Chunwongse, Steven D Tanksley. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1995, 13 (3): 207 ~ 209
- 5 Rossiter B J F, Grompe M, Caskey C T. Detection of deletions and point mutations. In: McPherson M J, Quirke P, Taylor G R eds. *PCR, A practical approach*. Volume 1. Oxford: University Press, 1991. 67

The Establishment of Multiplex - CAPS Technique and Its Application for Genetic Characterization in Tomato

Wang Xiaoxuan¹, Du Yongchen¹, Zhu Dewei¹, Luigi Monti², and S. Grandillo²

(¹ *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China*; ² *CNR-IMOF, Research Institute for Vegetable and Ornamental Plant Breeding, Portici 80055, Italy*)

Abstract: An efficient and reliable technique Multiplex - CAPS was developed for genetic characterization by combination of two principles Multi - PCR and CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) in tomato. This technique included (1) using 2 or 3 or more than 3 primer pairs in the same amplification reaction, after 30 - 40 thermal cycles the PCR yield different products which correspond to each individual primer pair, (2) using only one enzyme to digest these different PCR products, (3) Using agarose gel electrophoresis to detect polymorphisms followed by ethidium staining. By comparison with CAPS, Multiplex - CAPS can detect the polymorphism of 2 or 3 or more than 3 primer pairs in the same amplification reaction at the same time. The polymorphism of Multiplex - CAPS equal exactly the polymorphism superimpose of each individual primer pair. Multiplex - CAPS has good reproducibility with high analytical effect, low cost, low labor and time consuming.

Key words: Tomato; Multiplex - CAPS; CAPS; Multiplex - PCR