

辣椒 RAPD 系统的建立及在杂种纯度鉴定中的应用

黄三文 张宝玺 郭家珍 杨桂梅 朱德蔚 堵玫珍 杨 婕*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 对辣椒 RAPD 反应的各个环节, 包括 DNA 提取、PCR 反应和电泳检测进行了筛选和优化, 确定了一个简单、高效、相对稳定的 RAPD 系统, 并筛选出 12 个较稳定的 RAPD 标记。可以用于“中椒”系列辣椒的 9 个杂交种的纯度鉴定。

关键词: 辣椒; RAPD—PCR; 杂种一代; 纯度鉴定

中图分类号: S 641.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 01-0077-03

1 目的、材料与方法

本文报道辣椒 RAPD 技术体系中 DNA 提取、RAPD—PCR 和电泳检测 3 个环节的优化过程, 以及在“中椒”系列辣椒 F₁ 代杂种纯度鉴定上的应用结果。‘中椒 4、5、6、7、8、10、11、12 和 13 号’及其相应的亲本均随机取 10 个幼苗全展开的子叶提取 DNA, 测定浓度后, 取等量的 DNA 混合成混合样。先筛选双亲混合样间有差异的扩增强度大的标记, 重复扩增 3 次以验证其稳定性。再用 F₁ 和双亲共 30 个单株 DNA 验证稳定标记的一致性。采用 SDS 法、简化 CTAB 法^[1]和碱裂解法 3 种方法提取 DNA。用自制的与离心管内壁吻合的玻璃棒研磨子叶, 以充分粉碎叶片组织细胞释放 DNA, 研磨后立即加入适量的 DNA 提取液。DNA 的浓度和纯度用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶法测定。

总共 25 μ L 的 RAPD 反应体系包括 Tris-HCl 10 mmol/L (pH 8.3)、KCl 50 mmol/L、MgCl₂ 1.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L 及 1U Taq DNA 聚合酶 (华美公司)。对模板 DNA 浓度 (0、1、5、10、20、40、80 ng) 进行了单因素试验。扩增反应在 PTC 200 热循环仪 (MJ Research, 美国) 上进行, 扩增程序依 Prince 等^[2]的程序加以调整: 预变性 94℃ 3 min; 变性 94℃ 20 s 和 1 min, 退火 36℃ 40 s 和 1 min, 延长 72℃ 1 min 20 s 和 2 min, 40 和 45 个循环; 终延长 72℃ 7 min。每一次扩增反应都设置不含模板 DNA 的阴性对照。

对 CTAB (0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 g/L)、SDS (0.001、0.01、0.1、1、10、100 g/L)、乙醇 (0.5%、1%、2.5%、5%、10%、20%)、EDTA (0.004、0.008、0.02、0.04、0.08、0.2、0.4、0.8 mmol/L)、甘油 (1.5%、3%、6%、12%)、蔗糖 (20、40、80、160 g/L)、聚蔗糖 (7.5、15、30、60 g/L)、溴酚蓝 (0.125、0.25、0.5、1 g/L) 和二甲苯腈 (0.125、0.25、0.5、1 g/L) 浓度做了一系列梯度试验。PCR 扩增采用优化后的程序。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳或 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。琼脂糖凝胶用溴化乙锭染色, 聚丙烯酰胺凝胶

收稿日期: 2000-03-13; 修回日期: 2000-06-02

基金项目: 农业部重点开放实验室资助项目

* 现在中国农业大学西校区气象系。

© 2001 China Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnep.com.cn>

用快速银染法^[3]染色。用 Gel Doc 1000 电泳凝胶分析仪 (Bio Rad, 美国) 分析电泳结果。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取方法的筛选 在供试的 3 种方法中, 碱裂解法虽然最简单, 但所提取的 DNA 含有较多多糖和蛋白成分, 影响 RAPD-PCR 扩增的稳定性, 不适合于纯度鉴定。SDS 法提取的 DNA 用异丙醇或乙醇沉淀后不易溶解于水或 TE 缓冲液, 需要在 65℃ 水浴中加热溶解, 耗时较长。简化 CTAB 法所提取 DNA 的数量和质量均能够满足扩增的要求, 其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.9 左右, 表明样品中含有 RNA, 但不影响 RAPD 扩增。一个熟练人员可以在一个工作日 (8 h) 提取 200 个 DNA 样品。本试验确定简化 CTAB 法为辣椒子叶和幼叶 DNA 提取的标准方法。

2.2 RAPD-PCR 反应条件的优化 由于在实际纯度鉴定操作中不可能对 DNA 精确定量, 所以要求 RAPD-PCR 对模板 DNA 的浓度范围要求较宽。本试验中发现辣椒模板 DNA 含量为 5、10、20、40 和 80 ng 时的 RAPD-PCR 的扩增产物完全一致, 并且没有明显的亮度差异, 但为 1 ng 时扩增不太稳定。本试验所设定的不同变性、退火和延长时间及循环数对辣椒 RAPD 扩增结果均没有影响。因此可以采用比 Prince 的程序^[3]较短的变性、退火和延长时间及较少的循环数, 试验可缩短约 110 min。简化的程序在 PTC-200 PCR 仪上运行约需 2 h 45 min。

研究表明: SDS 对扩增的抑制浓度为 1 g/L, 而 CTAB 为 0.1 g/L, 因此在用简化 CTAB 法提取辣椒 DNA 时用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀的步骤是必须的, 这一步可以溶解 DNA 沉淀中大部分残余的 CTAB; 0.2 mmol/L 的 EDTA 即对扩增有抑制作用, 所以用 0.1 倍 TE 溶解 DNA 沉淀比 1 倍 TE 更安全; 乙醇的抑制浓度为 5%, 在实际操作时 PCR 扩增体系中不可能到达此值, 因此在风干 DNA 沉淀时, 不必等到完全蒸发, 因为残余的少量乙醇对扩增没有影响, 同时 DNA 也易于溶解; 在本试验浓度梯度范围内的甘油、蔗糖、聚蔗糖和溴酚蓝对扩增均无影响, 而 0.25 g/L 的二甲苯腈即可抑制 PCR 扩增。因此本研究采用聚蔗糖和溴酚蓝为上样缓冲液的成分, 并按适当的浓度把它们直接加入到 PCR 反应体系中, 这样省略了去扩增后每个样品分别加上样缓冲液的程序。

2.3 电泳检测方法的选择 聚丙烯酰胺凝胶-银染法比琼脂糖凝胶-EB 染色法的灵敏性高两个数量级, 分辨率也高, 但操作较复杂。传统的银染法需要 5~6 个步骤, 约需 1.5 h。本研究采用快速银染法只需 15 min, 且试剂可多次重复使用。采用预制胶的方法, 一个熟练人员可以在 1 h 内配制 25 块聚丙烯酰胺凝胶, 用于分析 1 000 个样品, 并且预制胶密封后可在室温下保存 14 d, 在 4℃ 冰箱中保存 1~2 个月。此外, 由于琼脂糖价格较高, 琼脂糖凝胶电泳的成本比聚丙烯酰胺凝胶高一倍以上。综合以上因素, 本试验确定聚丙烯酰胺凝胶-银染法为辣椒 RAPD 技术的标准电泳检测方法。一般用 4% 的非变性

表 1 用于鉴定“中椒”系列辣椒品种 F₁ 代杂种纯度的 RAPD 标记

Table 1 RAPD markers selected for genetic purity testing of “Zhongjiao” cultivars

“中椒”系列 “Zhongjiao” cultivars	与母本区别的标记 Marker (s) used for identifying mother plants	与父本区别的标记 Marker (s) used for identifying father plants
4 号 No. 4	RAPD1	RAPD2
5 号 No. 5	RAPD1	RAPD2
6 号 No. 6	RAPD3, RAPD4	RAPD2, RAPD5
7 号 No. 7	RAPD2	RAPD1
8 号 No. 8	RAPD1	RAPD2
10 号 No. 10	RAPD1, RAPD4, RAPD6	RAPD2, RAPD5, RAPD7
11 号 No. 11	RAPD8	RAPD9
12 号 No. 12	RAPD1	RAPD2
13 号 No. 13	RAPD10	RAPD11, RAPD12

胶即可达到满意的分辨率, 必要时可适当提高到 5%。

2.4 纯度鉴定标记的筛选 共用 120 个长度为 10 bp 随机引物, 其中 114 个 (95%) 能够扩增出产物。用琼脂糖凝胶- EB 法能够检测出 3~ 6 条带, 用聚丙烯酰胺凝胶- 银染法能够检测出 8~ 15 条带。用双亲 DNA 混合样初步筛选共得到 30 条多态性 RAPD 条带, 经过可重复性检验和双亲及 F₁ 代单株鉴定后, 获得 12 个稳定的 RAPD 标记。“中椒”系列辣椒所有 F₁ 代杂种的纯度均可以用这些标记来鉴定 (表 1, 图 1)。

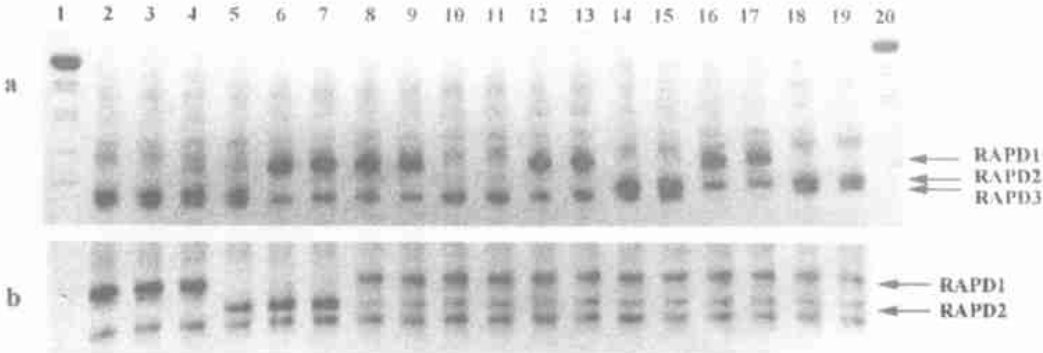


图 1 用于“中椒”系列辣椒杂种纯度鉴定的 RAPD 标记

a. 引物 S01 对骨干亲本的扩增

1. 20 λ DNA EcoR I 和 Hind III 双酶切分子量标准; 2. 3. “中椒 4 号”母本; 4. 5. “中椒 5 号”母本;
6. 7. “中椒 4 号”父本; 8. 9. “中椒 5 号”父本; 10. 11. “中椒 11 号”父本; 12. 13. “中椒 7 号”母本;
14. 15. “中椒 7 号”父本; 16. 17. “中椒 6 号”母本; 18. 19. “中椒 6 号”父本。4% 非变性胶, 银染。

b. 引物 S01 对“中椒 7 号”父母本和 F₁ 单株 DNA 的扩增。

1. 空白对照, 2~ 4. 母本单株, 5~ 7. 父本单株, 8~ 19. F₁ 单株。5% 非变性胶, 银染。

Fig. 1 Screening of RAPD markers for purity testing of ‘Zhongjiao’ serial hybrid cultivars

a. The amplification pattern of key parental lines with primer S01.

1. 20 λ DNA restricted by EcoR I and Hind III; 2, 3. female parent of ‘Zhongjiao No. 4’; 4, 5. female parent of ‘Zhongjiao No. 5’; 6, 7. male parent of ‘Zhongjiao No. 4’; 8, 9. male parent of ‘Zhongjiao No. 5’; 10, 11. male parent of ‘Zhongjiao No. 11’; 12, 13. female parent of ‘Zhongjiao No. 7’; 14, 15. male parent of ‘Zhongjiao No. 7’;
- 16, 17. female parent of ‘Zhongjiao No. 6’; 18, 19. male parent of ‘Zhongjiao No. 6’. 4% native PAGE with silver staining.

b. The amplification pattern of individuals of ‘Zhongjiao No. 7’ F₁ and its parents, with primer S01.

1. negative control; 2~ 4. female individuals; 5~ 7. male individuals;

8~ 19. F₁ individuals. 5% native PAGE with silver staining.

参考文献:

- 1 Haymes O. Mini prep method suitable for a plant breeding program. Plant Mol. Biol. Rept., 1996, 14: 280~ 284
- 2 Prince J P, Lackney V K, Angeles C, et al. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome, 1995, 38: 224~ 231
- 3 Sanguinetti C J, Neto E D, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Bio. Techniques, 1994, 17: 915~ 919

Establishment of an Efficient RAPD Protocol in Pepper and Its Application in Genetic Purity Testing of F₁ Seeds

Huang Sanwen, Zhang Baoxi, Guo Jiazhen, Yang Guimei, Zhu Dewei, Du Meizhen, and Yang Jie
(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In this report, a simple and efficient protocol for RAPD assay in pepper was established through optimization in three main procedures: DNA extraction, PCR, electrophoresis. The protocol was employed in screening RAPD markers for genetic purity testing of ‘Zhongjiao’ serial hybrid cultivars. A total of 12 stable and strong RAPDs were identified to distinguish all 9 F₁ s from their parental lines.

Key words: Pepper (*Capsicum annuum* L.); RAPD PCR; Hybrid purity determination