

芥蓝 × 甘蓝 F₂ 群体的 2 个 RAPD 标记 转化为 ERPAD 标记的研究*

陈书霞¹, 王晓武², 程智慧¹, 方智远², 孙培田²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农科院 蔬菜花卉研究所, 北京 100086)

[摘 要] 在对芥蓝 C₁₀₀₋₁₂ × 甘蓝秋_{50-Y7} 杂交组合构建 F₂ 作图群体进行 RAPD 检测的基础上, 分别对 4 个 O₁₂, R₁₃, Q₁₄, P₁₇ 进行了延长 1 个碱基的研究, 其中 O₁₂ 和 P₁₇ 能将部分特异 RAPD 标记转化为稳定性更强的 ERPAD 标记, 但对 R₁₃ 和 Q₁₄ 随机引物未找到相应的 ERPAD 标记。

[关键词] RAPD 标记; ERPAD 标记; 甘蓝

[中图分类号] S635.1 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0039-04

基因组分析是生物科学领域的一大研究热点, 其中分子标记已经成为一种不可或缺的重要手段和工具。甘蓝类作物具有广泛的变异, 因而是多基因系 (multigene families) 研究的理想材料^[1]。但由于甘蓝可利用的形态标记较少, 同工酶标记也有限, 因此, 有必要广泛开展甘蓝数量性状的分子标记研究工作。

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD), 是由 Williams 于 1990 年发展起来的一项新的分子标记技术^[2]。RAPD 的本质是 PCR 反应, 但由于它使用短引物和低退火温度, 并允许碱基误配, 要获得能够完全重复的结果比较困难。因此, 人们对 RAPD 作了许多方面的改进, 衍生出 SCARs (Sequence Characteristic Amplified Region, 序列特性扩增区域) 等方法。但 SCARs 需要进行测序和设计引物, 花费比较高。为此, 王晓武^[3] 利用延长随机引物扩增 DNA (Extended Random Primer Amplified DNA, ERPAD) 标记方法将所得到的某些标记转化为较稳定的标记。利用这种方法进行引物的延长过程是一个逐步添加碱基和筛选引物的过程, 延长引物的设计无需额外的碱基顺序信息, 直接在随机引物的 3 端添加 1 个或 2 个碱基。本研究只进行了延长 1 个碱基的研究, 以期分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验所用的亲本材料由中国农科院蔬菜花卉研究所甘蓝组提供。以高代自交纯合的甘蓝自交系“秋_{50-Y7}”为父本 (P₁), 以经几代自交的芥蓝“C₁₀₀₋₁₂”为母本 (P₂), 以 C₁₀₀₋₁₂ × 秋_{50-Y7} 杂交组合 F₂ 为试验材料, 群体的具体构建方法见文献[4]。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取方法参照王晓武等^[5] 的方法。分离群体按单株取样 1 g 分别提取总 DNA, 两亲本及 F₁ 每个单株取 0.1 g 混合后提取总 DNA。DNA 质量浓度用琼脂糖凝胶电泳法测定。根据 DNA 质量浓度测定值将所有样品质量浓度调整到 40 ng/μL。

1.3 ERPAD 扩增设计

从所用的随机引物中选出 4 个扩增稳定、多态性好的随机引物 O₁₂, P₁₇, Q₁₄, R₁₃ 进行 ERPAD 引物设计。在 3 端分别添加 1 个碱基, 然后进行延长碱基的引物筛选, 分别由 O₁₂-A, O₁₂-T, O₁₂-C, O₁₂-G 组成如表 1 所示的引物对。其他 P₁₇, Q₁₄, R₁₃ 与 O₁₂ 组成的引物对类同。

1.4 RAPD 及 ERPAD 扩增程序

本试验中所使用的 PCR 仪为 PE480PCR, Taq 酶购自鼎国生物技术发展中心, 缓冲液购自

* [收稿日期] 2004-06-07

[基金项目] 农业部蔬菜遗传与生理重点实验室项目

[作者简介] 陈书霞(1971-), 女, 河南临颖人, 讲师, 博士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

Promega 公司, dNTPs 购自华美生物工程公司。常规 PCR 扩增程序是: 95 3 min, 然后 36 30 s, 72 80 s, 94 20 s, 40 个循环; ERPAD 扩增程序

表 1 筛选的引物对

Table 1 Pairs of primers to be selected

引物 Primers	O ₁₂ -A	O ₁₂ -T	O ₁₂ -C	O ₁₂ -G
O ₁₂ -A	O ₁₂ -A	O ₁₂ -A + O ₁₂ -T	O ₁₂ -A + O ₁₂ -C	O ₁₂ -A + O ₁₂ -G
O ₁₂ -T		O ₁₂ -T	O ₁₂ -T + O ₁₂ -C	O ₁₂ -T + O ₁₂ -G
O ₁₂ -C			O ₁₂ -C	O ₁₂ -C + O ₁₂ -G
O ₁₂ -G				O ₁₂ -G

1.5 ERPAD 标记引物筛选

确定目标谱带后, 选用 F₂ 单株和父母本 DNA 为模板进行扩增, 筛选这 40 个引物时, 使用 ERPAD 程序进行扩增。根据 PCR 扩增结果, 确定能得到与 RAPD 标记片段分子质量相同、且产量最高的引物对入选。然后用该引物对扩增 F₂ 所有单株和父母本 DNA 进行检测。延长 1 个碱基有 10 种引物组合。筛选在 RAPD 扩增中目标谱带扩增最强的引物组合作为 ERA PD 引物。延长引物组合时用 5 pmol/μL 的单一引物混合。用 ERA PD 程序扩增。

1.6 单株 ERA PD 标记检测

ERA PD 标记检测类似单株 RAPD 标记检测, 将 RAPD 引物换成 ERA PD 引物组合, 利用 ER-

APD 程序扩增。

2 结果与分析

2.1 亲本的多态性分析及 RAPD 随机引物对 F₂ 群体的扩增

共用 300 个随机引物扩增亲本芥蓝 C₁₀₀₋₁₂ 和甘蓝秋_{50-Y7}, 其中 257 个引物扩增出清晰可辨的带型, 谱带总数为 3 642 条, 有效引物比例为 74%, 平均每个引物扩增的带数为 14 条。选用其中 52 个带型清晰、多态性丰富的随机引物, 用于 F₂ 群体的扩增。其中, O₁₂, P₁₇, Q₁₄, R₁₃ 经过多次重复扩增效果稳定, 带型清晰(图 1, 2)。



图 1 O₁₂产生的多态性带在 48~72 单株中的分离
1~24. 单株序号; M. Hind III + EcoRI

Fig. 1 Polymorphism bands produced by O₁₂
in 48~72 F₂ individuals

1~24. No. of individuals; M. Hind III + EcoRI

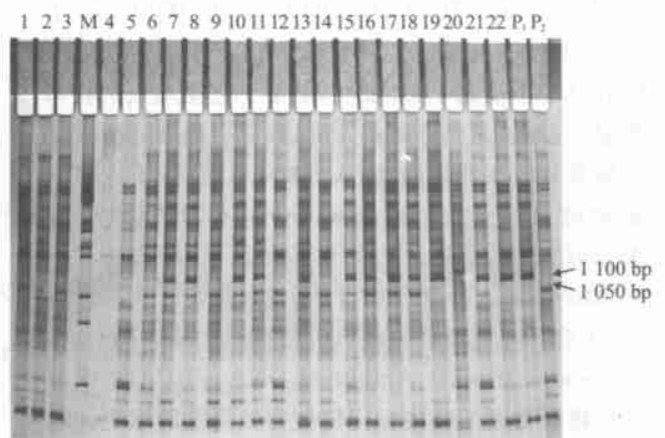


图 2 O₁₂产生的多态性带在 73~96 单株中的分离
1~24. 单株序号; M. Hind III + EcoRI

Fig. 2 Polymorphism bands produced by O₁₂
in 73~96 F₂ individuals

1~24. No. of individuals; M. Hind III + EcoRI

2.2 ERPAD 扩增结果

对随机引物 O₁₂ 及其延长 1 个碱基的引物组合, 选用 P₁, P₂ 和随机选取单株 2、单株 3 做模板, 分别对随机引物 O₁₂ 和延长 1 个碱基所组成的 10 个引物对进行扩增, 结果发现, 延长 1 个碱基的引物组合能

扩增出比原 RAPD 引物扩增较多的带, 其中原 RAPD 扩增出 2 条特异带, 分别为 1 050, 1 100 bp, 经延长 1 个碱基的引物对筛选发现, A + G 组合即 O₁₂-A + O₁₂-G 组合可以扩增出 1 050 bp 和 1 100 bp 的特征带, 且所找到的谱带都相应地得到加强

(图 3)。随后用 A + G 组合进行单株检测, 上述两条带能够和原 RAPD 特征谱带吻合, 且稳定性得到增强。

对随机引物 P₁₇ 及其延长 1 个碱基的引物组合, 选用 P₁, P₂, 单株 6, 单株 7 进行扩增筛选, 结果发现原 RAPD 扩增出 4 条谱带, 分别为 200, 550, 560, 1 100 bp, 其中分子质量为 550 和 560 bp 的特征谱带有 A + G 组合扩出, 且谱带比较强, 此组合也扩增

出了 1 100 bp 谱带, 但较弱。200 bp 特征谱带在延长引物组合中未找到对应的扩增物。用前 1~46 个单株和亲本进行单株检测, 发现 P₁₇-A + P₁₇-T 能特意扩增 550 和 560 bp 的特征谱带, 经反复试验都能得到相同的结果。

对随机引物 Q₁₄ 和 R₁₃ 也进行了延长引物组合的研究, 但研究发现, 在随机引物 Q₁₄ 和 R₁₃ 及其随机引物的延长引物组合中未找到对应的特异谱带。

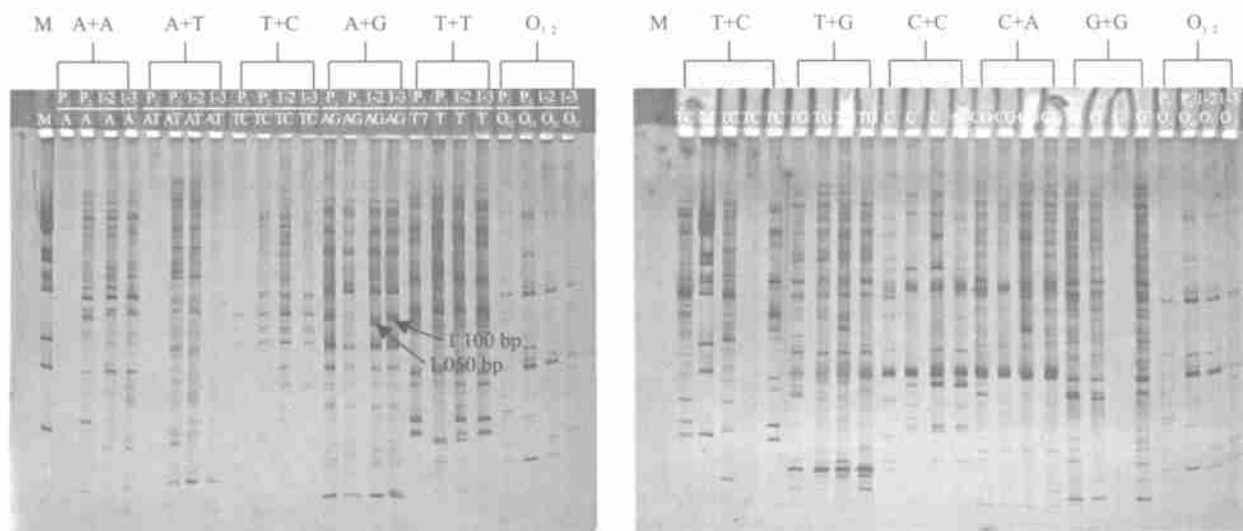


图 3 O₁₂ 延长随机引物组合筛选

M. *Hind*III + *Eco*R I; A + A. O₁₂ 3'端延长 1 个碱基 A; A + T. O₁₂ 3'端分别延长 1 个碱基 A 和 T 的引物组合; 其余依此类推

Fig. 3 3'-end-extended random primers of RAPD primer O₁₂

M. *Hind*III + *Eco*R I; A + A. Denotes that 3'-end of primer O₁₂ extended a "A". A + T. Denotes combination of O₁₂-A and O₁₂-T

3 讨论

RAPD 是建立在 PCR 基础上的一种试验技术, 具有快速、简便、花费较少的优点, 但也存在稳定性和重复性差、易于产生假阳性的缺点。由于存在这些缺点, 在试验时必须严格对其外部条件进行优化, 同时尽可能对其内部因素进行改善, 以提高其稳定性和特异性。

RAPD 反应主要包括 2 个阶段, 第一个阶段是引物与模板结合形成引物—模板复合物, 第二个阶段是在特定条件下通过链的延伸而形成扩增产物。

影响第一个阶段的因素主要有引物、模板和退火温度。对于任一特定的引物, 它同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点。而且引物在模板的两条链上有互补位置, 引物 3'端相聚在一定的长度范围内 (一个扩增子) 就能形成扩增。所以, 符合扩增条件的引物形成引物模板复合体的机会多, 反之, 形成引物模板复合体的机会少。可见, 引物与模板的结合是非

常重要的一步。模板质量浓度的影响也是非常重要的因素, 对某一特定 RAPD 扩增, 模板本身是确定的, 但是模板质量浓度的大小常常直接影响 DNA 片段的大小, 质量浓度过高易导致非特异引物模板复合体的产生, 模板质量浓度过低则易形成随机扩增。退火温度影响反应体系的严谨性。较高的退火温度能减少错配的机率, 但退火温度较低时, DNA 错配的机率增加。而 RAPD 反应中一般用低退火温度, 错配的机率较高。

在 RAPD 反应的第二个阶段, 主要受 Mg²⁺ 浓度、Taq 酶浓度、dNTP 浓度、缓冲体系的浓度、所形成的引物—模板复合体的数量等因素影响。对这些反应体系外部条件的研究很多, 而且已经总结出比较严谨的反应体系。但大都是在 Williams 的基础上加以改进。这些外部条件的改进只能在一定程度上提高 RAPD 的稳定性和特异性。

1993 年 Paran 等建议在引物上进行改进, 将 RAPD 标记转换为 SCAR 标记。但 SCAR 标记要求

将 RAPD 引物克隆测序,而且合成的引物较长,花费较高且程序繁琐。本研究设计利用 ERPAD 的方法,即在原 RAPD 引物的 3 端进行改进,添加 1 个碱基,组成引物对,然后挑选特异扩增原 RAPD 特征谱带的引物对。经王晓武等^[5]验证,ERPAD 标记无论在稳定性或是特异性方面都优于 RAPD 标记。

本研究只进行了延长 1 个碱基的研究,4 个引物中有两个引物在延长 1 个碱基时可以较有效地扩增出目标特异谱带,但另外两个引物不能有效扩增出目标谱带,而其非特异谱带有所增多。若要进一步提高其特异性,有效消除非目标谱带,还必须进行延长 2 个碱基的引物筛选工作。

[参考文献]

- [1] Kianian S F. Evolutionary trends in the *B. oleracea* cytodeme: chromosome and linkage relationships[D]. California: University of California, 1990 20- 23
- [2] Williams J G K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531- 6535
- [3] 王晓武. 甘蓝显性雄性不育基因的分子标记及延长随机引物扩增 DNA 标记的建立[D]. 北京: 中国农科院蔬菜花卉研究所, 1998 23- 25
- [4] 陈书霞, 王晓武, 方智远, 等. RAPD 标记构建芥蓝 × 甘蓝分子标记连锁图[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 229- 232
- [5] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 甘蓝显性雄性不育基因延长随机引物扩增 DNA (ERPAD) 标记[J]. 园艺学报, 1999, 26(1): 23- 27

Studies of transforming 2 RAPD markers based on F₂ population from *B. oleracea* var. *capitata* × *B. oleracea* var. *alboglabra* into ERPAD markers

CHEN Shu-xia¹, WANG Xiao-wu², CHENG Zhi-hui¹, FANG Zhi-yuan², SUN Pei-tian²

(1 Department of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Vegetable Crops, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100086, China)

Abstract: Four random primers O₁₂, R₁₃, Q₁₄, P₁₇ were researched by screening 3'-end-extended random primers, in order to enhance the stability and specificity of RAPD markers of F₂ population from *B. oleracea* var. *capitata* × *B. oleracea* var. *alboglabra*. The stability of ERPAD marker was higher than that of the original RAPD markers of O₁₂ and P₁₇. However, such ERPAD marker was not derived from R₁₃ and Q₁₄.

Key words: RAPD; extended random primer amplified DNA (ERPAD); cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*)