

高番茄红素加工番茄品系的 RAPD 引物筛选及特异片段的克隆

谢放, 张楠

(兰州交通大学 化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以加工番茄高茄红素近等基因系为材料, 分别从高茄红素含量及低茄红素含量植株中提取 DNA 构建 DNA 池, 采用 RAPD 技术, 从 260 个随机引物中筛选出 1 个在 2 基因池间具有特异性的引物 S636, 在轮回亲本及回交后代单株的 DNA 中进行验证, 证明了该引物扩增出的特异性片段是 1 个与番茄耐高茄红素含量连锁的 RAPD 标记. 经琼脂糖凝胶电泳回收扩增出的特异条带与载体 pMD-18T 连接, 并转入大肠埃希菌 DH-5 α , 对克隆片段测序结果表明其实际大小为 827 bp, 这为转化成稳定的 SCAR 标记奠定了基础.

关键词:加工番茄; 番茄红素; RAPD; 克隆

中图分类号: Q75

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)04-0503-04

Selection of RAPD Marker for High Lycopene in Tomato and Its Specific Fragment Cloning

XIE Fang, ZHANG Nan

(School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The near isogenic lines of high and low lycopene processing tomato were used as experiment materials; DNA was extracted from these plants to develop high and low lycopene DNA gene pools, respectively. RAPD techniques were adopted to screen molecular marker linked to high lycopene, and only primer S636 was found to be polymorphic between near isogenic lines of high and low lycopene processing tomato from 260 RAPD random primers. It had been proved that a specific fragment of RAPD marker was linked to high lycopene in the back cross parent and the single plants in the backcross population. The specific fragment was extracted from the agarose and ligated with pMD-18T vector, then transformed into DH-5 α . The positive clone was sequenced to find a 827 bp fragment. This fragment could be used to develop SCAR marker for steady lycopene.

Key words: processing tomato; lycopene; RAPD; clone

加工番茄是普通番茄的一种栽培类型, 是作为加工原料而生产的番茄^[1]. 番茄红素是考察加工番茄品质的重要指标之一, 其含量越高, 品质越好. 近年来的研究表明番茄红素具有抗氧化、保护心血管、防止心脏病发生和降低人类患多种恶性肿瘤几率等作用^[2-4]. 因此, 通过遗传改良选育高番茄红素含量的番茄品种已成为番茄品质育种的重要目标. 目前

以提高番茄中番茄红素含量为目的的育种研究, 国外已从常规育种和基因育种两方面取得了显著成效^[5], 但在我国加工番茄高番茄红素含量品种的选育上却迟迟未取得实质性进展. 为获得我国特有的高番茄红素品质的品系, 作者以番茄红素含量有明显差异的品种为材料, 用 RAPD 技术筛选出了与番茄高番茄红素基因连锁的分子标记, 以期建立一套

收稿日期: 2012-02-16

作者简介: 谢放 (1962—), 男, 副教授, 博士, E-mail: xfrankf@163.com

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与应用项目 (GNSW-2006-02)

完整的分子标记辅助育种体系,促进番茄新品种的改良,为育种工作的顺利开展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验材料 加工番茄采自兰州交通大学科技园生物种苗工程研究所试验田种植的加工番茄品系,选取高番茄红素和低番茄红素品种杂交,获得3个杂交组合,F1收获自交种子,F2代构建分离群体,对F2代分离群体进行品质的测定,再针对番茄红素含量的高低构建高、低番茄红素基因池进行试验。

1.1.2 主要试剂及 RAPD 引物 *Taq*-DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂ 和 260 个 RAPD 引物均购自上海生工生物工程有限公司。

1.1.3 仪器设备 PCR 扩增仪(Biometra)、凝胶成像系统(USA)、紫外分光光度计(上海精科)、高速冷冻离心机(湖南湘仪)、DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 加工番茄基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取方法采用改良的 CTAB 法^[6]。提取的 DNA 经紫外分光光度法和 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度。

1.2.2 PCR 扩增及 RAPD 特异片段的筛选 PCR 扩增反应的总体积 25 μL,其中含 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.35 μL, *Taq*-DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL,模板 DNA 1 μL,引物(20 μmol/L)1 μL,最后用 ddH₂O 补至 25 μL。

PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,36 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s, 35 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保温。PCR 扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳进行检测。吸取 5 μL RAPD 产物与 1 μL 6 × 上样缓冲液混合,在 12 g/L 的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/mL)上进行电泳,将电泳后的凝胶置于 UVP 凝胶成像系统下观察并拍照,比较扩增产物的多态性,找出在高番茄红素基因池中存在而在低番茄红素基因池中缺少的条带并标记。

1.2.3 RAPD 特异片段纯化回收 用上海生工生物工程有限公司生产的 DNA 回收试剂盒回收 DNA 特异片段。在紫外灯下将特异片段切下,放入 1.5 mL Ep 管中,每 100 mg 琼脂糖凝胶加入 4 倍体积的溶胶液,50 ~ 60 °C 水浴 10 min。将融化好的胶液转移到 UNIQ-10 过滤柱中,室温放置 2 min,8 000 r/min 离

心 1 min。弃掉废液,加入 700 μL 漂洗液,静置 2 min 后,8 000 r/min 离心 1 min,重复 1 次。将柱子放入新的 1.5 mL 离心管中,往膜中央加洗脱缓冲液 30 μL,50 °C 水浴 2 min。水浴后室温静置 2 min,8 000 r/min 离心 1 min,弃滤液。将离心管安置于新的 1.5 mL 的离心管上,在离心管膜的中央处加入 25 μL 的灭菌蒸馏水,12 000 r/min 离心 1 min 洗脱 DNA。

1.2.4 RAPD 特异片段与载体的连接及重组质粒的筛选 将回收产物与 pMD-18T 进行连接,连接体系为:pMD-18T(50 ng/μL)1 μL, DNA 模板(50 ng/μL)4 μL,连接液 15 μL,加样完成后,稍微离心使液体集于离心管底部进行充分混匀,16 °C 水浴连接过夜。

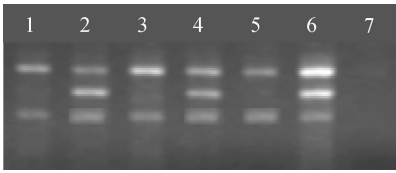
连接产物的转化及阳性克隆的筛选:将连接产物 10 μL 加入到 100 μL 感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴 2 ~ 3 min。42 °C 水浴热激 90 s,加入 890 μL 不含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基,混匀后 37 °C 振荡培养(220 r/min)45 min。取 100 μL 菌液涂布于含有 100 μg/mL Amp⁺ 的 LB 固体培养基上,涂匀后,37 °C 倒置培养过夜。

1.2.5 重组质粒的 PCR 鉴定及特异片段核苷酸序列测定 菌落涂布培养进行蓝白斑的筛选,挑出白色菌落于含有 100 mg/mL Amp⁺ 的液体 LB 培养基中培养 12 h,用于质粒 DNA 的提取,同时用空质粒转化大肠埃希菌作对照,取 5 μL 培养的菌液用作 PCR 扩增的模板,PCR 扩增体系同上述 RAPD 扩增体系,用引物 S636 对重组质粒进行扩增。并将纯化的质粒 DNA 送往上海生工,对质粒进行测序。

2 结果与分析

2.1 构建 DNA 池的 RAPD 扩增结果

根据番茄红素含量的高低构建高、低番茄红素性状基因池。将选用的 260 个 RAPD 随机引物逐个对两个基因池的 DNA 进行扩增,其中大部分引物有扩增条带,片段长度在 0.2 kb ~ 3 kb 之间,当以引物 S636 扩增时,2 个 DNA 池的扩增谱带存在明显差异,在高番茄红素 DNA 池扩增出了清晰的 3 条 DNA 谱带,在低番茄红素 DNA 池中扩增出了 2 条谱带(图 1),因高番茄红素株是以低番茄红素材料为轮回亲本经 6 代回交而获得的后代,在 2 个分别构建的 DNA 池中除了高番茄红素基因的差异外,其余相关遗传背景应该是一致的。据此可以推测出该引物在高番茄红素 DNA 池中比低番茄红素 DNA 池多扩增出的 1 条带是与高番茄红素有关的特异性条带。



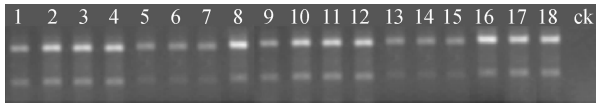
1、3、5:低番茄红素 DNA 池;2、4、6:为高番茄红素 DNA 池;7:对照(不加入模板 DNA)。

图1 RAPD 引物 S636 扩增结果

Fig. 1 Results of RAPD amplified by primer S636

2.2 高番茄红素单株与低番茄红素亲本的 RAPD 扩增结果

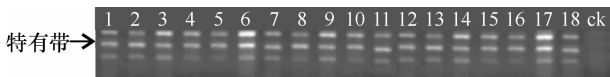
用引物 S636 对高番茄红素及低番茄红素单株 DNA 进行 RAPD 扩增的结果如图 2、图 3 所示,引物 S636 对高番茄红素单株都能扩增出清晰的 3 条带,而低番茄红素亲本只扩增出 2 条带,进一步说明了高番茄红素单株特有的 DNA 扩增条带是与高番茄红素有关的特异带,可作为加工番茄高番茄红素选择的分子标记。



1~18: 低番茄红素 DNA 池; ck: 对照(不加入模板 DNA)。

图2 低番茄红素品系扩增图谱

Fig. 2 Results of RAPD amplified of low lycopene by primer S636



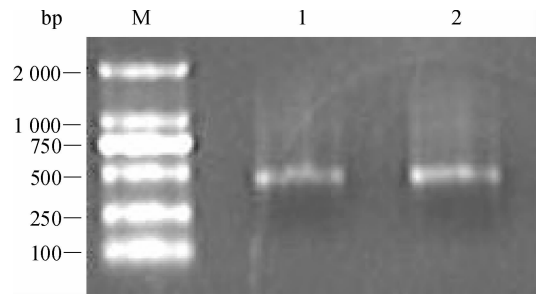
1~18: 高番茄红素 DNA 池; ck: 对照(不加入模板 DNA)。

图3 高番茄红素品系扩增图谱

Fig. 3 Results of RAPD amplified of high lycopene by primer S636

2.3 加工番茄高茄红素 RAPD 特异片段的克隆、转化结果与分析

在重组质粒转化感受态细胞的检测结果中,加空质粒的正对照全部表现为蓝菌斑,经连接反应的外源质粒转化的感受态细胞在相同培养板上表现为既有蓝菌落,又有白菌落,这说明转入大肠埃希菌的质粒既有重组质粒,又有载体自身环化的质粒,其中,白色菌落为期望的含有重组质粒菌落.为进一步鉴定重组质粒是否插入到目的 DNA 片段中,对转化质粒进行 PCR 扩增,结果产生一条与 RAPD 扩增相同的电泳距离相等的条带(图 4),由此初步证明目的片段已经克隆进载体质粒中。



M 为 DNA marker DL2000; 1、2 为重组质粒。

图4 重组质粒 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplification of recombination plasmids

2.4 RAPD 特异片段测序结果与分析

克隆片段用引物 S636 进行测序,通过重叠序列连接处理其中始端 10 个碱基是 S636 (GCGGCT-CAAT),末端 10 个碱基是该引物反向结合位点 (ATTGAGCCGC).证实克隆的片段来自引物 S636 的扩增产物,克隆片段的实际长度为 827 bp (图 5)。

```

GCGGCTCAATAATACCTTTTCTCTTTTGTC AACAGCCTTGCAATCGCTAAAGAAGGTGAGTTAAC AATTGGCA
CTATTTGTGAAGTACTCAGTC AAATGCAGATGATCCTGAAACCCGGAC ATTTGCTCTATGCAGGGAAGTGC
ATATGTGATGCCAGAGGAAAATGAACCTACTAAGGTAAGTTTATTTGATAATGCATTTTGCTCCCTGTTGGAT
GATCAGACATTTGAGTTCATATCAACATATCCCTTGACCATGTTCCATACTAAGCTGCTCCCTTTCTGATGATA
GTAATGTGTATTATTGCATTGATGAAATTC AAAAGCTTCACATTCGTTCAATACCCCTTGGGGAGCATGCACGT
CGCATCAGCCATCAAGAGCAGGAAGATTCCTAATCATAAGGTTTGC TTAGATCCTGTGATTTTACGCTGCAC
TGAAAAC TGATGAGTCTAATCTTTATGATTAGCTTGCCGGAGAGAGTGGAGTTTAAATCATTAGTATCTACAG
AGTGGTAAATTTGAATATGGCCTTGCGTCTTTGGTGATCTTTTATTTGGACTGTTCTGCAGTTTC AACTTGATC
TTTGATTCCTTGC TTAAGTGAGATGTGATAAC AAATATGGGATGGATGGTAATGAACATTTGATTTCACTAG
TTTTTTGGGC GTC AACCATATTGTTTTCTATGAGTTCATCTGATGGAAC TTTAACATATCCCATCATTGTCCT
CACTTTGTC CCGAAATATTTACACCTTGAGGATGTTTCGGTTGATCTAAGTTTGTTC AAA CAAAAGTGA
TGTAAC GATTGAGCCGC

```

图5 RAPD 特异片段测序结果

Fig. 5 The sequence of RAPD specific fragment

3 讨论与结论

在克隆载体的选用上通过使用 T 载体克服了外源 DNA 与载体连接效率低下的缺点,成功克隆了目的 PCR 片段,同时提高了连接转化效率,避免了在克隆转化筛选中所遇到的连接转化效率低的问题^[7]. 近年来,分子标记辅助育种已经得到了很大的发展,主要农作物中已定位了许多重要基因^[8-12]. 将所筛选的分子标记经克隆之后,转化成实用、稳定、简单分子标记,有助于将分子标记辅助选择用于育种实践. 本项研究通过对加工番茄高、低番茄红素的 RAPD 扩增谱带进行多态性分析,初步筛选到了以 S636 为引物的在番茄高番茄红素品系中唯一扩增的位点,并克隆了这一特异片段,为今后建立更加实用、稳定的通过 SCAR 分子标记筛选高番茄红素基因,并快速鉴定培育出的高番茄红素的番茄品种提供了依据.

致谢:感谢兰州交通大学生物工程实验室任爱梅老师对试验的大力支持!

参考文献:

- [1] 王华新. 加工番茄果实机械损伤抗性及其相关性状的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2002.
- [2] 廖彩霞,闫春兰,黄聪. 番茄红素生理功能现状[J]. 浙江中西医结合杂志,2004,14(9):592-593.
- [3] 李春生. 番茄红素的研究概况[J]. 农产品加工学刊,

2009,160(1):71-74.

- [4] 韩美清,赵致. 番茄红素的研究进展及应用前景[J]. 山地农业生物学报,2003,22(5):456-461.
- [5] 李君明,徐和金,周永健. 加工番茄生产的现状及品种遗传改良浅析[J]. 中国蔬菜,2001(6):52-53.
- [6] 谢放,陈京津,朱子雄. 三种提取冬虫夏草菌丝体基因组 DNA 方法的比较[J]. 生物技术通报,2010,8:134-136.
- [7] ŚMIECH M, RUSINOWSKI Z, STEFAN M, et al. New RAPD markers of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in *Lycopersicon esculentum* Mill[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2000,22(3):299-303.
- [8] CHEN Fan-qi, FOOLAD M R, HYMAN J, et al. Mapping of QTLs for lycopene and other fruits traits in a *Lycopersicon esculentum* × *L. pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomatoes species [J]. Molecular Breeding, 1999,5(3):283-299.
- [9] 熊芳,郑闾江,刘新锐. SCAR 标记技术鉴定榆黄蘑品种[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(3):593-597.
- [10] 王会,梁月荣,陆建良. 低咖啡因茶树品系的 RAPD 分析及特异片段的克隆[J]. 茶叶,2008,34(1):29-33.
- [11] 丁铭,方琦,张丽珍. 马铃薯 A 病毒云南分离物外壳蛋白基因的克隆与序列析[J]. 云南农业学报,2006,19(6):1078-1081
- [12] 马彩霞,李梅,邱星辉. 棉铃虫细胞色素 P450CYP6B7 基因的克隆与融合表达[J]. 昆虫学报,2006,49(6):944-949.

【责任编辑 李晓卉】