

利用 RAPD 技术快速鉴定番茄种子纯度

戴修纯 王佛娇 谢伟平 张 华

种子质量是影响农作物品质和产量的重要因素,虽然我国已加入国际种子检验协会(ISTA),但由于种子检测设备、技术相对落后,至今仍未有通过 ISTA 认证的种子检测机构,使我国种子质量难以得到有效的保证。为了防止假冒伪劣种子给农业生产造成危害,实现种子的产业化,加快与国际接轨的步伐,必须进一步完善种子质量尤其是种子纯度检测技术。

近年发展起来的 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 技术^[1-3]简便易行,目前已在多种作物的杂种纯度鉴定中应用^[4-8],笔者利用 RAPD 技术鉴定两个番茄一代杂种的种子纯度,建立了适合于番茄 RAPD 分析的程序;并从 100 个随机引物中筛选到十几个合适的随机引物,能快速、准确地鉴定 F₁ 种子的纯度。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试番茄为一代杂种金丰 1 号及其父本、母本,益丰及其父本、母本,均由广州市农业科学研究所提供。种子在 25~30℃ 条件下发芽,以芽为 DNA 提取材料,质量约 0.5 g。

试验所用的 Taq DNA 聚合酶、dNTP、模板 DNA、琼脂糖以及随机引物均购自华美生物工程公司,其它常规试剂为国产分析纯试剂。使用德国 Biometra 公司生产的 Tgradient PCR 扩增仪和 UV Ifec 凝胶成像系统。

1.2 方 法

1.2.1 提取 DNA 将 2×CTAB 提取液于 65℃ 水浴锅中预热 30 min(分),取金丰 1 号和益丰及其父本、母本各 1 颗芽,称取 0.5 g,先用 2×CTAB 提取液 350 μL 研磨,转入 1.5 mL 离心管中,再用 2×CTAB 提取

液 300 μL 清洗研钵加入离心管中。把 6 支离心管置于 65℃ 水浴锅中保温 20 min(分)后;拿出冷却至室温,加入等体积的氯仿-异戊醇(24 V:1 V),上下颠倒混匀,4℃ 下 12 000 rpm 离心 10 min(分);将上清液转移至干净的离心管中,加入 2/3 体积的异丙醇,上下颠倒混匀,室温放置 30 min(分)后,8 000 rpm 离心 10 min(分),弃上清液,沉淀用 75% 乙醇 100 μL 清洗 3 min(分),12 000 rpm 短暂离心,弃乙醇,再用 100% 乙醇清洗 1 min(分),把离心管倒置晾干;用 TE 缓冲液 100 μL 溶解,置于 4℃ 冰箱中。

1.2.2 DNA 扩增反应和琼脂糖凝胶电泳 反应体系:先取 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 26 μL, 10×PCR Buffer 26 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) 2.5 μL, 4×dNTP (每种 10 mmol·L⁻¹) 1.4 μL, 无菌双蒸水 1.59 μL 混合,取混合液 17 μL,模板 DNA (10 ng·μL⁻¹) 2 μL,随机引物 (40 μmol·L⁻¹) 1 μL,反应总体积 20 μL,扩增前 12 000 rpm 短暂离心。PCR 反应程序:先 94℃ 预变性 5 min(分),然后 94℃ 30 s (秒),36℃ 1 min(分),72℃ 2 min(分)扩增 40 个循环,之后再 72℃ 保持 5 min(分)。

琼脂糖凝胶电泳检测:在全部 20 μL 反应产物中加入 6×凝胶加样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 40% 蔗糖水溶液) 4 μL 混匀,取 10 μL 点入 1.4% 琼脂糖凝胶中,用 0.5×TBE 电泳缓冲液 (0.045 mol·L⁻¹ Tris-硼酸, 0.001 mol·L⁻¹ EDTA),先在 120 V·cm⁻¹ 电场强度下电泳 10 min(分),然后在 45 V·cm⁻¹ 电场强度下电泳 100 min(分),取出凝胶在 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭溶液中染色 20 min(分),然后在清水中脱色 1 h (小时),取出在凝胶成像系统下观察。

2 结果与分析

2.1 改良 CTAB 法提取 DNA 应用改良的 CTAB 法提取番茄芽 DNA 样品,经 UV Ifec 凝胶成像系统观察检测 (图 1),DNA 条带 (上部) 清晰,其分子量

戴修纯,男,博士研究生,农艺师,广州市农业科学研究所,广州市新港东路 151 号,510308,电话:020-84213224, E-mail: xchdai@tom.com
王佛娇,谢伟华,张华,通讯地址同第 1 作者
收稿日期:2006-02-15
基金项目:广州市科技攻关项目 (2001-2-048-02)

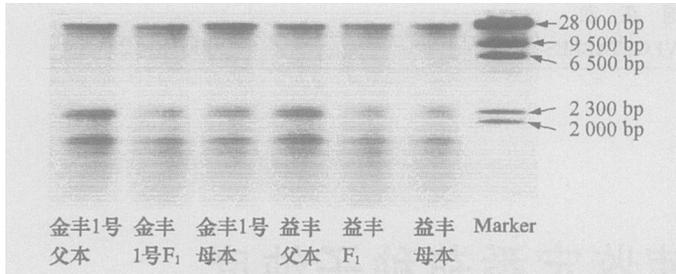


图 1 番茄 DNA 电泳图谱

大约为 28 000 bp。

2.2 引物筛选和杂种鉴定 用华美生物工程公司生产的 100 条随机引物分别扩增了金丰 1 号和益丰两个番茄一代杂种及其父本、母本,共筛选出 10 个能同时鉴定出金丰 1 号及其父本、母本的引物,6 个

能同时鉴定出益丰及其父本、母本的引物,其中引物 S27 能同时用来鉴定两个品种的纯度(图 2)。对这些引物进行重复试验,结果稳定,而且与田间形态观察鉴定结果相吻合。

金丰 1 号纯度鉴定中(图 2),引物 S296 为偏父型,即父本与 F_1 扩增条带形状与数目一致,该引物只能鉴定 F_1 与母本;S22、S27、S29 均为杂合型引物,父本、 F_1 、母本三者扩增条带形状或数目不一致,能同时鉴定父本、母本与 F_1 。

益丰纯度鉴定时(图 2),引物 S296、S22 为偏父型,该引物只能鉴定 F_1 与母本;S17 为偏母型,该引物只能鉴定 F_1 与父本;S27 为杂合型引物,能同时鉴定父本、母本与 F_1 。

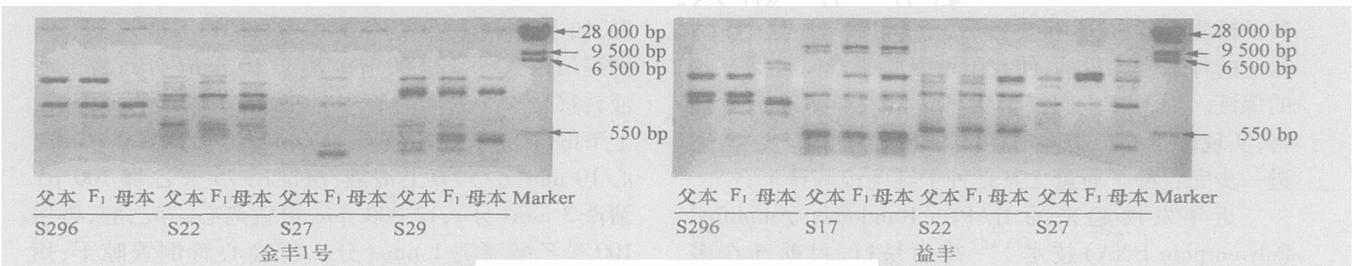


图 2 金丰 1 号、益丰纯度鉴定的引物筛选

3 讨论

应用 RAPD 技术鉴定作物种子纯度,首先要求 DNA 的提取方法简单、易行、快速、费用低。本试验应用改进的 CTAB 法提取 DNA,不需应用苯酚、RNAse 酶等试剂,全部操作在 2 h(小时)内完成,且提取的 DNA 适于 RAPD 分析;利用传统的田间纯度鉴定方法,至少需要几百株,而且需要生长到一定的阶段,既占用田间资源,又浪费人力物力。应用 RAPD 技术鉴定作物种子纯度,只需在实验室发芽 4~5 d(天),提取 DNA 需 2 h(小时),扩增反应 3 h(小时),电泳 1 h(小时),整个鉴定过程在一个星期内完成,扣除仪器设备费用,平均每株约需 1 元的药品费。因而应用 RAPD 技术鉴定作物种子纯度,具有简单、快速、准确、费用低的优点。

参考文献

1 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等. 精编分子生物学实验指南.

北京:科学出版社,1998

- 2 Willams J G K, Kublik A R, Livak K J, et al DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6 531 ~ 6 535
- 3 McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies Seeds Science and Technology, 1994, 22: 171 ~ 176
- 4 刘富中,刘万勃,宋明,等. 利用 RAPD 快速鉴定甜瓜杂交种的遗传纯度. 中国蔬菜, 2002(5): 7 ~ 9
- 5 庄木,王晓武,杨丽梅,等. 利用 RAPD 方法鉴定两个春甘蓝品种的纯度. 中国蔬菜, 1999(5): 8 ~ 9
- 6 栾雨时,苏乔,李海涛,等. 利用 RAPD 技术快速鉴定番茄杂种纯度. 园艺学报, 1998, 25(3): 247 ~ 251
- 7 王得元,邓义才,李乃坚. RAPD 标记检测蔬菜种子纯度中 DNA 提取方法的研究. 广东农业科学, 1999(3): 13 ~ 15
- 8 Ko H L, Cowan D C, Henry R J, et al Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties Euphytica, 1994, 80: 179 ~ 189



北京市科益农土壤分析仪器厂

TFY 系列土壤分析仪

科益农土壤分析仪器厂(原海淀土壤分析仪器厂)为土壤分析仪器专业生产厂家,有 20 年生产经验,技术成熟,质量可靠,产品从单功能到微机型,有 5 种样式供选择,价格 1 880 ~ 6 500 元(供参考)。提供的分析方法规范,使用标准计量单位,测试精确度高,是配方施肥和平衡施肥的必备仪器。

对 1998 年前购买海淀土壤分析仪器厂仪器的用户优惠换购新仪器。

联系人:张亚珠 刘利 电话:010-88453727 88435921 13801297578

地址:北京市海淀区闵庄 129 号 邮编:100089 网址: <http://www.bjkyn.com>