

“中国春”小麦不同缺体的 RAPD 分析

何聪芬 黄占景 沈银柱 刘植义 柏 峰 马闻师 张召铎
(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

摘 要 利用 PCR-90A 型 DNA 扩增仪, 对 7 个中国春小麦缺体核 DNA 进行了扩增。结果显示, 中国春小麦缺体核 DNA 的 RAPD 产物可分为二种类型: (1) 所有供试材料均能扩增出的片段, 代表了核 DNA 在进化上的保守性。有一个引物检测到这类片段。(2) 全部供试材料间存在的差异片段, 这类片段是用来基因定位的主要依据。另外, 建立中国春小麦缺体系统的 RAPD 指纹图谱对研究小麦的系统进化也将有重要意义。

关键词 小麦 中国春缺体 核 DNA 组 RAPD 技术

RAPD(random amplified polymorphie DNA) 也称 AP-PCR(arbitrary primer PCR) 技术, 是 1990 年由 Williams 和 Welsh 几乎同时发展起来的^[4]。其基本程序是 PCR 反应, 利用 PCR 扩增原理, 用一个随机核苷酸顺序的寡聚核苷酸引物指导 PCR 扩增, 对 PCR 产物作电泳分析获得 DNA 指纹图谱, 从而提供 DNA 多态性信息。因此, RAPD 是一种检测 DNA 片段多态性的快速、经济有效的技术途径, 被广泛用于群体遗传学中种属分类鉴定, 动植物遗传连锁图的建立, 基因定位和分离以及杂交后导入基因的追踪等^[5]。本研究利用中国科学院遗传所生产的 PCR 扩增仪对 7 种中国春小麦缺体及中国春小麦核 DNA 进行 RAPD 分析, 试图寻找与某条染色体有关的基因片段。

1 材料和方法

1.1 材料

中国春(*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) 及 7 种缺体(1A、1B、2A、3A、3B、5B、6B) 种子由穆素梅先生提供。经大田繁种后用于提取核 DNA。

1.2 方法

DNA 的分离: 参照张忠廷^[3]的方法。取 10g 黄化苗在液氮中研成粉末, 然后转到 50ml 离心管中, 加 20ml 预热至 97℃ 的 1.67×CTAB(十六烷基三甲基溴化铵) 和 100μl 巯基乙醇(1.67×CTAB 提取缓冲液: 83.5mM pH8.0 Tris-HCl, 1.17M NaCl, 16.7mM EDTA、1.67% CTAB)。用玻璃棒迅速搅匀, 65℃ 水浴 1.5h, 加 1 倍体积的氯仿/异戊醇(24/1), 轻轻混匀,

8000rpm 离心 10min, 取上清液, 加 2/3 体积的异丙醇, 用玻璃棒绕出沉淀的 DNA, 再用 70% 冷乙醇洗 2~3 次, 抽干, 移至 5ml 离心管中, 加 4ml TE, 在 60℃ 下水浴 1h, 6000rpm 离心 10min, 取上清液, 加无 DNA 酶的 RNA 酶, 使终浓度为 10μg/ml, 37℃ 下保温 5h, 加 1/10 体积的 3M 醋酸钠和 2 倍体积的冷乙醇, 绕出沉淀 DNA, 再用 70% 乙醇洗 2 次, 溶于 1ml TE 中, UV-120 分光光度计测其浓度后, 可做为 PCR 反应的模板。

PCR 仪为中国科学院遗传所生产的 PCR-90A 型 DNA 扩增仪; 引物及其它均由中科院遗传所 802 室提供(表 1)。

RAPD 反应条件: 扩增反应总体积为 25μl 引物 1μl, dNTP1.5μl, Buffer (10mM Tris-HCl pH 8.3) 2.5μl, Taq 酶 1μl, DNA 模板 1μl, MgCl₂ (2mM) 6.5μl, ddH₂O 11.5μl, 液体石蜡油 40μl。

表 1: RAPD 引物顺序及其 PCR 产物条带数目

| 引 物 | 寡聚核苷酸长度 | 序列 5'~3' | 扩增条带数 |
|--------|---------|------------|-------|
| OPT-13 | 10 | AGGACTGCCA | 1~5 |
| OPT-14 | 10 | AATGCCGCAG | 0~3 |
| OPT-6 | 10 | CAAGGGGCAG | 0~4 |
| OPT-7 | 10 | GGCAGGCTGT | 0~7 |

反应程序: (1) 97℃ 变性 1min, 36℃ 结合 1min, 72℃ 延伸 2min, 40 个循环; (2) 97℃ 变性 1min, 36℃ 结合 1min, 72℃ 延伸 2min, 45 个循环。在上述二程序中样品都在 72℃ 保温 5min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳 1~1.5h, 溴化乙锭染色; 紫外灯下观察照相。

2 结果与讨论

在本实验室所建立的扩增条件下, 4 个单引物的扩增产物经电泳分离, 均得到了清晰的 DNA 扩增结果(图 1, 2)。为分析方便, 将两次电泳所扩增条带从负极向正极按迁移率大小分别编号。其中不同缺体经引物 OPT-13, OPT-14 扩增后的产物列于表 2; 不同缺体经引物 OPT-6, OPT-7 扩增后的产物列于表 3。结果表明:

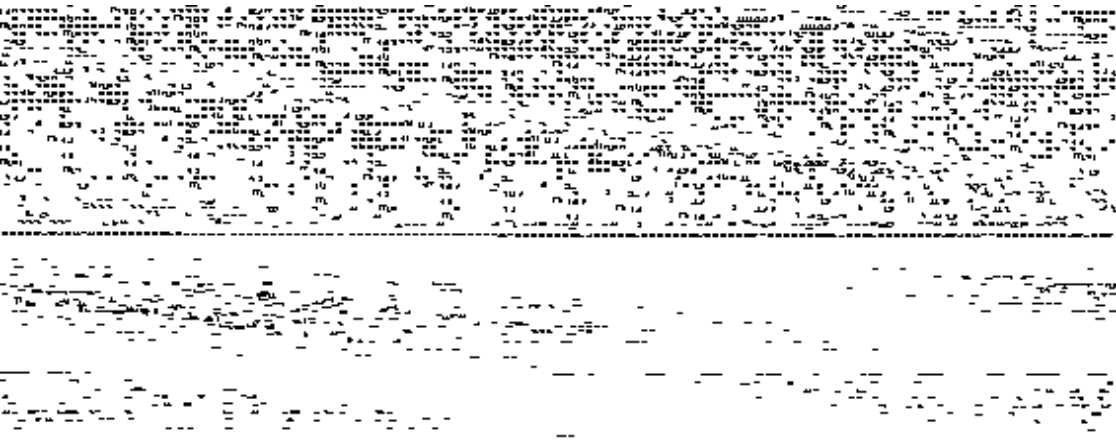


图 1 中国春不同缺体经引物 OPT-13, OPT-14 扩增产物图谱
1. 6B 缺体; 2. 中国春; 3. 1A 缺体; 4. 1B 缺体; 5. 2A 缺体; 6. 3A 缺体; 7. 3B 缺体; 8. 5B 缺体。

1. 在引物 OPT-13, OPT-14 存在下, 扩增后的第 5、6、8 号扩增带(图 1, 表 2) 以及引物 OPT-6 扩增的产物 2 号带(图 2, 表 3), 是所有供试材料均能产生的扩增片段, 反映了普通小

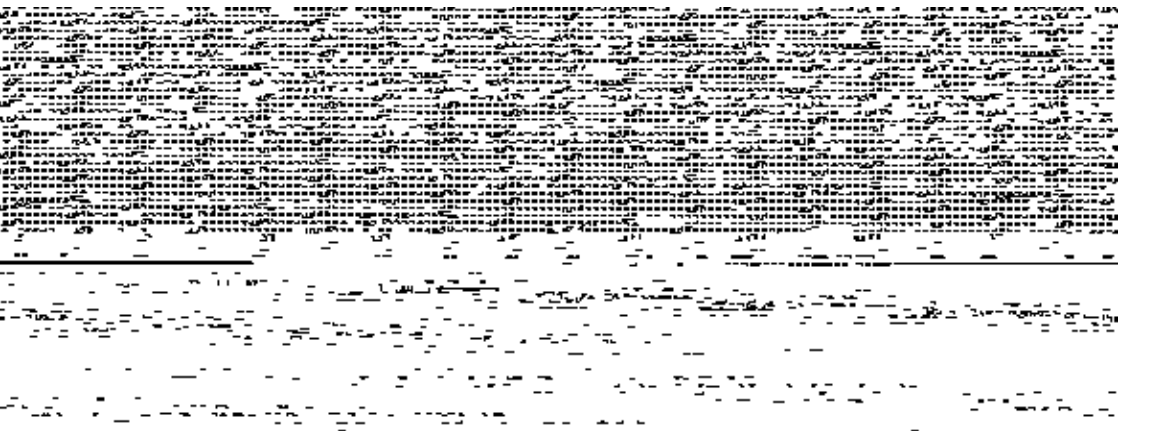


图 2 中国春不同缺体经引物 OPT-6、OPT-7 扩增产物图谱(材料编号同图 1)

表 2 不同缺体经引物 OPT-13、OPT-14 扩增结果比较

| 扩增带编号 | 引物 OPT-13 | | | | | | | | 引物 OPT-14 | | | | | | | |
|-------|-----------|-----|----|----|----|----|----|----|-----------|-----|----|----|----|----|----|----|
| | 6B | 中国春 | 1A | 1B | 2A | 3A | 3B | 5B | 6B | 中国春 | 1A | 1B | 2A | 3A | 3B | 5B |
| 1 | | | | | | + | + | + | | | | | | | | |
| 2 | | + | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | + | + | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | + | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | + | + | | | + | + | + | | + | + | + | | | + | |
| 6 | | + | | | | + | + | + | | | + | | | + | + | + |
| 7 | | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 8 | | + | | | | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| 9 | | + | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | + | | | | | | | | | | | | | | |

表 3 不同缺体经引物 OPT-6、OPT-7 扩增结果的比较

| 扩增带编号 | 引物 OPT-13 | | | | | | | | 引物 OPT-14 | | | | | | | |
|-------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|----|----|----|----|----|-----|
| | 6B | 中国春 | 1A | 1B | 2A | 3A | 3B | 5B | 6B | 中国春 | 1A | 1B | 2A | 3A | 3B | 5B |
| 1 | | | | | | | | | ++ | ++ | | | + | + | | +++ |
| 2 | +++ | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | | | | | | | | |

麦在进化上的保守性。

2. 引物 OPT-13 和 OPT-14 均能使不同缺体扩增出较多的条带,在扩增强度上有明显不同(图 1,表 2)。说明这两个引物是研究普通小麦核 DNA 多态性的较好的引物。
3. 中国春和 1A 缺体经 OPT-13 扩增后,第 2、9、10 号扩增带为中国春所特有,第 3 号扩增带为 1A 缺体所特有。这些扩增带,特别是第 3 号扩增带有可能做为鉴别相应缺体的标志带,这些差异片段有可能是另一同源群相同序号染色体的产物。
4. 比较 1A 和 1B 缺体以及 3A 和 3B 缺体,经引物 OPT-13、OPT-14 和 OPT-7 扩增后的产物,可以发现,在引物 OPT-13 存在下,1A 缺体与 1B 缺体相比,前者扩增出 3 号和 5 号带,而 1B 缺体没有相应扩增产物;在引物 OPT-14 存在下,3A 与 3B 缺体相比,3A 缺体可以扩增出 5、6、7、8 号带,而 3B 缺体缺少相应扩增产物;在引物 OPT-7 存在下,3A 与 3B 缺体相比,

3A 缺体可以扩增出 1 号带, 而 3B 缺体没有。这种规律性变化, 均发生在缺少 A 组染色体, B 组相应序号染色体存在时, 可以扩增出差异片段; 相反, 缺少 B 组染色体, A 组相应序号染色体存在时, 却没有相应的扩增产物, 说明 B 组染色体对 A 组染色体有补偿作用。由此启示我们, 在育种工作中, 特别在创造人工代换系时, 代换 A 组的某一染色体可能不如代换 B 组的某一染色体更为有效。

上述不同引物对不同缺体扩增片段数目, 以及主扩带或扩增强度、差异与 Welsh 和 Williams 等对人、植物(如大豆、水稻和玉米)及真菌、细菌的核基因组^[3]、许仁林等^[2]对水稻线粒体基因组的扩增结果相类似。表明中国春小麦缺体系统在核 DNA 上存在丰富的遗传多态性, 建立其核 DNA 的 RAPD 指纹图谱对小麦基因定位的研究将具重要的价值。

总之, 本研究结果表明, 应用 RAPD 进行基因定位以及物种系统学^[1]的研究, 是一项切实可行的有效手段。利用该项技术对中国春不同缺体进行 RAPD 的研究, 尚需进一步深入。

参 考 文 献

- 1 惠东威. 利用 RAPD 对大豆属植物系统学研究的初报. 科学通报, 1994, 39(2): 175~179
- 2 许仁林. 杂交水稻及其“三系”线粒体 DNA 的 AP-PCR 指纹图谱. 植物学报, 1994, 36(1): 1~6
- 3 张忠廷. RAPD 在水稻温敏核不育研究的应用. 遗传学报, 1994, 21(5): 373~378
- 4 Wang Bin et al. The Identification of Wheat-wheatgrass Translocation Lines by RAPD Analysis. In: Selected Papers on Rice Biotechnology. Beijing: China Science and Technology Press, 1994, 98-103
- 5 Wang Bin, Li Songtao. RAPD and its Application in Plant Molecular Biology. In: Selected Papers on Rice Biotechnology. Beijing: China Science and Technology Press, 1994, 111-122

RAPD Analysis on Different Nullisomic Genomes of Wheat “Chinese Spring”

He Congfen Huang Zhanjing Shen Yinzhu Liu Zhiyi

Bai Feng Ma Wenshi Zhang Zhaoduo

(Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

Abstract RAPD analysis on seven nullisomic genomes of wheat “Chinese Spring” was conducted using four primers with 10mer oligonucleotides (OPT-13, OPT-14, OPT-6 and OPT-7). The RAPD products revealed that the amplified DNA bands fell into two categories: those could be amplified in all genomes, represented the DNA stability in evolution; and those differed in the studied genomes, were the important bands for genome identification. Results also suggested that RAPD “fingerprints” assay of nuclear DNA could be used as a tool in the study of systematic evolution of wheat.

Key words: Nullisomic wheat Chinese Spring; Nuclear genome; RAPD