

# 番茄 EST-SSR 标记 PCR 反应体系的优化

韩明利<sup>1,2</sup>, 侯丽霞<sup>1</sup>, 崔娜<sup>2</sup>, 王施慧<sup>1</sup>, 于志海<sup>2</sup>, 郭彩杰<sup>2</sup>

(1. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东 济南 250100;

2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**应用  $L_{16}(4^4)$  正交实验优化番茄 EST-SSR 标记 PCR 反应体系。结果表明:20  $\mu$ L 体系中各反应物最适浓度为:DNA 模板 45 ng/20 $\mu$ L, 引物 0.75  $\mu$ mol/L,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L, *Taq* DNA 酶 0.5 U/20 $\mu$ L, 且  $Mg^{2+}$  对该标记反应体系影响最大。利用 5 对 EST-SSR 引物及  $P_1$ 、 $P_2$  基因组 DNA 验证优化体系的可靠性, 为该标记在番茄基因组分子标记辅助育种提供了试验依据。

**关键词:**番茄; EST-SSR; 体系优化; PCR

中图分类号: S 641.2; Q 789 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)16-0142-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是世界上最重要的蔬菜作物之一, 已成为对茄科的模式植物<sup>[1]</sup>。随着生物技术和番茄基因组测序工作的进行, 低成本高效率分子标记如 SRAP、EST-SSR、SNP 等被迅速开发并在品种改良中得到应用<sup>[2]</sup>。

EST-SSR 标记从 EST 序列中开发 SSR 位点。大量 EST 序列收集于核酸公共数据库中, 尤其是番茄 EST 序列, 到 2011 年 1 月 NCBI(美国国家生物信息中心) 序列总数达 298 289 条 (Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest), 为开发 SSR 标记提供了快捷、有效和

廉价的途径<sup>[3]</sup>。EST-SSR 标记在物种间具有高通用性, 通常都代表某种基因功能, 可反映出转录区的差异, 因其本身是功能基因的一部分序列, 所以它为功能基因提供了“绝对”标记。该标记技术已在烟草、水稻、大豆、鹰嘴豆等植物中有相应的报道<sup>[4-5]</sup>, 但在番茄研究中鲜有报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

E-95F<sub>8</sub>(♀)、中华巨粉 8 号(♂) 及 F<sub>2</sub> 代番茄群体均由山东农业科学院蔬菜研究所提供。快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根公司;  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成及其他常规试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司; 50 bp maker 购自 Fermentas 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 提取操作依据试剂盒说明, 紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳进行浓度和纯度检测。

第一作者简介: 韩明利(1985-), 女, 山西吕梁人, 在读硕士, 现从事发育分子生物学研究工作。E-mail: hemerry@163.com。

责任作者: 侯丽霞(1970-), 女, 博士, 研究员, 现主要从事番茄育种与分子生物学研究工作。E-mail: houlx2006@126.com。

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2006AA100108-3-1); 山东省农业良种工程资助项目(2010LZ006-01)。

收稿日期: 2011-04-13

## Construction and Identification VIGS Vector about Vitamin E Biosynthesis Gene of Tomato

LU Liang-liang, FU Da-qi, LIU Hai-ping, WANG Xiao-hui, LUO Yun-bo, ZHU Ben-zhong, ZUO Jin-hua  
(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

**Abstract:** Tomato was used as test material, using RT-PCR to clone part sequence of vitamin E biosynthesis gene's (*tocopherol cyclase VTE1*) from the tomato fruit. Fragment length was 420 bp. Sequence analysis showed that gene homology of this fragment and *VTE1* was 95%. Then *Xho*I, *Kpn*I restriction sites connected *VTE1* with *pTRV2-PDS* plasmid. The recombinant vector *pTRV2-PDS-VTE1* was obtained. And the recombinant vector was transformed into *Agrobacterium*. The study provided the experimental material for using VIGS technology to further analysis *VTE1*'s role in vitamin E biosynthesis in tomato. On this basis, laid the foundation for using transgenic technology to control vitamin E biosynthesis in tomato fruit in the future.

**Key words:** tomato; vitamin E; VIGS; gene silencing; vector construction

1.2.2 PCR 扩增 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。HML26 为优化引物, 其它 5 对为验证引物(表 1), 退火温度均为 48 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上检测, 银染显色, 照相保存。

表 1 PCR 反应体系引物

引物名称	序列碱基	预扩增长度/bp
HML 3	S 5' GAACCATGCCAAATAGCC 3' A 5' GATGATGGGTGAAATAAG 3'	128
HML11	S 5' GGGGTTTGTCTGTCTGT 3' A 5' AAGCCAATGATCTACTCTTC 3'	193
HML12	S 5' AAAAGGGTAGTCGCTGAG 3' A 5' TGCCGTGAAGTCCATTAA 3'	293
HML13	S 5' GGTCTTGTGAGGCTTAT 3' A 5' TGACGGGTGTACTTTCT 3'	175
HML18	S 5' ATGGGAATTTGCTAATGAAGG 3' A 5' TTTGATTCTGTCCCTTG 3'	311
HML26	S 5' TGTGGTGGTGAATGTTGAT 3' A 5' ACAGGAAATCGGGAATAG 3'	178

1.2.3 正交实验设计 该研究对 DNA 模板浓度、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶浓度 5 个因素进行 4 个水平的  $L_{16}(4^4)$  正交实验(表 2), 另外每管加 2  $\mu\text{L}$  不含  $\text{Mg}^{2+}$  的 10 $\times$ PCR Buffer。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 浓度和纯度检测

供试材料的基因组 DNA, 紫外分光光度检测  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  值均在 1.8~2.0; 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 主带清晰, 无降解, 纯度较高, 达到 EST-SSR 分析要求。

表 2 正交实验设计  $L_{16}(4^4)$

编号	DNA 模板 /ng $\cdot (20\mu\text{L})^{-1}$	镁离子 /mmol $\cdot \text{L}^{-1}$	dNTPs /mmol $\cdot \text{L}^{-1}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>Taq</i> 酶 /U $\cdot (20\mu\text{L})^{-1}$
1	15	1.5	0.1	0.25	0.5
2	15	2.0	0.2	0.50	1.0
3	15	2.5	0.3	0.75	1.5
4	15	3.0	0.4	1.00	2.0
5	30	1.5	0.2	0.75	2.0
6	30	2.0	0.1	1.00	1.5
7	30	2.5	0.4	0.25	1.0
8	30	3.0	0.3	0.50	0.5
9	45	1.5	0.3	1.00	1.0
10	45	2.0	0.4	0.75	0.5
11	45	2.5	0.1	0.50	2.0
12	45	3.0	0.2	0.25	1.5
13	60	1.5	0.4	0.50	1.5
14	60	2.0	0.3	0.25	2.0
15	60	2.5	0.2	1.00	0.5
16	60	3.0	0.1	0.75	1.0

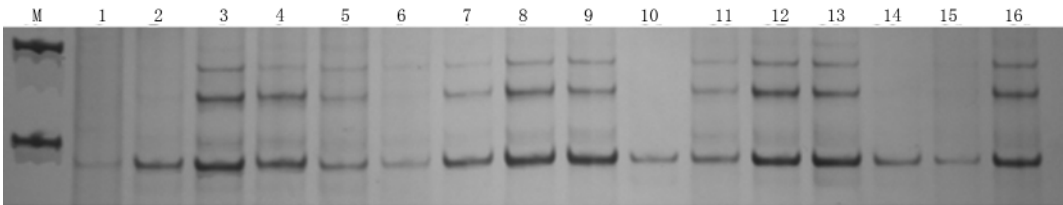


图 1 正交设计 EST-SSR 反应体系扩增结果

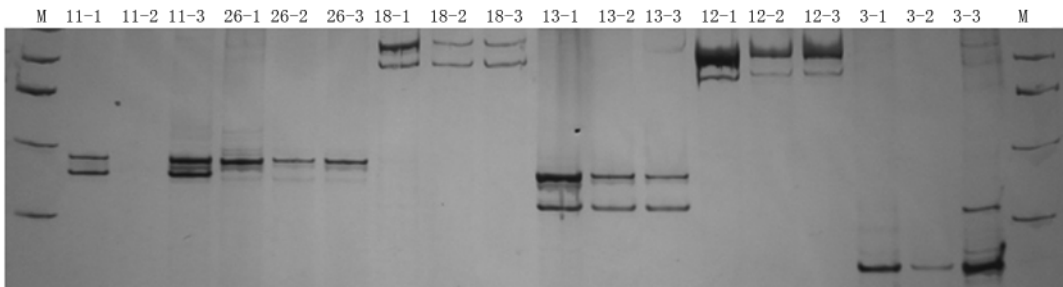


图 2 10 号反应体系在  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $F_2$  中的验证

注: Maker; 50 bp, 11-1, 11-2, 11-3 分别为 HML11 对  $P_1$ 、 $P_2$  和  $F_2$  的扩增, 其它类同

2.2 正交优化结果分析

PCR 反应体系扩增结果表明(图 1), 2、10、14 和 15 扩增条带清晰、特异性强, 但 10 号反应体系试剂使用最经济, 因此, 最佳体系为: DNA 模板 45 ng/20  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L, *Taq* DNA 酶 0.5 U/20 $\mu\text{L}$ , 每个引物 0.75  $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 优化体系的验证

该试验采用  $P_1$ 、 $P_2$  基因组 DNA 和 5 对引物对 10 号反应体系进行验证,  $F_2$  基因组 DNA 为对照。结果表

明(图 2), 5 对引物(HML3、HML11、HML12、HML13、HML18)扩增条带符合预期片段大小, 条带清晰, 均为有效扩增。但 11 号引物在  $P_1$  中无扩增, 表明该引物能分辨父母本差异性状。

3 结论与讨论

正交实验优化番茄 EST-SSR 标记 PCR 反应体系中 2、10、14、15 反应体系扩增结果表明, DNA 模板、引物和 *Taq* DNA 酶在 4 个水平范围都有效扩增, 对反应

# 三苞唇柱苣苔花梗的离体培养

韦 啸<sup>1</sup>, 唐赛春<sup>2</sup>, 黄素梅<sup>2,3</sup>

(1. 广西壮族自治区永福县林业局, 广西 永福 541800; 2. 中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

3. 广西农业科学院 生物技术研究所, 广西 南宁 530007)

**摘 要:**以三苞唇柱苣苔带腋芽花梗为外植体, 对外植体消毒、不定芽的诱导与增殖、生根培养以及生根苗的移栽等组织培养相关技术进行研究。结果表明: 外植体的消毒以 0.1% 的升汞消毒 7 min 最佳, 其成活率为 73.3%; MS 基本培养基适合于芽的诱导及生长; 不定芽诱导及增殖的最佳培养基为: MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 最佳的生根培养基为: MS + IBA 0.3 mg/L, 最佳的移栽基质为腐殖土, 移栽成活率为 95%。

**关键词:**三苞唇柱苣苔; 花梗; 离体培养

**中图分类号:**S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0144-04

三苞唇柱苣苔(*Chirita tribracteata* W. T. Wang)为

第一作者简介: 韦啸(1972-), 男, 广西永福人, 本科, 工程师, 现主要从事园林植物与观赏园艺方面的工作。E-mail: hsmey74@yahoo.com.cn。

责任作者: 黄素梅(1974-), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事植物资源开发利用等研究工作。

收稿日期: 2011-05-04

苦苣苔科唇柱苣苔属多年生草本植物, 其叶片墨绿、叶脉清晰、花冠蓝色, 具有较高的观赏价值和很大的发展潜力<sup>[1]</sup>。此外, 唇柱苣苔属植物的许多种类还是我国民间传统的药用植物, 该属植物在医药领域同样具有较大的开发潜力<sup>[2-3]</sup>。由于唇柱苣苔属植物大多对生境要求严格, 分布范围十分狭窄, 这使得该属很多植物成为珍稀濒危种类, 其中三苞唇柱苣苔仅在广西的凤山县发现一个自然分布点。因此, 有必要加强植物资源保护及开发利用研究, 尤其是加强繁育及种质保存

体系影响最小; dNTPs 在 3 个水平内有效扩增, 对反应体系影响也不大;  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L 时, 扩增条带特异性好, 都为预扩增条带,  $Mg^{2+}$  与扩增条带的特异性相关性强, 对反应体系影响最大。与王娟等<sup>[6]</sup>优化苹果 EST-SSR 标记 PCR 反应最佳体系一致(除 DNA 模板 30 ng/20  $\mu$ L、引物 0.4  $\mu$ mol/L)。佟海申等<sup>[7]</sup>研究了 4 个因素(不含  $Mg^{2+}$ ) 对大白菜 EST-SSR 标记 PCR 反应体系的影响, 最佳反应浓度与该研究有差异, 且表明引物对反应影响最大。原因可能是试验材料不同所致, 试验所得最佳体系浓度均符合常规 PCR 反应体系所需浓度。

## 参考文献

[1] 贺俊, 张忠华, 李颖, 等. 国际马铃薯和番茄基因组测序进展[J]. 园

艺学报, 2008, 35(10): 1545-1549.

[2] 陈佳, 沈火林, 杨文才. 番茄分子标记开发进展[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 130-138.

[3] Squirrell J, Hollingsworth P M, Woodhead M, et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants[J]. Mol. Ecol., 2003(12): 1339-1348.

[4] 林元震, 郭海, 刘纯鑫, 等. EST-SSR 标记在木本植物中的开发和应用[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1221-1225.

[5] Varshney R K, Hiremath P J, Lekha P, et al. A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [M]. BMC Genomics, 2010, 10(1): 523-541.

[6] 王娟, 宋尚伟. 苹果 EST-SSR 引物的开发及部分品种亲缘关系分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

[7] 佟海申, 宋琳, 张志刚, 等. 大白菜 EST-SSR 反应体系优化及引物筛选[J]. 科技导报, 2010, 28(3): 75-81.

## Optimization of EST-SSR Marker PCR System on Tomato

HAN Ming-li<sup>1,2</sup>, HOU Li-xia<sup>1</sup>, CUI Na<sup>2</sup>, WANG Shi-hui<sup>1</sup>, YU Zhi-hai<sup>2</sup>, GUO Cai-jie<sup>2</sup>

(1. Institute of Vegetable Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, National Improvement Center for Vegetable, Shandong Branch, Jinan, Shandong 250100; 2. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:**  $L_{16}(4^4)$  orthogonal design was used in the EST-SSR Marker PCR system optimization of tomato. The results showed that the best PCR system was: 45 ng/20  $\mu$ L DNA template, 0.75  $\mu$ mol/L primer, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.4 mmol/L dNTPs, 0.5 U/20  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase, and the effect of the primer concentration was the greatest for this system. The system had been verified by five pairs of primers and  $P_1$ ,  $P_2$  genome DNA, and provided experiments reference on molecular marker assisted selection of tomato.

**Key words:** tomato; EST-SSR; system optimization; PCR