

## 黑麦通用特异性 DNA 探针的筛选\*

任如意<sup>1,2</sup>, 肖志敏<sup>3</sup>, 李集临<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨师范大学生物与环境科学学院, 黑龙江哈尔滨 150080; 2. 牡丹江师范学院生物系, 黑龙江牡丹江 157012; 3. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

**摘要:** 为了筛选出鉴定小麦背景下黑麦成分的通用特异性引物, 选用胜利黑麦、八倍体小黑麦新麦 73、六倍体小黑麦哈师 209、普通小麦 s165、中国春为试验材料, 利用国内外发表的黑麦特异性 DNA 探针引物进行 PCR 扩增并进行了电泳检测。结果表明, 在选用的 6 对引物 (NOR - R1、AF<sub>1</sub>/AF<sub>4</sub>、PASW、pSC19.1、pSC20H、pSC10C) 中只有 4 对引物即 pSC20H、pSC119.1、AF<sub>1</sub>/AF<sub>4</sub>、NOR - 1R 在黑麦和小黑麦 DNA 中扩增出了特异性条带, 扩增片段大小依次为 1 490、750、1 500、300 bp 左右, 说明这 4 对引物是黑麦通用特异性 DNA 探针引物, 可以用于在小麦背景下进行黑麦外源种质的鉴定。

**关键词:** 黑麦; 通用引物; 特异性探针

中图分类号: S512.5; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2007)03-0382-04

## Screening of the Universal Specific DNA Probes of Rye

REN Ru-yi<sup>1,2</sup>, XIAO Zhi-min<sup>3</sup>, LI Ji-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Biology and Environment, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150080, China; 2. Department of Biology, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012, China; 3. Heilongjiang Academy of Agriculture Science, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

**Abstract:** With the introgression of good alien genomes, it is important to detect the segment of alien chromatin in wheat background. In order to screen the universal specific DNA probes of rye, using rye, triticale, wheat were used as experiment material, PCR with universal primers of rye were conducted and PCR products were examined electrophoresis. Only 4 pairs of primers could produce specific band among 6 pairs of candidate primers and could be used as the universal specific DNA probes of rye to identify rye alien chromatin in wheat background.

**Key words:** Rye; Universal primers; Specific DNA probe

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是中国的主要粮食作物之一。中国小麦品种的遗传基础较为狭窄, 在很大程度上限制了小麦产量的提高和品质的改良。挖掘近缘野生物种的优良基因资源, 有目的地将这些有益基因导入普通小麦对于拓宽小麦的遗传基础具有重要的意义。黑麦 (*Secale cereale*) 是小麦重要的异源基因来源之一, 对于丰富小麦的遗传变异, 提高小麦品种的抗病抗逆性及产量潜力具有重要作用<sup>[1]</sup>。

异源遗传成分的检测是小麦远缘杂交工作的

组成部分。目前已运用 C-分带<sup>[2]</sup>、生化标记<sup>[3]</sup>、分子标记<sup>[4,5]</sup>、原位杂交<sup>[6]</sup>等方法来分析和鉴定小麦背景中的外源遗传物质。C-分带方法对没有特异性带型或带纹少、颜色浅、片段小的染色体不太理想, 同时 C-分带对环境条件非常敏感, 使用不同的试剂、选择不同的材料往往会得出不同的结果。生化标记数目比较少, 有些同工酶基因在进化过程中已丧失活性, 这给外源染色质的鉴定带来了困难。PCR 分子标记具有方便快捷的优点<sup>[7,8]</sup>, 但在一些染色体区域的遗传标记只对跟

\* 收稿日期: 2006-11-10

修回日期: 2007-02-20

作者简介: 任如意 (1968 - ), 女, 在读博士, 副教授, 主要从事植物遗传工程与小麦生物技术育种研究。

通讯作者: 肖志敏 (1952 - ), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事小麦生态育种研究。

踪特定的染色体或片段有效<sup>[4]</sup>。因此筛选物种或染色体组特异性标记就显得更有实用性。在黑麦研究上,这方面的报道目前还比较少。本研究旨在筛选黑麦通用特异性 DNA 探针引物,为小麦背景下的黑麦成分的检测提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

胜利黑麦、八倍体小黑麦(新麦 73)、六倍体小黑麦(哈师 209)、s165(无黑麦血缘的普通小

麦)由哈尔滨师范大学遗传教研室提供;中国春由中国农业科学院李立会先生提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取及检测 选各参试材料种子于 25 ℃ 温箱中发芽,取发芽 7~10 d 的幼苗提取 DNA。提取液含有 200 mmol/L Tris·HCl(pH 7.5),2 mol/L NaCl,2%CTAB,氯仿-异戊醇(24:1)抽提二次,无水乙醇沉淀。风干 DNA 溶于 200 μL 灭菌无离子水中,用 UV-2010 型紫外分光光度计与凝胶电泳检测 DNA 的浓度、纯度。

表 1 黑麦特异扩增 PCR 引物

Table 1 Specific primers for PCR amplification of rye fragments

引物 Primer	引物序列 Sequence of primers	
NOR-R1	5'GCA TGTA GCGACTAACTCA TCG 3'	5'CCCA GTTTTCCA TGTCGC 3'
AF1/AF4	5'GGA GACA TCA TGAACA TTTG 3'	5'CTGTTGTTGGGCA GAAA G 3'
PASW	5'AACGA GGGGTTCGAG 3'	5'GAGTGTCAAACCCAACGA 3'
pSC 119.1	5'TTGCCCTCATGCTTTTGA 3'	5'CTTGCCCTCTCCGCTTGAC 3'
pSC 20H	5'GTTGGAA GGA GCTCGA GCTG 3'	5'GTTGGCA GAAA GGTCGACA TC 3'
pSC 10C	5'AAA GCCTCAA GATAA GCG 3'	5'ATTACGAACACGAGTCCC 3'

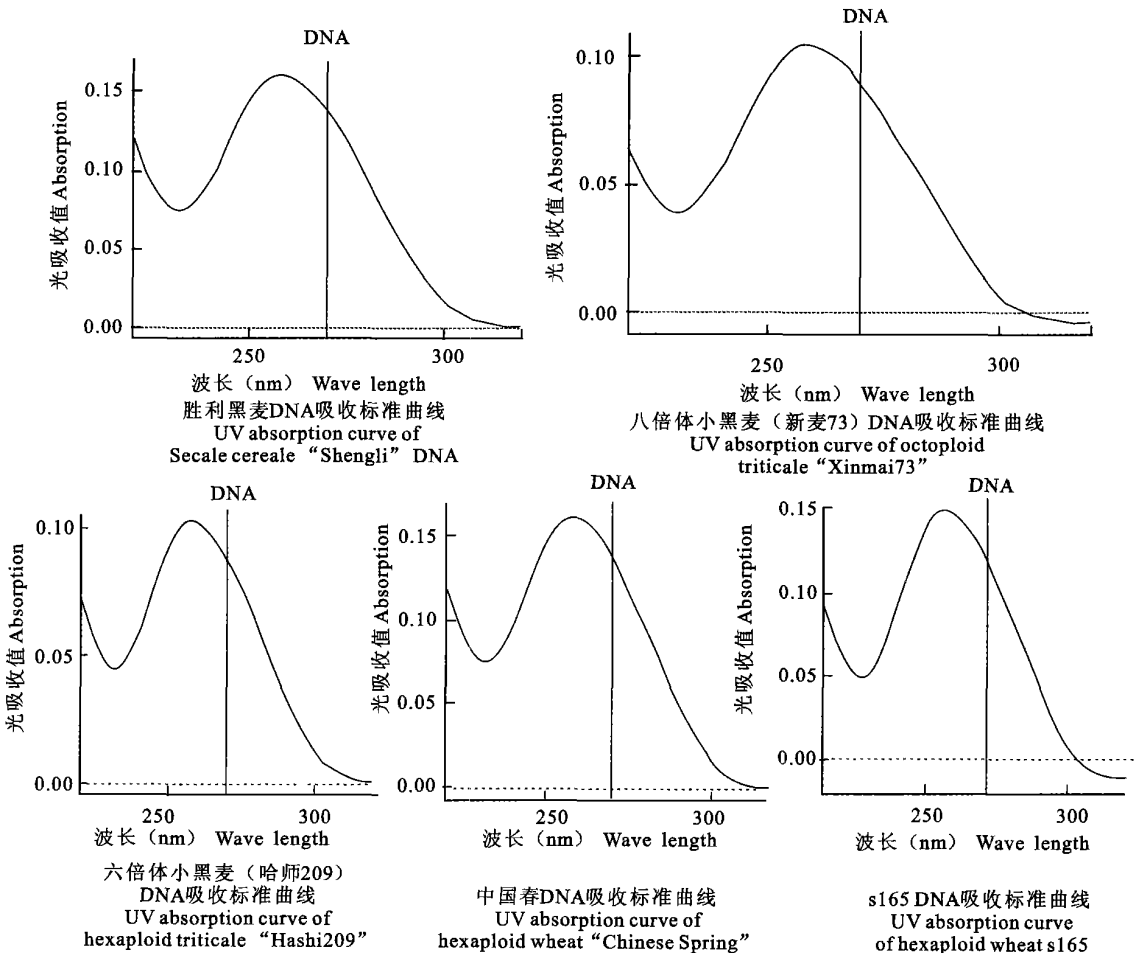
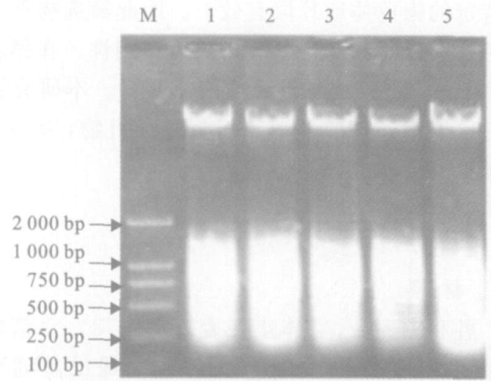


图 1 DNA 紫外吸收曲线  
Fig.1 UV absorption curve of DNA

1.2.2 黑麦特异性 DNA 探针引物的扩增 根据王二明<sup>[4]</sup>、周建平<sup>[5]</sup>、Cristina 等<sup>[7-9]</sup>的方法合成黑麦特异性 PCR 引物,由大连宝生物工程公司合成,引物序列见表 1。

PCR 扩增在 MJ Research PTC-100(USA)热循环仪上进行,其反应体系为 25 μL,含有 1 × PCR buffer,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,200 μmol/L dNTP,0.5U Taq 酶(Takara, Japan),40 ng 引物,40~60 ng 模板 DNA。反应条件为 95 5 min 预变性,继而按 94 30 s(变性),55 或 60 30 s(退火),72 1 min(延伸),循环 30 次,最后 72 延伸 10 min。PCR 产物用 2% Agarose 胶(内加 EB)在 1 × TAE 电泳缓冲液上电泳,放置 Bio-Rad 紫外凝胶成像系统下扫描照像。

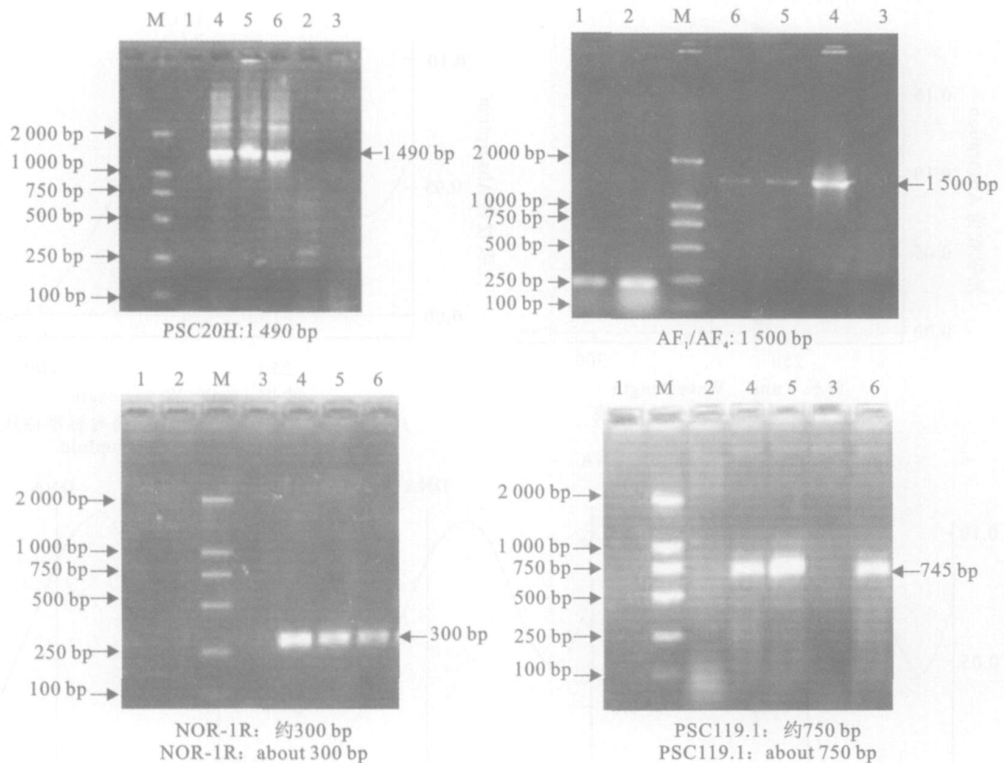


M. DNA Marker;1. 胜利黑麦;2. 八倍体小黑麦(新麦 73);3. 六倍体小黑麦(哈师 209);4. s165(无黑麦血緣的普通小麦);5. 中国春。

M. DNA Marker;1. *Secale cereale*"Shengli"; 2. Octoploid triticales"Xinmai73"; 3. Hexaploid triticales "Hashi209"; 4. s165 Hexaploid wheat; 5. Chinese Spring.

图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of DNA extracted



M. DNA Marker;1. s165;2. 中国春;3. 空白;4. 胜利黑麦;5. 六倍体小黑麦(哈师 209);6. 八倍体小黑麦(新麦 73)

M. DNA Marker;1. s165;2. Hexaploid wheat "Chinese Spring"; 3. Blank; 4. *Secale cereale*"Shengli"; 5. Hexaploid triticales "Hashi209"; 6. Octoploid triticales"Xinmai73"

图 3 黑麦通用引物筛选的结果

Fig. 3 Screening of the universal primers of rye

## 2 结果与分析

### 2.1 黑麦 DNA 的提取效果

图 1 中的五个曲线图依次为胜利黑麦、八倍体小黑麦(新麦 73)、六倍体小黑麦(哈师 209)、s165、中国春的 DNA 紫外吸收曲线。从这五个 DNA 紫外吸收曲线图中可以看出,曲线的吸收峰均在 260 nm 处,曲线符合 DNA 标准曲线。图 2 为 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图。由图 2 可以看出,基因组 DNA 经电泳后主带清晰而集中,没有明显的 Smear 现象,说明 DNA 比较完整。紫外分光光度计测定的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.8 ~ 2.0 之间。说明提取的 DNA 可用于 PCR 检测。

### 2.2 黑麦通用 SSR 引物的筛选

从图 3 中可以看出,用 6 对黑麦特异性引物对黑麦、小黑麦 DNA 进行扩增,只有 4 对引物即 pSC20H、pSC119.1、AF1/AF4、NOR-1R 在黑麦、小黑麦 DNA 中扩增出了特异性条带,扩增片段大小依次约为 1 490、750、1 500、300 bp 左右。其余 2 对引物在黑麦、小黑麦及普通小麦中都没有扩增出特异性条带。

本试验仅用了 6 对引物,检测的结果只能说明在这 6 对引物中只有 4 对扩增出特异性的条带,这 4 对引物可作为黑麦通用特异性引物,来检测小麦背景下的黑麦成分,但不能说明黑麦通用的特异性引物只有这 4 对。

## 3 讨论

本研究所选用的是文献[4,9~11]报道的黑麦特异性引物,但所选用的引物中只有 4 对引物在黑麦、小黑麦中能够扩增出目标 DNA 片段。其中 pSC20H、pSC119.1、AF1/AF4 黑麦特异性引物扩增出的片段大小与文献[9~11]报道的一致。但 NOR-1R 引物扩增的特异性片段与文献[4]报道的略有差异,可能是所用的黑麦、小黑麦的基因组序列略有变异而致。其余的 2 对引物在

黑麦、小黑麦及普通小麦中均未能扩增出目标 DNA 片段<sup>[5]</sup>,笔者认为其原因可能是使用的黑麦与小黑麦材料有易位等变异的产生而改变了序列结构,目标序列不存在,特异性带就难以出现。为进一步判断这 2 对引物的通用性,还需选用多种黑麦、小黑麦材料进行试验验证。

### 参考文献:

- [1] 吴金华,吉万全,李凤珍. 黑麦在小麦改良中的应用研究进展[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(1): 115 - 119.
- [2] Dou Quan-wen, Chen Pei-du, Xie Jun-feng. Cytological and molecular identification of alien chromatin in giant spike wheat germplasm[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(9): 1109 - 1151.
- [3] 颜泽洪,郑有良. 小麦异源(黑麦)重组系酯酶同工酶分析[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(1): 5 - 10.
- [4] 王二明,邢宏燕,张文俊,等. 黑麦 1R 染色体特异性 PCR 引物的分子证据[J]. 植物学报, 1999, 41(6): 603 - 608.
- [5] 周建平,杨足君,冯娟,等. 黑麦特异 DNA 重复序列的分离与鉴定[J]. 西南农业学报, 2005, 18(5): 508 - 602.
- [6] Wang Zhi-guo, An Tiao-guo, Li Jur-ming, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of rye chromatin in the background of "Xiaoyan No. 6" [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(4): 436 - 4421.
- [7] Cristina Katto M, Endo T R, Shuhei Nasuda. A PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background. Genes Genetics System[J]. 2004, 79: 245 - 250.
- [8] Yang Zu-jun, Liu Cheng, Feng Juan, et al. Studies on genome relationship and species-specific PCR marker for *Dasyphyrum breviaristatum* in *Triticeae*[J]. Hereditas, 1 - 8.
- [9] 刘志勇,孙其信,姜岚,等. 利用黑麦基因组特异 PCR 标记鉴别小麦 K 型雄性不育保持系[J]. 农业生物技术学报, 1997, 15(3): 205 - 210.
- [10] Liu Baoshen, Li Dayong, Zhang Xueyong, et al. Primary identification of alien chromatin in T911289, a maintainer of wheat male sterile line with cytoplasm of *Aegilops kotschyi* [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(6): 724 - 730.
- [11] Nkongolo K, Perinet G, Ratiarson A. Identification of a repeat sequence of rye DNA in wheat and related species[J]. Plant Molecular Biology Report, 1996, 14(4): 343 - 352.