



应用特异引物对彩色棉花色苷合成关键酶基因初步研究

Preliminary Study on the Anthecyanin Gene of the Naturally Colored Cotton by PCR Based Specific Markers

孙东磊^{1,2}, 杜雄明^{1*}, 马峙英^{2*}

(1. 中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 河南 安阳 455112;

2. 河北农业大学, 保定 071001)

彩色棉纤维中色素为类黄酮物质, 同植物花色苷的成分类似。从类黄酮物质的生化合成途径出发, 利用棉花、拟南芥、矮牵牛等植物花色苷合成关键酶的 EST(表达序列标签)和 cDNA 序列设计特异引物, 并与 pre-mRNA 剪接保守区的通用引物(共 4 条)进行组合, 在不同色泽纤维的棉花中进行了扩增, 进行了关键酶基因多样性初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以中国农业科学院棉花研究所品资室自育的 6 个彩色棉品系和 TM-1 为供试材料(表 1)。

表 1 材料名称及纤维特征

Table 1 The colored cotton and their fiber characteristics

序号	材料名称	纤维特征	序号	材料名称	纤维特征
1	中 9409/ 绿 1-9(F ₇)	绿色	5	棕 1-61	棕色
2	绿 4560	绿色	6	ROI/ 棕 263	棕色
3	SGK9708/ CC28(F ₇)	绿色	7	TM-1	白色
4	棕 263	棕色			

1.2 引物设计

利用 NCBI(National center for biotechnology information, USA) 提供的 ENTREZ 搜索程序, BLAST 程序, 运用 OLIGO6 生物软件, 根据植物花色苷合成关键酶基因的 EST 或 cDNA 序列设计特异引物, 上海申工合成(表 2)。

1.3 棉花叶片 DNA 的提取

取 0.5~1 g 幼嫩的棉花叶片, CTAB 方法提取棉花叶片总 DNA。

1.4 PCR 扩增与检测

1.4.1 EST 特异引物的扩增。 PCR 反应总体积为 10 μ l, PCR 反应在 PTC-100 上进行。退火温度 46 $^{\circ}$ C~57 $^{\circ}$ C(基于设计特异引物不同进行调整)。

1.4.2 与通用引物组合扩增。 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 前 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 38 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 后 25 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 46 $^{\circ}$ C~57 $^{\circ}$ C(基于设计特异引物不同进行调整)30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min; 4 $^{\circ}$ C 保存待测。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并在 GENENIUS 成像系统进行拍照。

2 结果与分析

2.1 EST 引物扩增结果分析

本研究设计的 31 对 EST 特异引物中, 27 对有扩增产物, 占总设计引物的 88%。8 对引物有差异, 占有扩增产物引物的 29.6%, 但在绿色棉、棕色棉和白色棉中都没特异带出现。扩增产物无差异的引物, 因扩增产物只是该基因的一部分, 不能说明基因结构在材料中没有差异性。扩增产物除 F3'5'H 外扩增长度均大于预扩长度, 说明这些基因内含子的广泛存在。运用矮牵牛 An1、An2 基因 cDNA 序列设计的特异引物均有扩增产物, 表明棉花中存在与矮牵 An1、An2 相对应的同源基因。运用拟南芥花色苷基因 cDNA 设计的引物中, CHS, CHI 等基因扩增产物在不同材料中有多态性, 表明这些特异引物对彩色棉花色苷合成关键酶基因遗传多样性研究具有一定的意义。

编码花色苷合成酶的结构基因中 CHS,

CHI, F3'5'H, DFR, 3GT, F3H 在不同供试材料中具有多态性, 在调节基因中, CYTP450、An2 在供试材料中扩增结果表现差异, 调节基因结构的差异将影响结构基因的激活转录。本研究根据矮

牵牛等植物的 EST 或 cDNA 保守序列所设计的引物能在棉花中获得较好的扩增结果, 且多态性较高, 将为引物的开发提供了新的途径。

表 2 部分引物名称及序列

Table 2 Part of markers desinged on the base of the Anthecyanin Gene

编号	关键酶	基因登记号	正向序列	反向序列
P1	3GT	AI728058	5' TGT ATG GGA TGG ATT ACC TG 3'	5' CCA AAG TGA AAG GGA CCA AC 3'
P2	F3'5'H	AI729430	5' GAT GAT GAA AGA GCA TGA GG 3'	5' TGT ACT CAA CCA GCA CGA TC 3'
P3	F3'5'H	AY275430	5' CAG CAC CAA ATG GAA TCA AC 3'	5' ACC GAC ACA TCC TCA AGC AT 3'
P4	F3H	AI730814	5' CTG CTT GGG AGG TTA CTC AC 3'	5' AGA CGG GTC ATC TCA GAA AT 3'
P5	CHI	AI728859	5' CAA GTT GCT CCA GAC TCG TG 3'	5' GTT GAT GAA TCG CTC TTG CC 3'
P6	CHS	AI730667	5' CCA TAT TGG ATC AGG TTG AG 3'	5' GGC GTT AGA CAC CAT ATC AT 3'
P7	An1	AF260919	5' GAG CAA CAA CCA CCT CTG CC 3'	5' TTT TCT CTA CGC CGT CGT TC 3'
P8	DFR	AI726438	5' GGT TTT GCC TTC ATG TGT AG 3'	5' AAT CTG CAT CGG GTC GAT AT 3'
P9	F3'H	AF271651	5' CAC CGA TGG AGA CTG TTG AG 3'	5' GGA TGA AGC CTG AAA TTC TC 3'
P10	ANS	AI728893	5' AGA AAT GGT GAC CTC AGT GC 3'	5' AAC TTC AGT GTA CTC GCT GG 3'
P11	DEL	AF336279	5' CAA CAT TGA CCA AGG ATT GC 3'	5' TTA TTT TTT CCC GAC GCC TC 3'
P12	ANS	AI728893	5' AGA AAT GGT GAC CTC AGT GC 3'	5' AAC TTC AGT GTA CTC GCT GG 3'
P13	CYTb5	AI727921	5' CCT GTC ATG TGC TTT GCT AG 3'	5' CCT GTC ATG TGC TTT GCT AG 3'
P14	MYC	AI728046	5' ACT CAG AAA AGA CGC TGC CT 3'	5' GGT AAT TTA CAG ACG CCC AC 3'
P15	POD	AW587502	5' CTC TTC TTC TTT GCT TTG CT 3'	5' TAC TCC TCC ACA ACA TCT GC 3'

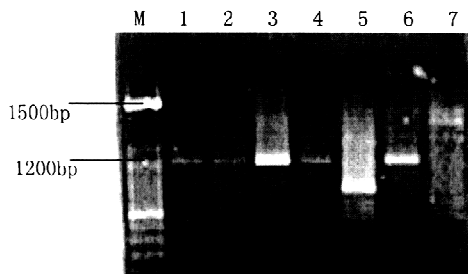


图 1 引物 P6 在不同材料中扩增结果

Fig. 1 PCR amplification by primer

2.2 通用引物与 EST 引物扩增结果分析

通用引物与 EST 引物组合扩增结果, 出现了多条带。在 3GT 基因下游引物与 I1 (扩 intron 通用上游引物), ANS 基因下游引物与 E1 (扩 exon 通用上游引物), ANS 基因上游引物与 I1 (扩 intron 通用上游引物) 等组合扩增片段长度出现

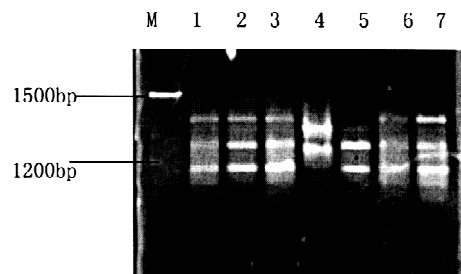


图 2 引物 P1-E1 组合在不同材料中扩增结果

Fig. 2 PCR amplification by primer P1-E1

差异, 差异频率高达 50% 以上, 本研究运用通用引物和 EST 引物组合, 扩增结果出现差异的频率较高。这种组合与 EST 引物一起与现有的 EST-SSR 引物都与基因功能的表达具有直接和间接的关系。从而强化了这些分子标记在遗传研究的应用。