

王春雷, 高季平, 赵宪坤. 利用酶联免疫反应鉴定梨树 S 基因型[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1124-1128.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.028

利用酶联免疫反应鉴定梨树 S 基因型

王春雷, 高季平, 赵宪坤

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 梨是蔷薇科植物, 具有典型的配子体自交不亲和性。获取各品种 S 基因型是果树生产中一项重要内容。现有 S 基因型鉴定方法存在一些缺陷。利用通用引物扩增 *S-RNase* 高变区, 结合单链核苷酸探针杂交、酶联免疫反应, 成功鉴定 8 个品种的 7 个 S 基因型。PCR 酶联免疫法结果显示爱宕(S_2S_5), 爱甘水(S_4S_5), 二十世纪(S_2S_4), 丰水(S_3S_5), 今村秋(S_1S_6), 新高(S_3S_9) 和幸水(S_4S_5) 7 个品种都能与各自对应的 S 基因型探针杂交结合, 颜色反应明显, 无明显假阳性反应。秋荣($S_{4sm}S_5$) *S_{4sm}-RNase* 基因在花柱中不表达, 只在秋荣花柱中检测到 $S_5-RNase$ 基因信号。与目前已有的方法相比, PCR 酶联免疫法操作简单, 结果可靠, 能够广泛用于梨树 S 基因型鉴定。

关键词: 梨; 自交不亲和性; S 基因型鉴定; 酶联免疫反应

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1124-05

S genotyping in pear by PCR-ELISA

WANG Chun-lei¹, GAO Ji-ping, ZHAO Xian-kun

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Pear, belonging to the family Rosaceae, possesses gametophytic self-incompatibility. Since SI inhibits self-fertilization, it is essential to obtain information on S genotypes of cultivars for successful planting. A method using a semi-automated sequencer is not convenient. S genotyping by dot-blot analysis requires considerable time and skill, and it is not suitable for identifying S genotypes of a small number of cultivars. A rapid and reliable new method for S genotyping is needed to be developed. To solve those problems, in this study, a PCR-ELISA using a set consensus primers to amplify the fragment covering hypervariable region of *S-RNase* genes, using allele-specific oligonucleotide probes to discriminate the PCR fragment, and using enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) to detect the signal allowed us to identify 7 S haplotypes of 8 cultivars. The signals in Atago(S_2S_5), Aikansui(S_4S_5), Nijisseiki(S_2S_4), Housui(S_3S_5), Imamuraaki(S_1S_6), Niitaka(S_3S_9), and Kousui(S_4S_5) were consistent with their respective S genotypes. In 'Akiba' ($S_{4sm}S_5$), the $S_{4sm}-RNase$ were not expressed in the style; only $S_5-RNase$ signals were detected. Compared with the common methods, the PCR-ELISA method is easily-operated and reliable, which is generally applicable to identify the S genotype of pear.

Key words: pear; self-incompatibility; S genotyping; ELISA

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目(201467)

作者简介: 王春雷, (1981-) 男, 江苏南京人, 博士, 教授, 研究方向: 果树生殖生理。(Tel) 18118252060; (E-mail) wangcl@yzu.edu.cn

梨是典型的自交不亲和性果树, 生产上通常需配置花期一致、S 基因型不同的品种作为授粉树。目前, 常见梨树品种的 S 基因型大多被鉴定。但在生产和育种工作中梨树品种 S 基因型鉴定仍然必不可少。比如, 育种获得的梨树新品种及新发现的地

方品种,这些品种的 S 基因型就需要鉴定。

蔷薇科李属果树 S 基因型可以通过 *SFB* 序列或者 *S-RNase* 序列确定。但与李属植物不同,梨属花粉 S 基因至今还没有确定。因此,梨属植物的 S 基因型只能根据 *S-RNase* 序列判断。梨属 S 基因具有 5 个保守区域,分别是 C1 区、C2 区、C3 区、C5 区以及蔷薇科植物特有的 RC4 区,此外还有一个高变区:RHV 区。根据 *S-RNase* 基因结构特点,开发出大量以 PCR 技术为基础的果树 S 基因型鉴定法,最常用的是 PCR 电泳法。但是此方法有一些弊端,例如该方法很难区分长度相似的 S 等位基因^[1-2],利用半自动测序仪虽然能精确确定 PCR 产物大小,但是这种半自动测序仪价格昂贵,不适合推广^[1-3],圆点杂交也是利用探针检测 PCR 产物,但是圆点杂交操作难度大,测试周期长^[4]。

PCR-酶联免疫分析技术开发于上世纪 80 年代,主要用于诊断植物病害和人类疾病^[5-7],也可以

用来检测单核苷酸多态性^[8]。在该方法中,PCR 产物的序列通过探针杂交来检测,并通过免疫反应来检测探针是否与 PCR 产物结合。本研究拟建立一种基于 PCR-酶联免疫反应鉴定梨树 S 基因型的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用 8 个日本砂梨品种采自扬州大学园艺场,品种名和其 S 基因型分别为爱宕(S_2S_5),爱甘水(S_4S_5),二十世纪(S_2S_4),丰水(S_3S_5),今村秋(S_1S_6),秋荣($S_{4sm}S_5$),新高(S_3S_9)和幸水(S_4S_5)。这些品种包含 7 个等位基因和 1 个等位基因的突变体。采集各品种花前 1~2 d 的花蕾收集花柱,每 20 朵花的花柱存于 1 个 1.5 ml 离心管中,贮于-70 °C 冰箱中备用。

表 1 探针和引物序列

Table 1 The sequences of probes and primers

S 基因	探针序列(5'→3')	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	登录号
S_1	TCAAACAGAAATGGACCTGAC	TTACGCAGCAATATCAGCC	TGGCACTGAATTTTGGTTT	AB002139
S_2	TTCAACCAAAGTAGGACGTGA			AB014073
S_3	CCTTCAAACATGGTAGGACC			AB025421
S_4	TTCAAACAGGAATGGACCTGA			AB009385
S_5	GCCCTCAAGCATGGCAGG			AB045711
S_6	TTCAAACGACCTAGGAGATGA			AB002142
S_9	CCTCAAATGTTAATGGAAGTGA			AB104909

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 制备 从-70 °C 冰箱中取出花柱,花柱总 RNA 提取使用 SV 96 total RNA isolation system 试剂盒(Promega, USA); cDNA 合成使用 iScript™ cDNA 合成试剂盒(BioRad, USA), 4 °C 冰箱保存备用。

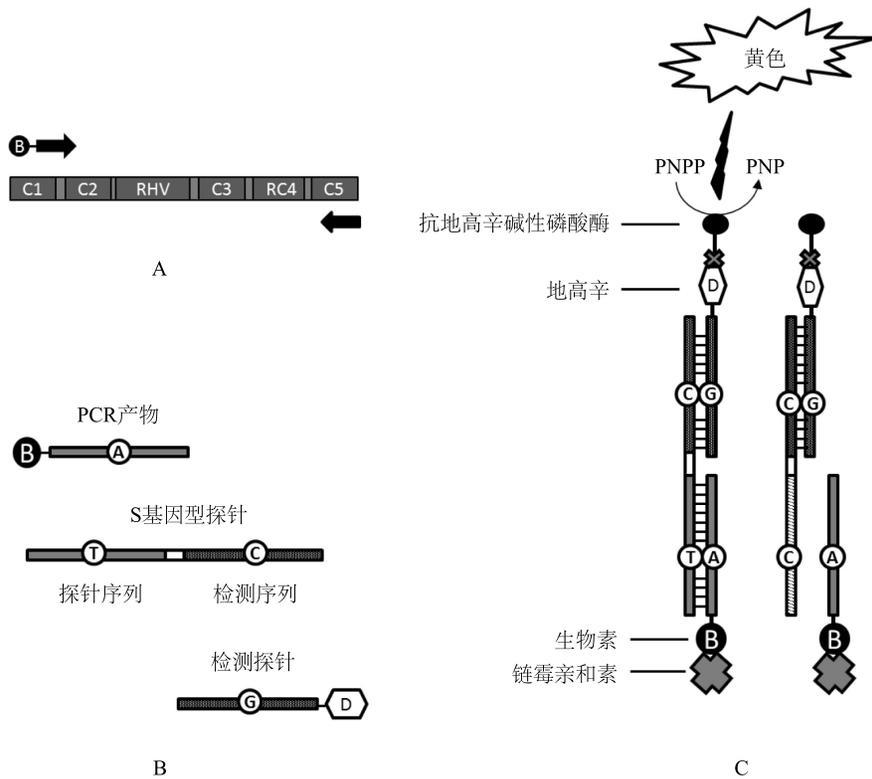
1.2.2 引物和探针制备 本试验所需引物和单链核苷酸探针序列如表 1 所示,该对引物正向引物经生物素(Biotin)标记,引物扩增获得的产物大小在 450 bp 左右,该产物包含 *S-RNase* 等位基因的高变区(RHV)。各 S 基因等位基因单链核苷酸探针主要是根据各 S 等位基因 RHV 区域序列设计获得,各探针 T_m 值均为 60 °C。用于检测 PCR 产物的探针,

除了包含 S 等位基因探针序列,还包括一个 6 bp 的 TATATT 间隔序列和一个 23 bp 的检测序列(5'-TACATTCGCAATTGAGGCTTCGT-3'),该检测序列与地高辛(Digoxin)标记的检测探针序列互补。杂交的原理如图 1 所示。

1.2.3 序列杂交 各品种 S 等位基因 DNA 片段通过 PCR 扩增获得。PCR 反应体系为:50 μ l 反应体系中加入 20 ng cDNA, 20 pmol 正反向引物,1 \times Ex Taq 缓冲液,400 μ mol/L dNTPs, 2.5 U Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa Biomedicals, Japan)。PCR 扩增 40 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min。反应结束后,每 5 μ l PCR 产物添加 100 μ l PBST 缓冲液和 50 μ g 链酶亲和素

包裹的磁力球 (Roche, Germany), 94 °C 孵育 30 min。随后, 加入 50 μ l 变性溶液 (0.5 mol/L NaOH, 10 mmol/L EDTA), 使磁力球结合的 PCR 产物变成单链, PBST 缓冲液冲洗 2 遍。再加入 200 μ l 杂交缓冲液 (5 \times SCC 缓冲液, 0.3% Tween-20, 50 pmol S 等位基因探针和地高辛标记的检测探针), 50 °C 杂交 2 h。PBST 缓冲液清洗 2 遍, 与含 1% 抗地高辛碱性

磷酸酶 (Anti-digoxigenin IgG Fab fragment conjugated with alkaline phosphatase, Roche, Germany) 的 PBST 缓冲液室温孵育 30 min。PBST 清洗 2 次后, 再与 PNPP (Thermo, USA) 在 37 °C 反应, 根据颜色变化判断杂交结果, 如果呈黄绿色, 表示该 S 等位基因探针与 PCR 产物互补, 即该品种包含 1 个该 S 基因型。



A: 生物素标记的正向引物和反向引物扩增 *S-RNase* 高变区, 获得长度在 450 bp 左右产物; B: PCR 产物与 S 基因型探针、检测探针杂交; C: 探针结合信号检测。

图 1 PCR-ELSIA 梨树 S 基因型鉴定法流程示意图

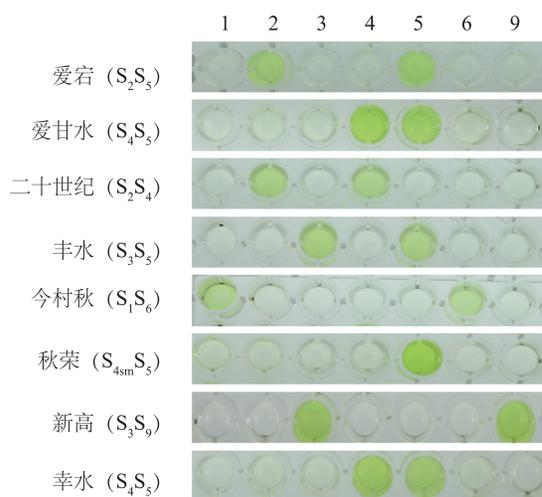
Fig. 1 Schemes of S genotyping in pear by PCR-ELSIA method

2 结果

在本试验中, 我们一共设计了 7 个单链核苷酸探针, 各探针分别与 *Pyrus pyrifolia S-RNase* 中的 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_6 和 S_7 等位基因特异互补。探针序号与其对应的等位基因序号相同。完成所有试验步骤后, 如果该溶液呈黄绿色, 表明 PCR 产物与该 S 等位基因特异结合, 即测试品种拥有此 S 等位基因。

试验中, 一共测试了 8 个品种, 除品种秋荣外,

每一个品种花柱 RNA 反转录获得的 cDNA 扩增获得的 PCR 产物都能与 2 个探针互补杂交结合 (图 2)。其中爱宕能与探针 2 和探针 5 结合, 爱甘水能与探针 4 和探针 5 结合, 二十世纪能与探针 2 和探针 4 结合, 丰水能与探针 3 和探针 5 结合, 今村秋能与探针 1 和探针 6 结合, 新高能与探针 3 和探针 9 结合, 幸水能与探针 4 和探针 5 结合。杂交结果符合各品种 S 基因型。因为 S_{4sm} 在秋荣花柱中不表达, 所以秋荣 PCR 产物只与探针 5 呈阳性反应。其他无探针结合杂交, 溶液则无明显颜色反应。



1,2,3,4,5,6,9 为探针名称。

图2 PCR-ELISA 梨 S 基因型鉴定探针杂交后 PNPP 颜色反应结果

Fig. 2 The coloring reaction with PNPP of S genotype by PCR-ELISA after probe hybridization

3 讨论

S 基因型鉴定是果树栽培中一项重要任务,它为果园授粉树的配置提供依据。S 基因型鉴定最早是通过观察授粉后坐果率或者花粉管生长情况获得,随后该方法被更加快速、可靠的 PCR 扩增法取代。目前,最常用的方法就是通过通用引物扩增,电泳鉴定 PCR 产物大小的方法判断 S 基因型。这种方法缺陷是不能区分大小相近的 S 等位基因^[9-11]。为了解决这个问题,有学者提出使用半自动测序仪精确测定 PCR 产物大小^[1-3,12],该方法可以精确分辨产物 1 bp 大小差别,但是该方法需要使用昂贵的仪器。本研究利用等位基因特异探针鉴定 PCR 产物,不需要昂贵仪器,与半自动测序仪法相比更易操作。此外,Kitashiba 等^[4]开发出一种圆点杂交法鉴定果树 S 基因型方法,但此方法过于灵敏,需要通过预备试验,获得每个探针最适杂交温度,否则会产生假阳性反应。

我们曾经利用相似原理鉴定李子和樱桃 S 基因型^[13]。李子和樱桃 S 基因型鉴定,既可以通过花粉自交不亲和性因子 *SFB* 基因序列鉴定,也可以通过花柱自交不亲和性因子 *S-RNase* 基因序列鉴定。本

研究,我们又运用该方法鉴定梨树 S 基因型。梨树 S 基因型只能根据 *S-RNase* 基因序列判断,这主要是因为梨花粉 S 基因至今未被鉴定。在李子、樱桃 S 基因型鉴定中,因为在高变区存在 500 bp 以上内含子,我们根据所有等位基因序列设计 1 个正向通用引物和多个等位基因特异反向引物,再利用多引物 PCR 扩增梨品种 *S-RNase* 高变区。在多引物 PCR 中,存在引物之间相互影响,我们根据 *S-RNase* 基因编码区设计了 1 对通用引物,利用花柱 RNA 反转录获得 cDNA 作为 PCR 模板,扩增 *S-RNase* 基因高变区,不存在多引物干扰问题,同时回避了多数梨 *S-RNase* 基因没有内含子序列的问题。除秋荣外,所有品种都与 2 个探针呈阳性反应,结果与各品种的 S 基因型一致,表明该方法非常可靠。品种秋荣所含 *S_{4sm}-RNase* 基因发生突变,在花柱中不表达,因此无法检测到其信号。

在该方法中,用于检测 S 基因型的探针都包含 3 段序列,第 1 段是与各 S 基因型对应的等位基因互补序列,第 2 段是与地高辛标记的检测探针互补的检测序列,第 3 段是分隔上述两部分的间隔序列。*S-RNase* 等位基因探针通过与地高辛标记检测探针杂交结合间接获得地高辛标记。通过这种设计,避免每个探针都用地高辛标记,只需合成 1 个地高辛标记的检测探针,从而大大降低试验成本,尤其在多个探针时,更能体现出该方法的经济性。

虽然在我们试验中,由于材料限制只选取了 8 个品种,7 个 S 基因型,但我们在设计引物和探针时,比较了数据库中所有梨 S 基因型,保证各探针的特异性。在对梨品种 S 基因型进行鉴定时,可将已经公布的 S 等位基因分成多个组,以组为单位分别检测,从而减少工作量。

参考文献:

- [1] SONNEVELD T, TOBUTT K R, ROBBINS T P. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107 (6):1059-1070.
- [2] VAUGHAN S P, RUSSELL K, SARGENT D J, et al. Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112 (5):856-866.
- [3] ORTEGA E, SUTHERLAND B G, DICENTA F, et al. Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction

- of reported *S* genotypes [J]. *Plant Breeding*, 2005, 124 (2): 188-196.
- [4] KITASHIBA H, ZHANG S, WU J, et al. *S* genotyping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis [J]. *Mol Breeding*, 2008, 21 (3):339-349.
- [5] INOUE S, HONDO R. Microplate hybridization of amplified viral DNA segment [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28 (6):1469-1472.
- [6] KELLER G H, HUANG D P, SHIH J W, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28 (6):1411-1416.
- [7] SYVANEN AC, BENGSTROM M, TENHUNEN J, et al. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16 (23):11327-11338.
- [8] TONOSAKI , KUDO J, KITASHIBA H, et al. Allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads for species identification, *S* genotyping, and SNP analysis in plants [J]. *Mol Breeding*, 2013, 31(2): 419-428.
- [9] ISHIMIZU T, SHINKAWA T, SAKIYAMA F, et al. Primary structural features of rosaceous *S*-RNases associated with gametophytic self-incompatibility [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37 (6): 931-941.
- [10] SAPIR G, STERN RA, EISIKOWITCH D, et al. Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis [J]. *J Hort Sci Biotech*, 2004, 79 (2):223-227.
- [11] TAMURA M, USHIJIMA K, SASSA H, et al. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(3):344-349.
- [12] GUERRA ME, RODRIGO J, LOPEZ-CORRALES M, et al. *S*-*RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum [J]. *Plant Breeding*, 2009, 128(3):304-311.
- [13] WANG C L, ZHANG Z P, TONOSAKI K, et al. *S* genotyping in Japanese plum and sweet cherry by allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(6):567-576.

(责任编辑:陈海霞)