

黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化

王振国^{1,2}, 张海英², 于广建¹, 张峰², 王永健², 许勇², 郭绍贵², 官国义²

(1. 东北农业大学园艺系, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 北京蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘要: 采用正交试验设计方法, 对影响黄瓜 SRAP 反应体系的 5 种因素(dNTP、模板 DNA、引物、Taq 聚合酶及变性剂) 4 个水平进行优化筛选, 确立了适合黄瓜 SRAP 分析的优化反应体系, 即在 10 μ L PCR 反应体系中含有 1 μ L 10 \times PCR buffer, 150 μ mol/L dNTP, 30 ng 模板 DNA, 0.3 μ mol/L 引物、1.5 U Taq 聚合酶, PCR 产物变性时用 10 μ L 变性剂。

关键词: 黄瓜; 正交设计; SRAP

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0112-04

The Orthogonal Optimization of SRAP Amplification System in Cucumber

WANG Zhen-guo^{1,2}, ZHANG Hai-ying², YU Guang-jian¹, ZHANG Feng²,

WANG Yong-jian², XU Yong², GUO Shao-gui², GONG Guo-yi²

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China;

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097, China)

Abstract: In this study, the optimum SRAP-PCR reaction system in cucumber was established with orthogonal design on four levels of five factors(dNTP, template DNA, primer, Taq DNA polymerase, Loading buffer). In a total volume of 10 μ L SRAP-PCR system, the optimum SRAP-PCR reaction system contains 1 μ L 10 \times PCR buffer, 150 μ mol/L dNTP, 30 ng template DNA, 0.3 μ mol/L primer, 1.5 U Taq DNA polymerase. The optimum volume of Loading buffer is 10 μ L.

Key words: Cucumber; Orthogonal design; SRAP

SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism) 分子标记技术由美国 Li 和 Quiros 博士于 2001 年提出^[1]。该技术引物组合包括 17 个碱基的正向引物和 18 个碱基的反向引物, 正向引物特异扩增富含 CCGG 的外显子相应区域, 反向引物特异扩增富含 AATT 的内含子、启动子及间隔区域。虽然外显子序列在不同物种间是保守的, 多态性水平较低; 但内含子、启动子及其间隔区在物种间甚至个体之间都有很大差异, 有很高的多态性, 所以由一条正向引物和一条反向引物组成的 SRAP 引物组合, 可以扩增出丰富的 SRAP 多态性标记^[2]。SRAP 标记的特点是简便、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀, 适合遗传图谱构建、遗传多样性分析、比较基因组学等研究。目前已经在马铃薯、水稻、苹果、柑桔类果树、樱桃、油菜、大蒜、莴苣、芹菜等多种植物研究中应用^[3,4]。在葫芦科作物研究方面, Ferriol 等^[5]利用 SRAP 技术对葫芦科的遗传多样性进行分析, 结果显

示 SRAP 的多态性优于 AFLP。潘俊松等^[6]将 SRAP 应用于黄瓜遗传连锁图谱的构建及始花节位基因的定位。王刚等^[7]将 SRAP 应用于黄瓜遗传连锁图谱的构建和侧枝基因的定位。

由于 SRAP 分子标记技术基于 PCR 反应, 而 PCR 反应又受多种反应因素的影响, 不同物种对反应条件的要求也存在一定的差异, 因此, 采用 SRAP 分子标记技术时应首先对其反应体系进行优化。国内有关反应体系的优化研究, 大多采用单因素试验的方法, 在多种组分中, 逐一变化其中一种组分浓度而固定其余几种, 从中分析得到每一组分的最佳浓度, 最后组合成为最佳反应体系。黄瓜 SSR 反应体系的建立^[8]和黄瓜 AFLP 反应体系的建立^[9]就是采用这种方法。单因素试验法的缺点在于, 当变化一个因素固定其余几种因素时, 往往靠经验或参考相近物种确定, 这样既不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用, 也不能保证各组分最佳浓度的组合就是

收稿日期: 2006-09-20

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5050001); 国家自然科学基金项目(30570997)

作者简介: 王振国(1983-), 男, 山东聊城人, 在读硕士, 从事蔬菜分子育种研究。

通讯作者: 张海英(1969-), 女, 北京人, 博士, 副研究员, 主要从事瓜类作物分子育种研究。

最佳反应体系^[10]。

正交设计是根据统计学原理研究各因素不同水平交互作用的一种试验方法^[11]。用正交设计法安排的试验,有均衡分散和整齐可比的特点,可以通过部分试验了解全面试验的情况,较快地找到最佳组合^[12]。王佳等^[13]利用正交设计优化了黄瓜 ISSR 反应体系。张彦萍等^[14]采用正交设计方法得到了适合西瓜的 RAPD 反应体系。目前有关用正交设计法优化黄瓜 SRAP 反应体系的研究还未见报道。

本研究拟采用正交设计的方法,从 dNTP、引物、模板 DNA、Taq 聚合酶和变性剂等 5 种因素 4 个水平,对黄瓜 SRAP 反应体系进行优化,旨在建立适合于黄瓜的 SRAP 反应体系,为进一步进行相关黄瓜分子育种研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

材料为黄瓜幼苗,由北京蔬菜研究中心黄瓜育种课题提供。

1.2 基因组 DNA 提取

参照 CTAB 方法^[15]提取黄瓜基因组 DNA。DNA 浓度用分光光度计检测,最后将纯化后的 DNA 稀释到 30 ng/μL 备用。

1.3 PCR 反应

PCR 反应在 BIO-RAD 公司的 PTG-100 PCR 仪中进行,扩增程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 反应总体积是 10 μL。PCR 产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, Na₂CO₃ 银染法染色显影^[16], 在荧光灯上观察分析条带。

1.4 PCR 反应体系优化的正交设计

根据统计学原理^[17], 采用 L₁₆(4⁵) 正交表^[11]设计试验, 对 dNTP、模板 DNA、引物、Taq 聚合酶和变性剂等 5 种影响因素设置 4 个水平 16 个组合, 方案如表 1 和表 2。上游引物序列为 5'-TGAGTCCAAAGCGGTGG-3'; 下游引物序列为 5'-GACTGCGTACGAAT-TAAA-3'。

表 1 SRAP 体系的因素-水平

Tab 1 SRAP-PCR factors-levels

水平 Levels	因素 Factors				
	dNTP/(μmol/L)	模板 DNA/ng Template DNA	引物/(μmol/L) Primer	变性剂/μL Loading buffer	Taq 聚合酶/U Taq polymerase
1	50	10	0.3	2	0.5
2	150	30	0.6	5	1.0
3	250	50	0.9	7	1.5
4	350	100	1.2	10	2.0

表 2 SRAP 正交实验设计表 L₁₆(4⁵)

Tab. 2 SRAP orthogonal design L₁₆(4⁵)

编号 No.	因素 Factors				
	dNTP/(μmol/L)	模板 DNA/ng Template DNA	引物/(μmol/L) Primer	变性剂/μL Loading buffer	聚合酶/U Taq polymerase
1	50	10	0.3	2	0.5
2	50	30	0.6	5	1.0
3	50	50	0.9	7	1.5
4	50	100	1.2	10	2.0
5	150	10	0.6	7	2.0
6	150	30	0.3	10	1.5
7	150	50	1.2	2	1.0
8	150	100	0.9	5	0.5
9	250	10	0.9	10	1.0
10	250	30	1.2	7	0.5
11	250	50	0.3	5	2.0
12	250	100	0.6	2	1.5
13	350	10	1.2	5	1.5
14	350	30	0.9	2	2.0
15	350	50	0.6	10	0.5
16	350	100	0.3	7	1.0

1.5 优化体系的稳定性检测

选择另外 5 对 SRAP 引物作为检测引物, 用优化的黄瓜 SRAP 反应体系, 对黄瓜基因组 DNA 进行

PCR 扩增, 每对引物重复 3 次。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后观察结果。检测引物的序列如表 3。

表 3 检测引物的序列
Tab.3 Sequence of testing primers

引物编号 No.	引物序列 Primer sequence	
	上游引物 5'-3' Forward primer 5'-3'	下游引物 5'-3' Reverse primer 5'-3'
1	5'-TGAGTCCAAACCGAAT-3'	5'-GACTGCGTACGAATTACT-3'
2	5'-TGAGTCCAAACCGAAG-3'	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
3	5'-TGAGTCCAAACCGAAG-3'	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
4	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	5'-GACTGCGTACGAATTTCT-3'
5	5'-TGAGTCCAAACCGGATG-3'	5'-GACTGCGTACGAATTCG-3'

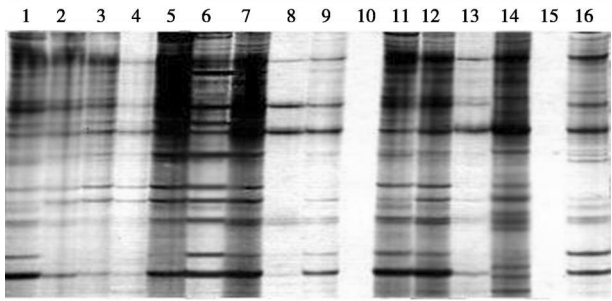
2 结果与分析

2.1 SRAP 反应体系的正交优化

从图 1 正交设计 SRAP 反应体系的扩增结果直观可以看出,不同的 dNTP 浓度和 Taq 聚合酶用量是 SRAP PCR 反应的主要影响因素。组合 1~ 4 中 dNTP 浓度较低(50 μmol/L),其扩增条带较弱,扩增效果较差。组合 5~ 12 随着 dNTP 浓度的增高,条带相对增强,条带较为清晰且亮度较大,特别是组合 6 的清晰度和亮度最好。组合 13~ 16 由于 dNTP 浓度过高(350 μmol/L),扩增条带的效果也较差,组合 15 几乎扩增不出条带,其原因可能是体系中引物浓度过高所致。由此可知,dNTP 浓度为 SRAP 反应的主要影响因素之一。组合 5~ 8 和组合 9~ 12 的 dNTP 浓度分别为 150 和 250 μmol/L,从经济的角度来看,dNTP 浓度为 150 μmol/L 较为合适。在组合 5~ 8 中,其 dNTP 浓度均是较合适浓度(150 μmol/L),但 Taq 聚合酶用量、引物、模板 DNA 和变性剂用量各不相同。其中组合 8 尽管引物、模板 DNA 和变性剂用量均较高,但其 Taq 聚合酶用量是最低水平(0.5 U),因此泳道中几乎没有扩增产物。相反,组合 5 中 Taq 聚合酶用量是最高水平(2.0 U),尽管引物、模板 DNA 和变性剂用量中等甚至较低,但其条带数目多,背景深,条带无法清晰区分,这可能是由于 Taq 聚合酶用量偏高所致。由此可见,Taq 聚合酶用量也是 SRAP 反应的主要影响因素之一。

从图 1 还可以看出,在 16 个组合中,由于 dNTP、Taq 聚合酶、引物、模板 DNA 和变性剂等五大影响因素浓度组合的不同,扩增结果存在着明显的差异。由于理想组合应具备条带清晰、多态性高和重复性好的特点,经试验发现,组合 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 15, 16 扩增的条带数目很少甚至没有条带,条带的强度也较弱,扩增的效果较差。组合 5, 6, 7, 11, 12, 14 扩增的条带多且强度强,但组合 5, 7, 11, 12, 14 的泳道背景较深,杂带稍多,重复性较差。综合各因素考虑,6 号组合为最佳组合,其条带多、清晰、亮度高、重复性较好,即在 10 μL 反应体系中含有 1 μL 10× PCR buffer, 150 μmol/L dNTP, 30 ng 模板

DNA, 0.3 μmol/L 引物, 1.5 U Taq 聚合酶, PCR 产物变性用 10 μL 变性剂。

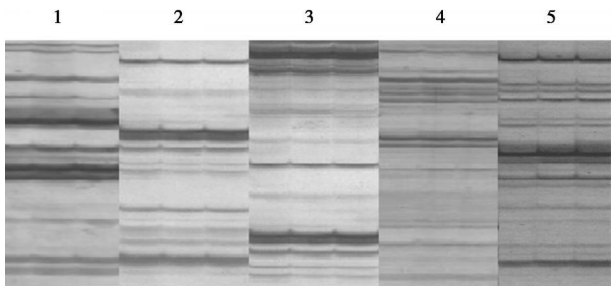


1~ 16. 表 2 的组合编号
1~ 16 Treatments showed in table2

图 1 正交设计 SRAP 反应体系的扩增结果
Fig.1 The amplification result of SRAP reaction system from orthogonal design

2.2 黄瓜优化 SRAP 反应体系稳定性的检测结果

从图 2 可以看出,同一引物 3 次重复的扩增结果相比较,其条带数目、强度和背景深浅都非常一致,证明优化的黄瓜 SRAP 反应体系是比较稳定可靠的。



1~ 5. 表 3 检测引物编号
1~ 5. Primers showed in table 3

图 2 黄瓜 SRAP 优化体系的检测结果
Fig.2 The testing result of optimized SRAP system

3 讨论

SRAP 技术,因操作简单、分析速度快被广泛应用^[18]。然而,SRAP 技术是基于 PCR 反应的技术,这一反应体系受诸多因素的影响,包括 dNTP、Taq 聚合酶、模板 DNA、Mg²⁺ 浓度、变性剂等各反应成分都会影响 PCR 结果。dNTP 是 PCR 反应的原料,浓度过低将降低 PCR 产物的产量;浓度过高将与 Taq 聚合酶竞争 Mg²⁺,使体系中的游离 Mg²⁺ 减少,造成 Taq

聚合酶活性降低, 最终导致 PCR 产量降低^[13]。本试验认为 dNTP 浓度是 PCR 反应的重要影响因素, 与谈探^[19]的结论一致。然而张建军等^[20]认为 dNTP 浓度对萝卜 RAPD-PCR 反应影响不大。从试验细节分析, 张建军设计 dNTP 浓度梯度是 80, 100, 160, 200 $\mu\text{mol/L}$, 跨度范围较小。而本试验设计了 50, 150, 250, 350 $\mu\text{mol/L}$ 等 4 个浓度梯度, 跨度范围较大, 所以不同 dNTP 浓度下的 PCR 反应, 结果差异较大。Taq 聚合酶是 PCR 反应中不可缺少的, 浓度过高会引起非特异性扩增, 浓度过低则反应产物量减少^[21]。从经济角度出发, 在保证扩增结果满足要求的前提下, Taq 聚合酶用量越少越好。本研究表明, 10 μL 反应体系, 1.5 U 聚合酶为合理用量。模板 DNA 是 PCR 反应的基础, 在反应中模板 DNA 量过高会产生核酸碎片, 使电泳出的谱带背景变黑, 影响观察; 模板 DNA 量过低则不能提供足够的扩增模板, 使 PCR 产量降低^[22]。本研究表明, 黄瓜 SRAP-PCR 反应体系, 具有较宽的 DNA 模板范围, 10 μL 反应体系中, DNA 模板一般用量为 10~100 ng。变性剂具有增加样品稳定性、促进模板 DNA 快速下渗的作用。变性剂用量过少, 点样时 PCR 产物浓度过高, 造成点样速度过慢, 引起串样、渗样等问题。变性剂用量过多, PCR 产物浓度稀释过低, 电泳条带将过浅, 不利观察分析。本体系以 10 μL 变性剂为合理用量。

与以往的单因素 PCR 优化设计相比, 利用正交实验直观分析方法, 能迅速获得满意的试验结果, 而且试验规模小, 节省人力物。但该方法亦有一定的局限性, 如对试验结果本身优劣的判断带有主观上的成分^[23], 一般是根据电泳条带的清晰度及数目是否合适判断试验结果的好坏。另外, PCR 反应不是一个孤立的部分, 它和基因组 DNA 提取、聚丙烯酰胺凝胶的制备、银染等步骤构成了一个有机的整体, 它们每一步的变化都会导致试验结果的差异。因此, 在试验过程中, 严格遵守操作规范的同时, 应灵活处理所遇到的问题, 适时调整试验条件, 使这几部分互相协调, 确保整个试验顺利进行。

参考文献:

- [1] Quiros C F, Li G. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [2] 李 严, 张春庆. 新型分子标记—SRAP 技术体系优化及应

用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.

- [3] 柳李旺, 龚义勤, 黄 浩, 等. 新型分子标记—SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.
- [4] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图谱的构建[J]. 科学通报, 2003, 48(15): 90-93.
- [5] Ferriol M, Pió B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271-282.
- [6] 潘俊松, 王 刚, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图谱的构建及始花节位的基因定位[J]. 自然科学进展, 2005, 15(2): 167-172.
- [7] 王 刚, 潘俊松, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图谱的构建及侧枝基因定位[J]. 中国科学 C 辑, 2004, 34(6): 510-516.
- [8] 葛风伟, 张海英, 陈青军, 等. 黄瓜 SSR 反应体系的建立[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 5-9.
- [9] 张桂华, 杜胜利, 鞠秀芝, 等. 黄瓜 AFLP 反应体系的建立[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 10-12.
- [10] 杨云水, 李续娥, 吴明宇, 等. 正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用[J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 202-206.
- [11] 西南农业大学编. 蔬菜研究法[M]. 第 2 版. 郑州: 河南科技出版社, 1986: 414.
- [12] 王家保, 刘志媛, 徐碧玉, 等. 用正交设计优化荔枝 RAPD 反应体系[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 363-368.
- [13] 王 佳, 梁国华, 缪 珉, 等. 正交设计优化黄瓜 ISSR 体系[J]. 分子植物育种, 2005, 4(3): 439-442.
- [14] 张彦萍, 刘海河. 西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 51-53.
- [15] 王宏建, 吴 越, 谷 维, 等. 改进的 CTAB 法提取黄瓜 DNA[J]. 黑龙江农业科学, 2006, 2(5): 124-125.
- [16] 傅占江, 刘宝文, 刘体全, 等. DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳三种银染方法比较[J]. 临床军医杂志, 2002, 30(4): 71-73.
- [17] 盖钧镒. 实验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 157-159.
- [18] 任 羽, 王得元, 张银东, 等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 689-693.
- [19] 谈 探, 金则新, 李钧敏. 青钱柳 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 安徽农业科学, 2006, 32(24): 6450-6451.
- [20] 张建军, 司龙亭, 姜 晶. 优化萝卜基因组 DNA RAPD-PCR 反应体系的正交设计法[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 293-295.
- [21] 余 艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19.
- [22] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995: 71-73.
- [23] 沙 伟, 滕兆岩, 倪红伟. 正交设计优化星星草 ISSR-PCR 反应体系研究[J]. 中国草地学报, 2006, 28(6): 52-55.