

# 日本沼虾 SRAP 反应体系正交设计及优化

姚建华<sup>1</sup>, 傅洪拓<sup>1,2</sup>, 龚永生<sup>2</sup>, 吴 滢<sup>2</sup>, 何新龙<sup>2</sup>, 李慧萍<sup>1</sup>, 乔 慧<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心,  
农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 对影响 SRAP 反应的 4 个因素(*Taq* 酶、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、引物) 4 个水平进行正交组合, 以建立日本沼虾的 SRAP 分子标记技术。试验分两步进行: 第一步筛选出可有效扩增的引物组合; 第二步对筛选出的体系进行优化。结果表明, 日本沼虾 SRAP 反应体系适宜引物组合为 Me4Em2, 最适条件为在 25  $\mu$ L 的反应体系中,  $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* 酶、引物浓度分别为 2.5 mmol/L、0.25 mmol/L、0.64 U/20  $\mu$ L、0.6  $\mu$ mol/L。本研究结果为 SRAP 分子标记技术在日本沼虾中的应用奠定了基础。

**关键词:** 日本沼虾; 分子标记; SRAP; 正交设计

中图分类号: S945.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0122-04

## Orthogonal Design and Optimization of SRAP Amplification System for *Macrobrachium nipponense*

YAO Jian hua<sup>1</sup>, FU Hong tuo<sup>1,2</sup>, GONG Yong sheng<sup>2</sup>, WU Yan<sup>2</sup>,  
HE Xir long<sup>2</sup>, LI Hui ping<sup>1</sup>, QIAO Hui<sup>1</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Open  
Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture,  
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Four factors (*Taq* DNA polymerase, dNTP,  $Mg^{2+}$ , primer) with four levels were studied by orthogonal design in order to establish SRAP technique of *Macrobrachium nipponense*. Firstly, effective amplification systems were screened out, which were optimized at the second step. Optimal amplification system for *Macrobrachium nipponense* was established with 2.5 mmol/L *Taq* DNA polymerase, 0.25 mmol/L dNTP, 0.64 U/20  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  and 0.6  $\mu$ mol/L primer. The result laid on foundation for the application of SRAP marker in *Macrobrachium nipponense*.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; Molecular marker; SRAP; Orthogonal design

Li G<sup>[1]</sup> 在研究芸苔属油菜时发明了一种新的分子标记技术, 即相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)。原理是利用独特的正反引物设计, 对开放阅读框进行扩增。因不同个体的内含子、启动子与外显子间隔区长度不等而产生多态性。该分子标记技术具有成本低、重复性好、适用性强等特点。采用利于引物与 DNA 靶位点结合的复性变温法; 对 DNA 模板纯度与浓度要求不高; 扩增区域受选择压力较小, 更适于遗传多样性分析。当前对 SRAP 反应体系的研究和应用主要见于

植物<sup>[2-8]</sup>, 在动物中仅应用于罗氏沼虾遗传结构分析<sup>[9]</sup>, 但并未对反应体系进行系统的优化。从以前的研究来看, SRAP 反应体系优化大部分采用逐一变化其中一种因子而固定其他因子的方法进行。尽管该方法有效且简单, 但并未考虑到因子间的交互作用。本研究拟利用正交试验设计法对 SRAP 反应体系进行优化, 一方面可以克服常规试验量大的问题, 另一方面可以将因子间的互作考虑进去, 以建立日本沼虾的 SRAP 反应体系。

收稿日期: 2008-09-09

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A13; 2006BAD03B07); 农业部农业科技跨越计划(2007); 江苏省高技术研究项目(BG2007328)

作者简介: 姚建华(1984-), 男, 江西贵溪人, 在读硕士, 主要从事水生动物遗传育种研究。

通讯作者: 傅洪拓(1964-), 男, 湖南长沙人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事水生动物遗传育种研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料 分别采自山东微山湖、太湖、长江江阴段、长江九江段、鄱阳湖。

1.1.2 试剂 引物序列参照 Li G<sup>[1]</sup>(表 1), 由捷瑞生物公司合成; *Taq* 酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTP 等试剂均购自上海生工。

1.1.3 主要仪器 Eppgradient S 型 PCR 扩增仪; Che-

mrSmart 3000 型凝胶成像系统; Micro 22R Centrifuge 型冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 提取参照 Strauss<sup>[10]</sup> 进行。

1.2.2 引物筛选 按 Li G<sup>[1]</sup>报道的扩增程序, 参照罗氏沼虾 SRAP 反应体系<sup>[9]</sup>, 用微山湖等 5 个群体的模板对 5 对正向引物和 6 对反向引物共 30 对引物组合进行筛选。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers

正向引物 Forward primer	序列 Sequence	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence
Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGG-3'	Em2	5'-GACTGCGTACGAATTGGE-3'
Me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAG-3'
Me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACG-3'	Em4	5'-GACTGCGTACGAATTGGA-3'
Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAAG-3'
		Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

1.2.3 DNA 扩增 ①扩增程序为 94℃预变性 5 min; 94℃预变性 1 min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 5 个循环; 94℃预变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存; ②对 Mg<sup>2+</sup> (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L), dNTP

(0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mmol/L), *Taq* 酶(0.64, 0.80, 0.96, 1.44 U/20μL), 引物(0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μmol/L) 4 个因子 4 个水平进行正交设计, 共 16 个组合(表 2)。扩增时, 每个组合设 3 个重复。

表 2 SRAP 正交实验设计表 L16(4<sup>4</sup>)

Tab. 2 SRAP orthogonal design L16(4<sup>4</sup>)

组合 Combination	因素 Factors			
	Mg <sup>2+</sup> /(mmol/L)	dNTP /(mmol/L)	<i>Taq</i> 酶/(U/20μL) <i>Taq</i> polymerase	引物/(μmol/L) Primer
1	1.0	0.10	0.64	0.2
2	1.0	0.15	0.80	0.4
3	1.0	0.20	0.96	0.6
4	1.0	0.25	1.44	0.8
5	1.5	0.10	0.80	0.6
6	1.5	0.15	0.64	0.8
7	1.5	0.20	1.44	0.2
8	1.5	0.25	0.96	0.4
9	2.0	0.10	0.96	0.8
10	2.0	0.15	1.44	0.6
11	2.0	0.20	0.64	0.4
12	2.0	0.25	0.80	0.2
13	2.5	0.1	1.44	0.4
14	2.5	0.15	0.96	0.2
15	2.5	0.20	0.80	0.8
16	2.5	0.25	0.64	0.6

1.2.4 电泳检测 ①用 1.0% 琼脂糖检测扩增产物。②用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 采用 EB 染色和银染两种染色方法。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

按照扩增条带数多、清晰、多态性较好且扩增稳

定的要求, 筛选出了 Me4Em2 引物组合。

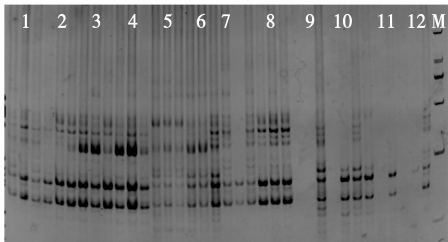
2.2 因子间交互作用

由图 1, 2 可以看出, Mg<sup>2+</sup> 浓度对其他 3 种因子交互作用效果影响较为明显, 当其浓度分别在 1.0, 1.5 mmol/L 时, 能扩增出条带, 但稳定性不好; 浓度为 2.0 mmol/L 时, 基本上扩增不出来条带; 在 2.5 mmol/L 时, 扩增出的条带数很多, 且很稳定。 *Taq*

酶和引物之间也有一定的交互作用, *Taq* 酶浓度增加, 引物浓度下降, 扩增效果较差, 反之, 扩增效果较好。当 *Taq* 酶浓度下降时, dNTP 与引物同样存在交互作用。另外, dNTP 与 *Taq* 酶之间存在协同交互作用, 如浓度同时增加, 扩增效果较好。

### 2.3 各因子适合浓度与最佳浓度

从图 1, 2 中还可以得知, 在 4 因素 4 水平共 16 个组合中, 由于 dNTP、*Taq* 酶、引物、 $Mg^{2+}$  等因素浓度组合的不同, 扩增结果存在着明显差异。理想组合应具备条带数多且清晰、重复性好的特点。经过试验, 得到了日本沼虾 SRAP 反应体系中 4 个因子的适合浓度与最佳浓度, 如表 3 所示。



M. Marker. 下同  
图 1 1~ 12 组合扩增图。

Fig. 1 The result for factors of PCR from combination 1 to 12

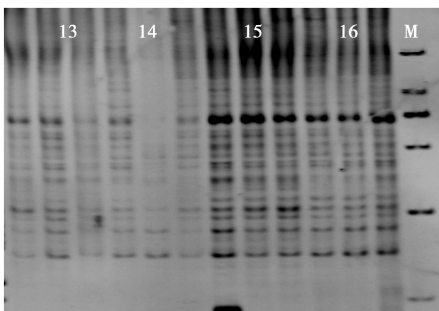


图 2 13~ 16 组合扩增图

Fig. 2 The result for factors of PCR from combination 13 to 16

表 3 各因子适合浓度与最佳浓度

Tab. 3 The fit and best concentration for each factor

因子 Factors	适合浓度 Fit concentration	最佳浓度 The best concentration
$Mg^{2+}$ / ( mmol/ L)	1, 1. 5, 2. 5	2. 5
dNTP/ ( mmol/ L)	0. 1~ 0. 25	0. 25
<i>Taq</i> 酶/ ( U/ 20 $\mu$ L) <i>Taq</i> polymerase	0. 64~ 1. 44	0. 64
引物/( $\mu$ mol/ L) Primer	0. 2~ 0. 8	0. 6

### 3 最优反应体系的检测

以上述所确定第 16 号组合, 用 Me4Em2 引物组合扩增 5 个不同地理种群的日本沼虾基因组。由扩增图可以看出, 扩增条带数多, 多态性和稳定性较好 (图 3)。

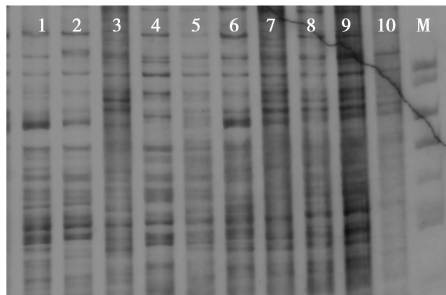


图 3 5 个不同地理种群日本沼虾 SRAP 扩增图

Fig. 3 The SRAP amplified profile for 5 different geographic populations of *Macrobrachium nipponense*

### 4 讨论

同其他 PCR 反应一样, SRAP 反应成分中包括  $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* 酶、引物和模板。其中 dNTP 是反应的原料;  $Mg^{2+}$  对酶的激活起作用, 而酶又对合成有着重要的催化作用; 引物会影响合成的效果, 如特异性和非特异性。因 SRAP 对模板浓度与纯度没有要求, 所以没有将模板浓度作为因素予以考虑, 而是选择  $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* 酶、引物 4 个因子。研究结果表明, 对反应体系影响程度是  $Mg^{2+}$  > dNTP> *Taq* 酶  $\approx$  引物。

$Mg^{2+}$  是该反应体系中最重要因子, 该结论与 Joe Sambrook<sup>[11]</sup> 观点一致, 这主要是因为  $Mg^{2+}$  对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响, 浓度过高, 反应特异性降低, 出现非特异性扩增, 浓度过低会降低 *Taq* 酶的活性, 使反应产物减少。但在以往的许多反应体系研究中, 大部分都是随着浓度升高, 反应效果较好。可笔者采用正交法, 并没有发现这种规律, 这可能是其他因素交互作用所致。dNTP 也是较为重要的因素之一, 同王振国等<sup>[6]</sup> 的研究结论一致, 浓度过低, 会降低产物扩增量, 过高会引起碱基的错配, 本研究的浓度为 0. 25 mmol/ L。 *Taq* 酶浓度过高会引起非特异性扩增, 产生大量的弥散带, 从而使背景加深, 浓度过低则合成的产物量减少, 本研究确定的最适 *Taq* 酶浓度为 0. 64 U/ 20 $\mu$ L。引物是 PCR 特异性反应的关键, 浓度偏高会引起错配和非特异性扩增, 且可增加引物间形成二聚体的机会。本试验中采用的正反配对引物, 所以引物量更不能过大, 最终确定的引物浓度为 0. 6  $\mu$ mol/ L。

研究表明,  $Mg^{2+}$  浓度的变化对其他因子互作效果较为显著, 这与二价阳离子的存在的重要性有关, 比如激活 *Taq* 酶。一般认为, dNTP 与 *Taq* 酶之间会相互竞争  $Mg^{2+}$ , 但研究结果显示两者之间存在一定的协同作用, 可能是较高的镁离子浓度所致。dNTP 与引物的可能表现在引物浓度增加时, 扩增时所需

的 dNTP 量也增加, 而 dNTP 量增加, 也可以促进引物的利用效率, 减少形成引物二聚体的机会。同样, 引物浓度增加, 在扩增时也要求相应浓度的 *Taq* 酶, 以便高效聚合及延伸。在正交设计中, 还存在 3 因子相互作用, 2 个因子先互作, 再与第 3 个乃至第 4 个因子互作等情形。从试验结果来看, 上述互作

情形非常微弱, 基本上对 SRAP 反应体系没有影响。  
日本沼虾 SRAP 反应体系与罗氏沼虾 SRAP 反应体系有较大差别(表 4)。与罗氏沼虾相比, 日本沼虾  $Mg^{2+}$  浓度、引物浓度较高; *Taq* 酶浓度较低; dNTP 浓度完全一样。

表 4 日本沼虾与罗氏沼虾 SRAP 反应体系比较

Tab. 4 The comparison of SRAP reaction system between <i>Macrobrachium nipponense</i> and <i>Macrobrachium rosenbergii</i>				
沼虾 <i>Macrobrachium</i>	$Mg^{2+}$ /( mmol/L)	dNTP /( mmol/L)	<i>Taq</i> 酶/( U/ 20 $\mu$ L) <i>Taq</i> polymerase	引物/( $\mu$ mol/L) Primer
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	2. 5	0. 25	0. 64	0. 6
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	1. 5	0. 25	0. 8	0. 4

本试验建立并优化了日本沼虾 SRAP 反应体系, 一方面填补了日本沼虾 SRAP 方面研究的空白, 另一方面建立了日本沼虾 SRAP 分子标记技术。这将为 SRAP 分子标记技术在日本沼虾乃至水产动物遗传育种研究中应用奠定了基础。

参考文献:

[ 1 ] Li G, Quiros C F. 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 ] 郭大龙, 罗正龙. 部分柿属植物 SRAP PCR 反应体系的优化[ J ]. 果树学报, 2006, 23( 1 ): 138– 141.

[ 3 ] 李严等, 张庆春. 新型分子标记技术 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.

[ 4 ] 应正河, 吴小平, 谢宝贵, 等. 香菇 SRAP 反应体系的优化[ J ]. 食用菌学报, 2006, 13( 4 ): 1– 5.

[ 5 ] 武志朴, 杨文香, 刘大群, 等. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步的研究[ J ]. 河北农业大学学报, 2005, 28( 3 ), 60– 62.

[ 6 ] 王振国, 张海英, 于广建, 等. 黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化[ J ]. 华北农学报, 2007, 22( 4 ): 112– 115.

[ 7 ] 邱文武, 孙伟生, 窦美安, 等. 菠萝 SRAP 反应体系的建立及优化[ J ]. 生物技术, 2008, 18( 1 ): 39– 42.

[ 8 ] 王华忠, 吴则东, 韩英, 等. 甜菜 SRAP PCR 反应体系的优化[ J ]. 中国糖料, 2007, 2: 1– 4.

[ 9 ] 周劲松, 曹哲明, 杨国梁, 等. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析[ J ]. 中国水产科学, 2006, 13( 4 ): 667– 673.

[ 10 ] Strauss W M. Preparation of genomic DNA from mammalian issues[ M ]//Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley and softs, 1989: 221– 222.

[ 11 ] Joe Sambrook, David Russell. 分子克隆实验指南[ M ]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 597– 601.