

桃 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

史红丽, 韩明玉, 赵彩平

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 建立适宜桃基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增体系, 为桃基因图谱的构建和分子标记打下基础。以桃基因组 DNA 为模板, 通过正交试验设计, 从 dNTPs、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、引物、模板 5 种因素 4 个水平对桃 SRAP-PCR 反应体系进行优化, 所建立的体系为 25 μ L: dNTPs 为 0.12 mmol/L, Mg^{2+} 为 4 mmol/L, *Taq* 酶 2 U, 引物为 0.3 mmol/L, 模板 DNA 50 ng。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 35℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 5 个循环; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

关键词: 桃; SRAP; 优化; 正交试验

中图分类号: S662.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0201-04

Optimization of SRAP Reaction System in Peach(*Prunus persica*)

SHI Hong-li, HAN Ming-yu, ZHAO Cai-ping

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: The aim of the research was to establish SRAP-PCR amplification system which was suitable for Peach (*Prunus persica*) genome DNA so as to lay foundation for the construction of gene map and molecular marker in Peach (*Prunus persica*). Peach (*Prunus persica*) genome DNA as template, the major components of SRAP, such as concentrations of dNTPs, Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, primers and template, were optimized in this study by orthogonal design in five factors four levels respectively. The results showed that the optimum SRAP reaction system includes dNTPs 0.12 mmol/L, Mg^{2+} 4 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 2 U, primer 0.3 mmol/L and DNA template 50 ng in the 25 μ L system. The most suitable protocol was initially denaturing at 94℃ for 5 min, then pre-amplifying at 94℃ 1 min, 35℃ 1 min and 72℃ 1 min for five cycles, finally amplifying for 35 cycles when the annealing temperature was adjusted to 50℃.

Key words: Peach (*Prunus persica*); SRAP; Optimization; Orthogonal design

SRAP^[1] (Sequence-related amplified Polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是一种新型的基于 PCR 技术的标记, 此技术由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 于 2001 年提出。目前已应用于植物遗传多样性研究^[2]、作物种质鉴定^[3] 和遗传连锁图的构建^[4] 等诸多领域。其原理是针对基因外显子中 GC 含量丰富, 而启动子、内含子中 AT 含量丰富的特点设计 2 组引物进行 PCR 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。SRAP 标记已经在黄瓜、辣椒、小麦等植物^[5-15] 和水稻稻瘟病^[16] 研究中广泛应用。Riaz 等^[17] 发现 SRAP 标记在鉴定区分桃和油桃品种时比 SSR 标记更有效; Ruiz 等^[18] 发现可利用 SRAP 检测出番茄品

种内的变异, 而 SSR 标记则无法检测出来。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。本研究以桃为研究材料, 设计了一套适合于桃 SRAP-PCR 分析的反应体系, 以期对桃的基因图谱的构建提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为桃秦光 2 号和曙光杂交 F_1 群体的成熟叶片, 由西北农林科技大学园艺学院提供。所用 *Taq* 聚合酶产于 Fermentas life science 公司, dNTPs

收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 陕西省攻关项目 (2006K01-G27-01); 农业部“948”项目 (2006-G27)

作者简介: 史红丽 (1984-), 女, 山东东平人, 在读硕士, 主要从事果树育种与生物技术研究。

通讯作者: 韩明玉 (1962-), 男, 陕西扶风人, 教授, 主要从事果树种质资源和果树育种研究。

产于 Genview 公司,分子量 DL2000 标准产于天根生物工程有限公司,PTC-200 型 PCR 仪为基因公司产品, Gel 2000 凝胶成像系统为 Alpha Innotech 公司产

品。SRAP 引物采用 Li 和 Quiros 已发表的引物组合:(正向引物)me1-me10/(反向引物)em1-em11,由上海生物工程有限公司合成。

表 1 SRAP 引物的序列

Tab.1 Sequence of SRAP primers

引物编号 Primer number	序列(5'-3') Sequence	引物编号 Primer number	序列(5'-3') Sequence
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTAGCAATTAAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTAGCAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTAGCAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTAGCAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAAG	em5	GACTGCGTAGCAATTAAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTAGCAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCGTAGCAATTCAA
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em8	GACTGCGTAGCAATTCTG
me9	TGAGTCCAAACCGGTAG	em9	GACTGCGTAGCAATTCCA
me10	TGAGTCCAAACCGGTCT	em10	GACTGCGTAGCAATTCTAG
		em11	GACTGCGTAGCAATTCCA

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 方法^[19]提取桃基因组 DNA。DNA 浓度用分光光度计检测,最后将纯化后的 DNA 稀释到 20 ng/μL 备用。

1.2.2 SRAP-PCR 扩增程序和体系优化 反应体系总体积为 25 μL,扩增采用复性变温法,共 40 个循环,即 94℃ 预变性 5 min;前 5 个循环:94℃ 变性 1 min,35℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min;后 35 个循环:94℃ 变性 1 min,50℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min;循环结束后 72℃ 延伸 10 min。前 5 个循环复性温度设为 35℃,主要是考虑到低的复性温度能确保两个引物与靶 DNA 部分配对;随后循环中复性温度升

到 50℃,可保证前 5 个循环的扩增产物可在余下循环中进行指数式扩增。

表 2 SRAP PCR 反应体系的因素-水平

Tab.2 Factors and levels of SRAP PCR reaction μL

水平(体积) Levels (concentration)	因素 Factors				
	dNTPs	Mg ²⁺	Taq polymerase	Primer	Template DNA
1	0.1	1	0.1	0.75	0.5
2	0.3	2	0.2	1.00	1.5
3	0.5	3	0.3	1.25	2.5
4	0.7	4	0.4	1.50	3.5

注: dNTPs 10 mmol/L; Mg²⁺ 25 mmol/L; Taq 酶 5 U/μL; 10 μmol/L 引物; 20 ng/μL 模板 DNA。表 3 同。

Note: dNTPs 10 mmol/L; Mg²⁺ 25 mmol/L; Taq polymerase 5 U/μL; 10 μmol/L Primer; 20 ng/μL Template DNA. The same as Tab. 3.

表 3 SRAP PCR 反应因素水平正交试验设计表 L₁₆(4⁵)

Tab.3 Orthogonal design of the factors and levels of SRAP PCR reaction L₁₆(4⁵)

μL

编号 No.	因素 Factors					
	dNTPs	Mg ²⁺	Taq polymerase	Primer	Template DNA	得分 Score
1	0.1	1	0.1	0.75	0.5	0
2	0.1	2	0.2	1.00	1.5	0
3	0.1	3	0.3	1.25	2.5	2
4	0.1	4	0.4	1.50	3.5	1
5	0.3	1	0.2	1.25	3.5	1
6	0.3	2	0.1	1.50	2.5	2
7	0.3	3	0.4	0.75	1.5	5
8	0.3	4	0.3	1.00	0.5	2
9	0.5	1	0.3	1.50	1.5	0
10	0.5	2	0.4	1.25	0.5	4
11	0.5	3	0.1	1.00	3.5	0
12	0.5	4	0.2	0.75	2.5	4
13	0.7	1	0.4	1.00	2.5	1
14	0.7	2	0.3	0.75	5.5	2
15	0.7	3	0.2	1.50	0.5	1
16	0.7	4	0.1	1.25	1.5	3
K1	3.0	2	5.0	11.00	7.0	-
K2	10.0	8	6.0	3.00	8.0	-
K3	8.0	8	6.0	10.00	9.0	-
K4	7.0	10	11.0	4.00	4.0	-

注: 评分标准为电泳条带多少,清晰程度,亮度。

Note: Scoring is according to the quantity, quality and brightness of the electrophoresis results.

根据统计学原理^[20], 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表^[21] 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 个水平的筛选分析, 共计 16 个组合, 方案如表 2 和表 3。选取 me2/ em1 作为引物, 随机选取 1 个模板 DNA 进行扩增。

PCR 产物用 2% 的琼脂糖(Gene Tech 公司产品) 凝胶电泳分离, 经溴化乙锭(EB) 染色后在 Gel 2000 凝胶成像系统上采集图像。

1. 2. 3 优化体系的稳定性检测 选择 SRAP 引物 me4/ em7 对随机选取的 7 个模板 DNA 分别进行扩增, 对优化过的 SRAP-PCR 反应体系的稳定性进行检测。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后检测结果。

2 结果与分析

2.1 桃基因组 DNA 的提取

改良 CTAB 方法提取桃基因组 DNA 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 1。分光光度计检测结果显示: A260/ A280 值位于 1. 8~ 1. 9, A260/ A230 值位于 2. 0~ 2. 1。DNA 质量较高, 可用于 SRAP-PCR 反应。

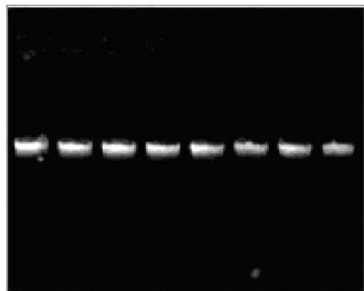
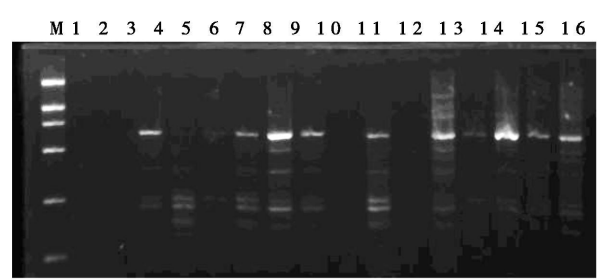


图 1 改良 CTAB 法提取 DNA 电泳结果

Fig. 1 The peach leaves DNA with modified CTAB

2.2 桃 SRAP-PCR 体系优化

选取 me10/ em11 作为引物, 随机选取 1 个模板, 按照表 3 设计的正交试验体系对模板 DNA 进行扩增(图 2)。从扩增结果可以看出, 组合 1~ 4 中扩增条带均较弱甚至无条带, 可能是 dNTPs 浓度较低, 其组合 13~ 16 普遍条带模糊, 背景过高, 扩增效果也不理想, 可能是因为 dNTPs 浓度过高所致。特别是组合 13, 15 几乎没有条带, 组合 13 的 Mg^{2+} 浓度过低, 组合 15 引物浓度过高, 模板浓度过低都可能是影响扩增的不利因素。而谱带较优的组合出现在 5~ 12 条带中, 这一范围 dNTPs 浓度较为适宜, 由此可知, dNTPs 浓度可能为 SRAP-PCR 反应的重要影响因素之一。当 dNTPs 浓度在较为适宜的水平时, 组合 9, 11 也几乎没有条带。组合 9 Mg^{2+} 浓度过低, 引物浓度过高, 组合 11 模板浓度过高, 酶浓度过低都有可能成为反应的不利因素。



1~ 16 为表 2 中处理编号。

1~ 16 are the treatments showed in table 2; Marker is DL2000

图 2 引物 me10/ em11 的正交设计 SRAP PCR 反应体系扩增结果

Fig. 2 The amplification results of SRAP PCR reaction systems from orthogonal design

当 dNTPs 浓度分别在 4 个水平, 最优的谱带总是分布于每一水平的后两个条带, 即随着 Mg^{2+} 浓度的增加谱带质量增高。因此 Mg^{2+} 浓度也可能是 SRAP-PCR 反应的重要影响因素之一。

由图 2 可知, 较优组合为 7, 10, 12, 较差组合为 1, 2, 9, 11。通过比较, 发现较优组合的引物浓度普遍较低, 较差组合的引物浓度普遍较高, 说明过高的引物浓度可能不利于扩增。

较优组合中 *Taq* 酶普遍处于高水平, 较差组合中酶浓度均很低。说明高水平的 *Taq* 酶可能是扩增的有利因素。

进一步综合分析, 较优组合和较差组合均分别包含了模板 DNA 的较高和较低水平, 虽然模板 DNA 在最高水平时扩增效率较差, 但其对扩增结果不具有决定性因素, 与其他因素的互作效应大于单独效应。

重点分析较优组合 7, 10, 12, 发现 10 号主带不够明显, 12 号杂带较多, 谱带强度和重复性较差。综合各因素考虑, 确定 7 号为最佳组合, 其条带多, 清晰, 亮度高, 主带明显, 重复性好。根据电泳条带明亮, 清晰程度, 亮度进一步为 16 个组合评分, 谱带质量越高得分越高, 在假设不存在交互作用的情况下求各列各水平的和 K_1, K_2, K_3, K_4 。综合看来, 假设不存在交互作用的情况下, 最优组合为 dNTPs 为 0. 12 mmol/ L, Mg^{2+} 为 4 mmol/ L, *Taq* 酶为 2 U, 引物为 0. 3 mmol/ L, 模板 DNA 为 50 ng。该体系与最佳组合 7 号基本一致。考虑到在实际的操作中, 各因素会存在一定的交互作用。综上所述, 最佳组合即在 25 μ L 反应体系中含有 0. 12 mmol/ L 的 dNTPs, 3 mmol/ L 的 Mg^{2+} , 2 U 的 *Taq* 酶, 0. 3 mmol/ L 的引物, 30 ng 的模板。

2.3 桃 SRAP-PCR 优化体系稳定性检测

从优化体系的稳定性检测结果可以看出, 每个

反应都能扩增出多态性强, 条带清晰, 重复性好的结果(图 3), 证明优化的桃 SRAP-PCR 反应体系是比较稳定可靠的。

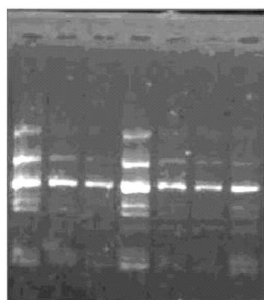


图 3 桃 SRAP 优化体系的检测结果

Fig. 3 The testing result of optimized SRAP system

3 结论与讨论

SRAP 标记是在总结已有的 DNA 分子标记优缺点的基础上开发的一种新的基于 PCR 反应的 DNA 分子标记技术。它具有操作简单、稳定和高效等特点。PCR 反应体系受诸多因素影响, 如 dNTPs、 Mg^{2+} 浓度等因素均会对扩增结果产生显著影响。一般来说, 底物 dNTP 浓度过高, 会导致聚合酶将其错误的掺入。浓度过低又会影响合成的效率; 本试验设计了 0.04, 0.12, 0.20, 0.28 mmol/L 4 个浓度梯度, 跨度范围较大, 所以不同的 dNTPs 浓度下的 PCR 反应, 结果差异很大, 容易找出其合理用量。 Mg^{2+} 浓度过高, 非特异性产物增加, Mg^{2+} 浓度过低, 造成 *Taq* 酶活性降低, 导致扩增产物减少; 本试验最佳组合的 Mg^{2+} 为中等浓度 3 mmol/L。引物过多会引起与模板的非特异结合或产生引物二聚体, 引物过低则降低产量, 本体系以 0.3 mmol/L 的引物浓度为合理用量; 酶量过多会使产物非特异性增加, 过少则使产量降低, 本体系确定的最佳酶量为 2 U。

最终所确定的桃 SRAP-PCR 最优反应体系在 dNTP 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度以及模板量上与王振国等^[22]对黄瓜 SRAP-PCR 反应体系中所确立的各个因素用量差别不大, 而 *Taq* 酶差别较大, 原因可能是试剂产地不同或物种差异所致。因此, 对于不同物种应对各个因素反复摸索以确定出稳定的适合该物种的最优反应体系。即使是同一物种, 因试剂药品可能带来的影响, 也可能对某一个或几个因素进行适当调整, 以确定了一套适合所研究对象的 SRAP-PCR 体系。

参考文献:

[1] Lic G F. Quiros Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system base on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455– 461.

[2] Ferriol M, Pico 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.

[3] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2004, 129: 204– 211.

[4] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 168– 180.

[5] 潘俊松, 王刚, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图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.

[6] 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.

[7] 武志朴, 杨文香, 刘大群, 等. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 66– 69.

[8] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F_2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 622– 626.

[9] 李严, 张春庆. 西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析 [J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 643– 647.

[10] 刘月光, 滕永勇, 潘辰, 等. 应用 SRAP 标记对莲藕资源的聚类分析 [J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(1): 29– 32.

[11] 郭大龙, 罗正荣. 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.

[12] Wang C X, Zhang J C, Yang X D, et al. The sequence related amplification polymorphisms in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Journal of Peanut Science, 2005, 34(3): 11– 15.

[13] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立 [J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 33– 38.

[14] 刘立军, 蒙祖庆, 邢秀龙. 苕麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 726– 730.

[15] Wu J, Tan W F, He J R, et al. Construct on of SRAP linkage map and QTL mapping for starch content in sweet potato [J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(6): 841– 845.

[16] 吴伟怀, 王玲, 程贯忠, 等. 2004, 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究—广东省与云南省稻瘟病菌群体遗传及致病型结构的比较分析 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 675– 680.

[17] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129: 204– 211.

[18] Ruiz J J, Garcia M S, Pic B, et al. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130: 88– 95.

[19] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 173– 178.

[20] 盖钧镒. 实验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 157– 159.

[21] 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.

[22] 王振国, 张海英. 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.