

西瓜 SRAP-PCR 程序和体系优化

李晓慧, 王从彦, 张四普, 常高正

(1. 河南省农业科学院园艺研究所, 河南郑州 450002; 2. 河南农业大学生命科学院, 河南郑州 450002)

摘要 建立适宜西瓜 DNA 的 SRAP-PCR 扩增体系, 为西瓜基因图谱的构建和分子标记打下基础。以西瓜中华拳王品种为试验材料, 探索了西瓜 SRAP-PCR 反应程序, 并对西瓜 SRAP-PCR 反应体系的各影响因子进行梯度实验, 筛选和建立可扩增多态性高、重复性好、带型清晰的最佳 SRAP-PCR 反应程序和体系。最佳 SRAP-PCR 反应程序为: 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 35 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 共 5 个循环; 94 变性 1 min, 50 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 5 min; 4 保存。最佳 SRAP-PCR 反应体系 (15 μ) 为: DNA 100 ng, dNTPs 0.3 mmol/L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, primer 7.5 pmol/L, Taq polymerase 0.75 U。该程序和体系能很好地满足西瓜基因组 SRAP 扩增的要求, SRAP 标记应用于西瓜遗传研究是可行的。

关键词 西瓜; SRAP; 程序优化; 体系优化

中图分类号 S651 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08461-03

Optimization of SRAP-PCR Program and System in *Citrullus lanatus*

LI Xiaohui et al. (Institute of Horticulture, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract The aim of the research was to establish SRAP-PCR amplification system which was suitable for *Citrullus lanatus* DNA so as to lay foundation for the construction of gene map and molecular marker in *C. lanatus*. Watermelon variety Zhonghuaquanwang being taken as tested materials, SRAP-PCR reaction program in watermelon was investigated and the gradient experiment was conducted on each impact factors in SRAP-PCR reaction system to screen and establish the optimum SRAP-PCR reaction program and system that could amplify high polymorphism, good repeatability and clear band pattern. The optimum SRAP-PCR reaction procedure was as follows: pre-denaturation at 94 for 5 min; denaturation at 94 for 1 min, anneal at 35 for 1 min, extension at 72 for 1 min and in total 5 cycles; denaturation at 94 for 1 min, anneal at 50 for 1 min, extension at 72 for 1 min and in total 35 cycles; extension at 72 for 5 min; preservation at 4. The optimum SRAP-PCR system (Total of 15 μ) was as follows: DNA 100 ng, dNTPs 0.3 mmol/L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, primer 7.5 pmol/L, Taq polymerase 0.75 U. The program and system could meet the demands for genome SRAP amplification in *C. lanatus*. It was feasible to apply SRAP marker in genetic research in *C. lanatus*.

Key words *Citrullus lanatus*; SRAP; Program optimization; System optimization

SRAP 全称为相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP), 该标记技术是由 Li 等^[1]于 2000 年发明的一种以 PCR 技术为基础的分子标记技术, 采用一对引物对开放阅读框 (ORFs) 进行扩增。他们使用该标记系统成功得到了一个 276 bp 的 SRAP 标记——SRAP133, 找到了 BoGLS-ALK 基因, 得到芹菜雄性不育基因和一个抗病毒的基因, 还成功地构建了几种蔬菜作物的 cDNA 指纹图谱等。

由于 SRAP 技术简便、快速, 不需预知物种的序列信息, 故而近年来在植物遗传多样性分析^[2]、种质鉴定^[3]、遗传连锁图的构建^[4]、基因连锁标记的寻找与基因定位^[2]和比较基因组学研究^[2]等方面得到广泛应用。

目前, 小麦^[5]、烟草^[6]、玉米^[7]、红花^[8]、苕麻^[9]、辣椒^[10]、

柿属^[11]等植物的 SRAP-PCR 扩增体系已建立。笔者采用 SRAP 技术建立一个适宜西瓜 DNA 的 SRAP-PCR 扩增体系, 为西瓜基因图谱的构建、分子标记打下坚实基础。

1 材料与方

1.1 材料 西瓜中华拳王品种由河南农科院园艺所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取。 2006 年 10 月将供试材料播于河南省农科院实验田进行育苗, 待幼苗长出 3 片真叶时, 取真叶采用 CTAB 法提取总 DNA。

1.2.2 西瓜 SRAP-PCR 扩增程序和体系优化。 为了探索西瓜 SRAP-PCR 扩增反应的优化程序, 按照 Li 等^[1]提出的扩增反应程序, 设计 4 个不同的 PCR 扩增反应程序, 见表 1。

表 1 西瓜 SRAP-PCR 扩增反应程序设置

程序	预变性		×5 循环						×35 循环						×1 循环 (延伸)		保存温度
	温度	时间 min	变性		退火		延伸		变性		退火		延伸		温度	时间 min	
			温度	时间 min	温度	时间 min	温度	时间 min	温度	时间 min	温度	时间 min	温度	时间 min			
1	94	5	94	1	35	1	72	2	94	1	50	1	72	2	72	5	4
2	94	5	94	1	35	1	72	1	94	1	50	1	72	1	72	5	4
3	94	5	94	1	50	1	72	1	94	1	50	1	72	1	72	5	4
4	94	5							94	1	50	1	72	1	72	5	4

为了探索西瓜 SRAP-PCR 扩增反应的优化体系, 加之由于扩增体系成分复杂, 各种试剂的浓度变化都将影响扩增结果的稳定性和重复性, 因此对其中主要试剂的浓度进行优化。以西瓜中华拳王的 DNA 为模板, 对 SRAP-PCR 扩增反应

各影响因子进行 7 水平单因素梯度设置, 见表 2。

1.2.3 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳。 SRAP-PCR 扩增产物电泳分析检测在美国 BIO RAD 公司生产的 power-PAC3000 电泳仪上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (6% 丙烯酰胺, 含 7 ml/L 尿素) 分离, 胶板大小为 32 cm × 37 cm, 电泳缓冲液为 1 × TBE。胶板于 60 W 的功率预泳 30 min, 扩增产物加 1/5 体积的上样缓冲液后 94 变性处理 5 min 上样, 于 60 W 的

基金项目 河南省自然科学基金项目 (0611031800)。

作者简介 李晓慧 (1980-), 女, 河南郑州人, 硕士, 从事西瓜的遗传育种工作。

收稿日期 2007-05-14

功率下电泳70 min左右,使二甲苯氰移动到胶板2/3处停止电泳,电泳过程中确保胶板温度不高于45℃。

1.2.4 银染检测。固定(10%的乙醇溶液,0.5%乙酸溶液)15 min,蒸馏水漂洗4 min,染色(0.133 3%AgNO₃溶液)20 min,蒸馏水漂洗5 s左右,显色(1%NaOH溶液,0.5%甲醛溶液)至谱带清晰时停止显色,蒸馏水漂洗凝胶2~3 min,固影(10%的乙醇溶液,0.5%乙酸溶液)2~3 min,室温下自然晾干。干燥后即可用来拍照和分析。

表2 西瓜SRAP-PCR扩增反应各影响因子的梯度设置

模板 DNA	Mg ²⁺ mmol/L	dNTP mmol/L	Taq (polymerase) U	primer pmd/L
20	1.00	0.50	0.25	2.0
40	1.25	0.10	0.50	5.0
60	1.50	0.15	0.75	7.5
80	1.75	0.20	1.00	10.0
100	2.00	0.25	1.25	12.5
120	2.25	0.30	1.50	15.0
150	2.50	0.35	1.75	20.0

2 结果与分析

2.1 程序优化 由图1可知,程序1与程序2扩增出的条带较亮,带数最多且主带清晰;程序3和程序4的条带清晰但其扩增出的条带少且颜色较浅。这说明采用程序1、2所获得的SRAP扩增结果较好。程序1所需时间较程序2长约30 min,故从节约时间的角度,西瓜SRAP反应体系参数的优化研究均利用程序2进行扩增。

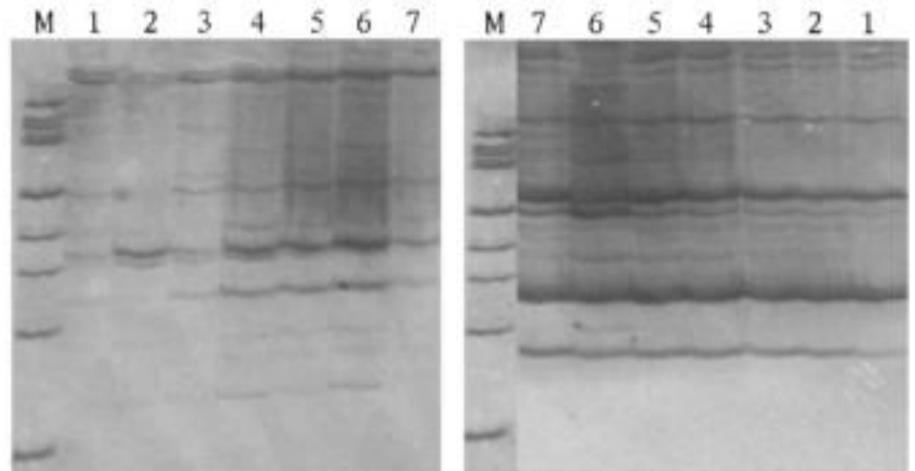
2.2 体系优化

2.2.1 Mg²⁺浓度确定。Mg²⁺浓度不仅影响酶活性,而且影响引物的退火、模板和中间产物的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成等。Mg²⁺是Taq DNA聚合酶活性的激活剂,浓度低时,DNA聚合酶活性没有充分发挥,带不亮、不清晰,甚至扩不出谱带;但当浓度过高时,易产生非特异扩增,背景深。由图2可见,当Mg²⁺浓度在1.00、1.25 mmol/L时谱带较弱;1.75和2.00 mmol/L时扩增谱带均清晰且稳定。由此可见,Mg²⁺最佳反应浓度为2.00 mmol/L。

2.2.2 dNTPs浓度确定。dNTPs是PCR扩增反应的原料,必须达到一定浓度才能满足PCR扩增需求。若dNTPs浓度过低,会影响合成的效率,甚至会因dNTPs过早的消耗而使PCR扩增产物单链化,影响PCR扩增的效果;但过高也会与Taq DNA聚合酶竞争Mg²⁺,会导致聚合酶错误的掺入,同样也不利于PCR扩增。由图3可见,不同浓度dNTPs扩增结果差异很大。在0.05至0.15 mmol/L时扩增产物谱带很弱,在0.20和0.25 mmol/L时扩增效果较好,在0.30

mmol/L时谱带更为清晰。但0.35 mmol/L时谱带反而变弱。故而,从节约试剂成本的原则出发,dNTPs的浓度确定为0.30 mmol/L。

2.2.3 Taq酶浓度确定。Taq DNA聚合酶在PCR中的用量受反应体积、酶活性、酶耐热性等因素的影响。Taq酶用量少易导致DNA新链合成效率下降,造成扩增产物较少。而使用较高浓度的Taq酶则造成药品浪费,且易导致非特异性的扩增。由图4可见,Taq酶在0.25、0.50 U时扩增产物有些条带较模糊,在0.75 U时均有扩增产物。0.75与1.00 U的扩增结果相似,但酶量较大时易出现非特异性扩增。所以从经济方面考虑,Taq酶适宜用量为0.75 U 15 μl。

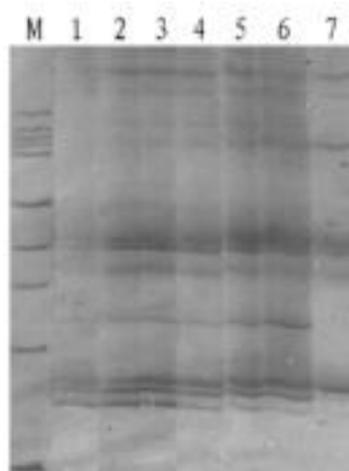


注:从左至右dNTP分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L时扩增谱带;M为Marker。

图3 dNTPs浓度优化

注:从左至右Polyase分别为1.75、1.50、1.25、1.00、0.75、0.50、0.25 U时扩增谱带;M为Marker。

图4 Polyase浓度优化

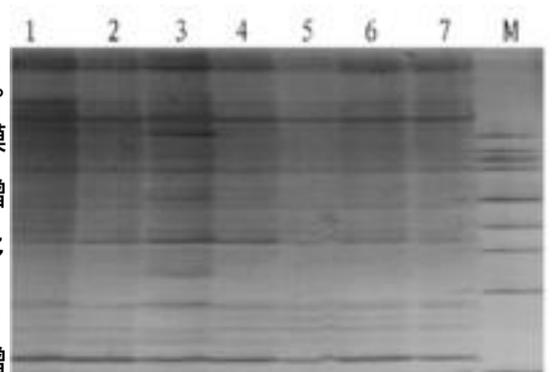


注:从左至右Primer分别为2.0、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、20.0 pmd/L时扩增谱带;M为Marker。

图5 Primer浓度优化

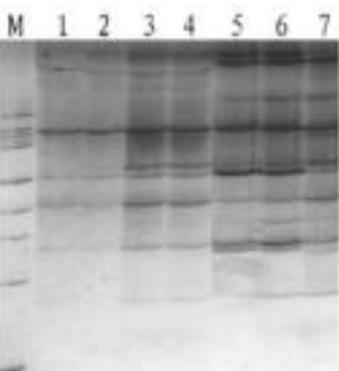
2.2.4 引物浓度确定。引物在退火时与模板DNA结合启动DNA的扩增。当引物浓度较低时,因引物与模板结合的效率低,产生的多态性带少;随着引物浓度的增加,产生的多态性带增加,但过高的引物浓度易导致引物二聚体的形成和非特异带扩增,影响靶序列的产量。由图5可见,引物浓度为2.0 pmd/L时,扩增产物电泳谱带较模糊,在5.0~10.0 pmd/L时谱带清晰稳定。考虑到药品用量以及引物量过大易形成引物二聚体,所以确定引物浓度为7.5 pmd/L。

2.2.5 DNA浓度确定。DNA是PCR扩增的模板,DNA太少时无扩增带或扩增带较少,太多时特异带又很难出现,而且易导致非特异的增加。由图6可见,模板用量在20~150 ng均能扩增出完整的条带,这表明SRAP扩增对模板



注:从左至右模板DNA分别为150、120、100、80、60、40、20 ng时扩增的谱带;M为Marker。

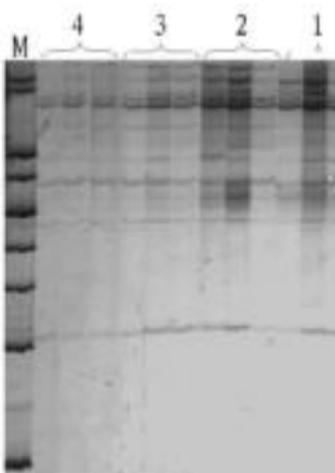
图6 DNA浓度优化



注:从左至右Mg²⁺分别为2.50、2.25、2.00、1.75、1.50、1.25、1.00 mmol/L时扩增的谱带;M为Marker。

图2 Mg²⁺浓度优化

图1 西瓜SRAP-PCR扩增反应程序优化



注:从左至右分别为程序4、3、2和1扩增的谱带;M为Marker。

DNA 的浓度范围要求较为宽松,也印证了郭大龙等^[11]的看法。只不过当模板 DNA 加入量为 20 ng 时,扩增条带很微弱,在 40 ng 时特异性不好,可能因为模板较少时,引物与模板的碰撞机会较少,而模板浓度过高时,模板与模板之间碰撞的机会较多,而与引物之间碰撞的机会相对减少。结果表明在 100 ng 时效果最佳。

2.2.6 SRAP-PCR 扩增反应体系的确立。以上所述确定的条件,用引物 ME5/EM4 组合对西瓜中华拳王 DNA 进行扩增。综合考虑以上各种因素,从结果稳定性和经济性出发,确立西瓜 SRAP-PCR 最佳反应体系(15 μ l)为:DNA 100 ng,dNTPs 0.3 mmol/L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L,primer 7.5 pmol/L,Taq polymerase 0.75 U。

3 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 的 DNA 分子标记技术。由于 SRAP 标记主要是对 ORFs 进行扩增,因此提高了扩增结果与表现型的相关性。一方面,SRAP 标记采用 PCR 扩增,不需要像 RFLP 标记那样要求高纯度和高浓度的 DNA 和使用放射性同位素,减少了对试剂质量、仪器设备的要求,同时也减少了对实验操作人员身体等方面的损害;另一方面,SRAP 标记不像 RAPD、SSR 标记那样花费大量人力、物力进行引物设计、开发,也不需像 AFLP 那样需要预扩增和连接,减少了对人力、物力的需求和依赖,并且多次重复实验结果稳定,克服了 RAPD 重复性、稳定性差的缺点。最为重要的一点是,SRAP 标记比 RAPD 标记稳定且其多态性可与 AFLP 标记相

媲美。

该实验对影响西瓜基因组 SRAP-PCR 扩增结果的 DNA、primer、dNTPs、Taq DNA 聚合酶的浓度及程序等进行了优化。结果表明,该程序和体系能很好地满足西瓜基因组 SRAP 扩增的要求。笔者利用该程序和体系开展了西瓜种质纯度鉴定的研究,获得了较好的结果。

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] FERRI CL M, HICO 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] HIAZ 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] 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.
- [6] 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.
- [7] 赵新亮, 马强. 玉米 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(15): 3619 - 3620.
- [8] 彭飒, 郭美丽, 陈跃华, 等. 红花 SRAP 扩增体系的建立和优化 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(5): 544 - 547.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [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.