

马铃薯 SRAP-PCR 反应体系的优化

阮先乐, 陈龙* (周口师范学院生命科学系, 河南周口 466000)

摘要 [目的]建立马铃薯大西洋 SRAP-PCR 反应体系, 为今后的研究奠定基础。[方法]以马铃薯大西洋基因组 DNA 为模板, 从 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶浓度、dNTPs 浓度、引物浓度和模板 DNA 浓度 5 个方面对大西洋 SRAP-PCR 反应体系进行优化。[结果]适合大西洋的 SRAP-PCR 反应体系为: 模板 DNA 1.0 μ l (50 ng/ μ l), *Taq* 酶 1.7 μ l (1 U/ μ l), 引物对 1.5 μ l (1 μ mol/L) \times 2, $MgCl_2$ 2.4 μ l (25 mmol/L), dNTPs 0.6 μ l (10 mmol/L), 10 \times Buffer 3.0 μ l, ddH₂O 18.3 μ l, 总体积 30 μ l。[结论]建立的 SRAP-PCR 反应体系是稳定可靠的。

关键词 马铃薯; SRAP; 反应体系; 优化

中图分类号 S532 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 25 - 11892 - 03

Optimization of SRAP-PCR Reaction System in Potato

RUAN Xian-le et al (Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466000)

Abstract [Objective] The study aimed to establish the appropriate potato SRAP-PCR reaction system. [Method] Using potato genome DNA as template, the major components of SRAP, such as concentrations of Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, primers and template, were optimized. [Result] A system and procedure to suit the potato SRAP analysis was established. The condition was in a 30 μ l volume with 2.4 μ l (25 mmol/L), 0.6 μ l dNTPs (10 mmol/L), forward primers (1 μ mol/L) 1.5 μ l, reverse primers (1 μ mol/L) 1.5 μ l, 1 μ l template DNA (50 ng/ μ l), 1.7 μ l *Taq* DNA polymerase (1 U/ μ l), ddH₂O 18.3 μ l and 3.0 μ l PCR Buffer (10 \times). [Conclusion] The new established SRAP-PCR system of potato was fully reproducible and good stability.

Key words Potato; SRAP; Reaction system; Optimization

近年来, 分子标记技术得到了迅猛的发展, 其中以 PCR 为基础的分子标记技术更是被广泛地应用于基因组 DNA 的分析中。序列相关扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 于 2001 年由美国加州大学蔬菜作物系的 Li 和 Quiros^[1] 博士提出, 又称为基于序列扩增多态性 (sequence-based amplified polymorphism, SBAP)^[2]。SRAP 针对基因外显子里 GC 含量丰富及启动子和内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行扩增, 因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。SRAP 标记具有简便、中等产量、高共显性、重复性、易于分离条带及测序等优点, 并且在基因组中分布均匀, 适合基因定位、基因克隆、遗传图谱构建等生物学研究。目前, 它已经被成功应用于甘薯^[3]、玉米^[4]、西瓜^[5]、小麦^[6]、辣椒^[7] 等作物。为此, 笔者对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系进行优化研究, 旨在建立并优化马铃薯 SRAP 反应体系, 为今后进行其遗传多样性分析、遗传图谱构建和基因定位等研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 马铃薯品种为大西洋 (Atlantic)。试验所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成; dNTPs、*Taq* DNA polymerase 和标准分子量 (100 bp plus DNA ladder) 均购自鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯总 DNA 的提取与浓度的测定。 马铃薯总 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[8]。用 Eppendorf 公司生产的 BioPhotometer 核酸蛋白测定仪检测 DNA 溶液浓度和纯度, 并将其稀释为 50 ng/ μ l, -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.2.2 试验设计。 参照杨志平^[9-11] 等的方。反应在 Eppendorf 公司生产的 Mastercycler gradient PCR 仪上进行, 反应程序是: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1

min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

从模板 DNA、*Taq* 酶、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs 等方面进行反应体系的单因子优化试验, 逐个优化其他反应因子, 以确定相对较优的因子组合。反应总体积为 30 μ l, 不足部分用 ddH₂O 补充。模板 DNA (50 ng/ μ l) 的水平分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ l; *Taq* 酶 (1 U/ μ l) 的水平分别为 0.7、1.2、1.7、2.2、2.7、3.2 μ l; 引物 (1 μ mol/L) 的水平分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ l; Mg^{2+} (25 mmol/L) 的水平分别为 0.6、1.2、1.8、2.4、3.0、3.6 μ l; dNTPs (10 mmol/L) 的水平分别为 0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2 μ l。

所用的引物组合为 EM8/ME8, 它们的序列为 EM8: 5'-GACTGCGTACGAATTCAA- 3', ME8: 5'-TGAGTCCAAACCGGTTG- 3'。

1.2.3 扩增产物的电泳检测。 对 SRAP 反应体系进行优化时, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 在恒定 100 V 电压下电泳 1 h, 最后在紫外成像系统中照相并记录分析。

对 SRAP 反应体系稳定性检测时, 用 9% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 在恒定 400 V 电压下电泳 3 h, 银染后照相并分析。从 110 对引物组合中选出 6 对引物组合进行检测。所选引物组合为: EM3/ME3、EM3/ME9、EM4/ME3、EM4/ME4、EM4/ME10、EM10/ME3, 其序列见表 1。

表 1 SRAP 所用引物序列

Table 1 The primer sequences used in SRAP analysis

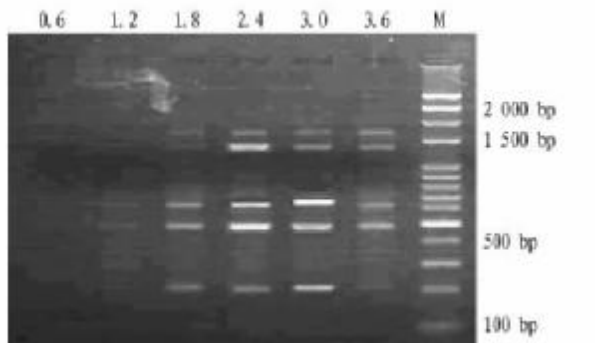
编号 No.	正向引物 Forward primers
ME3	5'-TGACTCCAAACCGGAAT- 3'
ME4	5'-TGACTCCAAACCGGACA- 3'
ME9	5'-TGACTCCAAACCGGTCA- 3'
ME10	5'-TGACTCCAAACCGGTGC- 3'
EM3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC- 3'
EM4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA- 3'
EM10	5'-GACTGCGTACGAATTTCTG- 3'

作者简介 阮先乐 (1977 -), 男, 河南周口人, 讲师, 从事植物细胞工程技术研究工作。* 通讯作者, 教授。

收稿日期 2009-04-24

2 结果与分析

2.1 Mg²⁺ 用量对 SRAP 反应的影响 由图 1 可知, 当 Mg²⁺ 的用量为 0.6、1.2 μl 时无扩增条带, 随着用量的增加条带逐渐清晰, 但用量过大条带又渐模糊。用量为 2.4、3.0 μl 时, 条带都比较清晰。Mg²⁺ 是 *Taq* 酶的激活剂, 但用量过高使反应特异性降低, 出现非特异性扩增。因此, 30 μl 反应体系中 Mg²⁺ 用量以 2.4 μl 为宜。



注: M 为 100 bp plus DNA laddmarker。下图同。
Note: M, 100 bp plus DNA ladder marker; The same as below.

图 1 Mg²⁺ 用量对 SRAP 反应的影响

Fig. 1 The effects of Mg²⁺ concentration on SRAP-PCR patterns

2.2 dNTPs 用量对 SRAP 反应的影响 dNTPs 是 PCR 扩增反应的原料, 必须达到一定浓度才能满足要求, 但过高也会与 *Taq* 酶竞争 Mg²⁺, 对扩增不利。由图 2 可知, dNTPs 的用量过高或过低都没有条带出现, 在一定用量范围内, 随着用量的减少条带渐清晰, 当用量为 0.6 μl 时条带最清晰。因此, 30 μl 反应体系中 dNTPs 用量以 0.6 μl 为宜。

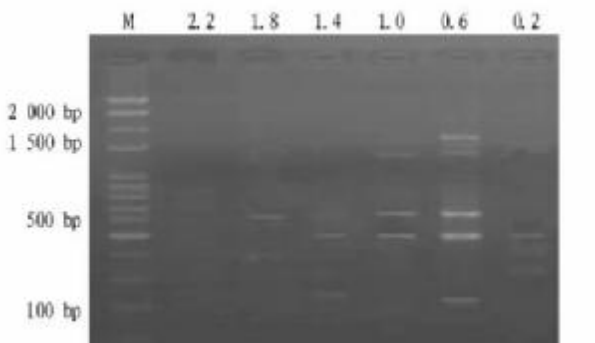


图 2 dNTPs 用量对 SRAP 反应的影响

Fig. 2 The effects of dNTPs concentration on SRAP-PCR patterns

2.3 *Taq* 酶用量对 SRAP 反应的影响 由图 3 可知, *Taq* 酶用量为 0.7 U 时, 不能扩增出条带, 用量为 1.2、2.2、2.7、3.2 U 时, 有较弱的条带, 酶量过大容易出现非特异性扩增。当用量为 1.7 U 时, 扩增的条带较好。因此, 30 μl 反应体系中 *Taq* 酶用量以 1.7 μl 为宜。

2.4 引物用量对 SRAP 反应的影响 由图 4 可知, 当引物用量为 0.5、1.0、2.0 μl 时, 扩增条带较少且比较模糊; 用量为 2.5、3.0 μl 时, 无扩增条带; 用量为 1.5 μl 时, 扩增的条带清晰且条带较多。因此, 30 μl 反应体系中引物用量以 1.5 μl 为宜。

2.5 模板 DNA 用量对 SRAP 反应的影响 由图 5 可知, 当模板 DNA 用量为 0.5、3.0 μl 时, 无扩增条带出现; 用量为

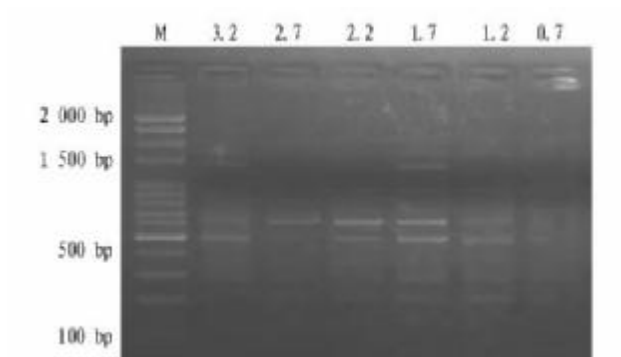


图 3 *Taq* 酶用量对 SRAP 反应的影响

Fig. 3 The effects of *Taq* DNA Polymerase concentration on SRAP-PCR patterns

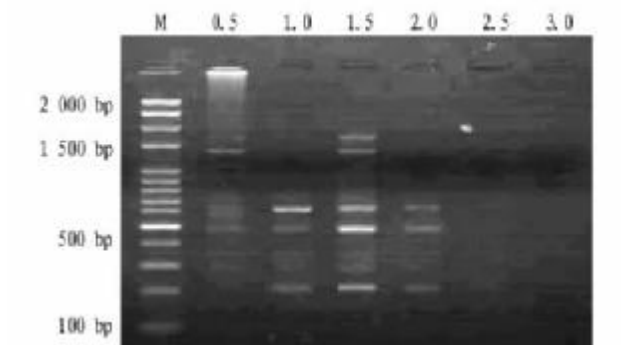


图 4 引物用量对 SRAP 反应的影响

Fig. 4 The effects of primers concentration on SRAP-PCR patterns

1.5、2.0、2.5 μl 时, 扩增的条带较弱且条带较少; 用量为 1.0 μl 时, 扩增的条带较清晰。因此, 30 μl 反应体系中模板 DNA 用量以 1.0 μl 为宜。

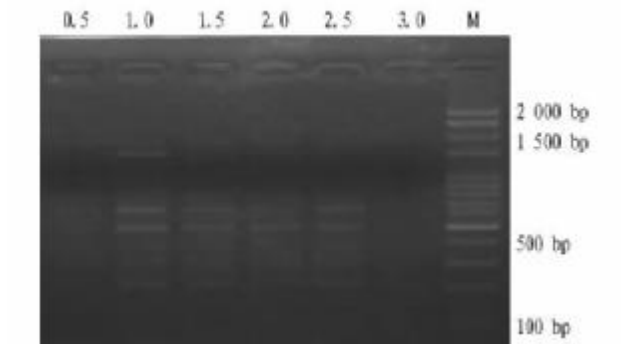


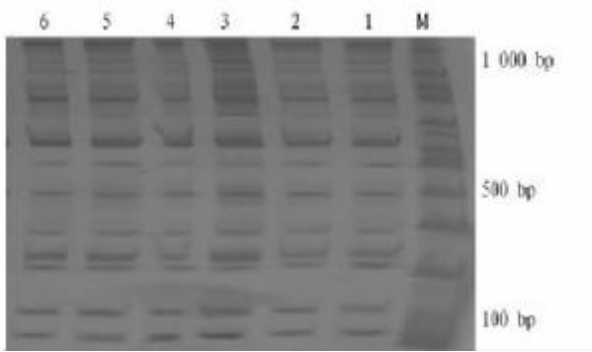
图 5 模板 DNA 用量对 SRAP 反应的影响

Fig. 5 The effects of template DNA concentration on SRAP-PCR patterns

2.6 SRAP-PCR 体系的稳定性检测 用选择的 6 对引物组合对建立的 SRAP-PCR 反应体系的稳定性进行检测。结果表明: 所使用的 6 对引物组合都能扩增出清晰且重复性好的谱带, 说明所建立的 SRAP 反应体系是稳定可靠的。EM4 和 ME4 引物组合的 SRAP 扩增谱带见图 6。

3 结论与讨论

适合一种植物的 SRAP-PCR 反应体系和反应程序受到许多因子的影响。在反应程序中, 变性温度、时间和循环次数, 复性温度、时间和循环次数, 延伸温度、时间和循环次数等因子都会影响到电泳检测结果的准确性。在反应体系中, Mg²⁺ 用量对 PCR 的特异性及扩增效率有很大的影响。Mg²⁺



注:1~6均为马铃薯样品。

Note:1-6 are potato samples.

图6 EM4和ME4引物组合的SRAP扩增谱带

Fig.6 SRAP amplification bands of EM4 and ME4 primers

用量过高非特异性产物增加,过低就没有足够的 Mg^{2+} 来激活 *Taq* 酶,最终导致扩增产物减少甚至失败。dNTP 用量过高,扩增时错误掺入率也增加,过低时,反应中过早消耗完,直接影响扩增产物的浓度。引物用量过低,引物与模板的结合率低,扩增反应过早终止,从而导致扩增图谱无产物,而过高则会引起引物与模板的非特异性配对,造成扩增背景模糊。

该研究确立的马铃薯大西洋 SRAP-PCR 反应体系是:模板 DNA 1.0 μ l (50 ng/ μ l), *Taq* 酶 1.7 μ l (1 U/ μ l), 引物对

1.5 μ l (1 μ mol/L) \times 2, $MgCl_2$ 2.4 μ l (25 mmol/L), dNTPs 0.6 μ l (10 mmol/L), 10 \times Buffer 3.0 μ l, ddH₂O 18.3 μ l, 总体积为 30 μ l。

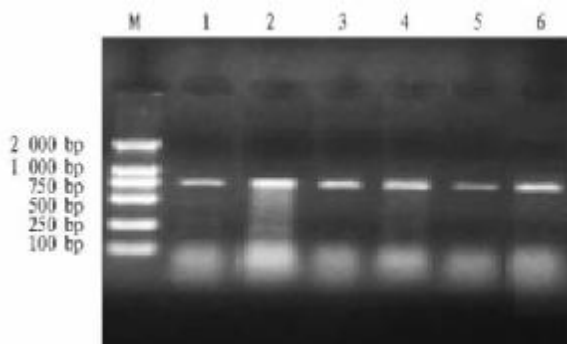
参考文献

- [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] RUIZ J J, GARCIA-MARTINEZ S, PICO B, et al. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers [J]. J Am Soc Horticul Sci, 2005, 130 (1): 88-94.
- [3] 吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 等. 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (6): 841-845.
- [4] 赵新亮, 郭霞光. 利用 SRAP 分子标记划分玉米自交系类群初探 [J]. 西北农业学报, 2007, 16 (3): 77-81.
- [5] 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.
- [6] 武志朴, 杨文香, 刘大群. 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.
- [7] 任羽, 王得元, 张银东. 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.
- [8] CLARK M S. 植物分子生物学: 实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [9] 杨志平. 马铃薯 (*S. tuberosum* L.) 种质资源的遗传多样性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [10] 雷剑, 柳俊. 一个与马铃薯青枯病抗性连锁的 SRAP 标记筛选 [J]. 中国马铃薯, 2006, 20 (3): 150-153.
- [11] 钱文成, 张桂华, 陈飞雪, 等. SRAP 在检测黄瓜基因多态性中的特征 [J]. 遗传, 2006, 28 (11): 1435-1439.

(上接第 11885 页)

各异, 导致 RNA 浓度有所不同。从质量上来说, 所提取 RNA 条带清晰、不拖尾、没有杂质的污染, 28S rRNA 量约是 18S rRNA 的 2 倍, RNA 基本没有降解, 品种间没有差异, 说明该方法适合苹果芽 RNA 的提取。

2.2 RT-PCR 利用所提的 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果如图 2 所示。以该方法所提取的 RNA 反转录以后的 cDNA 为模板, 成功扩增出约 700 bp 的 *AFL2* 基因特异条带, 说明所提取 RNA 能够满足 RT-PCR 的需要。



注: M 为 DL2000 Maker。

Note: M stands for DL2000 Marker.

图2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of RT-PCR products

3 讨论

RT-PCR 要求模板 RNA 完整没有降解, 且不含蛋白质、多糖等, 内源 RNase、酚类化合物、多糖及色素的去除是高质量苹果芽 RNA 提取的关键。试验结果表明, SDS 和氯仿能使蛋白变性并通过离心去除; 硼酸、PVPP 可以与酚类化合物形成复合物, 抑制酚类物质的氧化, 从而抑制了其氧化物与 RNA 结合; 低浓度乙醇和高浓度醋酸钾共同作用可以有效沉淀多糖^[5], 且采用氯化锂沉淀 RNA 既能防止多糖与其产生共沉淀, 又能使色素溶解^[6]。另外, 试验流程短, 简化了沉淀步骤和时间, 在一定程度上避免了 RNA 的降解; 试验方法相对简单, 药品均由自己配制, 降低了 RNA 提取的成本, 适合大批量提取; 采用锡纸包裹单芽将其击碎转管的方法又在最大程度上保留了芽子的全部遗传信息。

参考文献

- [1] LEPZ GMEZ R, LIM M A. A method for extracting RNA with modified Gomez method [J]. Hortscience, 1992, 27: 440-442.
- [2] CLAUDIO M, PAMELA G, MIRKO M, et al. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues [J]. Molecular Biotechnology, 2004, 26: 95-99.
- [3] 杨传平, 姜静, 那东辰, 等. 白桦花芽 RNA 的快速提取 [J]. 东北林业大学学报, 2002 (3): 1-4.
- [4] 曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 等. 苹果 LEAFY 同源基因的 cDNA 克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2003, 30 (3): 267-271.
- [5] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策 [J]. 生物技术通报, 1999 (1): 36-39.
- [6] 裴东, 谷瑞生. 几种提取木本植物中 RNA 方法的比较和改进 [J]. 植物生理学通讯, 2002 (4): 362-365.