

# 利用正交设计优化辣椒 SRAP 反应体系

吴智明<sup>1</sup>, 曾晶<sup>2</sup>, 胡开林<sup>2</sup>, 乔爱民<sup>1</sup>

(1. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院 广东 广州 510225; 2. 华南农业大学 园艺学院 广东 广州 510640)

**摘要:** 为快速建立优化的辣椒 SRAP 反应体系, 利用  $L_9(3^4)$  正交表, 探讨了  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物和模板 DNA 4 种主要反应成分的浓度变化对 SRAP 扩增结果的影响。结果表明: 通过正交设计实验可高效建立优化稳定的辣椒 SRAP 反应体系; 用该法建立的辣椒 SRAP 优化反应体系为: 20  $\mu$ L 反应体系中含 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.4  $\mu$ mol/L、模板 DNA 10 ng, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。

**关键词:** 辣椒; SRAP; 正交设计

**中图分类号:** S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0152-03

SRAP(sequence-related amplified polymorphism), 即相关序列扩增多态性, 是由 Li 和 Quiros<sup>[1]</sup> 创建的一种基于 PCR 的新型 DNA 分子标记技术。该技术针对基因的外显子中 GC 含量丰富而启动子和内含子中 AT 含量丰富的特点来设计引物, 对开放阅读框(open reading frame, ORF)进行扩增, 因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。SRAP 技术因具有操作简便、多态性好、重复性好、高共显性等优点, 并且标记在基因组中分布较均匀, 已被广泛应用于目标性状的标记与定位、遗传连锁图谱的构建与遗传多样性分析<sup>[2-4]</sup> 等方面。

辣椒是我国最重要的蔬菜作物之一, 栽培面积十分广阔。将 RAPD、AFLP 和 SSR 等分子标记技术应用于辣椒分子生物学方面的研究举不胜举, 而 SRAP 标记在辣椒上的研究报道甚少<sup>[5-7]</sup>。该研究以辣椒为试验材料, 通过正交设计建立并优化辣椒 SRAP-PCR 反应体系, 以期 SRAP 标记技术在辣椒上的广泛应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 自交系 ‘NA’、

**第一作者简介:** 吴智明(1981-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究工作。E-mail: zhiming\_wu521@hotmail.com。

**通讯作者:** 胡开林(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究工作。E-mail: hukailin@scau.edu.cn。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30370978); 仲恺农业工程学院引进优秀人才科研启动基金资助项目(G2360292)。

**收稿日期:** 2010-01-26

‘B162’ 及其 F2 群体由华南农业大学园艺学院蔬菜学系提供。用于 PCR 扩增的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等购自天根生化科技(北京)有限公司, SRAP 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 辣椒基因组 DNA 的提取** 采用改良 CTAB 法<sup>[8]</sup> 提取辣椒基因组 DNA。将 DNA 稀释后, 用核酸蛋白仪测定样品的浓度, 并结合 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。最后将 DNA 定量到 10 ng/ $\mu$ L, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 SRAP 反应体系优化的正交设计** 采用  $L_9(3^4)$  正交实验设计, 对 SRAP 反应体系的主要影响因素  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物和模板 DNA 浓度进行四因素三水平筛选, 共 9 个处理, 方案如表 1。每个处理重复 3 次。根据表 1 制备总体积为 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系, 除表中变化因素外, 每个反应中还含有 1 $\times$  PCR buffer 和 1U *Taq* DNA 聚合酶。

表 1 SRAP 反应正交实验设计表 [ $L_9(3^4)$ ]

处理 编号	因素				得分			平均 得分
	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	Primers	DNA  / ng	重复 1	重复 2	重复 3	
	/ mmol *	/ mmol *	/ μmol *					
	L <sup>-1</sup>	L <sup>-1</sup>	L <sup>-1</sup>					
1	2.0	0.1	0.2	10	4	3	4	3.67
2	2.0	0.2	0.3	20	3	3	4	3.33
3	2.0	0.3	0.4	30	1	2	1	1.33
4	2.5	0.1	0.3	30	6	7	7	6.67
5	2.5	0.2	0.4	10	9	8	9	8.67
6	2.5	0.3	0.2	20	8	7	7	7.33
7	3.0	0.1	0.4	20	5	4	4	4.33
8	3.0	0.2	0.2	30	4	4	5	4.33
9	3.0	0.3	0.3	10	6	7	6	6.33

**1.2.3 PCR 扩增与电泳检测** 以自交系 ‘NA’ 基因组 DNA 为模板, 根据预备试验结果选用 Me12/Em12 引物

对进行 SRAP 反应体系的建立与优化试验, Me12 和 Em12 的引物序列分别为: 5'-GACCAGTAAACCGGATG -3'; 5'-TGTGGTCCGCAAATTAG -3'。PCR 扩增在 BIO-RAD 公司生产的 PTC-200 扩增仪上进行, 参考 Li 和 Quiros 的扩增程序: 94℃ 5 min, 前 5 个循环: 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 接下来将退火温度升至 50℃, 其它条件不变, 进行 35 个循环, 最后 72℃延伸10 min。反应结束后, PCR 产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 300 V 稳压电泳2.5 h。电泳后, 将剥下的凝胶置于固定液(10% 乙醇、0.5% 冰乙酸)固定 10 min, 1 g/L AgNO<sub>3</sub> 溶液染色15 min, 显影液(15 g/L NaOH、0.4% 甲醛、1 g/L 硼砂)显影 10 min, 数码相机拍照观察, 记录结果。

1.2.4 优化体系的稳定性检测 应用上述最佳反应体系, 利用 12 对不同的引物组合 Me1/Em1 ~ Em12 对从 F2 群体中随机选取的 12 个单株 DNA 进行 SRAP 扩增, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 SRAP 扩增条带的直观分析

按表 1 设计的 9 个处理进行 PCR 试验, 电泳检测结果如图 1 所示。根据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色进行打分: 条带丰富、清晰度高, 背景颜色浅的记 9 分, 相反, 记 1 分<sup>[9]</sup>。对 3 次重复分别单独进行统计, 得分见表 1。从 3 次重复的得分来看, 结果的一致性较好。取 3 次得分平均值在假设不存在交互作用的情况下进行直观分析: 计算各因素列中相同水平所对应的指标(*K*)、平均值(*k*)及极差(*R*), 结果见表 2。

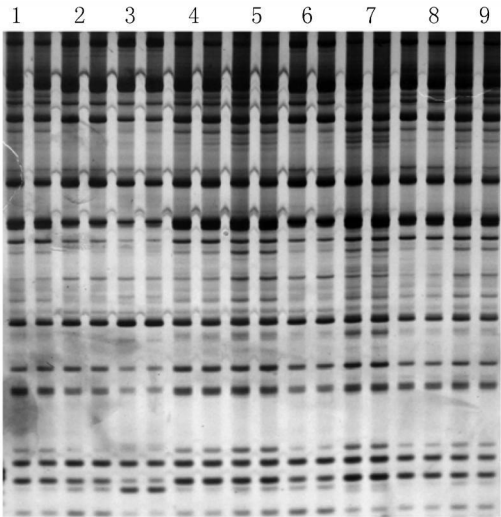


图 1 正交设计方案 PCR 产物电泳结果

极差 *R* 反映了影响因素对反应体系的影响, *R* 越

大, 影响越显著; 每一因素水平下的数据平均值 *k* 反映了影响因素各水平对反应体系的影响情况, *k* 值越大, 反应水平越好<sup>[10]</sup>。由表 2 可知, 各因素水平的变化对辣椒 SRAP 反应的影响从大到小依次为: Mg<sup>2+</sup> > 模板 DNA > 引物 > dNTPs。4 个影响因素的最佳反应水平组合并没有在正交表中出现, 但与分值最高的 5 号处理接近, 仅引物的用量不同。通过 SRAP 电泳结果结合正交实验的统计结果得出第 5 处理为最理想的组合。即 20 μL 反应体系中 4 因素的适宜浓度分别为: Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.4 μmol/L, 模板 DNA 10 ng。

表 2 正交设计直观分析

Results	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	Primers	DNA
	/mmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>	/μmol · L <sup>-1</sup>	/ng
<i>K</i> <sub>1</sub>	8.33	14.67	15.33	18.67
<i>K</i> <sub>2</sub>	22.67	16.33	16.33	14.99
<i>K</i> <sub>3</sub>	14.99	14.99	14.33	12.33
<i>k</i> <sub>1</sub>	2.78	4.89	5.11	6.22
<i>k</i> <sub>2</sub>	7.56	5.44	5.44	5.00
<i>k</i> <sub>3</sub>	5.00	5.00	4.78	4.11
<i>R</i>	2.56	0.55	0.66	2.11

2.2 反应体系的稳定性检验

应用上述最佳反应体系, 采用了 12 对引物对从 F2 群体中随机选取的辣椒单株 DNA 进行了 SRAP 扩增, 结果如图 2 所示。可见, 该反应体系对每个 DNA 样品均能扩增出一致、清晰可辨的 DNA 条带, 且条带丰富、多态性好, 说明该反应体系稳定, 适用于辣椒品种的 SRAP 扩增。

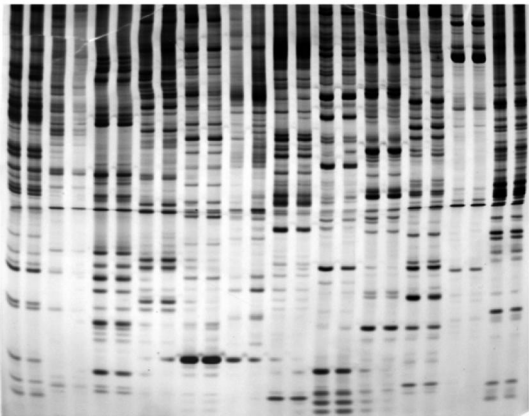


图 2 利用最佳体系对 F2 群体部分单株 DNA 的扩增电泳结果

3 讨论与结论

SRAP 分子标记技术基于 PCR 反应, 反应体系中各组分浓度的不同配比会对 SRAP 反应结果产生影响。而最优化的反应体系往往是获得高质量的电泳图的关键。

键。传统的单因素实验体系优化方法, 不仅实验处理繁多, 而且会忽视因素间的互作效应; 而采用正交实验设计优化体系的分析方法, 有利于了解各因素之间的互作, 较快找到好的水平组合, 因而近年来越来越多地被用来建立优化各种类型的分子标记 PCR 反应体系<sup>[11-13]</sup>。

在对不同生物优化的 SRAP 反应体系中, *Taq* 酶的用量基本都为 1 U, 说明 *Taq* 酶的浓度对 SRAP 反应体系的影响小<sup>[14-15]</sup>, 因此在试验中没有探讨 *Taq* 酶浓度对辣椒 SRAP 反应结果的影响。在探讨的其它 4 个主要影响因子中, 发现  $Mg^{2+}$  浓度对辣椒 SRAP 反应结果影响最大, 这一结果与姜维华等<sup>[16]</sup> 研究结果一致。由于  $Mg^{2+}$  浓度的变化不仅影响 *Taq* 酶的活性及合成的忠实性, 还会影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链稳定性及产物的特异性等, 因而  $Mg^{2+}$  往往成为任何探讨 PCR 反应体系必不可少的一个重要因素。试验结果还显示, 模板 DNA 的用量对辣椒 SRAP 反应有着重要影响, 是除  $Mg^{2+}$  外的第 2 大影响因子。这可能与正交设计采用的主观打分等有关。因此, 如果能对 PCR 扩增结果建立客观的评价标准, 将会更好地促进该方法的应用。

综上所述, 该试验获得的优化的辣椒 SRAP 反应体系为: 20  $\mu$ L 反应体系中含 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.4  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 10 ng, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。此体系为今后利用 SRAP 标记技术进行辣椒种质遗传多样性分析、亲缘关系与系谱分析、品种鉴定与分类、分子遗传图谱构建与基因定位和辣椒重要农艺性状分子标记辅助育种等提供了科学的依据。

## 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] 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.
- [3] 文雁成, 王汉中, 沈金雄等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246-256.
- [4] 乔燕春, 林顺权, 刘成明等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 348-352.
- [5] 杜晓华, 巩振辉, 王得元等. 辣椒优良自交系间遗传差异的分子分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2445-2452.
- [6] 任羽, 张银东, 尹俊梅等. 辣椒 31 个优良自交系的亲本类群分析[J]. 遗传, 2008, 30(2): 237-245.
- [7] 任羽, 张银东, 尹俊梅等. 应用 SRAP 分子标记评价辣椒自交系的遗传关系[J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 47-52.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
- [9] 何正文, 刘运生, 陈立华等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [10] 桂腾琴, 孙敏, 乔爱民等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.
- [11] 李亚利, 陈书霞, 孟焕文等. 利用正交设计优化黄瓜的 SSR-PCR 反应体系[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 280-284.
- [12] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 899-902.
- [13] 王轶, 陈崇顺, 曹伟杰等. 利用正交设计建立洋桔梗 RAPD 最佳反应体系[J]. 北方园艺, 2008(5): 197-199.
- [14] 刘丽娟, 刘灶长, 陈海荣等. 莴苣属蔬菜资源 SRAP 标记 PCR 体系的构建与优化[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 157-162.
- [15] 吴红, 林清, 雷开荣等. 丝瓜 SRAP-PCR 体系建立与优化[J]. 中国农学通报, 2009, 25(4): 30-34.
- [16] 姜维华, 陶俊, 冯立国等. 利用正交设计优化一品红 SRAP 反应体系[J]. 苏州科技学院学报(自然科学版), 2009, 26(1): 48-52.

## Optimization of SRAP-PCR System for Pepper Using Orthogonal Design

WU Zhi-ming<sup>1</sup>, ZENG Jin<sup>2</sup>, HU Kai-lin<sup>2</sup>, QIAO Ai-min<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225;

2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640)

**Abstract:** To construct the optimum SRAP reaction system of pepper, orthogonal experimental design  $L_9(3^4)$  was used. And the comprehensive effect of three levels of four main factors ( $Mg^{2+}$ , dNTPs, primers and DNA template) was assessed. The results showed that by orthogonal design, an optimal and stable SRAP system for pepper was quickly obtained: 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.4  $\mu$ mol/L primers, 10 ng DNA template and 1 U *Taq* polymerase within total 20  $\mu$ L reaction solution.

**Key words:** pepper; SRAP; orthogonal design