

丝瓜 SRAP 反应体系的建立与优化

李莲芳, 郭 爽, 林鉴荣

(广州市农业科学研究院, 广东 广州 510308)

摘 要:以丝瓜基因组 DNA 为模板, 采用正交实验设计 $L_{16}(4^5)$, 在 4 个水平上对影响丝瓜 SRAP 反应的 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、模板、dNTP 及引物等 5 个因素进行了优化, 建立了丝瓜 SRAP-PCR 的最佳反应体系。利用 18 份丝瓜自交系材料来验证此反应体系, 均可扩增出清晰、可辨的条带, 可见该反应体系较稳定, 适用于丝瓜 SRAP 标记的扩增。

关键词:丝瓜; SRAP; 体系优化

中图分类号:S 642.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0160-03

丝瓜 (*Luffa acutangula*) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 丝瓜属 (*Luffa*) 1 a 生攀缘性草本植物, 以嫩果供食用, 是深受人们喜爱的夏季蔬菜。在生产上分为普通丝瓜和有棱丝瓜 2 个栽培种, 在我国南北方均有栽培, 近年来栽培面积呈扩大趋势, 育种研究工作也得到深入开展, 新育成品种不断出现。但是, 丝瓜的分子生物学研究进展还比较缓慢。

SRAP 分子标记 (Sequence-related amplified

polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是由 Li 和 Quirós 开发的一种新的分子标记技术^[1], 该标记具有多态性高、信息量丰富、操作简便、重复性好、成本低等特点。目前已在 大葱^[2]、番茄^[3]、黄瓜^[4]、油菜^[5] 等蔬菜作物中广泛应用。主要用于生物遗传多样性分析、基因定位、基因克隆、基因图谱构建以及比较基因组学等方面的研究。SRAP 标记是基于 PCR 的标记系统, 因此, PCR 反应体系中涉及的 Mg^{2+} 、模板 DNA、*Taq* 酶、引物、dNTP 等的浓度均会影响扩增结果, 并最终影响 SRAP 标记结果。

该研究利用正交实验设计分析法^[6], 对 PCR 反应体系中几个主要影响因子进行了优化筛选, 建立了丝瓜 SRAP-PCR 的最佳反应体系, 以期对丝瓜 SRAP 分子标记、遗传多样性分析、基因定位、图谱构建等分子生物学方面的研究奠定基础。

第一作者简介:李莲芳(1968-), 女, 广东广州人, 高级农艺师, 现主要从事蔬菜育种研究工作。

责任作者:林鉴荣(1964-), 男, 研究员, 现主要从事蔬菜育种研究工作。

基金项目:广州市科技局资助项目(2010Z1-E381)。

收稿日期:2011-04-28

2010(3):41-42.

[6] 周玲玲, 秦华明, 赖幸韵, 等. 猕猴桃实生苗组织培养的研究[J]. 北方园艺, 2007(5):198-200.

[7] 黄文江, 周守标, 阚显照, 等. 越橘属植物克隆的体外繁殖[J]. 中国野生植物资料, 2005(2):62-64.

[8] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004(6):28-30.

[9] 崔澄. 植物激素与细胞分化及形态发生的关系[J]. 细胞生物学杂志, 1983, 5(2):1-5.

[10] 刘剑锋, 阎秀峰, 李霞, 等. 高山红景天叶片愈上组织诱导与植物再生[J]. 东北林业大学学报, 2007(2):33-34.

Establishment and Optimization of the Tissue Culture System of Wild *Actinidia arguta*

PIAO Yi-long, PIAO Ri-zi

(College of Agricultural, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000)

Abstract: Stem segments were used as explants, the tissue culture system of the Changbai mountain wild *Actinidia arguta* were established. To achieve an *in vitro* system, the hormone combination of 6-BA and NAA was compared with combination of ZT and NAA on the stem explants and the tube rapid propagation was studied. The results showed that the best explants was lateral buds; the appropriate media for generation was MS combined with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L, the generation rates were 95.83%; The multiple of the adventitious bud multiplication was up to 5.86 cultured on MS with 6-BA 2.0 mg/L and NAA 0.05 mg/L. For rooting, the suitable media was 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L and the rooting rate was 100%. The rooted plantlets were transplanted to substrata in two successive steps, the survival rates of which were 96.67% and 98% respectively.

Key words: *Actinidia arguta*; tissue culture; media; stem segments

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为丝瓜自交系 19 份,由广州市农业科学研究院提供,种植于广州市农业科学研究院花都试验基地,常规田间管理。待幼苗长出 3~4 片真叶时,取新鲜嫩叶于 2 mL 离心管中,放入冰盒中带回实验室, -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与浓度测定 采用改良的 CTAB 法^[7]提取丝瓜总 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 条带的完整性,紫外可见分光光度计测定其吸光度值,检测纯度和浓度,并将其稀释为 100 ng/ μ L, -20℃ 下保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系的正交设计 为了确定 PCR 反应中 5 个因素(Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、引物、dNTP)的最佳水平,采用正交设计 $L_{16}(4^5)$,在 4 个水平上进行试验,共设计 16 个处理组合, $L_{16}(4^5)$ 设计方案见表 1,3 次重复。

表 1 SRAP-PCR 反应正交实验设计

处理	Taq 酶 /U	Mg^{2+} /mmol · L ⁻¹	模板 /ng	dNTP /mmol · L ⁻¹	引物 / μ mol · L ⁻¹
1	0.5	1.0	25	0.1	0.1
2	0.5	1.5	50	0.2	0.2
3	0.5	2.0	100	0.3	0.3
4	0.5	2.5	200	0.4	0.4
5	1.0	1.0	50	0.3	0.4
6	1.0	1.5	25	0.4	0.3
7	1.0	2.0	200	0.1	0.2
8	1.0	2.5	100	0.2	0.1
9	1.5	1.0	100	0.4	0.2
10	1.5	1.5	200	0.3	0.1
11	1.5	2.0	25	0.2	0.4
12	1.5	2.5	50	0.1	0.3
13	2.0	1.0	200	0.2	0.3
14	2.0	1.5	100	0.1	0.4
15	2.0	2.0	50	0.4	0.1
16	2.0	2.5	25	0.3	0.2

1.2.3 SRAP-PCR 扩增 引物设计参照 Li 等^[2,8]、Ferriol 等^[9]发表的引物序列,选用上游 19 个引物和下游 20 个引物,由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增程序参照 Li 等的方法,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;然后,再 94℃ 变性 1 min,50℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

1.2.4 PCR 产物的检测 扩增反应结束后,在扩增产物中加入 5 μ L 6×loading buffer 混匀,上样于 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳检测。待二甲苯氰移动至胶板尾端时停止,银染显色,扫描图相并记录分析。

1.2.5 SRAP-PCR 反应体系验证 利用 18 份丝瓜自交系材料对优化确定的 SRAP-PCR 反应体系的稳定

性进行验证。

2 结果与分析

2.1 丝瓜 DNA 浓度和纯度的鉴定

应用改良 CTAB 法提取丝瓜基因组 DNA,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明 DNA 完整,条带清晰,无拖尾现象(图 1)。UV2000 紫外分光光度计测定其吸光度值, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间,表明提取的 DNA 质量较高,纯度较好,可以进行下一步试验。

2.2 正交实验设计优化 SRAP-PCR 反应体系

按表 1 设计的 16 个处理,以 Me1 (TGAGTCCAA ACCGGATA) 和 Em3 (GACTGCGTACGAATTAAT) 组合作为引物,对丝瓜自交系基因组 DNA 进行扩增,电泳结果见图 2。可以看出,不同的组合,由于各因素浓度不同,扩增结果存在明显差异。处理 5、6、8、9、11、12、14、16 没有扩增产物,或者扩增产物模糊,条带弱,不易观察。处理 4、7、13 扩增条带数最多,且最为清晰。综合比较 4、7、13 这 3 个反应体系中各因子浓度,本着扩增谱带数量,清晰性和经济性的原则,初步确定反应体系 7 为最佳反应体系。

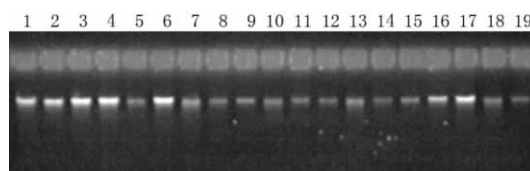


图 1 丝瓜叶片总 DNA 电泳检测

注:1~19,19 份自交系材料。

2.3 最佳反应体系稳定性检测结果

应用上述最佳反应体系,运用 Me1 (TGAGTCCAA AACCGGATA) 和 Em2 (GACTGCGTACGAATTT GC) 引物组合对 18 份丝瓜自交系 DNA 进行 SRAP 扩增,结果如图 3 所示。引物对每份 DNA 样品均可扩增出清晰、可辨的条带,可见该反应体系较稳定,适用于丝瓜 SRAP 标记的扩增。



图 2 丝瓜 SRAP-PCR 正交实验结果

注:1~16;代表不同处理。

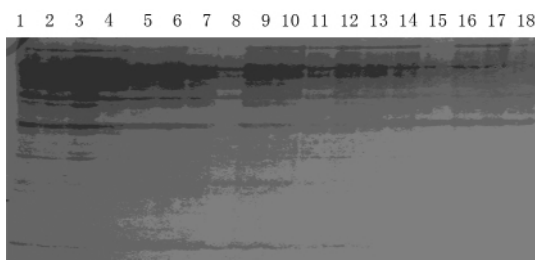


图3 丝瓜 SRAP-PCR 体系稳定性检验
注:1~18;18 份自交系材料。

3 结论与讨论

SRAP 技术因其操作简单,分析速度快而被广泛应用,是基于 PCR 反应的分子标记技术。而 PCR 反应体系是 SRAP 标记技术的一个重要环节,受到诸多因素的影响。该研究利用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,共对 16 个反应体系进行了扩增,考察了 5 种组分在 4 个不同水平上对 PCR 反应的影响,通过直观分析和稳定性检验,迅速筛选出稳定、重复性好的 SRAP 反应体系,为今后利用 SRAP 标记对丝瓜进行遗传多样性分析、分子标记等方面的研究奠定了基础。

在 SRAP-PCR 反应体系中,各反应因子之间相互作用,紧密相关。 Taq 酶的活性决定于反应体系中的 Mg^{2+} 浓度,而 Mg^{2+} 的最终反应浓度受到 dNTP 含量的影响;dNTP 是 PCR 反应的重要底物,当其含量不足时将直接影响 PCR 反应的进行,但是当 dNTP 浓度过高时,易吸附游离 Mg^{2+} 从而降低其浓度,进而使 Taq 酶活性降低。传统的分子标记反应体系筛选试验采用单因素实验法,逐一变化其中 1 个因子组分浓度而固定其余 4 个因子,从中分析得到每一因子的最佳浓度,最后组合成为最佳反应体系。这样不能考察 PCR 反应体系中各组分的交互作用,同时也不能保证各组分最佳浓度的组合就是最佳反应体系。如果采用完全组合设计,需设计 4^4 个处理,工作量大,操作繁琐。正交设计可弥补上述不足,试验规模和工作量小,信息量大且能快速获得理想

的结果。该试验利用正交实验设计进行 PCR 反应体系优化的方法可以综合考虑观察各个因素间的相互作用,从而获得的正佳反应体系更加合理。

该研究采用正交实验设计建立优化的丝瓜 SRAP-PCR 反应体系,与任羽^[10]、李红双^[11]、孙宪芝^[12]等分别在辣椒、萝卜、芍药上优化的 SRAP-PCR 反应体系有所差异。可能是不同物种间基因组成不同的原因,因为 SRAP-PCR 反应体系因物种的不同而有很大的差异。

参考文献

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), 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] 李慧兰,尹燕桦,张春庆,等. SRAP 在葱蒜品种遗传多样性研究中的适用性分析[J]. 园艺学报, 2007(4): 929-934.
- [3] 王燕,龚义勤,赵统敏,等. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 23-29.
- [4] 李丽,郑晓鹰,柳李旺. 用 SRAP 标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 702-708.
- [5] 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.
- [6] 张春华,周永志,阎隐. 数理统计方法[M]. 济南: 山东大学出版社, 1992: 151.
- [7] Liu L, Guo W, Zhu X, et al. Inheritance and fine mapping of fertility-restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(3): 461-469.
- [8] 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(1): 168-180.
- [9] 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(2): 271-282.
- [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, 2001, 2(5): 689-693.
- [11] 李红双,邱杨,李锡香. 萝卜 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 91-95.
- [12] 孙宪芝,王晓茵,马燕,等. 应用正交设计建立芍药的 SRAP 反应体系[J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 198-200.

Establishment and Optimization of SRAP Amplification System in Loofah

LI Lian-fang, GUO Shuang, LIN Jian-rong

(Guangzhou Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510308)

Abstract: Loofah genom DNA was used for the PCR template to optimize loofah SRAP-PCR reaction system. Orthogonal experiments were designed to optimize the key parameters including Taq polymerase, Mg^{2+} , template DNA, dNTPs, primer and so on. A SRAP-PCR system with good stability was established. The optimized SRAP-PCR system was tested by 18 loofah inbred lines and was steady and reliable.

Key words: loofah; SRAP-PCR; system optimization