

番茄 SRAP-PCR 反应体系建立与优化

郝 凤, 于 铁 峰, 雷 银 川

(甘肃省航天育种工程技术研究中心, 甘肃 天水 741030)

摘 要:利用正交实验设计 $L_{16}(4^5)$ 对番茄 SRAP-PCR 反应体系的 5 个因素(Mg^{2+} 、dNTPs、引物、*Taq* DNA 聚合酶和模板 DNA)在 4 个水平上进行优化试验研究。结果表明:各因素水平变化对反应体系影响的大小依次为: Mg^{2+} >dNTPs>引物>*Taq* DNA 聚合酶>模板 DNA;建立的番茄 SRAP-PCR 最佳体系(25 μ L)为: Mg^{2+} 2.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.4 μ mol/L、模板 DNA 80 ng。

关键词:番茄;SRAP;正交设计;体系优化

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0107-03

番茄是目前世界上栽培最为广泛的蔬菜之一,果实营养丰富,具有独特的风味,可以生吃、加工制成番茄酱、果罐等,因此选育番茄新品种具有重大的经济效益,然而传统的育种方法周期长、耗资大、效率低。近年来,航天诱变育种成为新品种选育的一条全新而有效的途径,其利用太空的特殊环境获得地面罕见的突变,从而得到一些特异的种质^[1-5]。

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)标记是通过设计非常独特的一对引物对基因的 ORFs (Open reading frames)特定区域进行扩增,并进行分析的标记手段。上游引物长 17 bp 对外显子区域进行特异扩增。下游引物长 18 bp 对内含子区域进行特异扩增。因不同个体以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。其特点是检测的多态性范围大,可直接检测 DNA 水平的变化,检测结果不受环境条件的影响^[6-8]。该研究采用正交设计,建立了一套适宜于番茄的 SRAP-PCR 反应体系,旨在为进一步开展番茄种质资源遗传多样性研究奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Taq 酶、dNTP、 Mg^{2+} 购自西安鼎国生物公司,引物购自北京三博远志公司,标准分子量(Marker)DL2000

购自西安鼎国生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄基因组 DNA 的提取及浓度检测 采用改良 CTAB 法^[9]提取番茄基因组 DNA, -20℃ 下保存待用。

1.2.2 正交实验设计方案 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行试验,设计模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶五因素四水平,3 次重复。设计 16 个处理进行 PCR 扩增,得分取 3 次重复平均值。PCR 反应体系 25 μ L,扩增程序为 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,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。根据条带数量丰富度、扩增条带敏感性与特异性进行打分,即背景深、条带多且清晰的记为 16,反之记为 1,3 次重复分别计分^[10]。将得分的平均值输入 DPS V7.05 软件进行统计分析,分别得出 5 个因素对 PCR 试验的影响。通过统计分析,求各列各水平得分的和(T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4),各水平的平均值($\overline{T_1}$ 、 $\overline{T_2}$ 、 $\overline{T_3}$ 、 $\overline{T_4}$)和极差 R,极差越大说明该因素对反应结果影响越大。

1.2.3 SRAP-PCR 优化体系的验证 采用 SRAP-PCR 已优化的反应体系,对番茄材料 DNA 进行扩增,以验证该体系的效果。

2 结果与分析

2.1 正交实验电泳结果分析

由表 1 分析极差 R 可知,各因素对反应结果的影响大小依次: Mg^{2+} >dNTPs>引物>*Taq* DNA 聚合酶>模板 DNA。

第一作者简介:郝凤(1985-),女,硕士,现从事蔬菜育种与生物技术研究工作。E-mail:haofeng1026@163.com。

基金项目:国家农业科技成果转化资金资助项目(2010GB2G100487)。

收稿日期:2011-11-03

表 1 PCR 反应 $L_{16}(4^5)$ 正交设计Table 1 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design of PCR reaction

编 号	Mg^{2+} /mmol·L ⁻¹	dNTPs /mmol·L ⁻¹	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U	引物 / μ mol·L ⁻¹	模板 DNA /ng	得分 1 2 3	得分 平均值
1	1.5	0.15	0.5	0.2	20	1 1 1	1.00
2	1.5	0.20	1.0	0.3	40	1 1 1	1.00
3	1.5	0.25	1.5	0.4	60	12 11 10	11.00
4	1.5	0.30	2.0	0.5	80	7 6 7	6.67
5	2.0	0.15	1.0	0.4	80	4 2 3	3.00
6	2.0	0.20	0.5	0.5	60	6 5 5	5.33
7	2.0	0.25	2.0	0.2	40	2 4 3	3.00
8	2.0	0.30	1.5	0.3	20	2 3 2	2.33
9	2.5	0.15	1.5	0.5	40	9 8 8	8.33
10	2.5	0.20	2.0	0.4	20	10 9 8	9.00
11	2.5	0.25	0.5	0.3	80	16 14 15	15.00
12	2.5	0.30	1.0	0.2	60	3 3 5	3.67
13	3.0	0.15	2.0	0.3	60	6 5 3	4.67
14	3.0	0.20	1.5	0.2	80	5 6 7	6.00
15	3.0	0.25	1.0	0.5	20	6 6 5	5.67
16	3.0	0.30	0.5	0.4	40	8 9 7	8.00

2.2 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Mg^{2+} 浓度影响 PCR 扩增的特异性和产量,当 Mg^{2+} 浓度过低时,会使反应产物减少;浓度过高时,降低反应特异性,产生非特异性扩增。由表 2 可知, Mg^{2+} 浓度在 1.5~3.0 mmol/L 范围内,PCR 结果均值随 Mg^{2+} 浓度的增加呈现波动变化,当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,得分平均值最高。因此,选择 2.5 mmol/L 为最佳浓度水平。

表 2 PCR 正交实验结果统计分析

Table 2 Statistic result of the orthogonal design

编号	模板 DNA	引物	dNTPs	Mg^{2+}	<i>Taq</i> DNA 聚合酶
T1	18.00	13.67	17.00	19.67	29.33
T2	20.33	23.00	21.33	13.66	13.34
T3	24.67	31.00	34.67	36.00	27.66
T4	30.67	26.00	20.67	24.34	23.34
T1	4.50	3.41	4.25	4.92	7.33
T2	5.08	5.75	5.33	3.42	3.34
T3	6.16	7.75	8.67	9.00	6.92
T4	7.67	6.50	5.17	6.09	5.84
R	3.17	4.34	4.42	5.58	3.99

2.3 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

dNTPs 浓度过低会影响扩增效果,降低产率;过高则影响扩增的准确性。由表 2 可知,dNTPs 浓度在 0.15~0.25 mmol/L 时,PCR 结果均值随 dNTPs 浓度的增加而增加,当 dNTPs 浓度超过 0.25 mmol/L 时,得分平均值明显下降。因此,选择 0.25 mmol/L 为最佳浓度水平。

2.4 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Taq DNA 聚合酶浓度过低影响扩增效率,使扩增产物量减少;浓度太高容易导致非特异性扩增,并且会造成浪费。由表 2 可知,*Taq* 酶浓度在 0.5、1.5 和 2.0 U

水平间相差不大,而 3 个水平均与 1.0 U 水平相差很大。这可能是由于反应各因素的相互作用等原因所致。*Taq* DNA 聚合酶价格较高,并且浓度在 0.5 U 时已经达到了较好的扩增效果,因此选择 0.5 U 为最佳反应水平。

2.5 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响

PCR 反应中引物浓度过低时,与模板 DNA 的结合率降低,扩增产物量少;浓度过高时会引起非特异性扩增,易形成引物二聚体。由表 2 可知,随着引物浓度的增加,PCR 结果均值总体呈上升趋势,在 0.4 μ mol/L 时达到最高,随后呈下降趋势。因此,选择 0.4 μ mol/L 为最佳浓度水平。

2.6 模板 DNA 浓度对 PCR 结果的影响

DNA 是 PCR 反应的模板,DNA 浓度过低时扩增条带少且模糊;浓度过高则易产生非特异扩增,出现扩增结果不稳定的假象。由表 2 可知,DNA 在 20~80 ng/25 μ L 时,PCR 反应得分平均值呈上升趋势。当浓度为 80 ng/25 μ L 时,扩增条带清晰可见。因此,选择 80 ng/25 μ L 为最佳浓度水平。

2.7 番茄 SRAP-PCR 反应体系的验证

应用上述最佳反应体系,对番茄材料的 DNA 进行 SRAP 扩增,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测。由图 1 可知,检测扩增产物的条带清晰、多态性丰富,说明该试验建立扩增体系是可行的,SRAP 标记适合用于番茄品种的遗传多样性分析及分子鉴定。

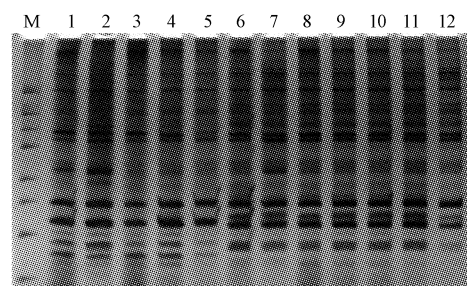


图 1 番茄 SRAP-PCR 扩增的电泳结果

Fig. 1 Tomato SRAP-PCR amplification results of electrophoresis

3 结论与讨论

SRAP 标记是目前较为理想的分子标记技术,与其它常用的分子标记相比,弥补了它们的一些不足,而且更能反应表型的多样性及进化史^[11],提供的信息也更为优良^[12]。SRAP 标记引物通用性强,不需要预知物种的序列信息,因此应用广泛。目前,已经在蔬菜作物、果树等多种植物的遗传育种研究中成功应用。在 SRAP 反应体系中,由于涉及到一个多组分的 PCR 反应体系,适宜反应体系的建立对试验成功与否非常重要。刘立军等^[13]认为不同植物的 SRAP-PCR 反应体系是不同的,建

立一个特定试验条件下适合该植物的最佳 SRAP-PCR 反应体系可为 SRAP 分子标记提供良好的基础。

SRAP 体系优化的方法有多种,该试验对其反应体系中 5 个因素采用正交实验设计,能够在较大程度实行多因素联合优化,得到了番茄 SRAP-PCR 的最佳扩增体系,试验快捷简便,结果科学可靠。获得 25 μL 的最佳体系为: Mg^{2+} 2.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、模板 DNA 80 ng。王燕等^[14]对番茄基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系进行优化,得到的最佳反应体系为: Mg^{2+} 浓度为 1.5~3.0 mmol/L,模板 DNA 为 10~20 ng(每 10 μL 体系)、引物浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 浓度为 0.05~0.20 mmol/L。司鹏等^[15]对苹果 SRAP-PCR 反应体系的优化结果为:总体积为 10 μL , Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.8 mmol/L,引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶含量为 0.6 U, DNA 含量为 60 ng,并含 1 μL 10 \times buffer(Mg^{2+} free)。该试验通过正交实验设计确立了番茄耐低温的 SRAP-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度,同苹果 SRAP-PCR 反应体系相比有一定的差异,表明不同植物间的 SRAP-PCR 反应体系存在明显差异;同王燕等^[14]对番茄基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系相比有细微的差异,表明同一作物在不同品种间也会存在不同。任羽等^[16]对 SRAP 条件优化的研究中也得到相似结论,特定的反应必须有特定的反应条件。

参考文献

- [1] 黄诗铿.我国航天育种项目建设[J].中国工程咨询,2002(3):45-46.
- [2] 王乃彦.开展航天育种的科学研究工作,为我国农业科学技术的发展做贡献[J].核农学报,2002,16(5):257-260.
- [3] 陈子元.从辐射育种的发展来展望航天育种的前景[J].核农学报,2002,16(5):261-263.
- [4] 沈桂芳,倪丕冲,孙丙耀.中国的航天育种[J].世界农业,2002(1):37-40.
- [5] 沈桂芳.航天育种—21 世纪前景诱人的农业高新技术[J].农业科研经济管理,2001(3):4-7.
- [6] 王呈祥,白志良,王良群,等.航天育种—我国农业科技革命的新路[J].山西农业科学,2003,31(3):92-96.
- [7] 张安世,刑智峰,刘永英,等. SRAP 分子标记及其应用[J].安徽农业科学,2007,35(9):2562-2563.
- [8] 海燕.新型分子标记 SRAP 及其应用[J].河南农业学报,2006(9):9-11.
- [9] Clark M S.植物分子生物学—实验手册[M].顾红雅,译.北京:高等教育出版社,1998.
- [10] 谢云海,夏德安,姜静,等.利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2005,3(3):445-450.
- [11] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of agermplasm collection of Cucubita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. Theor. Appl. Genet., 2003,107(2):271-282.
- [12] Ferriol M, Pico M B, Nuez F. Genetic diversity of some accession of Cucubita maxima from Spain using RAPD and SBAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2003,50(3):227-238.
- [13] 刘立军,蒙祖庆,邢秀龙,等.苧麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究[J].分子植物育种,2006,4(5):726-730.
- [14] 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.
- [15] 司鹏,戴洪义,薛华柏,等.苹果 SRAP-PCR 反应体系的建立[J].果树学报,2010,27(2):168-173.
- [16] 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.

Optimization for SRAP-PCR System of Tomato Based on Orthogonal Design

HAO Feng, YU Tie-feng, LEI Yin-chuan

(Space Breeding Engineering Research Center of Gansu Province, Tianshui, Gansu 741030)

Abstract: The SRAP-PCR system of Tomato was optimized by the orthogonal design which was in four levels of five factors (Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, dNTPs, Primer, and DNA template). The results showed that the order of each factor in different levels affected the result of PCR was: Mg^{2+} > dNTPs > primer > *Taq* DNA polymerase > DNA template; the optimum SRAP-PCR system (25 μL) for tomato included Mg^{2+} 2.5 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.5 U, dNTPs 0.25 mmol/L, Primer 0.4 $\mu\text{mol/L}$ and DNA template 80 ng.

Key words: tomato; SRAP; orthogonal design; system optimization