

北沙参SRAP分子标记体系的建立与优化

齐树杰¹, 沈 镒², 李 颖¹, 张钦德³, 李庆典¹

(¹青岛农业大学, 山东青岛 266109; ²中国农业科学院, 北京 100850;

³山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264000)

摘要:为北沙参的遗传多样性分析提供一种科学的途径,采用SRAP标记技术,以北沙参基因组DNA为模板,优化了SRAP反应体系的各主要参数。建立了稳定可靠的SRAP-PCR反应体系;20 μl反应体系中,DNA的量为80 ng、Mg²⁺ 2.5 mmol/L、dNTPs 0.25 mmol/L、Taq DNA聚合酶为1 U、正反向Primer浓度均为0.1 μmol/L。该体系适合北沙参遗传多样性分析、遗传图谱构建等研究。

关键词:北沙参;SRAP;分子标记;体系优化

中图分类号:S567.239

文献标识码:A

论文编号:2009-1655

Establishment and Optimization of SRAP Reaction System in *Glehnia littoralis*

Qi Shujie¹, Shen Di², Li Ying¹, Zhang Qinde³, Li Qingdian¹

(¹Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109;

²Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100850;

³Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai Shandong 264000)

Abstract: To develop a scientific method for *Glehnia littoralis* genetic diversity analysis, *Glehnia littoralis* DNA was used to optimize SRAP system's main parameters. A stability and reliable SRAP-PCR system was established. In the 20 μl system, DNA 80 ng, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Taq 1 U, Upstream and Downstream primers both for 0.25 μmol/L; The reaction system was suitable to study *Glehnia littoralis* genetic diversity analysis and gene mapping.

Key words: *Glehnia littoralis*, SRAP, molecular marker, system optimization

0 引言

相关序列扩增多态性^[1](Sequence Related Amplified Polymorphism, SRAP)是由美国加州大学蔬菜系 Li 和 Quiros 开发的一种基于 PCR 反应的新型分子标记技术。针对基因外显子中 GC 量丰富,而启动子、内含子中 AT 量丰富的特点来设计引物,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、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀的特点,已应用于基因定位与克隆、种质鉴定^[2]、遗传图谱构建^[3]、比较基因组学研究^[4]、植物遗传多样性分析^[5]等领域。目前已经在蔬菜、果树及大田作物的研究中

得到应用^[6],虽然已经被应用于红花^[7]、黄花蒿^[8]、首乌^[9]、青牛胆^[10]等几种药用植物的研究中,但在关于北沙参的研究中未见报道。

SRAP 是基于 PCR 的标记,所以其对反应条件要求严格,反应的进行也容易受到各种条件的影响。不同物种对反应条件的要求也存在着比较大的差异。因此,SRAP 标记在应用于特定物种时,必须对反应体系进行优化,从而保证标记体系的稳定性和准确性。

北沙参为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miquel 的干燥根,是一种传统的中药材,有养阴清肺、益胃生津之功效。临床上主要用于治疗肺

基金项目:国家中医药局课题“北沙参地道药材质量标准规范化研究”(06-07 ZP31)。

第一作者简介:齐树杰,男,1984年出生,山东东营人,在读硕士研究生。研究方向:植物分子生物学。通信地址:266109 山东省青岛市城阳区长城路700号 青岛农业大学园林园艺学院, E-mail: yuguangg@163.com。

通讯作者:李庆典,男,教授,主要从事蔬菜育种栽培方面的研究。通信地址:266109 山东省青岛市城阳区长城路700号 青岛农业大学园林园艺学院, E-mail: qdli@qau.edu.cn。

收稿日期:2009-08-13,修回日期:2009-09-03。

热燥咳,热病伤津口渴、劳嗽痰血等病症^[1]。北沙参在传统上被认为的划分为白条参、红条参和大统袍三个性状优良的农家品种,但是在栽培上,还没有明确的划分开来,所以造成了现在北沙参的栽培效益逐年下降,栽培面积逐年降低的现象。为了提高北沙参的生产效益,扩大栽培面积,提高农民的收入水平,开展北沙参的遗传育种工作就显得尤为重要。因此,有必要对北沙参的遗传多样性和遗传图谱进行研究。

笔者对北沙参SRAP反应体系进行了优化,从而建立起适合北沙参DNA的SRAP-PCR反应体系,为研究北沙参种群的遗传多样性及遗传图谱的构建奠定了

基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2008年7—12月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所基因资源遗传多样性评价实验室进行。

1.2 材料

北沙参采自其道地性产区山东省莱阳市胡城村。引物设计参考Li等的方法,所使用的引物序列见表1。所使用的引物是由北京三博远志生物技术有限公司合成的。试验中所使用的生化试剂购自北京天根生物有限公司。

表1 SRAP引物序列

编号	上游引物	编号	下游引物
Sp1	TGAGTCCAAACCGGATA	Ps8	GACTGCGTACCAATTTCGCC
Sp8	TGAGTCCAAACCGGAGG	Ps9	GACTGCGTACCAATTCTCA
Sp12	TGAGTCCTTTCGGTAA	Ps11	GACTGCGTACGAATTATG
—	—	Ps17	GACTGCGTACGAATTCGG

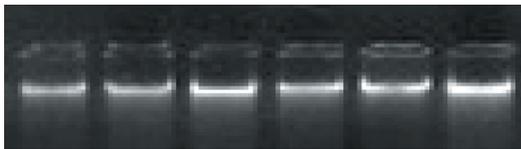


图1 北沙参基因组DNA

1.3 方法

1.3.1 北沙参基因组DNA的提取 采用改良的CTAB法提取北沙参DNA,取嫩叶0.2~0.3 g于液氮中研磨成粉末,加入CTAB裂解缓冲液(2%CTAB, 100 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 1.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 g/L的PVP-40),氯仿/异戊醇(24:1)抽提2次,用3 mol/L NaAc和异丙醇沉淀DNA,70%乙醇洗涤,DNA干燥后使用TE溶解,检测质量后,于-20℃保存备用。所提取的DNA经0.8%琼脂糖电泳检测,DNA完整,条带清晰(图1)。使用UV2000紫外分光光度计对所提DNA进行检测,测定比值在1.8~2.0之间,满足SRAP反应的要求。

1.3.2 SRAP反应体系 PCR扩增是在PTC-100PCR仪上进行的,反应程序为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,72℃延伸10 min,10℃保温。

基础反应体系为:DNA 30ng, dNTPs 1.6 μl (2.5 mmol/L), 10×Buffer缓冲液 2 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.8 μl, Taq (2.5 U/μl) 0.2 μl, Primer (5 μmol/L) 1 μl, 去

离子水 10.2 μl,反应总体积为20 μl。采用单因素实验设计,在反应体系中其他成分不变的情况下,将DNA、dNTPs、Mg²⁺、Primer、Taq DNA聚合酶设置不同的用量梯度。所使用的DNA模板为10、212号(单株形态差异大)单株所提取的DNA。使用的引物组合为sp8×ps9、sp12×ps17。

1.3.3 反应产物的检测 产物使用8%的非变性丙烯酰胺凝胶分离,在稳压160 V下电泳1.5~2 h,然后取下胶片进行银染:10%乙醇与0.5%冰乙酸混合水溶液固定6~10 min;2 g/L AgNO₃水溶液银染12~15 min;水洗后用显色液(15 g/L NaOH, 0.4%甲醛, 0.03 g/L Na₂S₂O₃)显色,直至条带清晰为止。

用引物组合sp8×ps9、sp12×ps17分别对5个不同的单株DNA进行扩增,然后选取7个不同地引物组合对105号单株基因组DNA进行扩增,鉴定所优化体系的稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA浓度对PCR扩增的影响

将DNA设置8个不同的浓度梯度,可以看出随着DNA模板浓度的增大,条带也逐渐清晰(图2),总的看来40 ng以上都会出带,但是可以看出不同的引物组合对DNA模板浓度的要求的差异性很大,为了保证体系适合大多数引物组合,最佳用量应为80 ng。

2.2 dNTPs浓度对SRAP-PCR扩增的影响

dNTPs是反应进行的原料,当用量过少时,产物形成的量较少,条带不清晰,当dNTPs用量过大时,同Taq DNA聚合酶竞争Mg²⁺,使反应体系中的Mg²⁺总量

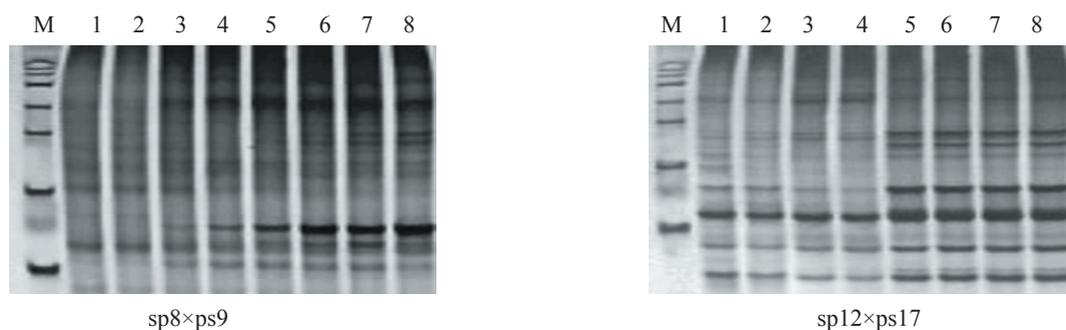


图2 DNA模板浓度对SRAP反应的影响

M: Marker; 1~8依次为: 5、10、20、30、40、60、80、100 ng; 引物为 sp8×ps9 和 sp12×ps17

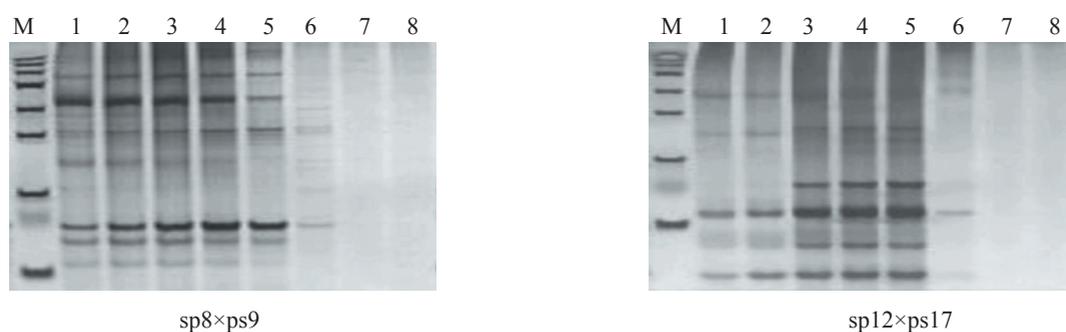


图3 dNTPs用量梯度试验

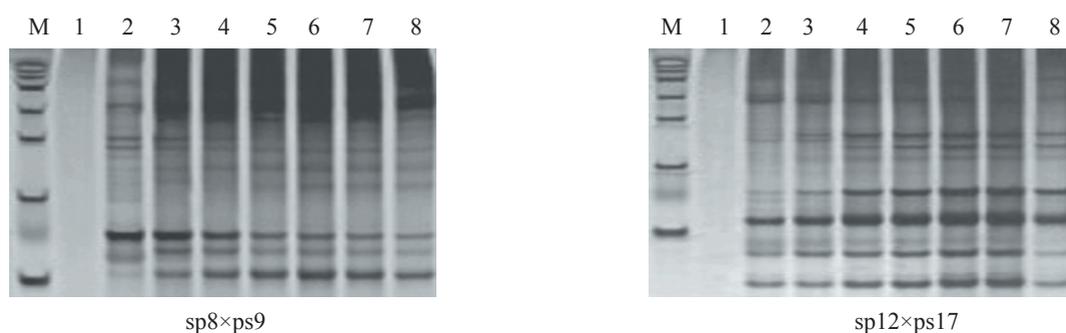
M: Marker; 1~8依次为: 0.05、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L; 引物为 sp8×ps9 和 sp12×ps17。

下降, *Taq* DNA 聚合酶活性受到影响。试验中, 当 dNTP 的浓度在 0.2~0.3 mmol/L 时, 两对引物组合条带均清晰(图3), 为了保证使用的引物都出带正常, 又要节省药品, 所以最适浓度为 0.25 mmol/L。

2.3 Mg^{2+} 浓度的影响

Mg^{2+} 是 *Taq* 酶的激活剂, Mg^{2+} 不足时, *Taq* 酶的作

用效率降低, 从而导致扩增产物少或者没有产物, 但是当 Mg^{2+} 过量时, 会使非特异扩增产物增加或导致扩增失败, 试验中可以看出, 当 Mg^{2+} 浓度为 2~3.5 mmol/L 时, 两个不同的引物组合均出带清晰(图4), 为了保证体系的稳定性和适应的广泛性, 最佳浓度应该为 2.5 mmol/L。

图4 Mg^{2+} 浓度对SRAP反应的影响

M: Marker; 1~8依次为: 0.5、1、1.5、2、2.5、3.5、5、6.5 mmol/L; 引物为 sp8×ps9 和 sp12×ps17。

2.4 引物用量对反应结果的影响

不同的引物组合对体系中引物的相对浓度要求有着很大的差异, 从图5中可以看出, 引物组合 sp8×ps9 对引物浓度的要求明显高于引物组合 sp12×ps17, 当引物用量在 0.08 μ mol/L 以上时, 两对引物均能够扩增出清晰的条带, 为适合所有引物的扩增反应, 最佳的

引物浓度应为 0.1 μ mol/L。

2.5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 SRAP 扩增的影响

Taq DNA 聚合酶量是反应能否正常进行的关键因素, 试验证明, 当体系中 *Taq* 聚合酶为 0.5~1.5 U 时, 扩增的条带清晰(图6), 当体系中 2.0 U 以上时, 则导致了扩增的失败。为保证体系的稳定, 节省药品的使

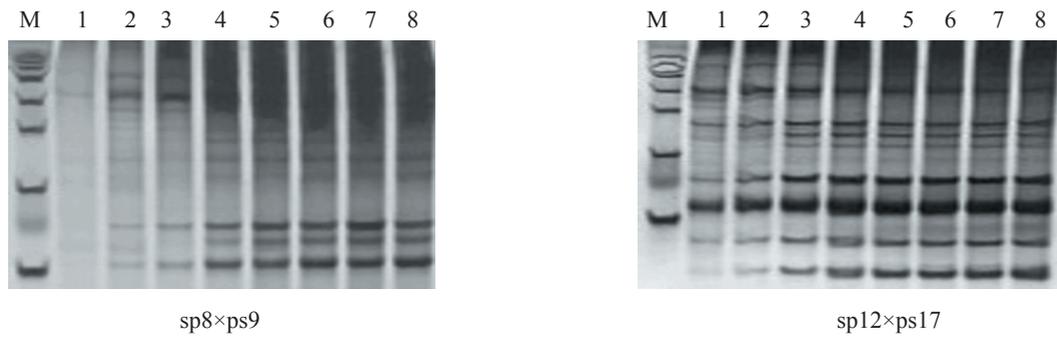


图5 引物用量梯度试验

M: Marker; 1~8 依次为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16 μmol/L; 引物为 sp8×ps9 和 sp12×ps17。

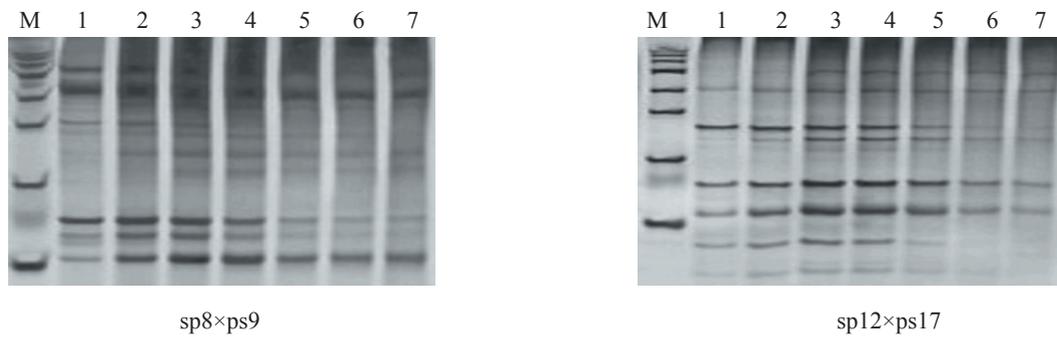


图6 *Taq*聚合酶用量梯度试验

M: Marker; 1~7 依次为 0.25、0.5、1.0、1.5、2、3、4 U; 引物为 sp8×ps9 和 sp12×ps17。

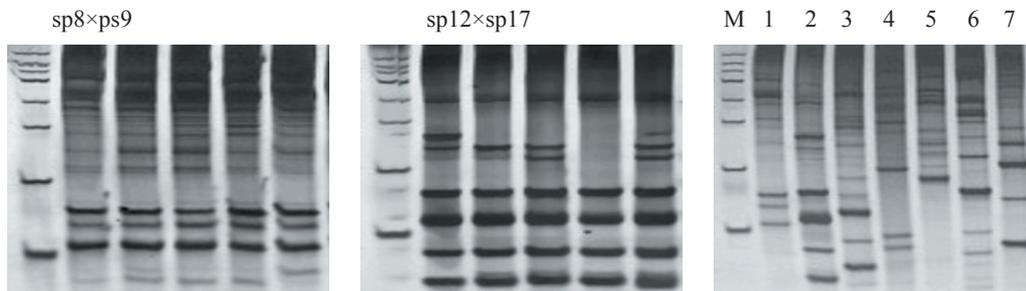


图7 北沙参SRAP-PCR体系的稳定性鉴定

M: Marker; 1~7 依次为引物组合: sp8×ps9、sp12×ps17、sp1×ps8、sp1×ps17、sp12×ps9、sp12×ps11、sp8×ps11。

用, 确定用量为 1.0 U。

2.6 北沙参SRAP-PCR体系的确定及稳定性鉴定

根据前面体系各主要成分的用量梯度试验, 初步得出北沙参 SRAP-PCR 最佳的 20 μl 反应体系为: DNA 80 ng、Mg²⁺ 2.5 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、正反向 Primer 浓度均为 0.1 μmol/L。

按照已经确定好的体系, 使用引物组合 sp8×ps9、sp12×ps17 分别对 5 个不同的单株 DNA 进行扩增, 然后选取 7 个不同地引物组合对 105 号单株基因组 DNA 进行扩增, 对反应体系的稳定性进行检测。试验结果表明(图7)该体系稳定可靠, 适用范围广, 满足对北沙参基因组 DNA 进行 SRAP 分析的要求。

3 讨论

以北沙参基因组 DNA 为模板, 建立了可靠、稳定、实用性强的 SRAP 反应体系, 即在 20 μl 的反应体系中, 模板 DNA 为 80 ng, Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 为 0.25 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 正反向 Primer 浓度均为 0.1 μmol/L。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、35 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min、50 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 10 °C 保温。

试验表明, 利用 CTAB 法提取的北沙参基因组 DNA 能够达到 SRAP 扩增的要求。影响北沙参 SRAP-PCR 反应最大的因素是 dNTPs、*Taq* DNA 聚合

酶浓度,反应对引物和 Mg^{2+} 浓度的要求范围较宽。同时也可以看出,不同的引物组合对各因素的浓度要求差异也很大,这可能是由于不同引物与模板位点结合的难易程度不同所造成的。所以在优化体系时,选用多个不同的引物组合对体系进行优化和稳定性鉴定,是非常必要的。

前人的试验结果表明,反应程序上细微的变化,对扩增反应的效果没有很明显的影晌^[8,10],所以笔者没有对反应的程序进行重点研究。反应完成后,保存温度 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对反应产物基本没什么影响,还利于PCR仪的维护,所以建议保存温度为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

所优化的反应体系与已经报道的使用在其他药用植物上的体系有一定的差异,如红花^[7]、黄花蒿^[8]、首乌^[9]、青牛胆^[10]等,这反应了不同物种间基因组DNA的差异,还可能与不同厂家生产的不同批次的试剂有关。试验在整个过程中均使用聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,使得所优化的体系更加符合试验的实际操作环境,实用性较强。

参考文献

[1] Lic G F. Quiros Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system base on a simple PCR reaction: its application

to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Gene, 2001, 103:455-461.

- [2] Riaz 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.
- [3] LIN Z X, ZHANG XL, NIE Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(19):2063-2067.
- [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(1):168-180.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet,2003,107:271-282.
- [6] 尚明照,何宁,殷冬梅,等.花生基因组SRAP-PCR体系的优化[J].中国农学通报,2007,23(5)99-103.
- [7] 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.
- [8] 邓婧,陈新,宣朴.黄花蒿SRAP-PCR反应体系的建立与优化[J].中草药,2007,38(1):125-128.
- [9] 程远辉,周昌华,马爱芬,等.重庆何首乌遗传多样性的SRAP研究[J].中国中药杂志,2007, 32(8):661-663.
- [10] 杨兵,王天志,罗禹,等.青牛胆SRAP标记反应体系的建立与优化[J].中草药,2007, 38(2):272-275
- [11] 余春生.北沙参[J].食品与药品.2005,7(4A):43-44.