

罗汉果 SRAP 反应体系的建立与优化

刘丽华¹, 马小军^{1*}, 孙晶晶², 覃嘉明³, 魏建和¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 辽宁工程技术大学理学院, 阜新 123000; 3. 广西玉米研究所, 南宁 530227)

摘要: 建立适合罗汉果的 SRAP-PCR 扩增体系, 为罗汉果的遗传图谱构建及基因定位奠定基础。实验对罗汉果 SRAP-PCR 反应体系的影响因素(引物, dNTP, Taq 酶, Mg²⁺, 模板 DNA)在多个水平上进行优化试验, 筛选出各反应因素的最佳水平, 建立了罗汉果 SRAP-PCR 反应的最佳体系(10 μL): 引物 0.6 μmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5U, Mg²⁺ 2.0 mmol/L 和模板 DNA 30 ng。该体系的建立能很好的满足罗汉果基因组 DNA 的扩增要求, SRAP 标记应用于罗汉果遗传研究是可行的。

关键词: 罗汉果; SRAP-PCR; 反应体系; 建立

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)06-0894-05

Establishment and optimization of SRAP reaction system in *Siraitia grosvenorii*

LIU Li-Hua¹, MA Xiao-Jun¹, SUN Jing-Jing²,

QIN Jia-Ming³, WEI Jian-He¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, China Academy Medicinal Science, Chinese Peking Union Medical Colledge, Beijing 100193, China; 2. College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China; 3. Guangxi Maize Research Institute, Nanning 530227, China)

Abstract: The design was used to establish SRAP-PCR amplification system on *Siraitia grosvenorii* DNA so as to lay foundation for genetic map construction and gene mapping. The factors influencing SRAP analysis, including primers, dNTP, Taq polymerase, Mg²⁺, and the concentration of DNA template were studied in a number of levels respectively. The results showed that: 0.6 μmol/L primer, 0.25 mmol/L dNTP, 0.5U Taq DNA polymerase, 2.0 mmol/L Mg²⁺ and 30 ng DNA template in 10 μL reaction system were the best suitable SRAP-PCR system for *Siraitia grosvenorii*. It was feasible to apply SRAP marker in genetic research in *Siraitia grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; SRAP-PCR reaction system; establishment

SRAP 标记(Sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)是美国加州大学蔬菜系 Li 等(2001)发明的一种新型分子标记技术。他们针对基因外显子中 GC 含量丰富而启动子、内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行 PCR 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。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点, 目前已被成功的应用于作物遗传多样性分析、遗传图谱的构

建、重要性状的标记以及基因定位的研究(Ferriol 等, 2003a; Ferriol 等, 2003b; Sun 等, 2007; Li 等, 2003)。

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)属葫芦科罗汉果属多年生草质藤本植物, 是我国特有的经济、药用植物, 为广西传统特产。罗汉果营养价值高, 含有丰富的果糖、蛋白质和多种维生素, 其性凉味甘, 具有清肺止咳、润肠通便的功效, 对慢性气管炎、急慢性咽喉炎和扁桃体炎等疗效显著。其果实中含有低卡路里的甜味成分, 是理想的天然甜味剂, 可作为食品、

收稿日期: 2009-06-16 修回日期: 2009-10-20

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BA109B01-07)[Supported by the National Key Technology R & D Program(2006BA109B01-07)]

作者简介: 刘丽华(1980-), 女, 河北献县人, 博士研究生, 生药学专业。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: xjma@public.bm.net.cn)

菜肴的甜味剂,是糖尿病人、肥胖病人理想的食糖代用品,具有极高的经济价值。目前应用于罗汉果的遗传标记有 ISSR(彭云滔等,2005;周俊亚等,2005),RAPD(周俊亚等,2006;秦新民等,2007;韦素玲等,2008)等方法,主要用于罗汉果性别相关研究、指纹图谱构建以及遗传多样性分析等方面。但 SRAP 应用于罗汉果的研究尚未见报道。本试验拟对影响罗汉果 SRAP-PCR 反应体系的主要因子进行研究,建立适合罗汉果 SRAP 分析的反应体系,为罗汉果遗传多样性、亲缘关系和遗传图谱构建等方面的研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

所用材料为长滩果和野红一号杂交产生的 F2 组配苗,采摘嫩叶-70 °C 保存。以其中一个罗汉果植株的基因组 DNA 作为优化实验材料。SRAP 引物由上海生物工程有限公司合成,Taq DNA 聚合酶、dNTP、10×PCR buffer 等购自天根生化科技有限公司,DNA Marker(DL2000)分子量标准购自宝生物工程(大连)有限公司。

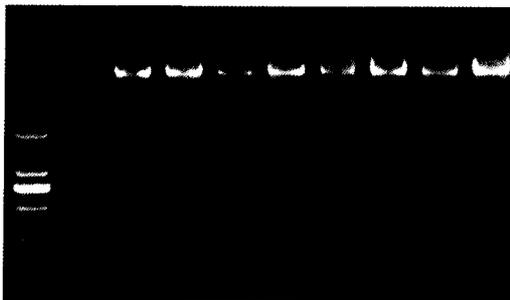


图 1 提取样品的总 DNA 检测结果

Fig. 1 Electrophoresis results of genomic DNA of samples

1.2 基因组 DNA 的提取

用改良 CTAB 法提取基因组 DNA(Sterward 等,1993)。提取的总 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及完整性(图 1)。分光光度计测定结果显示, A_{260}/A_{280} 值位于 1.7~1.9 之间。结果表明,用改良的 CTAB 方法提取,能够得到高质量的 DNA,可以直接用于 SRAP-PCR 反应。

1.3 SRAP-PCR 程序

PCR 反应在 BIOMETRA TGRADIENT96 型温

度梯度 PCR 仪上进行。PCR 反应扩增程序:94 °C 预变性 5 min,前 5 个循环 94 °C 变性 45 s,35 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 45 s;随后将退火温度升至 50 °C,其它条件不变,进行 35 个循环,最后,72 °C 延伸 7 min。

1.4 SRAP-PCR 体系

为得到扩增稳定、重复性好的 SRAP-PCR 反应体系,对影响 PCR 的 5 个主要因素(模板 DNA, Taq 酶, Mg^{2+} , dNTP 和引物)分别进行单因子多水平的优化实验。以 DC1(TAAACAATGGCTACT-CAAG)和 OD3(CCAAACCTAAAACCAGGA)引物组合进行 PCR 扩增已确定最佳反应体系。SRAP-PCR 反应的主要因素水平见表 1。

表 1 SRAP-PCR 反应的因素与水平
Table 1 Factors and levels of SRAP-PCR reaction

水平 Levels	引物 Primer ($\mu\text{mol/L}$)	dNTPs (mmol/L)	Taq DNA 聚合酶(U) Polymerase	Mg^{2+} (mmol/L)	模板 (ng) Template
1	0.5	0.05	0.25	0.5	10
2	0.6	0.10	0.50	1.0	20
3	0.7	0.15	0.75	1.5	30
4	0.8	0.20	1.00	2.0	40
5	0.9	0.25	1.25	2.5	50
6	1.0	0.30		3.0	60
7	1.1	0.35			70
8	1.2				80

1.5 SRAP 扩增产物的电泳检测

扩增产物加 1 μL Loading buffer 混匀后,取 1.5 μL 用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液为 1×TBE。180V 电泳 1.5 h,电泳结束后银染,拍照观察。

2 结果与分析

2.1 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响

要获得扩增清晰的特异性条带,引物的选择及用量很重要。引物用量小,与模板 DNA 结合效率低,产物产量会受到影响;引物浓度大,非特异性结合的机率增加,引物之间形成引物二聚体的机率也会增加,引物也会和 Taq DNA 聚合酶竞争与 Mg^{2+} 结合的机率。由图 2 可以看出,当引物浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩出的条带少且模糊;浓度为 0.6~1.1 $\mu\text{mol/L}$ 时,都能扩出特征带,以 0.6 和 0.7 $\mu\text{mol/L}$ 扩增清晰,但随着引物浓度的增大,条带逐渐减弱。当引物浓度为 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,没有条带扩出。考虑引物浓度过高会增加引物二聚体的形成机率,故

选择 0.6 μmol/L 为引物的最适浓度。

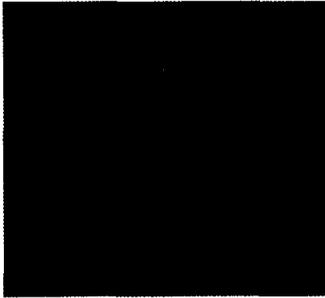


图 2 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 2 Effect of SRAP amplified result on concentration of primers

M: Marker; 1-8: 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 μmol/L.

2.2 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

dNTPs 是 PCR 扩增反应的原料, 为 PCR 中 Taq DNA 聚合酶提供底物, 使得产物得以延伸。dNTPs 浓度过低时, 扩增产物减少; 浓度过高时, 会增加错误率, 同时会与 Taq DNA 聚合酶竞争 Mg²⁺, 使反应体系中的 Mg²⁺ 总量下降, 从而抑制 Taq DNA 聚合酶的活性, 影响 PCR 效率, 甚至会阻止反应进行。由图 3 看出, dNTPs 浓度在 0.10~0.30 mmol/L 之间时, 随着 dNTPs 浓度的增加, 扩增条带由弱到强, 主带也明显增多, 浓度为 0.25 mmol/L 和 0.30 mmol/L 时, 扩增效果相似; 浓度升高到 0.35 mmol/L 时, 由于一部分 dNTPs 竞争了 Mg²⁺, 而使 Taq DNA 聚合酶活性下降, 扩增产物量下降, 出现条带缺失现象。因此我们确定 0.25 mmol/L 为 dNTPs 最适浓度。

2.3 Taq DNA 聚合酶浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Taq DNA 聚合酶浓度过大会造成浪费, 并且会导致非特异性扩增; 浓度过小会影响扩增效率, 降低扩增产物的产量。Taq DNA 聚合酶在 PCR 中的用量还会受反应体积、酶活性、酶耐热性等诸多因素的影响。在本试验中, 5 个 Taq DNA 聚合酶浓度都有条带扩出, 当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.25 U 时, 扩增条带较弱; 当 Taq DNA 聚合酶用量为 1 U 和 1.25 U 时, 非特异性条带增加, 而用量为 0.25 U 和 0.5 U 时, 扩增条带较多且清晰, 差异不大(图 4)。出于节约试验成本的考虑, 将 0.5 U 确定为 Taq DNA 聚合酶的适宜用量。

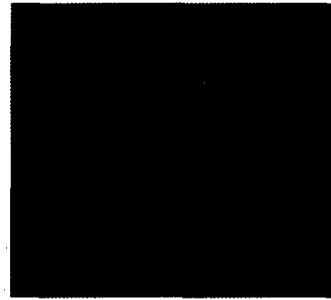


图 3 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 3 Effect of SRAP amplified result on concentration of dNTPs

M: Marker; 1-7: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mmol/L.



图 4 Taq DNA 聚合酶浓度的 SRAP 扩增结果
Fig. 4 Effect of SRAP amplified result on concentration of Taq DNA polymerase

M: Marker; 1-5: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 U/10μL.

2.4 Mg²⁺ 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Mg²⁺ 浓度可直接影响 SRAP 扩增条带的强弱。它不仅影响酶的活性及合成的真实性, 而且影响引物的退火、模板和中间产物的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成等。Mg²⁺ 是 Taq 酶的激活剂, Mg²⁺ 不足时, Taq 酶的作用效率降低, 且 dNTP 竞争 Mg²⁺。Mg²⁺ 受 dNTP 总量的影响。本试验对 Mg²⁺ 浓度设置了 6 个处理, 由图 5 可以看出, Mg²⁺ 浓度为 0.5 mmol/L 时, 无扩增产物; Mg²⁺ 浓度为 1.0~1.5 mmol/L 时, 扩增条带较少, 比较模糊; 当浓度为 2.0~3.5 mmol/L 时, 扩增条带增多, 主条带清晰, 以 2.5 mmol/L 扩增效果最好。因此 Mg²⁺ 最适浓度为 2.5 mmol/L。

2.5 模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

模板 DNA 浓度对 PCR 扩增有很重要的影响,

它的用量关系着产物的产量和特异性。模板 DNA 浓度过低, 扩增产物无或不稳定; 浓度过高, 产物的背景太强影响读带。由图 6 可以看出, 8 个模板 DNA 浓度都扩增出完整的条带, 但在 10~20 ng 时条带较弱; 在 30~70 ng 时可得到一致且清晰的扩增条带, 因此模板 DNA 浓度在 30~70 ng 时均可; 当模板浓度增加到 80 ng 时条带反而减弱。考虑到模板浓度过高会相应增加非特异性条带的扩增, 因此, 选择 30 ng 为 PCR 扩增时的模板浓度。



图 5 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 5 Effect of SRAP amplified result
on Mg^{2+} concentration

M: Marker: 1-5; 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L.

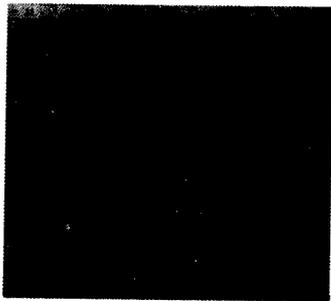


图 6 模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 6 Effect of SRAP amplified result
on DNA concentration

M: Marker: 1-8; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ng.

2.6 罗汉果 SRAP-PCR 反应体系的建立及群体检测

根据以上实验结果确立罗汉果 SRAP-PCR 反应体系: 反应总体积 10 μ L 中, 模板 DNA 30 ng, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, 引物 0.6 μ mol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U。采用该体系筛选出 60 对 SRAP 引物, 进行 SRAP 群体检测。引

物组合 PM8(CTGGTGAATGCCGCT CT)和 GA8 (GGCTTGAACGAGTGACTGA)对群体扩增结果如图 7, 扩增条带清晰, 个体间有不同程度的多态性。

3 讨论

近年来, 随着罗汉果研究的深入, 已有多种分子标记用于罗汉果的分子生物学研究, 主要有 AFLP (陶莉等, 2005), RAPD (秦新民等, 2007; 周俊亚等, 2006), ISSR (彭云滔等, 2005; 周俊亚等, 2005) 等。RAPD 技术操作简单, 但稳定性差、扩增产率低; AFLP 技术虽具很高的扩增产率, 但其操作步骤繁琐、技术难度高, 且为显性标记; ISSR 技术操作简单、快速, 重复性好, 遗传多态性高, 但也是显性标记, 且 PCR 扩增时需要一定时间摸索最适反应条件。SRAP 标记技术结合 RAPD 和 AFLP 二者的优点, 通过设计独特的上下游引物, 对外显子、内含子区域、启动子区域进行特异性扩增, 具有简便、稳定、中等产率、便于克隆、测序目标片段的特点。此标记的应用将进一步推进罗汉果分子生物学研究进程。

SRAP 扩增体系中模板 DNA、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、Taq DNA 聚合酶等各组分的用量均会影响扩增结果。本试验在优化 SRAP 扩增体系时发现, 引物、dNTPs、 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶作为 PCR 扩增的原料, 有一个相对适宜的用量范围, 浓度过低, 不能满足扩增要求; 浓度过高, 组分间可能会产生竞争, 影响扩增效果。在对模板 DNA 进行优化时发现, SRAP 扩增对模板 DNA 的浓度要求不高, 10~80 ng 的模板都可以扩增出条带。此结果与任羽等 (2004) 对辣椒、武志朴等 (2005) 对小麦、周春娥等 (2009) 对怀地黄的研究结果基本一致, 说明 SRAP 分子标记对 DNA 模板的浓度要求不高。

有关 SRAP 的程序和反应体系优化的报道很多 (徐莹莹等, 2008; 曾柏全等, 2008; 邹枚伶等, 2009), 但不同植物适合的 SRAP 体系不同, 而且同一种植物在不同实验室所做的研究也会有差异。因此, 构建同一物种在相同仪器设备和一定操作规范下的最佳优化技术体系是进行 SRAP 研究的关键所在。本实验优化了适应罗汉果的 SRAP 反应体系, 体系稳定且扩增条带丰富, 重复性好, 将为后续研究罗汉果遗传多样性、基因定位、基因克隆及遗传图谱构建打下良好基础。

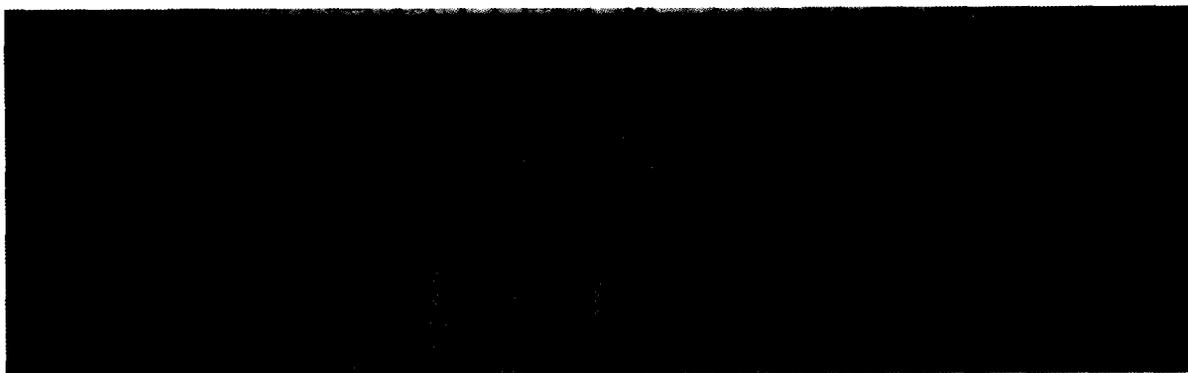


图 7 SRAP 引物 PM8-GA8 对罗汉果的群体检测

Fig. 7 Electrophoresis of amplification products of *Siraitia grosvenorii* population by primer PM8-GA8 of SRAP-PCR system

参考文献:

- Li G, Gao M, Yang B, et al. 2003. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping[J]. *Theor Appl Genet*, **107**(1):168—180
- Li G, Quiros CF. 2001. 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*, **103**(2—3):455—461
- Ferriol M, Picó B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SRAP markers[J]. *Genetic Res Crop Evolution*, **50**(3):227—238
- Ferriol M, Picó B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, **107**(2):271—282
- Peng YT(彭云滔), Tang SQ(唐绍清), Li BL(李伯林), et al. 2005. Genetic diversity of *Siraitia grosvenorii* detected by ISSR markers(野生罗汉果遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), **13**(1):36—42
- Qin XM(秦新民), Huang XY(黄夕洋), Jiang SY(蒋水元). 2007. RAPD markers linked to sex in *Siraitia grosvenorii*(罗汉果性别相关的 RAPD 标记)[J]. *J Guangxi Normal Univ(Nat Sci Edi)*(广西师范大学学报·自然科学版), **25**(3):109—112
- Ren Y(任羽), Wang DY(王得元), Zhang YD(张银东), et al. 2004. Optimization of SRAP-PCR in hot pepper(*Capsicum annuum*)(辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), **2**(5):689—693
- Sun ZD, Wang ZN, Tu JX, et al. 2007. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13 551 SRAP markers[J]. *Theor Appl Genet*, **114**(8):1 305—1 317
- Sterward CN Jr. 1993. Via LEA rapid CTAB DNA isolation technique use μ L for RAPD fingerprinting and other PCR application [J]. *Bio Techniques*, **14**:748—751
- Tao L(陶莉), Wang YW(王跃进), You M(尤敏), et al. 2005. Construction of AFLP fingerprints and seedling sex discrimination of *Siraitia grosvenorii*(AFLP 用于构建罗汉果 DNA 指纹图谱及其幼苗雌雄鉴别)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **23**(1):77—80
- Wei D(韦弟), Yang MC(杨美纯), Chen YS(陈廷速), et al. 2009. Study on RAPD marker linked to sex in *Siraitia grosvenorii*(罗汉果性别的 RAPD 标记研究)[J]. *J Chin Med Aterials*(中药材), **29**(4):311—313
- Wei SL(韦素玲), Huang ZM(黄姿梅), YANG H(杨华), et al. 2008. Cloning and sequence analysis of the RAPD markers related to sex in *Siraidia grosvenorii*(罗汉果性别相关 RAPD 标记的克隆与序列分析)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), **47**(3):251—253
- Wu ZP(武志朴), Yang WX(杨文香), Liu DQ(刘大群), et al. 2005. Establishment of SRAP technique system in wheat genome(小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究)[J]. *J Agric Univ Hebei*(河北农业大学学报), **28**(3):665—669
- Xu YY(徐莹莹), Qu SP(屈淑平), Cui CS(崔崇士). 2008. Optimization of SRAP-PCR program and system in Chinese cabbage(大白菜 SRAP-PCR 反应体系的优化)[J]. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大报), **39**(8):31—34
- Zeng BQ(曾柏全), Deng ZN(邓子牛), Yang YH(杨迎花), et al. 2008. SRAP marker reaction system for *Citrus reticulata* in Hunan(湖南宽皮柑橘 SRAP 的反应体系)[J]. *J Central South Univ ForeTech*(中南林业科技大学学报), **28**(6):71—74
- Zhou CE(周春娥), Gu FP(谷凤平), Lu SX(路淑霞), et al. 2009. Establishment and optimization of sequence-related amplified polymorphism amplification system for *Rehmannia glutinosa*(怀地黄 SRAP 分子标记优化体系的建立)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), **48**(3):536—540
- Zhou JY(周俊亚), Tang SQ(唐绍清). 2006. Genetic diversity of cultivated Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) revealed by RAPD markers(栽培罗汉果遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), **4**(1):71—78
- Zhou JY(周俊亚), Tang SQ(唐绍清), Xiang WS(向悟生), et al. 2005. Genetic diversity of cultivated Luohanguo(*Siraitia grosvenorii*) based on ISSR marker(栽培罗汉果遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Guihai*(广西植物), **25**(5):431—436
- Zou ML(邹枚伶), Xia ZQ(夏志强), Ji JM(吉家敏), et al. 2009. Establishment of SRAP-PCR reaction conditions in *Aquilaria sinensis*(白木香 SRAP-PCR 反应体系的建立)[J]. *Genomics Appl Biology*(基因组学与应用生物学), **28**(1):137—140