

红花 SRAP 扩增体系的建立和优化

彭 颀^{1,2}, 郭美丽^{1*}, 陈跃华^{2,3}, 郭庆华¹

(1. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆农业科学院经济作物研究所, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 探讨影响红花 SRAP 扩增的各种因素, 建立能够稳定扩增红花基因组的体系, 为研究红花重要性状的遗传基础及建立分子辅助标记育种的技术平台奠定基础。 **方法:** 用 CTAB 法提取红花 DNA, 设计 *Taq* 酶浓度 (0.02、0.04、0.06 U/ μ l)、dNTP 浓度 (0.15、0.25、0.30 mmol/L)、Primer 浓度 (0.15、0.30、0.45 μ mol/L) 3 因素 3 水平 27 次实验和 Mg^{2+} 浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L) 8 水平单因素实验。在 25 μ l 体系中加入模板 DNA 20 ng。对体系进行优化, 用琼脂糖进行检测。 **结果:** 本研究建立了适合红花的 SRAP 体系, *Taq* 酶浓度为 0.02 U/ μ l, dNTP 浓度为 0.25 mmol/L, Primer 浓度为 0.30 μ mol/L, Mg^{2+} 的浓度为 3.0 mmol/L, 优化后的体系目标条带增多, 重现性好, 得到了较好的扩增效果。 **结论:** 本研究建立的反应体系适合红花 SRAP 的研究。

[关键词] 红花; 相关序列扩增多态性; 核酸扩增技术

[中图分类号] R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0544-04

Establishment and optimization of sequence-related amplified polymorphism amplification system for *Carthamus tinctorius* L.

PENG Sa^{1,2}, GUO Mei-li^{1*}, CHEN Yue-hua^{2,3}, GUO Qing-hua¹ (1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830000; 3. Institute of Economic Crop, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumchi 830000)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the factors influencing the amplification of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) system in *Carthamus tinctorius* L. and to establish a stable SRAP reaction system, laying a foundation for molecular marker assistant breeding of *Carthamus tinctorius* L. **Methods:** Cetyltrimethylammonium bromide method was used to extract the genomic DNA of *Carthamus tinctorius* L.. Twenty-seven tests with 3 factors at 3 levels were designed, the conditions including *Taq* polymerase concentrations (0.02, 0.04, 0.06 U/ μ l), dNTP concentrations (0.15, 0.25, 0.30 mmol/L) and Primer concentrations (0.15, 0.30, 0.45 μ mol/L); another 8 tests were designed based on the single factor of Mg^{2+} concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0 mmol/L). Twenty ng DNA template was added into 25 μ l SRAP reaction system; the system was optimized and agarose electrophoresis was used for determination. **Results:** A SRAP reaction system for *Carthamus tinctorius* L. was established. In a 25 μ l reaction system, *Taq* polymerase was 0.02 U/ μ l, dNTP was 0.25 mmol/L, Primer was 0.30 μ mol/L, and Mg^{2+} was 3.0 mmol/L. Target bands increased after optimization, with good reproducibility, and the amplification results were satisfactory. **Conclusion:** The SRAP reaction system in this experiment is suitable for analysis of *Carthamus tinctorius* L.

[KEY WORDS] *Carthamus tinctorius* L.; sequence-related amplified polymorphism; nucleic acid amplification techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 544-547]

红花为菊科一年生草本植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥管状花, 是传统的活血化瘀中药, 具有活血通经, 祛瘀止痛的功效^[1]。红花中有效成分 (主要为黄酮类化合物^[2~4]) 含量的高低, 是影响红花品质的主要因素和筛选红花优良品种的重要依据。

相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是 Li 等^[5]发展的新型的分子标记, 该标记通过独特的引物设计对可读框 (open reading frames, ORFs) 进行扩增, 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。该标记将 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 和 RAPD (random amplified poly-

morphic DNA) 两者的优点有机的结合起来, 具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点, 目前已在马铃薯、水稻、莴苣、油菜和大蒜等植物研究中使用^[5,6], 并应用于图谱构建^[5,7,8]、比较基因组学^[9]、遗传多样性分析^[10~12]。

本研究探讨了 SRAP 对红花的适应性, 并建立了适合红花的扩增体系, 为红花基因图谱的构建及分子标记打下坚实

[基金项目] 国家自然科学基金 (30271588). Supported by National Natural Science Foundation of China (30271588).

[作者简介] 彭 颀, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: mlguo@smmu.edu.cn

的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 红花杂交 F₂代(♀×♂:品系 16号×25号的杂交后代第2代)的叶片,采自第二军医大学药学院药圃,经郭美丽副教授鉴定为 *Carthamus tinctorius* L.。

1.2 试剂 dNTP mixture,10× PCR buffer, *Taq* 酶及无菌超纯水均购自天为时代公司;DNA marker DL2000 购自博光公司;琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 主要仪器 T-GradientThermoblock PCR 扩增仪(Biometra 公司),Eppendorf minispin 离心机(Eppendorf 公司),ELITE 300 PLUS 琼脂糖水平电泳槽和电泳仪(WEALTEC 公司),QL-901 涡旋器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),P270 型摇床(中国科学院武汉科学仪器厂),DK-S12 型电热恒温水浴锅(上海华连医疗器械有限公司),PL3002 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司)。

1.4 红花基因组 DNA 的提取 按照 CTAB 微量法^[13]提取 DNA,并针对红花叶片内含物特殊性加以改进,具体步骤如下:取红花新鲜叶片 1.0 g,用液氮研磨成粉末,迅速转入 1.5 ml 的离心管中;加 600 μl 12% CTAB 提取液[使用之前向其中加入约 2%(V/V)的 β-巯基乙醇],在涡旋混合器上振荡,颠倒混匀后,放置于 65℃ 水浴锅中加热 1 h;加入等体积

的氯仿:异戊醇(24:1)混合液,混匀,37℃,振荡 30 min;8 000 r/min 离心 10 min,取上清液;加 2 倍体积-20℃ 的无水乙醇沉淀 DNA;8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 75% 乙醇洗沉淀 2 次;室温干燥 DNA 沉淀;用 100~200 μl TE 缓冲液(10 mmol/L Tris,50 μmol/L EDTA,pH 8.0)溶解,-20℃ 贮存。

1.5 DNA 浓度与质量测定 用 Beckman 紫外可见分光光度计测定样品 DNA 浓度与纯度质量(D_{260} 和 D_{280} 值);1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量;5 μl DNA 样品+2 μl 溴酚蓝上样缓冲液,加样于含溴化乙锭(EB)凝胶上,于 4 V/cm 电压下电泳 0.5 h 后,紫外灯下观察、拍照。

1.6 SRAP 反应体系的优化 根据红花及相关作物研究报告,设计 *Taq* 酶浓度(0.02、0.04、0.06 U/μl)、dNTP 浓度(0.15、0.20、0.25 mmol/L)、Primer 浓度(0.15、0.30、0.45 μmol/L)3 因素 3 水平 27 次实验(表 1)和 Mg²⁺ 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L)8 水平单因素实验。在 25 μl 体系中加入模板 DNA 20 ng。PCR 反应程序见文献^[5]:94℃ 5 min;94℃ 1 min;35℃ 1 min;72℃ 2 min;5 个循环;94℃ 1 min;50℃ 1 min;72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 5 min。

扩增产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶检测。

表 1 *Taq* 酶、dNTP 和引物浓度实验

Tab 1 Test with different concentrations of *Taq* polymerase, dNTP and Prime

No.	<i>Taq</i> ($\mu\text{g}/\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	dNTP ($\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$)	Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	No.	<i>Taq</i> ($\mu\text{g}/\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	dNTP ($\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$)	Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
0(CK)	0.04	0.20	0.30	14	0.04	0.20	0.30
1	0.02	0.15	0.15	15	0.04	0.20	0.45
2	0.02	0.15	0.30	16	0.04	0.25	0.15
3	0.02	0.15	0.45	17	0.04	0.25	0.30
4	0.02	0.20	0.15	18	0.04	0.25	0.45
5	0.02	0.20	0.30	19	0.06	0.15	0.15
6	0.02	0.20	0.45	20	0.06	0.15	0.30
7	0.02	0.25	0.15	21	0.06	0.15	0.45
8	0.02	0.25	0.30	22	0.06	0.20	0.15
9	0.02	0.25	0.45	23	0.06	0.20	0.30
10	0.04	0.15	0.15	24	0.06	0.20	0.45
11	0.04	0.15	0.30	25	0.06	0.25	0.15
12	0.04	0.15	0.45	26	0.06	0.25	0.30
13	0.04	0.20	0.15	27	0.06	0.25	0.45

2 结果

DNA 浓度对 SRAP 扩增有一定的影响,但影响不是很大,用 CTAB 法提取的 DNA 完全可以满足扩增的需要。根据扩增主带的稳定性和均匀程度以及经济性原则,选定第 8 泳道为最佳组合;dNTP 的浓度为 0.25 mmol/L,引物的浓度为 0.30 μmol/L,酶的用量为 0.02 U/μl(图 1)。

扩增产物经琼脂糖电泳检测表明,Mg²⁺ 浓度为 3.0 mmol/L 时,条带清晰整齐,无弥散现象,且 750 bp 以下条带较亮。因此确定 Mg²⁺ 浓度为 3.0 mmol/L 最佳(图 2)。

3 讨论

SRAP 对 DNA 浓度要求不高,本实验中 25 μl 体系中加模板 DNA 20 ng,但基因组 DNA 质量好、纯度高是保证扩增效果佳、重复性好的先决条件。在 DNA 提取过程中,要去除蛋白质、RNA、多糖、色素等物质,大多数蛋白可通过氯仿或苯酚处理后变性,沉淀除去,绝大部分 RNA 则可通过经处理过的 RNase A 除去。同时要尽量除尽模板中的一些小分子物质,如苯酚、氯仿等,因为这些物质直接影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性。

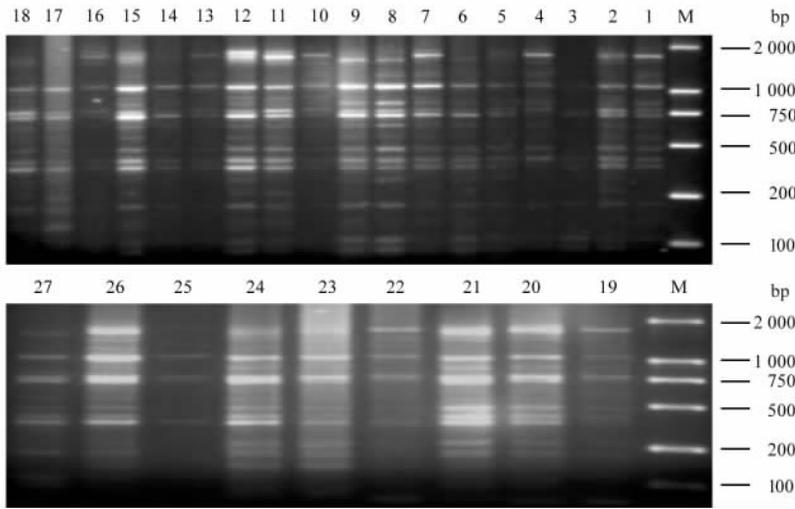


图1 Taq酶、dNTP、引物三因素对SRAP扩增结果的影响

Fig 1 Influence of Taq polymerase, dNTP and primer on SRAP amplification results

M: Marker; 1-27: Same as Tab 1

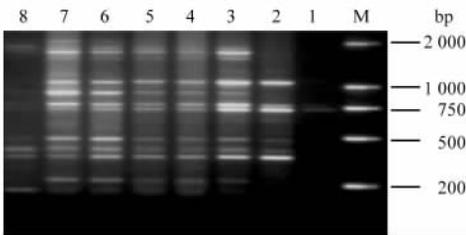


图2 Mg²⁺浓度对SRAP扩增结果的影响

Fig 2 Influence of Mg²⁺ on SRAP amplification results

1-8 correspond to Mg²⁺ concentrations of 0, 0.5, 1, 0.1, 5, 2, 0.2, 5, 3, 0, 3.5, 4, 0 mmol/L, respectively; M: Marker

Taq酶、dNTP、Mg²⁺及引物浓度均影响PCR扩增的结果。本实验当中Taq DNA聚合酶为0.02 U/μl时效果较好,由于Taq DNA聚合酶是Mg²⁺依赖性酶,Mg²⁺浓度过高过低均影响了Taq DNA聚合酶的活性而间接影响了SRAP的扩增。Mg²⁺浓度过高会抑制Taq DNA聚合酶的活性,过低对Taq DNA聚合酶的活化不够,影响扩增效果,无扩增产物;dNTP是SRAP反应的“原料”,在Taq DNA聚合酶的作用下,引物与单链DNA碱基配对相结合,dNTP延伸结合上去,产生了不同的DNA片段,dNTP浓度过高会产生错误掺入,过低导致PCR产率下降,因此本实验选择dNTP浓度为0.25 mmol/L;引物的浓度也要适量,过低时扩增的带较少,引物浓度过高会促使引物错误引导非特异性产物的合成和引物二聚体的形成,它们的形成与靶序列竞争Taq DNA聚合酶和dNTP从而使靶序列的扩增量降低。

本实验优化了适应红花的反应体系,经过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测发现小条带明显增多,且条带比较稳定,重复性好。与AFLP技术相比较而言,它省去了酶切、连接、预扩增等烦琐的步骤,节约了费用和时间,同时又简便可靠,得到的

目的条带便于测序,而且比AFLP更能反映表型的多样性及进化历史。SRAP标记技术体系的建立也将为进一步研究红花的品质性状和其定向调控奠定基础。

[参考文献]

[1] 孟歌,韩紫岩,孟文芳.红花降压活性与成分的初步研究[J].开封医学报,1999,18:46-51.

[2] 张戈,郭美丽,李颖,等.不同品种红花黄酮类成分的HPLC含量测定及其遗传稳定性研究[J].中草药,2004,35:1411-1414.

[3] 李颖,张戈,郭美丽,等.红花药材及注射液中羟基黄酮素A的含量测定[J].第二军医大学学报,2005,26:587-588.

[4] 陈文梅,金鸣,吴伟,等.红花黄酮成分抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用[J].药理学报,2001,36:881-885.

[5] Li G, Quiros CF. 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.

[6] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oil seed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. Plant Breeding, 2001,120:411-415.

[7] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.棉花SRAP遗传连锁图构建[J].科学通报,2003,48:1676-1679.

[8] 王刚,潘俊松,李效尊,等.黄瓜SRAP遗传连锁图的构建及侧枝基因定位[J].中国科学(C辑),2004,34:510-516.

[9] 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, 107:168-180.

[10] Ferriol M, PicóB, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003,107:271-282.

[11] Ferriol M, PicóB, Nuez F. Genetic diversity of some accessions

- of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SRAP markers[J]. Geneti Resources Crop Evolution, 2003, 50: 227-238.
- [12] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31: 622-626.
- [13] Clark MS. 植物分子生物学[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉 译. 北京: 高等教育出版社, 1998: 4-7.
- [收稿日期] 2006-01-11 [修回日期] 2006-03-17
- [本文编辑] 尹 茶