

赵 英,付海天,周俊岸,等. 正交设计优化芒果 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):41-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.011

正交设计优化芒果 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选

赵 英,付海天,周俊岸,李日旺,莫永龙,张 宇,黄国弟

(广西亚热带作物研究所,广西南宁 530001)

摘要:以芒果基因组 DNA 为模板,采用正交试验对模板 DNA 含量、引物浓度、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量进行 3 因素 5 水平正交试验优化。结果表明,相关序列扩增多态性 PCR(sequence related amplified polymorphism, SRAP-PCR)最佳反应体系为:30 ng 模板 DNA、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物、10 μL $2 \times Taq$ PCR Master Mix,总体积为 25 μL 。运用该体系对 10 份芒果种质材料进行验证,证明该体系稳定可靠,并从 100 对引物组合中筛选出扩增条带清晰、多态性丰富的 36 对引物组合。

关键词:芒果;SRAP 标记;正交试验设计;体系优化;引物筛选

中图分类号: Q943.2;S667.703

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)12-0041-03

芒果(*Mangifera indica* L.)为漆树科常绿果树,是著名的热带亚热带水果,享有“热带果王”之美誉,为世界五大名果之一。近年来由于我国芒果种质资源的深入挖掘利用以及芒果育种的进步,特别是国外引进品种的增多,芒果种质资源日益丰富,为芒果的品种创新奠定了坚实的基础,同时也对芒果遗传多样性鉴定和新品种测试与保护工作提出了新的挑战。

相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)是 Li 等于 2001 年发明的一种新的标记技术^[1]。该技术集随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术的优点于一体,具有简单、稳定、在基因组中分布均匀等优点。目前已应用于苹果、柑橘类果树、樱桃、大蒜、棉花、水稻、澳洲坚果^[2]、菠萝、桃、花生^[3]、番木瓜^[4]等,但至今尚未见 SRAP 分子标记应用于我国芒果遗传多样性分析、分类鉴定等方面的报道。笔者在开展芒果遗传多样性及其亲缘关系研究的过程中发现,SRAP-PCR 条件的变化会得到不同的结果,影响芒果的遗传多样性评价,因此构建适用于芒果的 SRAP-PCR 体系至关重要。

本试验以 10 份芒果种质为材料,借鉴其他作物的研究成果,就影响芒果 SRAP-PCR 反应的因素进行探索,建立了适合芒果 SRAP 分析的反应条件及体系,旨在为芒果种质资源鉴定和创新、分子标记辅助育种等提供技术帮助,为下一步开展芒果种质资源遗传多样性研究及遗传连锁图谱的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参试芒果种质共 10 份,均采自广西亚热带作物研究所芒

果种质资源圃。选取芒果健康植株上的无病虫嫩叶,采摘洗净后于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,反应体系的优化以金煌芒 DNA 为模板完成,供试品种见表 1。

表 1 供试品种

| 编号 | 品种或种系 | 来源地 | 亲本或母本 | 种子胚性 |
|----|-----------|-----|-------------------|------|
| 1 | 黄象牙芒 | 泰国 | ? | 单胚 |
| 2 | 白象牙芒 | 泰国 | ? | 单胚 |
| 3 | 印度芒 901 号 | 印度 | 椰香芒 | 多胚 |
| 4 | 桂热芒 10 号 | 广西 | 印度芒 901 号 | 单胚 |
| 5 | 桂热芒 14 号 | 广西 | 印度芒 901 号 | 单胚 |
| 6 | 金煌芒 | 台湾 | 白象牙芒 \times 凯特芒 | 多胚 |
| 7 | 桂热芒 23 号 | 广西 | ? | 多胚 |
| 8 | 桂热芒 82 号 | 广西 | 印度芒 901 号 | 多胚 |
| 9 | 桂热芒 264 号 | 广西 | 印度芒 901 号 | 多胚 |
| 10 | 桂热芒 265 号 | 广西 | 白象牙芒 | 多胚 |

注:“?”表示不确定或尚存争议。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取和检测 芒果基因组 DNA 的提取参照何新华等的 CTAB 法^[5],并稍加改良,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,根据样品 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 计算 DNA 纯度,根据 $D_{260\text{ nm}}$ 值计算样品 DNA 的浓度,并稀释至 10 ng/ μL ,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应条件 参考 Li 等所用引物^[1,6],设计 10 条正向引物和 10 条反向引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。选用引物 Me9 与 Em9 进行体系优化,试验重复 2 次。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶在 0.5 \times TBE 电泳缓冲液中、85 W 条件下电泳 1.5 h,采用核酸染料染色法进行条带检测。电泳结束后,于凝胶成像系统上检测并拍照,依照扩增条带的敏感性与特异性,即条带的强弱及杂带的多少来判断各体系的优劣。

1.2.3 SRAP-PCR 反应体系正交试验 反应根据已经确定的 PCR 反应程序,参照 $2 \times Taq$ PCR Master Mix 的 25 μL 扩增

收稿日期:2014-02-19

基金项目:广西壮族自治区亚热带作物研究所专项资金(编号:桂热研 201305)。

作者简介:赵 英(1980—),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事芒果选育种研究。

通信作者:黄国弟,男,研究员,主要从事芒果种质资源、育种与栽培研究。E-mail:zhaoying-222@163.com。

表 2 芒果 SRAP-PCR 所用引物序列

| 正向引物 | | 反向引物 | |
|------|------------------------------|------|-------------------------------|
| 编号 | | 编号 | |
| Me1 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA TA-3' | Em1 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3' |
| Me2 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3' | Em2 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3' |
| Me3 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AT-3' | Em3 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3' |
| Me4 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CC-3' | Em4 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGA-3' |
| Me5 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AG-3' | Em5 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAC-3' |
| Me6 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGT AA-3' | Em6 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3' |
| Me7 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGT CC-3' | Em7 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT CAA-3' |
| Me8 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGT CA-3' | Em8 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TCA-3' |
| Me9 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CG-3' | Em9 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT ATG-3' |
| Me10 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3' | Em10 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT CTG-3' |

体系,采用 $L_{25}(5^3)$ 对模板 DNA 含量、引物浓度、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量进行 3 因素 5 水平筛选,试验方案见表 3、表 4,以获得最佳的反应体系。

表 3 SRAP-PCR 体系的因素和水平

| 因素 | | | |
|----|----------------|----------------------------|--|
| 水平 | 模板 DNA 含量 (ng) | 引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量 (μL) |
| 1 | 20 | 0.1 | 9.5 |
| 2 | 30 | 0.2 | 10.5 |
| 3 | 40 | 0.3 | 11.5 |
| 4 | 50 | 0.4 | 12.5 |
| 5 | 60 | 0.5 | 13.5 |

表 4 芒果 SRAP-PCR $L_{25}(5^3)$ 正交试验设计表

| 编号 | 模板 DNA 含量 (ng) | 引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量 (μL) |
|----|----------------|----------------------------|--|
| 1 | 1(20) | 1(0.1) | 1(9.5) |
| 2 | 1(20) | 2(0.2) | 2(10.5) |
| 3 | 1(20) | 3(0.3) | 3(11.5) |
| 4 | 1(20) | 4(0.5) | 4(12.5) |
| 5 | 1(30) | 5(0.5) | 5(13.5) |
| 6 | 2(30) | 1(0.1) | 2(10.5) |
| 7 | 2(30) | 2(0.2) | 3(11.5) |
| 8 | 2(30) | 3(0.3) | 4(12.5) |
| 9 | 2(30) | 4(0.4) | 5(13.5) |
| 10 | 2(30) | 5(0.5) | 1(9.5) |
| 11 | 3(40) | 1(0.1) | 3(11.5) |
| 12 | 3(40) | 2(0.2) | 4(12.5) |
| 13 | 3(40) | 3(0.3) | 5(13.5) |
| 14 | 3(40) | 4(0.4) | 2(10.5) |
| 15 | 3(40) | 5(0.5) | 1(9.5) |
| 16 | 4(50) | 1(0.1) | 4(12.5) |
| 17 | 4(50) | 2(0.2) | 5(13.5) |
| 18 | 4(50) | 3(0.3) | 1(9.5) |
| 19 | 4(50) | 4(0.4) | 2(10.5) |
| 20 | 4(50) | 5(0.5) | 3(11.5) |
| 21 | 5(60) | 1(0.1) | 5(13.5) |
| 22 | 5(60) | 2(0.2) | 1(9.5) |
| 23 | 5(60) | 3(0.3) | 2(10.5) |
| 24 | 5(60) | 4(0.4) | 3(11.5) |
| 25 | 5(60) | 5(0.5) | 4(12.5) |

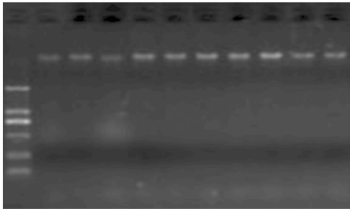
1.2.4 优化体系的稳定性检测及引物筛选 随机选择 6 对 SRAP 引物组合对优化体系进行验证,确定芒果 SRAP-PCR 的最佳反应体系和扩增条件,并对 100 条引物组合进行 PCR 扩增,筛选多态性引物。

2 结果与分析

2.1 芒果基因组 DNA 的检测结果

DNA 的提取质量是决定 SRAP-PCR 扩增效果的关键因素之一。本试验以芒果嫩叶为材料,对 10 份芒果种质材料的基因组 DNA 进行提取,最后得到的 DNA 呈透明絮状,电泳后条带清晰,无拖尾现象(图 1)。经分光光度计测定,所用 DNA 样品的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值均在 2.0~2.5 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均在 1.7~1.9 之间,表明所提取的 DNA 质量较高,符合试验要求。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1~10—芒果供试品种(编号同表1); M—DL2000 DNA marker

图1 芒果基因组DNA的电泳结果

2.2 正交试验设计的 SRAP-PCR 扩增结果分析

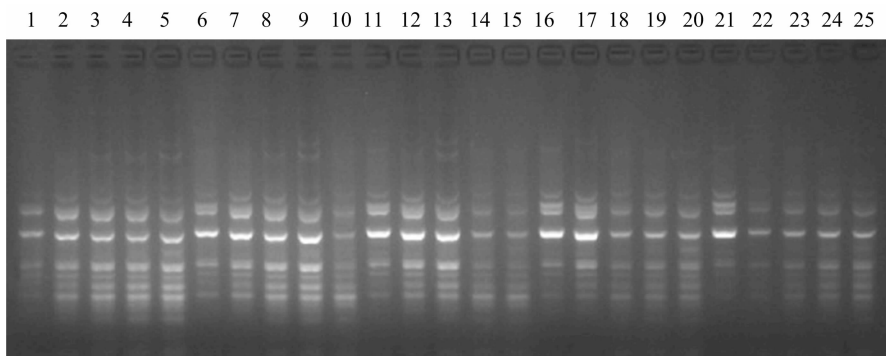
由图 2 可见,25 个芒果正交试验处理的 SRAP-PCR 扩增结果存在着一定的差异。从 2 次重复试验的结果来看,1、6、10、14、15、22 号处理谱带少且不清晰,4、5、8、9、12、13 与 17 号组合的谱带清晰,亮度、重复性好。综合扩增条带的数目、强弱、清晰度、可分辨率与节约成本等指标,确定组合 8 号是比较理想的扩增模式体系,即 $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中含 30 ng DNA, $0.3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 引物, $12.5\text{ }\mu\text{L}$ $2 \times Taq$ PCR Master Mix。

2.3 引物筛选

以随机选取的芒果 DNA 作模板,用 100 对引物进行 PCR 扩增,从中选择扩增条带清晰、稳定且多态性高的适合芒果种质鉴定的引物进行正式扩增。根据扩增条带的多少、清晰度、稳定性和多态性高低,最终从所合成的 100 对引物中筛选出 36 对引物用于 SRAP 扩增(表 5)。

2.4 SRAP 优化体系在不同芒果种间的扩增

根据上述试验的优化结果,随机选取 Me6 与 Em1 引物组合来对 10 份芒果种质的 DNA 进行扩增,以进一步验证该扩增反应体系的效果。由图 3 可以看出,引物 Me6 与 Em1 不但对 10 份芒果种质均能扩增出较好的条带,而且也存在着很明显的多态性条带,由此说明所优化的扩增体系比较可靠,适

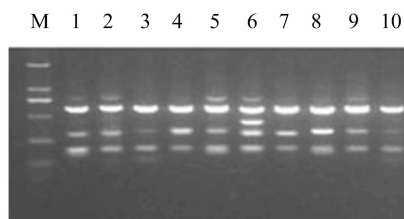


1~25—正交设计SRAP-PCR处理编号(同表4)

图2 正交设计 SRAP-PCR 反应体系扩增结果

表 5 筛选出的 36 对 SRAP 引物组合

| 序号 | 引物组合 | 序号 | 引物组合 | 序号 | 引物组合 |
|----|------------|----|------------|----|-------------|
| 1 | Me1 + Em3 | 13 | Me4 + Em7 | 25 | Me7 + Em10 |
| 2 | Me1 + Em5 | 14 | Me5 + Em1 | 26 | Me8 + Em1 |
| 3 | Me1 + Em6 | 15 | Me5 + Em5 | 27 | Me8 + Em7 |
| 4 | Me1 + Em7 | 16 | Me5 + Em6 | 28 | Me8 + Em8 |
| 5 | Me1 + Em8 | 17 | Me5 + Em8 | 29 | Me8 + Em10 |
| 6 | Me2 + Em1 | 18 | Me5 + Em9 | 30 | Me9 + Em1 |
| 7 | Me2 + Em5 | 19 | Me5 + Em10 | 31 | Me9 + Em2 |
| 8 | Me2 + Em10 | 20 | Me6 + Em1 | 32 | Me10 + Em2 |
| 9 | Me3 + Em2 | 21 | Me6 + Em9 | 33 | Me10 + Em3 |
| 10 | Me3 + Em3 | 22 | Me7 + Em5 | 34 | Me10 + Em7 |
| 11 | Me3 + Em7 | 23 | Me7 + Em6 | 35 | Me10 + Em8 |
| 12 | Me4 + Em1 | 24 | Me7 + Em9 | 36 | Me10 + Em10 |



1~10—供试品种(编号同表1); M—DL2000

图3 SRAP 引物 Me6和Em1组合在10份芒果种质中的琼脂糖电泳图谱

合芒果种质的 SRAP 分析研究。

3 结论与讨论

PCR 反应体系的优化方法主要有 3 种:单因素试验、均匀试验和正交试验优化。正交试验设计相对单因素试验而言具有试验次数较少、效用明确且能较快地获得极佳的试验结果的特点,避免了单一因素试验结果的不足。目前,正交试验设计已成功应用于枣、价廉草、花生、番石榴等植物的 SRAP-PCR 反应体系优化^[7],但在芒果上还未曾见报道。本试验通过正交设计,对影响芒果 SRAP 反应体系的模板 DNA 含量、引物浓度、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量进行了优化,建立了适用于芒果的最优 SRAP 反应体系,即 $25 \mu\text{L}$ 反应体系中包含 30 ng 模板 DNA、 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 引物、 $10 \mu\text{L}$ $2 \times Taq$ PCR Master Mix。同时,在 100 个引物组合中,共得到多态性引物组合 36 个。该反应体系及 36 个多态性引物组合可用于芒果种质遗传多样性分析、系统发育和育种应用等方面,同时也为

芒果品种鉴定、亲缘关系分析及优良新品种的选育等提供技术参考。

影响 SRAP-PCR 反应的因素相对复杂,不同植物适应的 SRAP 反应体系不同,且各因素之间存在着相互效应,只有各因子之间的浓度配比达到最佳状态时才能得到稳定、可重复的扩增结果。因此,SRAP 标记应用到不同物种上时需要优化反应体系和条件。在芒果 SRAP 体系优化的过程中,发现 DNA 模板含量、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix 含量及引物浓度等都会影响 SRAP 扩增效果,但模板 DNA 含量对扩增无明显影响($20 \sim 60 \text{ ng}$ 之间均有稳定的扩增),这与其他学者的研究结果相似^[2,8-10]。可见,对芒果 SRAP 反应条件进行优化是非常必要的。

参考文献:

[1] Li G, Quiros C F. 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2/3): 455 - 461.

[2] 郭凌飞, 邹明宏, 杜丽清, 等. 均匀设计优化澳洲坚果 SRAP 反应体系[J]. 果树学报, 2008, 25(2): 250 - 253.

[3] 邱文武, 孙伟生, 奚美安. 菠萝 SRAP 反应体系的建立及优化[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 39 - 42.

[4] 韦金菊, 何凡, 范鸿雁, 等. 番木瓜 DNA 提取与 SRAP 反应体系优化[J]. 中国南方果树, 2010, 39(1): 33 - 36.

[5] 何新华, 李杨瑞, 郭永泽, 等. 23 个广西本地芒果品种的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 829 - 834.

[6] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(2): 204 - 210.

[7] 杨祥燕, 蔡元保, 陈豪军, 等. 番石榴 SRAP 反应体系的建立与正交优化[J]. 中国农学通报, 2011, 27(22): 219 - 223.

[8] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2): 280 - 288.

[9] 刘冲, 葛才林, 任云英, 等. SRAP-ISSR 技术的优化及在甘蓝类植物种子鉴别中的应用[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 657 - 661.

[10] 路娟, 张绍铃, 刘庆忠, 等. 樱桃 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 163 - 169.