

缢蛏 SRAP-PCR 体系的正交优化

钟玉民¹ 刘达博¹ 冯冰冰¹ 陈慧² 林国文² 李家乐¹

(¹上海海洋大学水产与生命学院 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室,上海 201306;

²福建省闽东水产研究所,宁德 352100)

摘要: 运用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计对影响缢蛏 SRAP-PCR 反应的 5 个因素: *Taq* 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 浓度、dNTPs 浓度和引物浓度在 4 个水平上进行了优化试验,PCR 结果采用 SPSS v16.0 软件分析。结果表明,各因素对 SRAP-PCR 反应的影响依次为:引物 > *Taq* 酶 > 模板 DNA > Mg^{2+} ;缢蛏 SRAP 反应最佳体系为:在 20 μ L PCR 反应体系中,引物 0.3 μ mol/L、*Taq* 酶 0.5 U、模板 DNA 50 ng、dNTPs 0.2 mmol/L 及 Mg^{2+} 2 mmol/L。用不同缢蛏的基因组 DNA 两次 SRAP-PCR 扩增,8 对引物均能扩增出清晰且重复性好的谱带。因而建立的缢蛏反应体系稳定可靠。

关键词: 缢蛏 SRAP 正交设计 优化

Optimization of SRAP-PCR System with Orthogonal Design in *Sinonovacula constricta*

Zhong Yumin¹ Liu Dabo¹ Feng Bingbing¹ Chen Hui² Lin Guowen² Li Jiale¹

(¹Key and Open Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certified by the

Ministry of Agriculture College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University,

Shanghai 201306; ²Mindong Fisheries Research Institute, Ningde 352100)

Abstract: The orthogonal design was used to optimize SRAP-PCR amplification system of *Sinonovacula constricta* on four levels, the experiment was performed on five factors: the concentration of *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , DNA template, dNTPs and Primer. The results of PCR were analyzed by SPSSv16.0. The results showed: the effective degree of the factors on the SRAP-PCR reaction was in the order: Primer > *Taq* DNA polymerase > DNA template > dNTPs > Mg^{2+} ; the most suitable SRAP-PCR system for *S. constricta* was established: the 20 μ L volume system contained: 0.3 μ mol/L Primer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase, 50 ng DNA template, 0.2 mmol/L dNTPs and 2 mmol/L Mg^{2+} . In this two SRAP-PCR amplifications with different *S. constricta* template, eight primers could amplify the clear and stable bands. So the established system of SRAP in *S. constricta* is stable.

Key words: *Sinonovacula constricta* SRAP Orthogonal design Optimization

SRAP 是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quirós 博士于 2001 年提出的,全称为相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)^[1]。该标记通过 17 个碱基的正向引物(F-primer)和 18 个碱基的反向引物(R-primer)任意组合成一对引物对开放读码框(ORFs)进行 PCR 扩增,揭示 DNA 序列的多态性。它独特的引物设计使其可检测基因的开放阅读框区域,是一种无需任何

序列信息即可直接进行 PCR 扩增的新型分子标记技术。目前已经在基因定位^[2]、基因克隆^[3]、生物多样性研究^[4]、遗传图谱构建^[5]、预测杂种优势^[6]、数量性状定位(QTL)^[5]和比较基因组学^[7]等诸多领域得到广泛应用。在实际操作中呈现出简便、有效、产率高、共显性高、重复性好、易测序及便于克隆目标片段等优点。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国沿海虾塘

收稿日期:2010-11-30

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10A410),福建省海洋与渔业局重点项目(闽海鱼 2007015)

作者简介:钟玉民,男,硕士研究生,研究方向:水产动物种质资源与种苗工程;E-mail:zymrabbitt@126.com

通讯作者:李家乐,男,教授,博士生导师,研究方向:水产动物种质资源与种苗工程;E-mail:jll2009@126.com

和滩涂贝类主要养殖品种,尤其在浙江、福建两省养殖历史非常悠久,是我国四大养殖贝类之一,具有生长快、养殖周期短、易管理、产量高和效益好等养殖特点^[8]。但是,缢蛏的分子生物学研究进展还比较缓慢,迄今还没有 SRAP 标记技术在缢蛏上应用的研究报道。国内有关缢蛏的分子标记技术的研究,仅见采用线粒体 COI 和 16S rRNA 序列片段变异的方法研究了我国沿海缢蛏群体遗传结构^[9-12]。本研究以缢蛏为材料,建立并优化 SRAP-PCR 反应体系,为缢蛏分子标记、遗传图谱构建和相关基因的 QTL 定位打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2009 年 10 月,在福建省三沙湾梅田镇的自然滩涂上采集的缢蛏群体,采集后的缢蛏样本取其外套膜组织在无水乙醇中固定,带回实验室备用。

SRAP 引物序列参考文献^[1],由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列,见表 1。根据扩增位点的多态性,选用 me/em 引物组合进行扩增以确定最佳反应体系。试验所用的 dNTPs、引物(primer)、Mg²⁺、Taq 酶和标准分子量(Marker)DL2000 均购于天根生化科技(北京)有限公司。试验用仪器主要包括 PCR 仪、核酸蛋白分析仪和 Eppendorf 高速冷冻离心机等。

表 1 SRAP 引物序列

正向引物	序列(5'→3')	反向引物	序列(5'→3')
em 1	TGAGTCCAAACCGGATA	me 1	GACTGCGTACGAATTAAT
em 2	TGAGTCCAAACCGGACC	me 2	GACTGCGTACGAATTTGC
em 3	TGAGTCCAAACCGGAAT	me 3	GACTGCGTACGAATTGAC
em 4	TGAGTCCAAACCGGACC	me 4	GACTGCGTACGAATTTGA
em 5	TGAGTCCAAACCGGAAG	me 5	GACTGCGTACGAATTAAC
em 6	TGAGTCCAAACCGGTAA	me 6	GACTGCGTACGAATTGCA
em 7	TGAGTCCAAACCGGTCC	me 7	GACTGCGTACGAATTCAA
em 8	TGAGTCCAAACCGGTGC	me 8	GACTGCGTACGAATTCTG

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用苯酚-氯仿抽提的方法提取基因组 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再用 Eppendorf 核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度后,将 DNA 稀释至浓度 50 ng/μL,然后置于 -20℃

贮存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 试验设计 筛选试验:以 20 μL PCR 反应体系为基础,设定 dNTPs、引物、Mg²⁺、模板 DNA 和 Taq 酶共 5 个因子的处理水平(表 2),采用正交试验设计,利用正交表 L₁₆(4⁵),获得 16 个处理(表 3),试验设计 3 次重复。

验证试验:以中选处理设置反应体系,利用组合成的引物组合对单个 DNA 样品进行扩增,检验扩增效果。

SRAP-PCR 反应程序:在 Eppendorf PCR 仪上进行,反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,35℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,5 个循环;之后,94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后在 72℃ 延伸 10 min。反应产物在 4℃ 下保存备用。

表 2 PCR 反应的因素水平

因素	水平(体系终浓度)			
	1	2	3	4
Taq 酶(U)	0.5	1	1.5	2
Mg ²⁺ (mmol/L)	1	1.5	2	2.5
模板 DNA(ng)	25	50	75	100
dNTPs(mmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4
引物(μmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4

表 3 PCR 反应的因素水平 L₁₆(4⁵) 正交试验设计

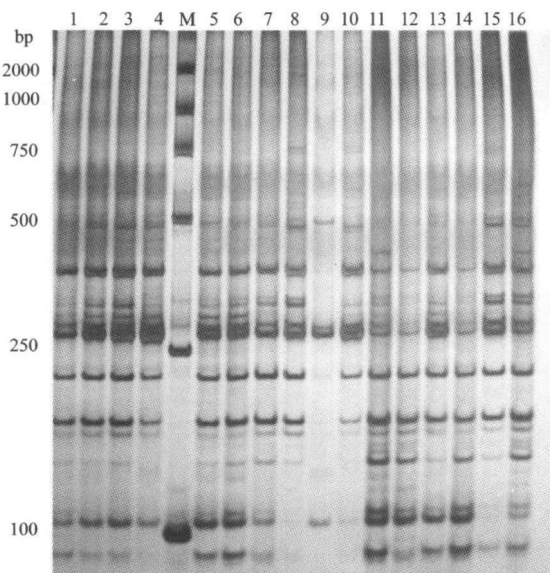
处理	Taq 酶 (U/20 μL)	Mg ²⁺ (mmol/L)	模板 DNA (ng/20 μL)	dNTPs (mmol/L)	引物 (μmol/L)
1	0.5	1	25	0.1	0.1
2	0.5	1.5	50	0.2	0.2
3	0.5	2	75	0.3	0.3
4	0.5	2.5	100	0.4	0.4
5	1	1	50	0.3	0.4
6	1	1.5	25	0.4	0.3
7	1	2	100	0.1	0.2
8	1	2.5	75	0.2	0.1
9	1.5	1	75	0.4	0.2
10	1.5	1.5	100	0.3	0.1
11	1.5	2	25	0.2	0.4
12	1.5	2.5	50	0.1	0.3
13	2	1	100	0.2	0.3
14	2	1.5	75	0.1	0.4
15	2	2	50	0.4	0.1
16	2	2.5	25	0.3	0.2

1.2.3 电泳检测 PCR 扩增反应产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,标准分子量标记 (Marker) DL2000,快速银染,银染后观察并照相记录电泳结果。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

引物 me2/em6 正交试验 PCR 产物电泳结果,见图 1。按照条带数量丰富、清晰度高和背景低的原则,依次给 16 个处理打分,最佳产物记为 16 分;与此相反,最差的记为 1 分^[13]。3 次重复,分别独立统计。从 3 次重复的结果来看,各个处理组合的反应都具有较高的一致性。对各组分浓度组合的正交试验结果进行了统计分析(表 4),其中 K 值代表某水平下某因子参与反应所产生的扩增条带的总和;k 代表某因子在某水平参与反应所产生的扩增条带的平均值;R 为某因子的极差,即某因子在不同水平下最大平均值与最小平均值之差。显然 R 越大,说明该因素对指标影响越大。分析极差 R 可知 *Taq* 酶的量对反应结果影响最大,模板 DNA 浓度的影响最小,各因素水平变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为: *Taq* 酶、引物、模板 DNA、dNTPs 和 Mg^{2+} 。



M. 2000 bp 标准分子量;1-16. 处理编号同表 3

图 1 PCR 产物电泳结果(引物 me2/em6)

表 4 正交设计直观分析

项目	<i>Taq</i> 酶	Mg^{2+}	模板 DNA	dNTPs	引物
K1	34.75	25.50	31.00	31.50	21.25
K2	31.25	29.25	34.75	31.75	25.00
K3	20.75	29.75	23.25	27.25	35.00
K4	27.25	29.50	27.50	23.50	32.75
k1	11.583	8.500	10.333	10.500	7.083
k2	10.417	9.750	11.583	10.583	8.333
k3	6.917	9.917	7.750	9.083	11.667
k4	9.083	9.833	9.167	7.833	10.917
R	4.667	1.417	3.833	2.750	4.583

表 5 PCR 反应各因素间方差分析

变异来源	方差 SS	自由度 df	均方 MS	F 值
校正模型	454.000	15	30.267	13.836
因素间变异	4332.000	1	4332.000	1.980E3
<i>Taq</i> 酶	144.333	3	48.111	21.994 *
Mg^{2+}	16.167	3	5.389	2.463
DNA 模板	65.167	3	21.722	9.930 *
dNTPs	61.500	3	20.500	9.371 *
引物	168.833	3	55.611	25.422 *
误差	70.000	32	2.187	
总变异	4856.000	48		

* 示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

2.2 各因素对 PCR 反应影响的差异分析

将上述处理和评分结果用统计软件 SPSS v16.0 进行方差分析,结果见表 5。由 F 值可知,引物的量对反应结果影响最大, Mg^{2+} 浓度的影响最小,各因素水平的变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为:引物、*Taq* 酶、模板 DNA、dNTPs 和 Mg^{2+} 。各因素水平间的差异均达到显著水平,可以进一步进行因素内多重比较分析。

2.3 因素内各水平对 PCR 结果的影响

2.3.1 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响 引物用量是影响 PCR 反应的关键。在 PCR 反应中,当引物浓度低于 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时,引物浓度低,与模板 DNA 的结合率低,PCR 产物量少;当引物浓度高于 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时,引物浓度过高会增加非特异性结合的几率,容易形成引物二聚体,并且会与 *Taq* 酶竞争 Mg^{2+} 。在试验中引物浓度各水平间差异均达到显著水平,浓度为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时效果最好,定为引物的最佳浓度水平(图 2)。

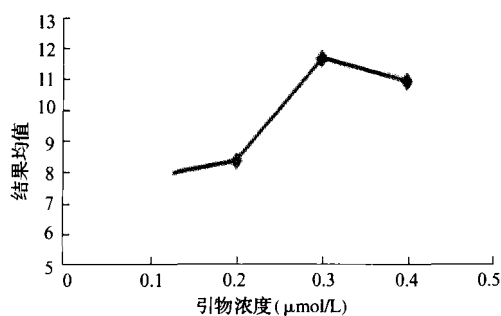
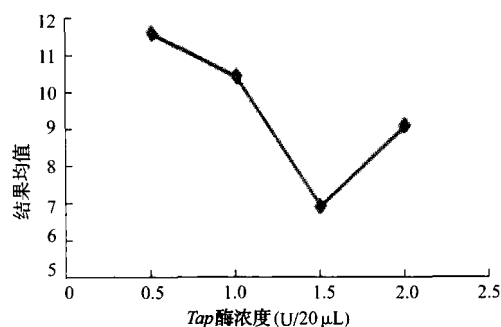


图2 引物浓度与结果均值的关系图

2.3.2 *Taq* 酶对 SRAP 扩增结果的影响 *Taq* 酶对 PCR 反应体系的影响较大。在反应中,影响酶活性的因素较多,使用较高浓度的酶会导致非特异性的扩增产物,同时还造成试验药品的浪费;酶的用量偏低会使新链的合成效率降低,减少扩增产物。在本试验中 0.5 U 的酶试验效果最好,为该反应体系的最佳反应浓度(图 3)。

图3 *Taq* 酶浓度与结果均值的关系图

2.3.3 模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增结果的影响 模板 DNA 浓度对 PCR 反应体系也有较大影响。模板 DNA 的量与纯化程度直接影响着 PCR 的扩增结果。当模板 DNA 浓度小于 50 ng/20 μL 时,模板 DNA 的量太少,模板与引物不能有效的配对,扩增效率低;当模板 DNA 浓度大于 50 ng/20 μL 时,模板的浓度偏高,则过早的消耗了引物,使 PCR 反应进行随机延伸或终止。在试验中,模板 DNA 浓度为 50 ng/20 μL 时,试验效果最好,定为模板 DNA 的最佳浓度水平(图 4)。

2.3.4 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响 dNTPs 是 PCR 反应的原料,必须达到一定的浓度才能完成扩增,当 dNTPs 浓度较低时,扩增有限;当 dNTPs 浓

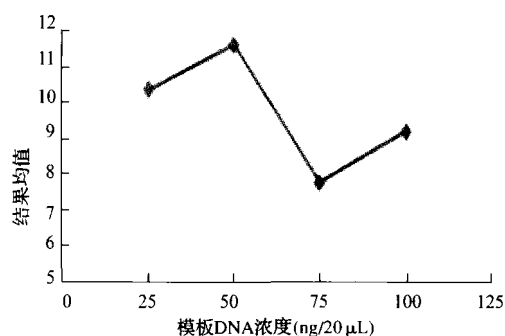


图4 模板 DNA 浓度与结果均值的关系图

度过高时则会与 Mg^{2+} 结合,降低了酶活性所需要的游离的 Mg^{2+} 的量,从而影响 PCR 反应的效率和结果,所以在试验中要严格控制 dNTPs 的浓度。由图 5 可知,0.2 mmol/L 是 20 μL PCR 反应体系的最佳浓度水平。

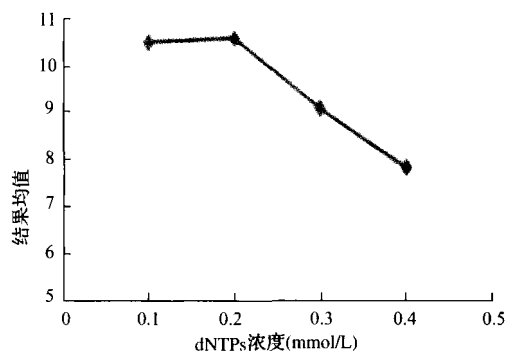
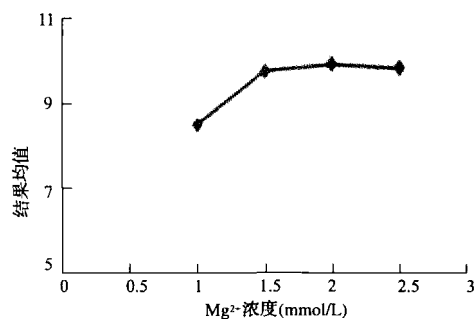


图5 dNTPs 浓度与结果均值的关系图

2.3.5 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响 Mg^{2+} 是通过影响 *Taq* 酶的活性来影响 PCR 反应体系的。通过多重比较,说明 Mg^{2+} 对反应体系的影响不是很大,但过高的 Mg^{2+} 浓度会大大增加非特异性的扩增;较低的 Mg^{2+} 浓度又会影响酶的活性。同时在本试验中得到 Mg^{2+} 浓度在 1.5 mmol/L 时试验效果最好,为反应体系的最佳浓度(图 6)。

图6 Mg^{2+} 浓度与结果均值的关系图

3 讨论

SRAP 分子标记技术是以 PCR 反应为基础的,具有多态性高,产率中等,重复性好,操作简单,在基因组中分布均匀,较易对扩增得到的目标片段进行测序,引物具有通用性等特点。与 RADP 相比具有简便的操作,同时采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染技术,比起琼脂糖胶检测,分辨率大大提高,而且不使用溴化乙锭不会造成环境污染,减少了操作的危险性,多次重复试验结果稳定。与 SSR 相比,SRAP 的上下游引物可以通用,两两搭配组合,避免了引物开发的困难,大大节省了试验时间、节约试验成本^[14,15]。

在 SRAP-PCR 反应中,在引物和模板结合的阶段,引物和模板的量将影响反应的结果,而在链的延伸阶段,*Taq* 酶、dNTPs、 Mg^{2+} 的量将影响反应的结果,所以特定的反应需要特定的反应条件。本试验结果证明,采用不同的体系组合对缢蛏的 SRAP-PCR 扩增结果影响很大。各因素对 SRAP-PCR 反应的影响依次为:引物 > *Taq* 酶 > 模板 DNA > Mg^{2+} 。引物浓度是 PCR 反应的重要条件,当引物浓度低时,引物与模板结合效率变低,因此条带少而弱。随着引物浓度的提高,产生的多态性条带也随之增多,但过高的引物浓度也会导致非特异性的扩增和引物二聚体的形成,影响靶序列的产量,因此确定合适的引物浓度,是做好 PCR 扩增的关键。在正交设计的基础上,得出了缢蛏 SRAP 最佳反应体系。在 20 μ L PCR 反应体系中,引物 0.3 μ mol/L、*Taq* 酶 0.5 U、模板 DNA 50 ng、dNTPs 0.2 mmol/L、 Mg^{2+} 2 mmol/L。试验结果与姚建华等^[14]建立并优化的日本沼虾 SRAP 反应体系(25 μ L 反应体系:引物 0.6 μ mol/L、*Taq* 酶 0.64 U、dNTPs 0.25 mmol/L、 Mg^{2+} 2.5 mmol/L)的结果相似。

SRAP 体系优化的方法有很多种,一般均采用多次单因素设计的方法,但此项工作耗时耗力,而且试验结果直接影响后续试验的进行。本试验与以往的 PCR 优化设计相比,借助统计软件,将正交试验设计与分析应用到 PCR 反应系统的优化中,使试验结果更科学、完善和简便^[15,16]。试验中每种因素间及因

素内水平的相关分析与图表相结合,使试验结果一目了然,更容易发现各因素变化对试验结果影响的规律。本试验建立并优化 SRAP-PCR 反应体系,一方面填补了缢蛏 SRAP 方面的空白;另一方面建立了缢蛏 SRAP 分子标记技术,可以为缢蛏分子标记、遗传图谱构建和相关基因的 QTL 定位奠定基础。

参考文献

- [1] 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*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461.
- [2] 张红玉,何毛贤,管云雁. SRAP 标记在马氏珠母贝家系 F1 代中的分离. *海洋通报*, 2009, 28(2): 50-56.
- [3] 陈锋,张洁夫,陈松,等. 甘蓝型油菜隐性核不育基因的 SRAP 标记. *江苏农业报*, 2007, 23(4): 283-288.
- [4] 傅洪拓,乔慧,姚建华,等. 基于 SRAP 分子标记的海南沼虾种群遗传多样性. *生物多样性*, 2010, 18(2): 150-154.
- [5] 葛学亮,尹洪滨,毕冰,等. 黄颡鱼遗传图谱构建及生长相关性状的 QTL 定位. *水产学报*, 2010, 34(2): 185-193.
- [6] 张志伟,韩曜平,仲霞铭,等. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 720-725.
- [7] 伊艳杰,胡楠,刘红彦,等. 小麦抗白粉病基因 SRAP 标记鉴定及序列分析. *河南农业科学*, 2007(3): 60-62.
- [8] 李太武,王冬群,苏秀榕,等. 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 生化遗传特征分析. *海洋与湖沼*, 2003, 29(2): 640-646.
- [9] 牛东红,陈慧,王树亮,等. 我国沿海缢蛏群体遗传结构的 mtDNA-COI 分析. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 11-18.
- [10] 牛东红,李家乐,冯冰冰,等. 缢蛏 6 个群体遗传结构的 ISSR 分析. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(3): 332-336.
- [11] 牛东红,李家乐,汪桂玲,等. 缢蛏六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异分析. *上海海洋大学学报*, 2007, 16(1): 1-6.
- [12] 牛东红,李家乐,郑润玲. 缢蛏微卫星序列分离及特异性分析. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(5): 733-738.
- [13] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件. *湖南医科大学学报*, 1998, 23(4): 403-404.
- [14] 姚建华,傅洪拓,龚永生,等. 日本沼虾 SRAP 反应体系正交设计及优化. *华北农学报*, 2009, 23(增刊): 122-125.
- [15] 周劲松,曹哲明,杨国梁,等. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 667-673.
- [16] 柴丹丹,陈书霞,孟焕文,等. 黄瓜 SRAP-PCR 反应体系的建立. *西北农业学报*, 2008, 17(3): 274-279.

(责任编辑 狄艳红)