

一种新型DNA 标记技术——限制性位点扩增多态性(RSAP)的建立与优化^{*}

杜晓华^{1,2}, 王得元², 巩振辉¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 广东省农业科学院 蔬菜研究所 广东省果蔬新技术研究重点实验室, 广东 广州 510640)

[摘 要] 为了避开基于限制性酶切位点分子标记技术的DNA 酶切环节, 简化其复杂的程序, 试验以辣椒为材料, 建立了一种新型DNA 标记技术——限制性位点扩增多态性(RSAP), 并对其反应体系进行了优化, 对RSAP 适用性、重复性进行了检验。结果显示, RSAP 技术的引物为2 条长度均为18 bp 的引物, 引物的3 端为4~ 6 个碱基的限制性酶切位点序列, 接着是12~ 14 个碱基的随机序列, 2 条引物的限制性位点和随机序列不同; PCR 扩增的前5 个循环采用35 的退火温度, 随后的35 个循环采用48 的退火温度; 在25 μ L 反应体系中, 模板DNA 用量为20 ng, Mg^{2+} 浓度为2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶用量为1.5 U, 2 条引物浓度均为600 nmol/L; RSAP 技术重复性好, 适用性广泛, 是一种操作简便、产率中等、稳定可靠的DNA 标记技术。

[关键词] 限制性位点扩增多态性; DNA 标记技术; 蔬菜育种

[中图分类号] S603.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)09-0045-05

作为一种遗传标记, DNA 标记因具有数量多、多态性高、可直接反映基因组DNA 等优点, 已被应用于生物遗传多样性分析、连锁图谱构建和重要基因的标记等方面。然而DNA 标记的广泛应用和深入推广有赖于DNA 标记技术的不断发展与改进。操作简便、多态性丰富、产率中等、结果稳定可靠和成本低廉, 已成为分子标记技术的发展方向。基于生物基因组上广泛分布的限制性内切酶识别位点(简称限制性位点), Botstein D 等^[1]创建了限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术, 该技术通过克隆的杂交探针来检测限制性位点之间的多态性, 具有稳定可靠、共显性等优点, 但其中的Southern 杂交耗时费力, 使其广泛应用受到一定限制。此后, 伴随着PCR 技术的诞生和方法的不断改进, 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)^[2]和一些改良的AFLP 分子标记技术^[3-4]先后产生。AFLP 结合了限制性酶切的可靠性和PCR 操作的简便性, 采用衔接子和对应引物避开对序列信息的依赖来检测限制性位点的多态性, 具有较高的产率, 成为目前广泛应用的DNA 标记技术之一。但该技术存在程序

复杂、步骤繁琐等不足, 整个过程包括了基因组DNA 或cDNA 的酶切, 寡核苷酸衔接子的连接, 连接片断的选择性扩增等。其中DNA 不完全酶切时, 采用甲基化不敏感的酶会导致检测时带型不一致, 影响AFLP 指纹分析的准确性; 采用甲基化敏感的内切酶, 基因组的甲基化又会导致假多态性出现^[2]。其他一些改良的AFLP 技术, 虽然不同程度地增加了检出的多态性或简化了步骤, 但仍离不开限制性内切酶酶切和随后的复杂步骤^[3-4]。为了进一步改进技术, 本研究通过设计独特的引物和PCR 扩增程序, 建立了一种新型的无需限制性酶切及其他复杂步骤, 仅一个简单PCR 即可实现对DNA 限制性位点多态性进行检测的DNA 标记技术, 命名为限制性位点扩增多态性(Restriction site amplified polymorphism, RSAP), 并以辣椒为试材, 对该项技术进行了优化, 在苦瓜和水稻作物上对其适用性进行了检验, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

辣椒(*Capsicum annuum* L.) 自交系1号、2号

^{*} [收稿日期] 2006-03-16

[基金项目] 广东省自然科学基金(000162); 广东省农科院院长基金(04-基金-38)

[作者简介] 杜晓华(1972-), 男, 陕西岐山人, 在读博士, 主要从事蔬菜分子标记育种研究。

[通讯作者] 王得元(1968-), 男, 河南焦作人, 副研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。E-mail: wdy168@tom.com

和3号及苦瓜(*Momordica charantia* L.)1号和2号,均由广东省农科院蔬菜研究所提供;水稻(*Oryza sativa* L.)1号和2号DNA为华南农业大学朱文银博士馈赠;RSA P引物的合成由上海基康生物技术有限公司完成; *Taq* 酶购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 辣椒和苦瓜DNA的提取采

表1 部分RSA P引物

Table 1 Example of RSA P primers used in this study

引物名称 Primer No.	引物序列 Primers sequence	限制性位点 Restriction site	限制性内切酶 Restriction enzymes
R1	5'-CACA GCA CCA CTT TAAA-3'	TTTAAA	<i>Dra</i> I
R2	5'-GACT GCG TACA TGA A TTC-3'	GAA TTC	<i>EcoR</i> I
R3	5'-A TTT CA GCA CCA CGA TC-3'	GATC	<i>Mbo</i> I
R4	5'-A TAG TCT GAG CGG TTA A-3'	TTAA	<i>Mse</i> I

为确定一次PCR反应中适宜选用的引物,本试验设计了3种不同的引物:(1)1条限制性内切酶识别位点为4 bp的引物(R4);(2)1条限制性内切酶识别位点为6 bp的引物(R2);(3)采用2条限制性内切酶识别位点和序列组成不同的引物(R2-R4),分别进行PCR扩增。

1.2.3 退火温度的确定 借鉴相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRA P)^[6]的PCR程序,具体如下:94 变性5 min;94 1 min,35 1 min,72 1 min,5个循环;94 1 min,45~50 1 min,72 1 min,35个循环;72 10 min,4 保存。反应在GeneAmp[®] PCR System 9700扩增仪上进行。

为确定最佳退火温度,试验将后35个循环的退火温度分别设为45,46,47,48和50,以辣椒1号和2号的DNA为模板,分别采用3对引物组合(R1-R2,R2-R3,R2-R4)进行PCR扩增。

1.2.4 反应体系中模板DNA和Mg²⁺浓度的确定 为确定适宜的PCR扩增体系,本研究以下面的PCR反应体系为基础,即25 μL反应总体积中,模板DNA 30 ng,Mg²⁺浓度为2.0 mmol/L,dNTPs浓度0.2 mmol/L,*Taq* DNA聚合酶量为1.5 U,2条引物浓度均为600 nmol/L,逐步对PCR反应体系中的模板浓度和Mg²⁺浓度进行优化。

(1)模板浓度的确定。以辣椒自交系1号的DNA为模板,设置10种DNA浓度(25 μL的反应体积中,DNA的量分别为0,10,20,30,40,50,60,70,80和90 ng),采用R2-R4引物组合进行扩增。

(2)Mg²⁺浓度的确定。以辣椒自交系1号的DNA为模板,设置6种Mg²⁺浓度,即0,0.5,1.0,1.

用SDS法,具体操作参照王得元等^[5]的方法进行。

1.2.2 引物设计与适宜引物确定 RSA P采用2条长度分别为18 bp的引物,其结构组成为:12~14 bp的随机序列+4~6 bp的某限制性内切酶识别位点。引物的设计时必须遵循一般引物设计原则,即40%~50%的GC含量,不形成发夹或其他二级结构。本文列举了4条RSA P引物序列的例子(表1)。

5,2.0,2.5和3.0 mmol/L,采用R2-R4引物组合进行扩增。

1.2.5 RSA P方法的重复性检测 为验证RSA P技术的重复性,确保其稳定性,本研究以辣椒1号、2号和3号的DNA为模板,采用R2-R4引物组合,分2次进行RSA P扩增。

1.2.6 RSA P方法的适用性检验 以禾本科的水稻1号和2号,葫芦科的苦瓜1号和2号为材料,分别采用R1-R2,R2-R3,R2-R4 3对引物进行RSA P扩增,以检验RSA P方法的适用性。

1.2.7 RSA P产物的检测 RSA P的扩增产物采用60 g/L的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(70 W恒功率),银染检测。银染程序参照许绍斌等^[7]的方法并略加改进。即胶板从电泳槽取下后,将附有凝胶的长板放入装有2 L染色液(1 g/L AgNO₃)的槽中,摇动10~15 min,捞出沥干,再放入装有显色液(40 g NaOH,0.8 g Na₂CO₃,8 mL 甲醛,加双蒸水2 L)的槽中轻摇,直到清晰的条带显示为止(一般需3~4 min);将凝胶板取出,稍沥干,放入装有清水的槽中漂洗2~3 min,捞出晾干,观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 引物数目的选择

从图1可以看出,采用1条引物,无论含6 bp或含4 bp的限制性位点识别序列的引物进行PCR扩增,均不能扩增或很少扩增出条带;而采用2条不同的引物组合进行PCR扩增时,可获得丰富的扩增谱带,得到类似AFLP的扩增带图谱,初步证明RSA P引物设计是科学合理的,RSA P技术的路线是可行的。

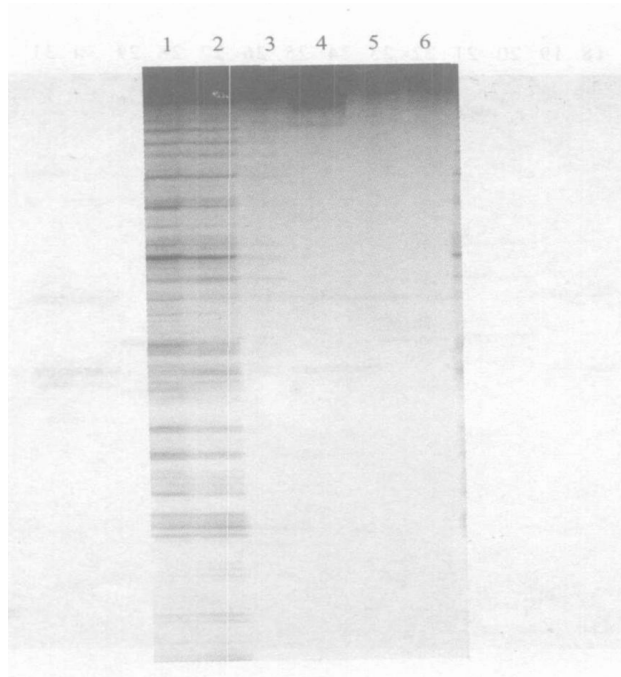


图1 不同引物条数扩增效果的比较

1, 2 以R2-R4 组合为引物; 3, 4 以R4 为引物; 5, 6 以R2 为引物; 1, 3, 5 以辣椒2 号基因组为模板; 2, 4, 6 以辣椒1 号基因组为模板

Fig 1 Comparison of profile amplified by different primer numbers

1, 2 Amplified by R2-R4 primer combination; 3, 4 Amplified by primer R4; 5, 6 Amplified by primer R2; 1, 3, 5 Pepper No. 2; 2, 4, 6 Pepper No. 1

2.2 模板DNA 浓度的确定

模板DNA 浓度的确定结果见图2。

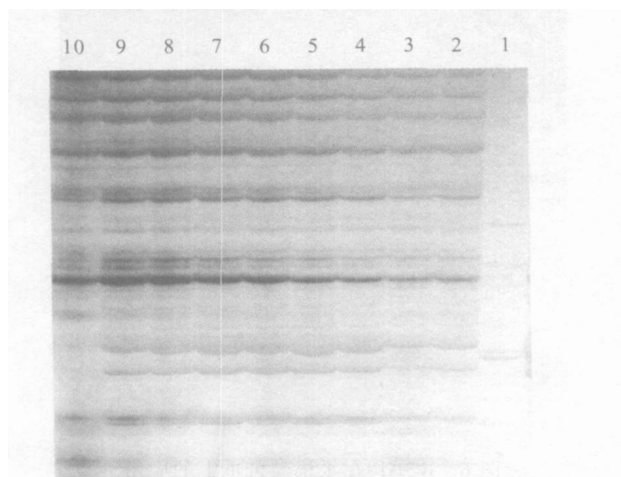


图2 模板DNA 浓度对RSAP 反应的影响

1~ 10 模板DNA 量分别为0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 和90

Fig 2 Effect of concentration of DNA templates

1- 10 Quantity of DNA is 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 ng

结果(图2)表明, 模板量为10~ 90 ng 均能获得成功扩增, 电泳带型基本一致, 说明RSAP 技术对模板DNA 量的要求范围较宽。同时也发现, 模板量为10 或90 ng 时条带较淡, 表明模板浓度过低(≤ 10 ng)或过高(≥ 90 ng)均不太适宜, 过低使起始拷贝数少, 影响扩增产物量, 过高则可能会妨碍扩增, 导致产物量减少。为节省DNA, 推荐在RSAP 分析中选用20 ng 的模板量。

2.3 最适 Mg^{2+} 浓度的确定

反应体系中 Mg^{2+} 浓度是非常重要的。由图3 可知, Mg^{2+} 浓度为1.0 和1.5 mmol/L 时, 几乎无扩增产物; Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L 时, 扩增条带清晰但很少; 之后随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 扩增产物谱带数也增加。从扩增结果来看, Mg^{2+} 浓度以2.5 mmol/L 较为合适, RSAP 条带数较多、且清晰稳定。

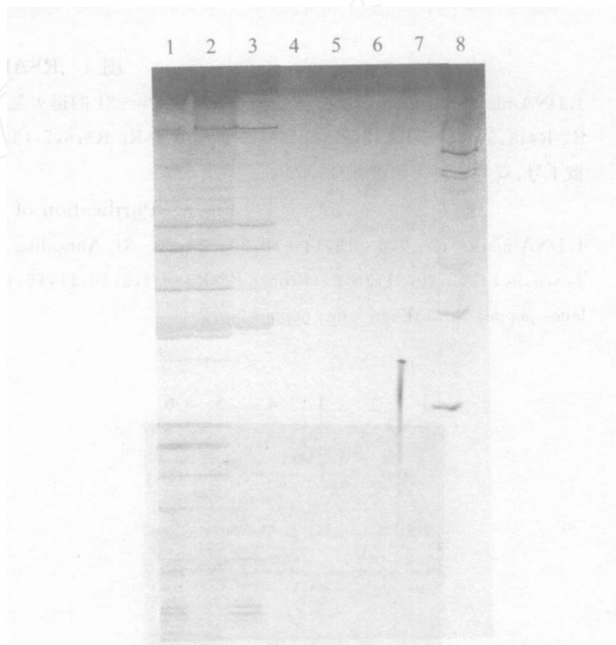


图3 Mg^{2+} 浓度对RSAP 反应的影响

1~ 7 Mg^{2+} 浓度分别为3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 和0 mmol/L; 8 DNA Marker

Fig 3 Effect of Mg^{2+} concentration on RSAP reaction

1- 7 Mg^{2+} concentration is 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 and 0 mmol/L; 8 DNA Marker

2.4 PCR 退火温度的确定

由图4 可以看出, 50 时, 2 种模板和3 对引物组合的扩增产物条带清晰但较少; 45~ 48 时均获得了清晰稳定的条带, 其中以48 时效果最好。故RSAP 的退火温度应为48 。

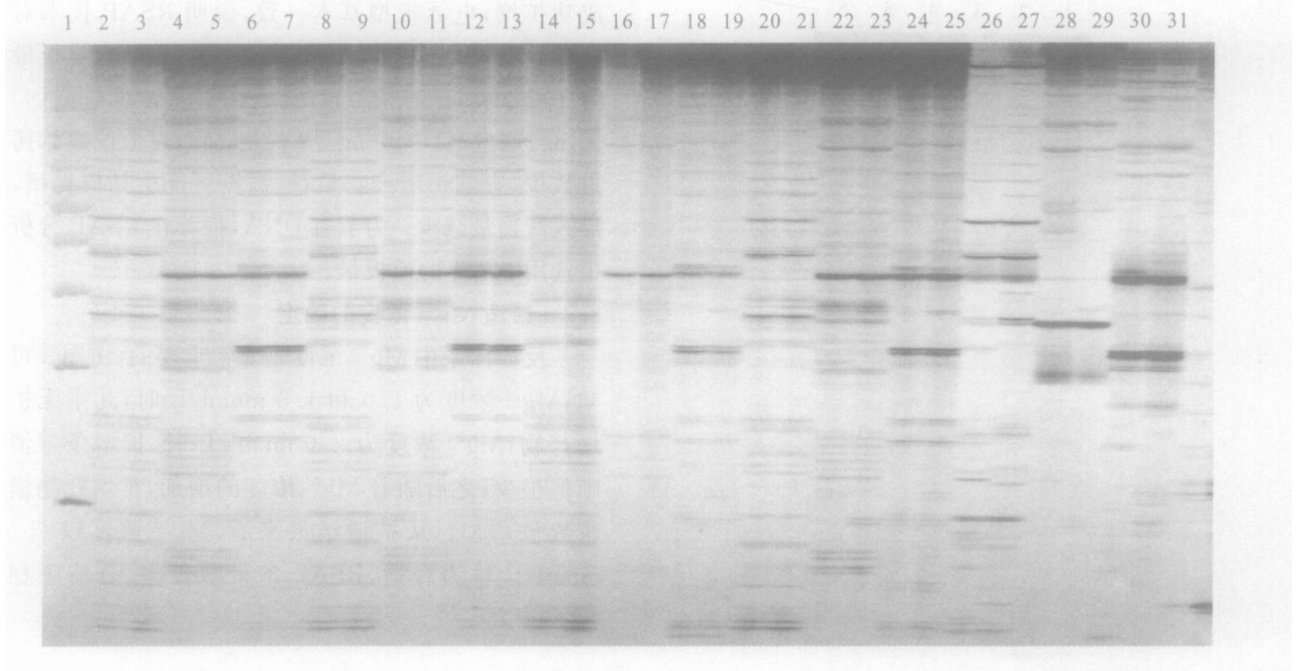


图4 RSA P 退火温度的优化

1 DNA marker; 2~ 7, 8~ 13, 14~ 19, 20~ 25 和 26~ 31 的退火温度分别为 45, 46, 47, 48 和 50 ; 2, 3, 8, 9, 14, 15, 20, 21, 26, 27 的引物为 R2-R4; 4, 5, 10, 11, 16, 17, 22, 23, 28, 29 的引物为 R2-R3; 6, 7, 12, 13, 18, 19, 24, 25, 30, 31 的引物为 R1-R2; 单号泳道(1 号除外) 模板为辣椒 1 号; 双号泳道为辣椒 2 号

Fig 4 Purification of RSA P annealing temperature

1 DNA marker; 2~ 7, 8~ 13, 14~ 19, 20~ 25, 26~ 31 Annealing temperature were respectively 45, 46, 47, 48 and 50 ; Primer R2-R4 of 2, 3, 8, 9, 14, 15, 20, 21, 26, 27; Primer R2-R3 of 4, 5, 10, 11, 16, 17, 22, 23, 28, 29; Primer R1-R2 of 6, 7, 12, 13, 18, 19, 24, 25, 30, 31; Odd lanes pepper No. 1; Even lanes pepper No. 2

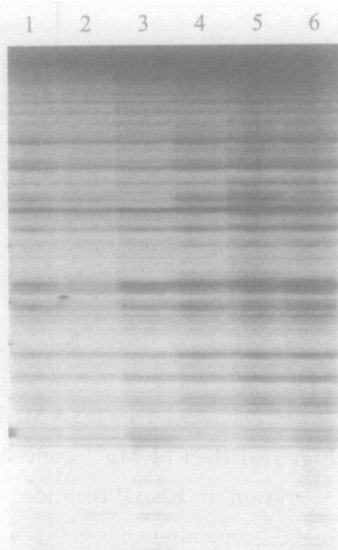


图5 2 次扩增的RSA P 图谱比较

1~ 3 第1 次扩增结果; 4~ 6 第2 次扩增结果; 1, 4 辣椒 3 号DNA 为模板; 2, 5 辣椒 2 号DNA 为模板; 3, 6 辣椒 1 号DNA 为模板

Fig 5 Comparison of RSA P profile amplified in two times

1- 3 Amplified result of first time; 4- 6 Amplified result of second time; 1, 4 Pepper No. 3; 2, 5 Pepper No. 2; 3, 6 Pepper No. 1

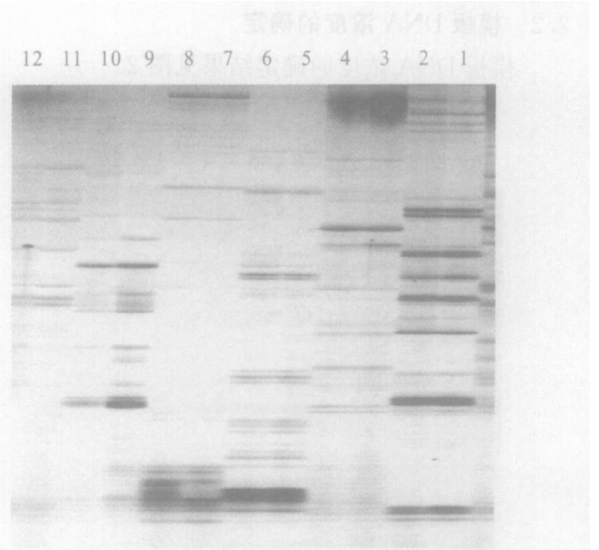


图6 RSA P 在水稻与苦瓜上的应用

1, 5, 9 水稻 1 号; 2, 6, 10 水稻 2 号; 3, 7, 11 苦瓜 1 号; 4, 8, 12 苦瓜 2 号; 1~ 4 以 R2-R4 为引物; 5~ 8 以 R2-R3 为引物; 9~ 12 以 R1-R2 为引物

Fig 6 RSA P application in rice and balsam pear
1, 5, 9, Rice 1; 2, 6, 10 Rice 2; 3, 7, 11 Balsam pear 1; 4, 8, 12 Balsam pear 2; 1- 4 R2-R4; 5- 8 R2-R3; 9- 12 R1-R2 primer

2.5 RSA P 方法的重复性检验结果

本试验建立的RSA P 技术采用较长的引物和较高的退火温度,理应具有较好的稳定性。为证明这一点,采用R2-R4 引物组合,以辣椒1 号、2 号和3 号的DNA 为模板,分2 次进行RSA P 扩增。RSA P 方法的重复性检验结果见图5。图5 表明,第1 次和第2 次RSA P 的扩增谱图几乎完全一致,说明本研究建立的RSA P 技术及体系重复性好、稳定性强。

2.6 RSA P 方法的适用性

3 组RSA P 引物组合在2 个水稻品种和2 个苦瓜品种上的扩增结果见图6。由图6 可以看出,3 种引物组合均在不同的水稻、苦瓜品种上成功扩增,初步显示RSA P 技术是一种适用于多种作物的DNA 标记技术。

4 结论与讨论

综上所述,RSA P 是一种操作简单、产率中等、稳定可靠的DNA 标记技术。其适宜的退火温度为48℃,在25 μL PCR 反应体系中,模板DNA 浓度为20 ng, Mg^{2+} 浓度为2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶量为1.5 U,2 条引物均为600 nmol/L。

RSA P 技术的PCR 扩增程序借鉴了SRA P 技术,前5 个循环采用较低的退火温度(35℃),以保证引物通过部分匹配与模板相结合,提高扩增的效率;后35 个循环采用较严谨的退火温度(48℃),对已扩增片段进行特异性扩增,以保证扩增产物的稳定。引物的设计借鉴了RAPD 随机序列的模糊匹配原理,形成了以酶切位点为核心的序列,结合5 端随机序列的部分错配引物结构,从而实现了限制性位点的选择性扩增。引物长度设计为18 bp,保证了扩增结果的稳定可靠。从操作步骤上讲,RSA P 技术是AFLP 的极大简化;从基因组的扩增区域上讲,RSA P 是对SRA P 和TRAP^[8]的有效补充。因为后者主要针对单拷贝区扩增,而RSA P 扩增的限制性位点则散布于整个基因组区(包括重复区和单拷贝区)。

RSA P 的引物可两两随机配对,产生较多引物组合,一定程度上降低了引物的合成成本,加上步骤简单和检测位点较多,RSA P 技术具有一定的成本优势。在许多作物全基因组的测序结果未获得以前,RSA P 在作物的遗传多样性分析、连锁图谱构建和基因定位等方面具有一定的推广应用价值。

[参考文献]

- [1] Botstein D, White R L, Skolnick M H, et al Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-333
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414
- [3] Wurff A W G van, Chan Y L, Straalen N M van, et al TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(24): 105-109
- [4] Zhang J, Lu Y, Yu S Cleaved AFLP (cAFLP), a modified amplified fragment length polymorphism analysis for cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1385-1395
- [5] 王得元, 彭世清, 刘志新, 等. 辣椒基因组DNA 提取与RAPD 分析 [J]. *江西农业大学学报*, 1998, 20(2): 180-183
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRA P), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *B. rassaica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461
- [7] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的DNA 银染和胶保存方法 [J]. *遗传*, 2002, 24(3): 335-336
- [8] Hu J G, Vick B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2003, 21: 289-294

(下转第54 页)

Effects of salt stress on growth and physiological characteristic of seven herbaceous ground cover plants

LUO Jian-xia, CHAI C-i-jang, SHI Yan-shan, XU Wen, YU Jia-jia

(Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract: Effects of salt stress on growth and physiological characteristic of *Limonium bicolor*, *Sedum lineare* Thunb., *Achillea millefolium*, *Phlox subulata*, *Thymus mongolicus* Ronn, *Dianthus acicularis* and *Festuca arundinacea* Schreb potted plants, which treated with various concentration NaCl solution, were studied. The results showed that the growth of tested plants was retarded by adding NaCl in the pots but degree of inhibition was significantly different between the seven species. The order of relative growth was *Festuca arundinacea* Schreb (86.52%) > *Limonium bicolor* (78.78%) > *Achillea millefolium* (65.38%) > *Dianthus acicularis* (56.08%) > *Thymus mongolicus* Ronn (41.02%) > *Sedum lineare* Thunb. (32.25%) > *Phlox subulata* (0.00%); The photosynthetic rates and stomatal conductance decreased under salt stress but varied in extent among the plants. The decrease extent in photosynthetic rates and stomatal conductance was relatively smaller for *Festuca arundinacea* Schreb and *Limonium bicolor* and greater for *Sedum lineare* and *Phlox subulata*; Variation of intercellular CO₂ concentration appeared complicated tendencies. According to analysis of the results, salt tolerance of the seven tested plants could be ranged as follows: *Limonium bicolor*, *Festuca arundinacea* Schreb > *Achillea millefolium* > *Dianthus acicularis* > *Thymus mongolicus* Ronn > *Sedum lineare* > *Phlox subulata*.

Key words: herbaceous ground cover plants; salt stress; growth; physiological characteristic

(上接第49页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)09-0045-EA

Development and refinement of a new marker technique- Restriction site amplified polymorphism (RSA P)

DU Xiao-hua^{1,2}, WANG De-yuan², GONG Zhen-hui¹

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Vegetable Institute, Guangdong Key Biotech Lab for Fruits and Vegetables, Guangdong Academy of

Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: To avoid DNA digestion in some marker techniques based on restriction sites and simplify complex procedure of these techniques, a new marker technique called restriction site amplified polymorphism (RSA P) was developed and refined with pepper DNA as trial material. The reproducibility and broad application were tested as well. The results showed that RSA P used two primers of 18 nucleotides in which starting at the 3' end of each primer were restriction site sequences (4-6 bases), followed 12-14 bases of arbitrary sequence, the differences between two primers were restriction sites and filler sequence; PCR amplification was run for the first 5 cycles with an annealing temperature of 35 °C, followed by 35 cycles with an annealing temperature of 48 °C; the PCR reaction of 25 μL included 20 ng DNA templates, 2.5 mmol/L of Mg²⁺, 0.2 mmol/L of dNTP, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase, 600 nmol/L of each primers. RSA P is a new marker technique with simplicity, moderate throughput ratio and reliability. RSA P is of good reproducibility and broad application.

Key words: restriction site amplified polymorphism; DNA marker technique; vegetable breeding