

火龙果 IRAP 分子标记反应体系的建立与优化

陶金^{1,2} 乔光¹ 文晓鹏¹ 刘涛³ 彭志军³

1. 贵州大学农业生物工程研究院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025;
3. 贵州省农业科学院果树科学研究所, 贵阳 550006

摘要 基于火龙果 *Ty1-copia* 类反转录转座子的长末端重复序列信息设计引物, 采用 5 因素 4 水平 $L_{16}(4^5)$ 的完全随机正交试验, 对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物浓度和 DNA 含量进行优化, 建立火龙果 IRAP 分子标记反应体系。结果表明, 25 μ L 反应体系含基因组 DNA 20 ng、2.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.10 mmol/L dNTPs、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、0.25 μ mol/L LTR 引物、0.080 g/mL 的非变性 PAGE 胶适于 IRAP 多态性检测。

关键词 火龙果; 反转录转座子间扩增多态性标记; 正交设计

中图分类号 S 667.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)04-0033-06

火龙果 (*Hylocereus* spp.) 为仙人掌科 (Cactaceae) 三角柱属 (*Hylocereus*) 的果用栽培种, 其果实外形独特、营养丰富、绿色保健, 含有一般植物少有的植物性白蛋白、花青素及水溶性膳食纤维等, 是近年来被广泛关注的一种新兴热带、亚热带水果^[1-2]。国内外学者多采用 ISSR^[3-4] 和 RAPD^[5] 等分子标记, 对火龙果的遗传多样性评价、种质鉴定及遗传稳定性检测等进行研究。但 RAPD 技术易受许多因素影响, 实验的稳定性和重复性较差, 而 ISSR 标记对体细胞遗传变异的检测效率较低^[6]。

反转录转座子间扩增多态性 (inter-retrotransposon amplified polymorphism, IRAP) 是一种检测反转录转座子插入位点间多态性的分子标记^[7], 具有操作简单、多态性丰富、检测效率高等特点^[8]。近年来, IRAP 标记技术已应用于苹果^[9]、香蕉^[10] 及柿^[11] 等果树的遗传多样性研究, 但尚未见在火龙果上的相关报道。本研究在已克隆出火龙果 *Ty1-copia* 类反转录转座子的长末端重复序列的基础上^[12], 设计引物, 采用完全随机正交试验, 以期建立并优化火龙果 IRAP 标记的 PCR 反应和 PCR 产物检测技术体系, 为火龙果种质的遗传多样性分析、种质鉴定及遗传变异分析等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试火龙果材料为幼嫩肉质茎, 采自贵州省农业科学院果树研究所, 用带有标记的自封袋将茎组织封好, 带回实验室, 储存在 -20 °C 的冰箱内。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用 Plant Genomic DNA Kit (DP305-03, 天根生化科技有限公司) 提取火龙果的幼嫩肉质茎基因组 DNA, -20 °C 保存备用。使用 Cary-50 紫外分光光度计 (美国 Varian 公司) 和 0.010 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3 引物设计和合成

引物的设计是根据贵州大学农业生物工程研究院已克隆的火龙果 *Ty1-copia* 类反转录转座子保守区域, 由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列为 5'-GACAACCTACCTACACCCCT-TCA-3'。

1.4 PCR 反应程序

94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 59 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 38 个循环; 循环结束后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 终止反应。

1.5 PCR 反应体系的优化

采用正交试验设计法对 PCR 反应体系参数进

收稿日期: 2013-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260464, 31060256) 和贵州省重大专项 (20126006-01)

陶金, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学与基因工程。E-mail: taohe20@163.com

通信作者: 文晓鹏, 博士, 教授, 研究方向: 果树生物技术及遗传育种。E-mail: xpwensc@hotmail.com

行设置,选取对 PCR 扩增影响最大的 $MgCl_2$ 、设置 4 个浓度水平的 $L_{16}(4^5)$ 5 因素 4 水平的正交 dNTPs、*Taq* 酶、引物和 DNA 5 个因子,各因子分别 16 个组合(表 1)。

表 1 IRAP-PCR 反应体系的正交试验设计

Table 1 Orthogonal design of IRAP-PCR

处理 Treatments	模板 DNA/ng Genomic DNA	引物/ $(\mu\text{mol/L})$ Primer	$MgCl_2/$ (mmol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U <i>Taq</i> DNA polymerase	dNTPs/(mmol/L)
1	10	0.30	0.50	0.50	0.10
2	10	0.40	1.50	0.75	0.20
3	10	0.50	2.00	1.00	0.25
4	10	0.60	3.00	1.25	0.30
5	20	0.30	1.50	1.00	0.30
6	20	0.40	0.50	1.25	0.20
7	20	0.50	3.00	0.50	0.20
8	20	0.60	2.00	0.75	0.10
9	30	0.30	2.00	1.25	0.20
10	30	0.40	3.00	1.00	0.10
11	30	0.50	0.50	0.75	0.30
12	30	0.60	1.50	0.50	0.25
13	40	0.30	3.00	0.75	0.25
14	40	0.40	3.00	0.75	0.25
15	40	0.50	1.50	1.25	0.10
16	40	0.60	0.50	1.00	0.20

1.6 非变性胶技术体系的确定

40 mL 的总体积,各组分的质量浓度设置如表 2。配制时,首先加入 ddH₂O,然后逐量迅速加入 0.30

g/mL PAM、10×TBE、0.10 g/mL APS、TEMED,利用供试火龙果材料的基因组 DNA 优化 PCR 反应体系,确定非变性聚丙烯酰胺凝胶的最适质量浓度。

表 2 非变性聚丙烯酰胺凝胶质量浓度的设置

Table 2 Concentration design for non-denaturing polyacrylamide gel

所用试剂 Reagents	非变性聚丙烯酰胺凝胶质量浓度/(g/mL) Non-denaturing polyacrylamide gel					
	0.035	0.045	0.050	0.060	0.080	0.100
0.30 g/mL PAM/mL	4.67	6.00	6.67	8.00	10.70	13.33
10×TBE/mL	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
0.10 g/mL APS/ μL	500.00	500.00	500.00	500.00	500.00	500.00
TEMED/ μL	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
ddH ₂ O/mL	30.78	29.45	28.78	27.45	24.75	22.12

1.7 PCR 产物的检测

上样缓冲液与 PCR 反应产物混合后上样,用 2.5 g/mL 琼脂糖凝胶和 1×TBE 缓冲液,电泳电压为 3.5 V/cm,时间为 90 min,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 EB 染色 35 min,在凝胶成像系统中观察拍照并记录。

非变性聚丙烯酰胺凝胶的电泳:恒定电压为 150 V,时间为 2.0~2.5 h。电泳后的凝胶置于含

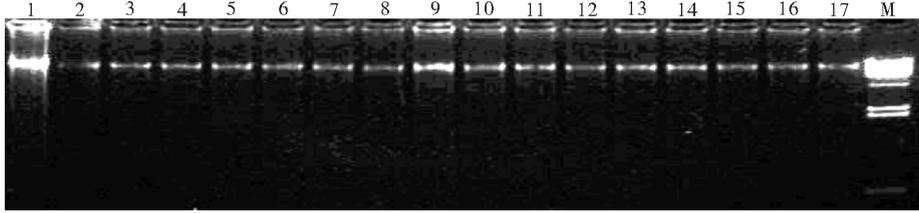
有固定液(50 mL 的冰醋酸和 100 mL 的无水乙醇,去离子水定容至 1 000 mL)的托盘中,摇床(100 r/min)上固定 20 min。0.002 g/mL 的 AgNO₃ 置于摇床(100 r/min)上银染 15 min,迅速冲洗 3 次,每次 20 s。将冲洗后的胶放入显色液中,轻轻摇动显色 10 min。用去离子水冲洗 3 次,去除胶表面的显色液,拍照记录后分析。

2 结果与分析

2.1 火龙果 DNA 的提取

17 份火龙果幼嫩肉质茎基因组 DNA 用 Cary-50 紫外可见分光光度计测定 D_{260}/D_{280} 的平均值为

1.89, D_{260}/D_{230} 的平均值为 2.18。用琼脂糖凝胶 (1.0 g/mL) 电泳检测 (图 1), DNA 集中在上样孔附近且为整齐的亮带, 表明提取的 DNA 纯度较高, 无 RNA 污染, 蛋白质、盐、多糖和酚类等杂质含量较低, 可用于 IRAP 分子标记。



泳道 1~17: 提取的火龙果基因组 DNA Lanes 1-17: The genomic DNA of 17 dragon fruit genotypes; M: λ DNA/*Hind*III.

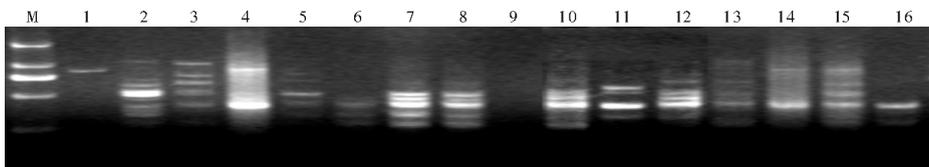
图 1 火龙果基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis analyses of genomic DNA of dragon fruit in agarose gels

2.2 PCR 反应体系的优化

PCR 结果如图 2, 依照电泳条带的多少、亮暗及清晰程度, 从优到差的排序为 7-8-10-12-11-3-2-15-13-14-5-16-6-1-4; 第 9 泳道无条带, 第 4 泳道出现严重拖尾。第 7、第 8、第 10、第 11、第 12 泳道的条带较多、明亮且清晰。第 6、第 13、第 14 泳道的电泳条带清晰度较低, 第 2、第 3、第 5、第 15 泳道的条带较暗, 第 1、第 16 泳道的条带数量少。第 7、第 8 泳道的扩增结果优于第 10、第 11、第 12 泳道。综上, 第 7 泳道 (处理 7) 和第 8 泳道 (处理 8) 更适合于火龙

果 IRAP 分析 (表 1, 图 2)。比较 2 个处理的各个因子, 第 7 组中 dNTPs 用量为 2.0 μ L, 为降低成本将 dNTPs 减少为 1.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 用量甚微, 易导致操作失误。第 8 组中 $MgCl_2$ 的浓度较低, 因 Mg^{2+} 对 PCR 反应扩增效率影响较大, 故提高 $MgCl_2$ 用量至 2.5 μ L。综上, 最适 IRAP-PCR 反应体系含基因组 DNA 20 ng、2.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.10 mmol/L dNTPs、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、0.25 μ mol/L LTR 引物, 该体系用于火龙果 IRAP 分子标记技术较好。



泳道 1~16 同表 1 处理 Lane 1-16 stands for the treatments given in Table 1; M: λ DNA/*Hind*III.

图 2 火龙果 IRAP 正交设计 [$L_{16}(4^5)$] PCR 电泳结果

Fig. 2 Orthogonal design of IRAP-PCR reaction components [$L_{16}(4^5)$] and electrophoresis results of dragon fruit

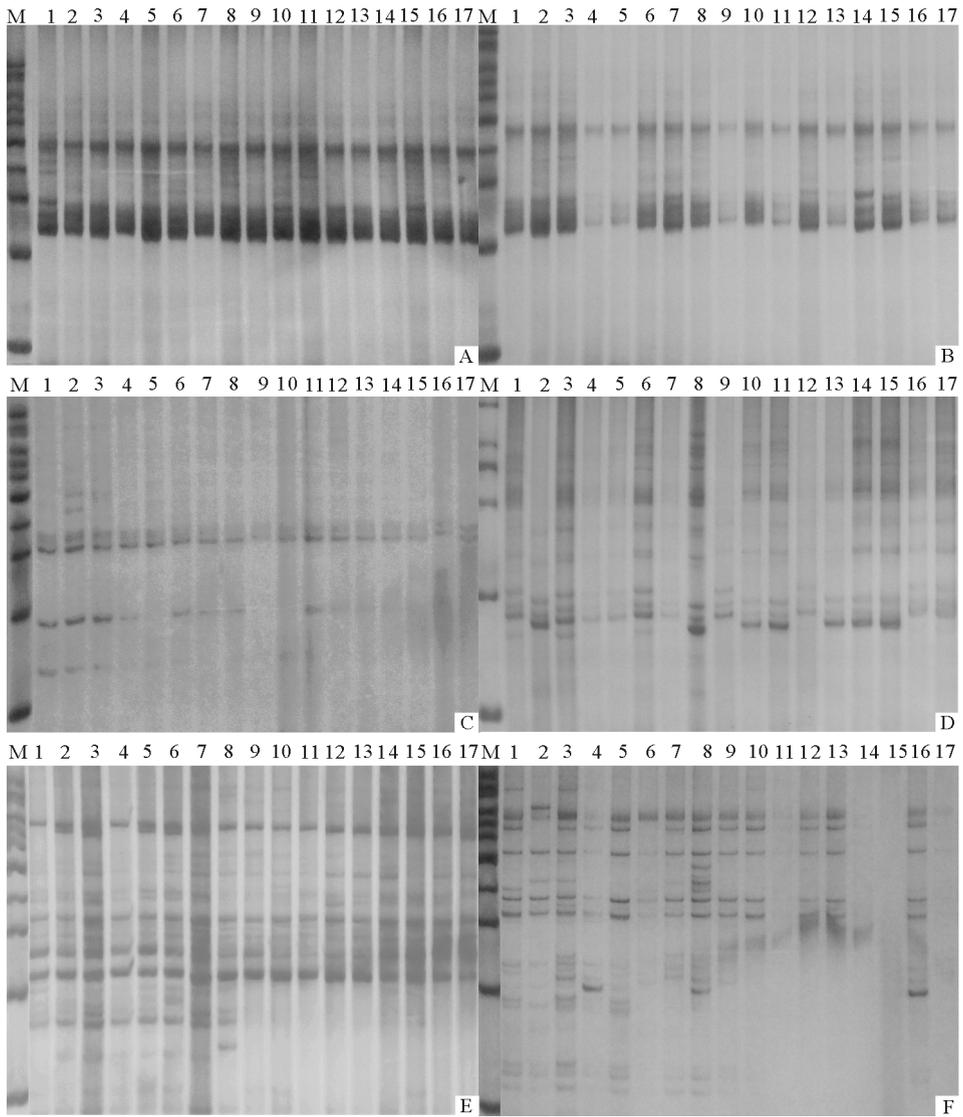
2.3 非变性胶技术体系

从图 3 可看出, 图 3A (0.035 g/mL) 和图 3B (0.045 g/mL) 的非变性 PAGE 胶浓度较低, 分辨能力较差, 故电泳条带比较集中, 不能很好地分散; 图 3C (0.050 g/mL) 的非变性 PAGE 胶基本不能显示条带, 电泳结果不理想。图 3D (0.060 g/mL) 的 PAGE 胶中间部分条带模糊, 不利于计数统计。图 3E (0.080 g/mL) 的非变性 PAGE 胶条带显示最多, 但清晰度有待提高, 需改善实验操作过程; 图 3F (0.100 g/mL) 的非变性 PAGE 胶与 0.080 g/mL 的 PAGE 胶相比较, 由于胶浓度较大, 故部分小片

段条带丢失。综合评价, 非变性 PAGE 胶的最适合质量浓度为 0.080 g/mL。

3 讨论

IRAP 分子标记技术的多态性源自反转录转座子结构特征、组成成分、分布特点和转录过程^[13-15]等。因反转录转座子存在着高丰度性, 故可以利用 LTRs 引物来检测反转录转座子之间 (IRAP) 的关系^[9]。范付华等^[12]成功克隆了火龙果 *Ty1-copia* 类反转录转座子反转录酶序列, 表明反转录转座子在火龙果基因组中的存在性及反转录转座子分子标



A:0.035 g/mL; B:0.045 g/mL; C:0.050 g/mL; D:0.060 g/mL; E:0.080 g/mL; F:0.100 g/mL; 泳道 1~17:17 份火龙果种质在不同质量浓度非变性 PAGE 胶条件下的电泳结果 Lane 1-17 stands for the electrophoresis results of 17 dragon fruit genotypes using various non-denaturing PAGE concentrations; M:100 bp DNA ladder.

图 3 不同质量浓度非变性 PAGE 胶 IRAP 电泳结果

Fig. 3 IRAP electrophoresis results of various non-denaturing PAGE

记技术在火龙果上应用的可能性,本研究结果进一步证明了 IRAP 标记技术在火龙果上应用的可行性。

反转录转座子标记技术的检测重点各不相同,IRAP 是检测反转录转座子插入位点之间多态性的一种分子标记技术^[6],其引物是基于反转录转座子 LTRs 含有的非常保守的序列所设计的。在 PCR 过程中,引物与 LTRs 反转录转座子的相应保守区域退火,继而扩增出相邻的同一家族的反转录转座子成员间的片段^[8,16-17]。因为 IRAP 标记是基于

PCR 技术来检测反转录转座子插入位点间的多态性,所以欲获得清晰稳定的扩增结果,PCR 反应参数的优化是非常必要的^[8-9]。

在优化 IRAP-PCR 反应体系过程中,由于不同果树基因组存在差异和药品规格不同,PCR 反应中各因素的最适浓度也有所不同。本研究利用 17 份火龙果材料对 IRAP-PCR 最适反应体系进行研究,主要针对各因素的浓度对扩增反应的影响进行了探讨。结果表明各因素浓度对扩增反应存在不同程度的影响,其中以 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度的影响最

大。 Mg^{2+} 浓度较低时, 扩增效果较模糊, 不够理想。随着 Mg^{2+} 浓度的逐渐提高, 扩增条带逐渐清晰; 在 Mg^{2+} 浓度低于 2.0 mmol/L 时, 在一定范围内随着 dNTPs 浓度的提高, 扩增条带数量逐渐增多且变亮; 当 Mg^{2+} 浓度大于 3.0 mmol/L 时, 增加 dNTPs 浓度对扩增反应影响不大; 在 dNTPs 浓度较高时, 增加 Mg^{2+} 浓度不能明显地增加扩增条带数量; 在引物浓度较低时, 扩增条带较暗, 随着浓度的增加, 扩增条带亮度逐渐提高; 在反应体系中, Taq DNA 聚合酶和 DNA 浓度对 PCR 扩增反应影响较小, 主要是通过与其他因素相互作用来影响扩增效果的。沈玉英等^[8]对梅 IRAP 反应体系进行优化, 确立了适合梅的 IRAP 反应体系, 相比之下, 本研究结果除了 Mg^{2+} 浓度相同外, 其余参数均不相同。贾怀志等^[9]建立了适合苹果 IRAP 技术体系, 除了 Mg^{2+} 浓度相同之外, 其余各参数都不相同。这说明对于不同种类的果树 IRAP-PCR 最适反应体系存在着较大的差异。

非变性 PAGE 胶的电泳结果表明, 0.080 g/mL 的胶电泳条带数量最多且清晰。聚丙烯酰胺凝胶质量浓度较低时, 扩增产物集中于胶的中部, 条带很难完全分开, 判断基因型的难度较大, 不利于条带的统计。用较高浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 条带被压缩而容易分开, 但胶质量浓度过高(0.100 g/mL)使得条带迁移的阻力过大而降低了移动的速度, 部分条带出现缺失。Muhammad 等^[18]利用琼脂糖凝胶检测基因型, 并基于 IRAP 标记构建了香蕉的指纹图谱。王利英等^[19]研究发现, 琼脂糖凝胶很难检测出 IRAP 标记扩增出的全部条带, 宜采用分辨率更高的非变性聚丙烯酰胺凝胶。肖炳光等^[20]采用 0.030 g/mL 的非变性聚丙烯酰胺凝胶检测烟草 IRAP-PCR 产物, 得到了丰富的多态性条带。本研究采用 0.080 g/mL 的 PAGE 胶对供试材料进行检测, 电泳条带多且较清晰。说明应用 IRAP 分子标记对于不同种类植物进行研究时, 采用 PAGE 胶的类型和浓度存在差异。

参 考 文 献

- [1] 罗小艳, 郭璇华. 火龙果的研究现状及发展前景[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(9): 142-145.
- [2] 纵伟, 刘艳芳, 白新鹏. 火龙果的营养保健成分及加工[J]. 中国食物与营养, 2007(10): 46-48.
- [3] 张冰雪, 范付华, 乔光, 等. 贵州地方火龙果芽变种质 DNA 指纹图谱及遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 果树学报, 2013, 30(4): 573-577.
- [4] FAN Q J, ZHENG S C, YAN F X, et al. An efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and the genetic fidelity assessment of *in vitro*-derived plants using ISSR markers[J]. Journal of Hort Sci & Tech, 2013, 88(3): 146-152.
- [5] TEL-ZUR N, ABBO S, BAR-ZVI D, et al. Clone identification and genetic relationship among vine cacti from the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* based on RAPD analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 100(1): 279-289.
- [6] 陈桂信, 潘东明, 吕柳新, 等. DNA 分子标记技术及其在热带亚热带果树上的应用[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(2): 176-182.
- [7] KALENDAR R, GROB T, REGINA M, et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA finger-printing techniques[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 704-711.
- [8] 沈玉英, 高志红, 王飞, 等. 梅(*Prunus mume*) IRAP 分子标记技术体系的建立[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 423-427.
- [9] 贾怀志, 刘艳红, 渠慎春, 等. 苹果 IRAP 技术体系的建立及优化[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 254-257.
- [10] NAIR A S, TEO C H, SCHWARZACHER T, et al. Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers[J]. Euphytica, 2005, 144: 285-290.
- [11] 杜晓云, 罗正荣. 部分柿属植物 IRAP 反应体系的建立和指纹图谱构建[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 931-936.
- [12] 范付华, 乔光, 郑思成, 等. 火龙果 *Ty1-copia* 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 265-272.
- [13] KUMAR A, BENNETZEN J I. Plant retrotransposons[J]. Annu Rev Genet, 1999, 33: 479-532.
- [14] LEIGH F, KALENDAR R, LEA V, et al. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques[J]. Mol Genet Genom, 2003, 269(4): 464-474.
- [15] TEO C H, TAN S H, HO C L, et al. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana[J]. Journal of Plant Biology, 2005, 48(1): 96-105.
- [16] KALENDAR R, TANSKANEN J, IMMONEN S, et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6603-6607.
- [17] 杨晖. 基于反转录转座子的 REMAP 和 IRAP 指纹图谱技术[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 708-709.
- [18] MUHAMMAD A J, OTHMAN F Y. Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar Rastali (*Musa* AAB) by random am-

- plified polymorphic DNA and Retrotransposon markers[J].
Plant Molecular Biology Reporter, 2005, 23(3): 241-249. 开发[J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1363-1367.
- [19] 王利英, 杜永臣, 张斌, 等. 茄子 IRAP 和 REMAP 分子标记的
[J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1119-1124.
- [20] 肖炳光, 杨本超. 利用 IRAP 标记分析烤烟品种间遗传差异
[J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1119-1124.

Establishment and optimization of IRAP marker methodology in dragon fruit

TAO Jin^{1,2} QIAO Guang¹ WEN Xiao-peng¹ LIU Tao³ PENG Zhi-jun³

1. Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

3. Guizhou Institute of Fruit Tree Science of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

Abstract Based on the LTR sequences of dragon fruit (*Hylocereus* spp.) *Ty1-copia* retrotransposons, primers for IRAP were designed. The complete random orthogonal design $L_{16}(4^5)$ was used to optimize the IRAP-PCR system at four levels and five factors, namely, Mg^{2+} , dNTP, *Taq* DNA polymerase, primers and DNA template. The results showed that the optimal system for IRAP amplification was 25 μ L mixture containing 20 ng of template DNA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.10 mmol/L dNTPs, 2.5 μ L of 10 \times PCR Buffer, 0.75 U of *Taq* DNA polymerase, 0.25 μ mol/L LTR primer. PAGE with 0.080 g/mL non-denaturing polyacrylamide gel could yield reproducible, clear and reliable bands, which facilitate the identification of dragon fruit germplasm, the elucidation of their genetic diversity as well as assessment of genetic variation.

Key words dragon fruit; IRAP marker; orthogonal design

(责任编辑: 张志钰)