

## SRFA 法构建水稻 DNA 指纹图谱

陈 洪\* 王振山\*\* 朱立煌

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

**摘 要** 水稻基因组 DNA 用 Pst I 酶切同时与人工接头连接后,使用选择性引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测所构建的水稻 DNA 指纹图谱。结果表明在 JX17 和 ZYQ8 间以及 5 种野生稻间均存在 DNA 多态性片段。

**关键词** SRFA, 水稻, DNA 指纹图谱

随着 PCR 技术的发展,以 PCR 技术为基础的 DNA 指纹图谱构建技术已在物种起源和进化的探讨,生物品种的鉴定,流行病的诊断,法医鉴别等诸多方面起着重要作用<sup>[1~4]</sup>,尤其是 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 技术的兴起<sup>[5]</sup>,使 DNA 指纹图谱的构建更加快速,简便,经济<sup>[6~7]</sup>。虽然 RAPD 方法有许多优点,但同时也存在一些不足,其中实验结果重复性较差是最主要的弱点,这是由于一般的 RAPD 引物通常由 9~10 个寡聚核苷酸组成,与特异 PCR 引物比较具有较低的 T<sub>m</sub> 值,因此 RAPD 扩增反应更易受到外界的影响,如模板纯度和浓度的变化,模板与引物浓度比例的变化, Taq 酶活性和 dNTP 浓度的变化以及 PCR 扩增仪自身误差和操作人员人为误差等。为了克服 RAPD 扩增反应重复性较差的弱点,我们使用了 1992 年 Zabeau 等人创立的 SRFA (Selective restriction fragment amplification) 或称 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 技术<sup>[8]</sup>,该方法用一人工接头与限制酶酶切的基因组 DNA 片段连接,制成 SRFA 模板 DNA,合成系列 3'-末端随机变化数个碱基的 PCR 引物进行 PCR 特异条件扩增,经电泳检测后可得到 DNA 指纹图谱(图 1)。该方法得到的指纹图谱具有稳定可靠且重复性好的优点,特别适合品种鉴定、法医鉴别等方面的应用。本文以 Pst I 酶切水稻基因组 DNA 为模式,成功地构建了栽培稻和野生稻的 SRFA DNA 指纹图谱。

### 1 材料和方法

#### 1.1 水稻材料

籼稻品种窄叶青 8 号 (ZYQ8) 和粳稻品种京系 17 (JX-17) 在中国科学院遗传研究所试验场种植;五种野生稻 (*Oryza rufipogon*) 分别从云南,江西,湖南,广西和广东采集。水稻基因组 DNA 的制备参照 McCouch<sup>[9]</sup>方法进行。

本研究由“863”计划经费支持。

\* 现地址:中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080。

\*\* 北京农业大学农学系。

本文于 1994 年 11 月 23 日收到。

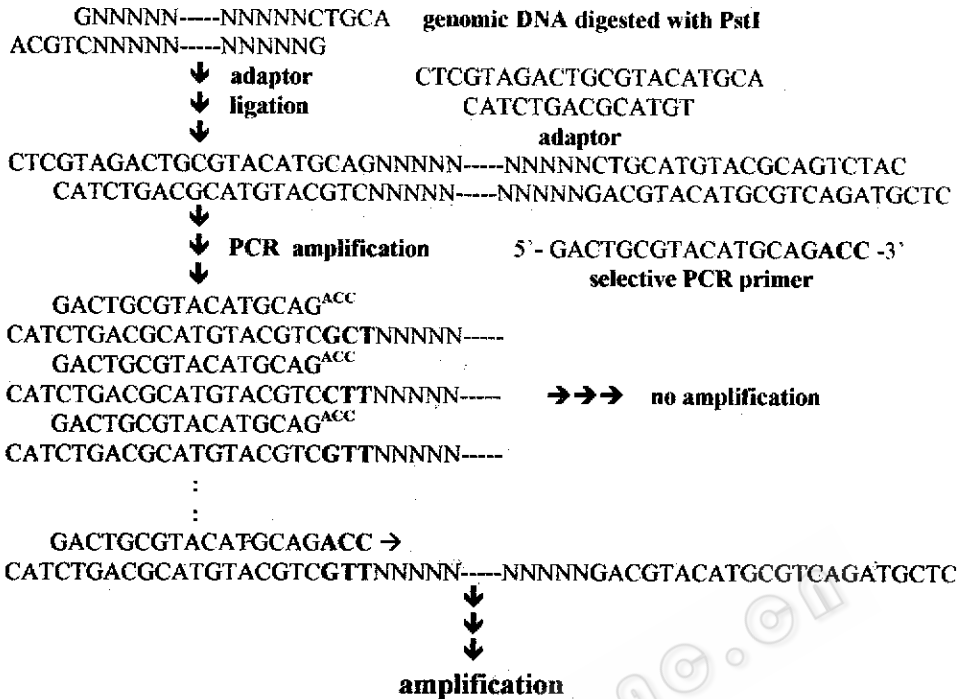


图 1 SRFA 技术原理

Fig. 1 Principle of SRFA technique

## 1.2 SRFA 人工接头设计

合成二个互补的寡聚核苷酸, 经 94℃ 变性 2min, 36℃ 退火 5min 后自然冷却至室温, 二个互补寡聚核苷酸结合成为人工接头。该人工接头一端为 3'-TGCA 粘端, 能与用 Pst I 酶切的基因组 DNA 片段粘端互补。

寡聚核苷酸 1. 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA -3'

寡聚核苷酸 2. 3'- CATCTGACGCATGT -5'

## 1.3 SRFA 模板 DNA 制备

水稻基因组 DNA 酶切和与人工接头的连接将在同一反应体系中同时进行。在 20μl 的反应体系中含有 10mmol/L Tris-HAc pH7.5, 10mmol/L MgAc<sub>2</sub>, 50mmol/L KCl, 2mmol/L DTT, 0.5mmol/L ATP, 水稻基因组 DNA 0.2μg, 人工接头 0.2μg, 24 单位 Pst I 和 2 单位 T4DNA 连接酶 (Boehringer 公司产品), 37℃ 反应 3h, 加入 NaAc 至最终浓度 2.5mol/L, 加等体积冷乙醇, 室温 5min, 离心收集沉淀, 70% 乙醇洗沉淀一次, 风干后加入 50μl 超纯水, 置冰箱备用。

## 1.4 SRFA 引物设计

根据人工接头的序列设计出相应的 SRFA 选择性引物。本研究设计和合成了二个选择性引物, 引物由不变碱基 (CB) 和选择碱基 (SB) 二部分组成, 其 3'-端具有 3 个随机碱基。

|..... C B .....|..SB..|

引物 1. 5'-GACTGCGTACATGCAG CTG-3'

引物 2. 5'-GACTGCGTACATGCAG ACC-3'

### 1.5 SRFA PCR 扩增

在50 $\mu$ l 体系中进行 SRFA PCR 扩增, 反应体系中含有10mmol/L Tris-HCl pH8.3, 50mmol/L KCl, 1.8mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X100, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各为0.2mmol/L, SRFA 选择性引物150ng, SRFA 模板 DNA10ng, 2单位的 Taq 聚合酶(中国科学院遗传研究所生产)。反应扩增条件为94 $^{\circ}$ C 变性1min, 56 $^{\circ}$ C 退火1min, 72 $^{\circ}$ C 链延伸2min, 共进行35个循环。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

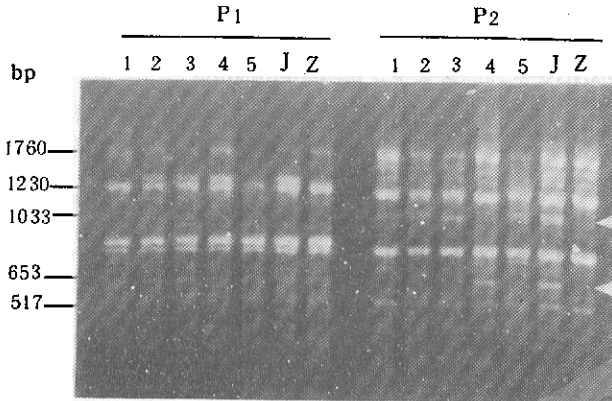


图2 SRFA 水稻 DNA 指纹图谱

Fig. 2 Rice DNA fingerprinting of SRFA

1. Yun-nan *O. rufipogon*, 2. Jiang-xi *O. rufipogon*, 3. Hu-nan *O. rufipogon*, 4. Guang-xi *O. rufipogon*, 5. Guang-dong *O. rufipogon*,  
J. JX-17, Z. ZYQ8, P1. Primer 1, P2, Primer 2

## 2 结果和讨论

使用两个3'-端具有3个随机碱基的 SRFA 选择性引物对栽培稻 ZYQ8, JX17和5种野生水稻进行 SRFA 扩增, 在1.5%琼脂糖凝胶电泳检测下每一扩增反应均能获得10条以上的扩增片段, 绝大部分扩增片段大小在400~2000bp 之间。在 ZYQ8和 JX17间, 引物1可得到一个多态性片段, 引物2可得到二个多态性片段; 在五种野生稻之间引物1和引物2也均能得到存在差异的 DNA 指纹图谱(图2)。

### 2.1 水稻 DNA 指纹图谱的多态性分析

引物1在 ZYQ8和 JX17间有一个多态性片段(1.3kb), 引物2有二个多态性片段(1.1kb, 0.7kb), 虽然使用引物数目仅为2个, 但也可初步得出 SRFA 法检测籼粳稻间的多态性是相当高的, 远高于 RAPD 法在籼粳稻间多态性的20%<sup>[10]</sup>, 从而证实了 SRFA 法在检测物种多态性方面的应用价值。从图2可见, 两个引物的扩增结果未能显示栽培稻和野生稻之间差异的带型或图谱, 可见栽培稻和野生稻有较近的亲缘关系, 野生稻是栽培稻的直接祖先。5种不同来源的野生稻的扩增结果可得到不同地理位置的野生稻具有不同的扩增图谱, 其指纹图谱大致可分为二类, 一类与粳稻 JX17相同, 一类与籼稻 ZYQ8相同, 就二个引物对本试验所用材料的指纹图谱而言, 江西、湖南、广西野生稻偏粳; 云南、广东野生稻偏籼。当然, 上述结论还有待于用更多的试验材料和扩增引物来进行验证。

### 2.2 SRFA 法特点分析

SRFA 法与其它方法比较具有一些明显的特点和优点。第一, 酶切基因组 DNA 和人工接头连接反应同时在一个反应体系中进行, 以减少基因组 DNA 片段间的连接, 提高人工接头与基因组 DNA 片段间的连接效率。第二, 人工接头的一端有数个碱基的突出, 以防止人工接头的自身连接, 另一端为 Pst I 的酶切粘端, 但把 CTGCA-3' 的 C 碱基用 A 碱基置换, 从而使人工接头中不含 Pst I 酶切位点, 使人工接头与基因组 DNA 片段连接后不能被 Pst I 酶切。第三, 引物由不变序列和选择序列二部分组成, 不变序列与人工接头

序列相互补, 选择序列可由数个随机碱基组成, 选择序列碱基数目与扩增产物片段数目成反比, 因此研究中可通过调节选择序列碱基的数目来调整所需的扩增产物片段数目, 以满足不同研究内容的需要。第四, 该方法具有好的重复性和高的灵敏度, 本实验共进行重复试验4次, 每次均能得到相同的指纹图谱; 可根据不同的需要, 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染色法或聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶混合电泳法来提高实验结果检测灵敏度<sup>[11]</sup>。第五, 按照本实验用 Pst I 酶切基因组 DNA 的模式, 可以设计合成一系列适合不同限制性酶的人工接头, 每一人工接头又可合成一系列互补的3'-末端随机变化数个碱基的选择性引物, 每一人工接头和每一选择性引物均可构成一张特异的 DNA 指纹图谱, 从而可为基因组分析提供大量的 DNA 指纹图谱数据。当然, SRFA 法也存在一些不尽如人意之处, 它不如 RAPD 法操作方便, 模板 DNA 需求量大且质量要求高, 反应除 PCR 扩增外还需要进行 DNA 酶切和连接, 故实验成本相对较高。我们在研究中的经验是, 根据不同的研究背景和研究目的, 灵活运用各种 DNA 指纹图谱构建技术, 如 RAPD, SRFA 和 RFLP 等, 或把不同种技术结合互补使用, 将会在研究工作中起到很好的效果。

### 参 考 文 献

- [1] Brant J B, Gustavo C A, Peter M G. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 1992, **38**: 70~76.
- [2] Dieter K, Rownak A, Kurt W *et al.* *Bio/technology.* 1992, **21**: 1030~1035.
- [3] Eskew D L, Gustavo C A, Bassam B J, *et al.* *Plant Molecular Biology.* 1993, **21**: 363~373.
- [4] Gustavo C A, Peter M G. *Bio/technology.* 1994, **12**: 619~623.
- [5] Williams J G K, Kubelik A R Livak K J, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**: 6531~6535.
- [6] Mazurier S, Giessen A V, Heuvelman K, *et al.* *Letters in Applied Microbiology.* 1992, **14**: 260~262.
- [7] Maria R M, Rodolfo B, Esterina P *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**: 1921~1922.
- [8] Zabeau M and Vos P. *Esterina Patent*, 0 534 858 A1. 1993-03-31.
- [9] Mc Couch S R, Kochert G, Yu Z H *et al.* *TAG.* 1994; **87**: 805~815.
- [10] 陈 洪, 朱立煌, 徐吉臣等. *植物学报*, 1995, **37**: 677~684.
- [11] Bassam B J. *Anal Biochem.* 1991, **196**: 80~83.

## Construction of Rice DNA Fingerprinting by SRFA

Chen Hong Wang Zhenshan Zhu Lihuang

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

**Abstract** After rice genome DNA was restricted with Pst I and ligated with adaptor meanwhile, DNA fingerprinting was constructed by selective primers for PCR amplification. The DNA fingerprinting was detected through agarose gel electrophoresis. This result shows that there are DNA polymorphic fragments between ZYQ8 and JX17, also in five wide rice accession (*Oryza rufipogon*) one another.

**Key words** SRFA, rice, DNA fingerprinting