

分子標記新技術—相關序列擴增多態性之介紹

黃家富、劉富光

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

目前應用於遺傳育種領域的分子標記很多，主要有限制性片斷長度多態性 (RFLP)、隨機擴增多態性 DNA (RAPD)、擴增片斷長度多態性 (AFLP)、微衛星 DNA 或簡單重複序列 (SSR)。每種分子標記都有其分析原理和特點。RFLP 是利用放射同位素或非放射性物質標記探針，與轉移至尼龍膜上的總基因組 DNA (經限制性內切酶消化處理) 雜交，由限制性酶切片段的大小，來檢測不同遺傳位點之等位變異；RFLP 標記呈共顯性遺傳，分析結果穩定可靠，但有 DNA 的需要量大、檢測步驟較多、週期較長、多態性較少等缺點。RAPD 技術是以基因組 DNA 為模板，以一個隨機的寡聚核苷酸作引物 (primer)，經 PCR 擴增反應，產生不連續的 DNA 產物，以檢測 DNA 序列的多態性，其操作簡便，但具重複性較差之缺失。SSR 是對基因組中的微衛星 DNA 進行擴增，其優點是高水準的多態性、容易檢測和產生共顯性標記，這種標記費工耗時、且分子量分析不易；AFLP 是選擇性擴增基因組 DNA 的酶切片段，重複性佳，缺點是操作流程較為複雜，需要多步驟的操作，包括 DNA 酶切、連接 (Ligation) 和

擴增，要使每一條件都達到最優化較為困難；此外，甲基化敏感的限制性內切酶對 DNA 的甲基化可導致“假多態性”的產生，AFLP 分析中識別 AATT 位點的 Mse I 酶常會引起一些物種基因組中標記分布不均衡的現象。

美國加州大學蔬菜作物系 G. Li 與 C. F. Quiros 二位博士於 2001 年提出一種新的分子標記技術—相關序列擴增多態性 (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP)，又稱為基礎序列擴增多態性 (Sequence-Based Amplified Polymorphism, SBAP)。他們針對真核生物基因中的外顯子 (exon，編碼區域的序列) 裡 GC 含量豐富，而啟動子 (promoter，參與 DNA 轉錄啟動的區域序列)、內含子 (intron，非編碼區的序列) 裡 AT 含量豐富的特點來設計引物進行 PCR 擴增，因不同個體的內含子、啟動子與間隔區長度不等而產生多態性 (圖 1)；其具有簡單、高效、高共顯性、重複性、易測序等優點，尤其是可檢測基因的開放閱讀框架區域 (open reading frames, ORFs，具有可轉譯出之蛋白質序列之讀架，包含並位於開始編碼與終止編碼之間)，適合基因定位、基因克隆 (clone) 等分子生物學研究。

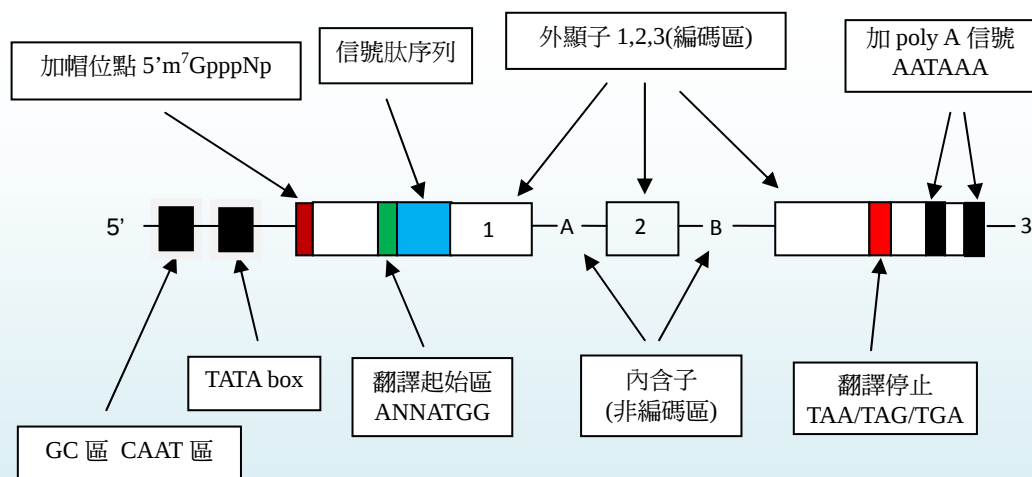


圖 1 真核生物基因的一般構造示意圖

SARP 標記體系分析原理與方法

一、原理

SRAP 的原理是利用獨特的引物設計對開放閱讀框架進行擴增，SRAP 標記分析共有兩套引物。一組正向 SRAP 引物中使用 GGCC 序列，其目的是使之特異結合 ORFs 區域中的外顯子。研究顯示，外顯子一般處於富含 GC 區域，從 GeneBank 中隨機選擇 20 個 BAC 序列，發現約 66% 的 GGCC 序列位於這些克隆中的外顯子內。運用 CCGG 序列就可特異擴增出包含這些組分的序列。

當然，由於外顯子序列在不同個體中通常是保守的，這種低多態性限制了將它們做為標記的來源。由於內含子、啟動子和間隔序列在不同物種甚至不同個體間變異很大，富含 AT 的區域序列通常見於啟動子和內含子中，SRAP 中使用的反向引物的 3' 端含有核心 AATT，以特異結合富含 AT 區，使得有

可能擴增出基於內含子與外顯子的 SRAP 多態性標記。

二、引物設計與應用

引物設計是 SRAP 分析的核心，引物大小和組合則是 SRAP 分析的成功關鍵。SRAP-PCR 反應中使用兩個引物：具 17 鹼基的正向引物 (F-primer) 和具 18 鹼基的反向引物 (R-primer)；正向引物設計含有一段 14 鹼基的核心序列 (core sequence)，其包含 5' 端前 10 個無任何特異組成的鹼基，稱為填充序列 (Filter sequence)，接著為 CCGG 序列，隨後為 3' 端的 3 個選擇性鹼基，選擇性鹼基的變化與核心序列組合成一套正向引物。反向引物的組成與正向引物類似，但填充序列後連接的為 AATT，AATT 序列後 3' 端為 3 個選擇性可變鹼基。當然，構建正向與反向引物的總體設計上的要求原則，就是它們不形成髮夾結構及其他二級結構，且 CG 含量在 40—50%，再者，填充序列在組成上必須

不同，長度為 10 或 11 個鹼基。目前 Li 與 Quiros (2001) 文獻中報導的部分標準引物序列如下：

正向引物 (F-primer)

	填充序列	選擇性鹼基
me 1	:5'-TGAGTCCAAA	CCGGATA-3'
me 2	:5'-TGAGTCCAAA	CCGGAGC-3'
me 3	:5'-TGAGTCCAAA	CCGGAAT-3'
me 4	:5'-TGAGTCCAAA	CCGGACC-3'
me 5	:5'-TGAGTCCAAA	CCGGAAG-3'

反向引物 (R-primer)

em 1	:5'-GACTGCGTACG	AATTAAT-3'
em 2	:5'-GACTGCGTACG	AATTTGC-3'
em 3	:5'-GACTGCGTACG	AATTGAC-3'
em 4	:5'-GACTGCGTACG	AATTTGA-3'
em 5	:5'-GACTGCGTACG	AATTAAC-3'
em 6	:5'-GACTGCGTACG	AATTGCA-3'

引物大小和正反向引物的結合是成功進行 SRAP 分析的關鍵。Li 和 Quiros 在早期發展 SRAP 流程時，對引物的大小進行實驗發現，用單引物擴增只能擴增幾條大約 0.5–1.0 Kb 的片段；使用較短引物，如 10 鹼基 RAPD 引物以及含有 SRAP 引物核心序列的 14–15 鹼基大小的引物，這些引物組合可得到多種擴增片段，但其二擴增產物不穩定，而且擴增片段總是不一致，專一性差；20–22 鹼基引物則放射自顯影時，結果背景顯影太強，不易判斷；結果發現最適的 SRAP 引物大小在 17–18 鹼基。

三、SRAP-PCR 的 DNA 擴增

反應模板多數是基因組 DNA，也可以是 cDNA。在一個標準 PCR 反應中，反應試劑濃度定為 0.2 mmole/L dNTPs，1.5 mmole/L MgCl₂，0.3 μmol/L 引物，1 U Taq 聚合酶。SRAP-PCR 反應採用煉合變溫法：開始時以 94℃ 變性 5 min；反應前 5 個循環在 94℃、1 min，35℃、1 min，72℃、1–2 min 條件下運行；之後 30–35 個循環煉合溫度 (Anneal Temperature) 提高到 50℃，其它條件如前，最後再延伸 5–7 min。

前 5 個循環煉合溫度設為 35℃，主要是考慮到低的煉合溫度能確保兩個引物與目標 DNA 部分配對；隨後循環中煉合溫度升到 50℃，可保證前 5 個循環的擴增產物可在其後之循環反應中進行指數式倍率擴增；如果煉合溫度在 40 個循環中都保持在 35℃，則擴增產物的重複性或再現性將會很差。

四、擴增產物檢測與片段測序

擴增產物在變性聚丙烯醯胺凝膠 (Acrylamine gel) 上分離，通常膠厚度 0.4–0.5 mm，每孔加樣 8–20 μl，以保證單條染色帶有足夠量回收。可使用同位素，也可採用銀染技術；用 2.0% 的瓊脂糖凝膠也可分析多態性，但分辨的條帶較少。

對標記測序有可能獲得更多的遺傳信息。由於多數 SRAP 產生高強帶，很少有重疊，而且引物較長，故比 AFLP 易測序。獲得的 SRAP 標記差異片段，從膠上割下、回收後，用相應引物直接定序，必要時可採用克隆定序。

五、SRAP 標記特徵

由於在設計引物時正反引物分別是針對序列相對保守的編碼區與變異大的內含子和

間隔序列，因此，多數 SRAP 標記在基因組中分布是均勻的，通過利用 RIL 系構建的遺傳連鎖圖也說明了這一點。同時發現在 130 個 SRAP 標記中，約 20% 為共顯性，這種高頻率的共顯性明顯優於 AFLP 標記。

利用同一引物組合，從甘藍類不同作物中（包括花椰菜、青花菜等）可獲得多個 SRAP 標記。單個組合在每個個體中可檢測到至少 10 條多態性譜帶，其中一些為作物特異的；在不同的實驗中，多態性條帶重複性極佳。

SRAP 標記測序顯示多數標記為外顯子區域。25 條多態性帶中，16 條 (64%) 序列 CG 含量超過 35%，表明可能是外顯子部分；Blast 搜索表明 60% 條帶與已知基因序列高度一致，這就確認了 SRAP 產生的多數標記包含了可譯框中的外顯子。測序還表明 SRAP 多態性產生於兩個方面：由於小的插入與缺失導致片段大小改變，而產生共顯性標記；核苷酸改變影響引物的結合位點，導致顯性標記產生。

SRAP 技術的應用

SRAP 分子標記系統最早是在芸薹屬作物開發出來。目前已在其他作物如馬鈴薯、水稻、生菜、油菜、大蒜、蘋果、櫻桃、柑橘與芹菜中也成功擴增。

SRAP 和其它 DNA 分子標記技術一樣，在遺傳學和育種學領域具有廣泛的應用前景。自 SRAP 標記建立以來，已被應用於圖譜構建、比較基因組學、遺傳多樣性分析和標定基因的研究。

一、構建遺傳圖譜

長期以來，科學家希望利用遺傳圖譜和遺傳標記來加速育種進程。自 1980 年 Bostein 等提出用 RFLP 構建圖譜以來，已構建了許多生物的 RFLP 圖，但大多數的密度偏低，因此需要構建高密度的遺傳圖。用 RAPD 技術作圖時，因其重複性差，且在一次實驗中不一定能得到大量的多態性 DNA 片段，因而限制了其應用。用 AFLP 技術作圖，可以得到高密度的遺傳圖，但因其技術難度大、費用高，目前用此技術作圖的還不多。而 SRAP 技術簡便、穩定，適用於遺傳作圖。

Li 和 Quiros (2001) 用此技術對 86 個羽衣甘藍 × 花椰菜的 RI 系作圖，此圖由 130 個 SRAP 標記和 120 個 AFLP 標記構成。大約 20% 的多態性 SRAP (26 個) 分離為共顯性標記。SRAP 標記和 AFLP 標記一樣，都非常平均的分布在 9 個連鎖群 ($LOD \geq 3.0$)，覆蓋 2165 cM。從這兩個標記技術來看，基因組覆蓋範圍區別甚小。因此，與 AFLPs 相似，SRAP 標記具有廣覆蓋範圍和高重複性。在遺傳圖譜的構建上有最佳的標記分布。

二、遺傳多樣性

育種者只有瞭解育種材料的遺傳變異資訊，才能有針對性地選擇雜交親本，在後代中獲得優良變異，從而培育出優良品種。因此遺傳多樣性研究對培育新品種具有重要意義。Ferriol 等用此技術評價 69 份甜瓜 (*Cucurbita pepo*) 的遺傳多樣性，將其分成兩個亞種、8 個生態型，並與 AFLP 標記比較，結果表明，與形態學變異及類型的進化歷史一致性方面，SRAP 標記提供的資訊比 AFLP 標記更優良；11 個 SRAP 引物組合獲得 88

條可重複的條帶，平均 8 條，其中 64 條 (72.7%) 為多態，大小在 154–653 bp 之間；測序發現多個標記序列與已知 DNA 或 EST 高度同源。

三、重要性狀基因標記

重要性狀基因緊密連鎖標記的獲得，可進行性狀分子標記輔助選擇，提高育種的選擇效率與預見性，加快新品種的選育進程。

Li 等 (2003) 在大白菜分析中，發現了一個與雄性不育基因有關的 SRAP 標記，也在芹菜中獲得一個與病毒抗性基因緊密連鎖的 SRAP 標記。

Ding 等 (2007) 利用 SRAP 技術對草魚基因組進行分析，共獲得個 SRAP 標記，其中發現有 21 個等位基因的基因頻率產生穩定的下降或上升趨勢，這或是由於草魚近親繁殖而使一些等位基因丟失所致，因此認為這些基因可能與草魚種質退化有關的特異性標記。表明該方法對草魚種質退化和分子標記輔助育種大有幫助。

四、繪製基因組轉錄圖譜

轉錄圖譜 (Transcriptome map) 是進行比較基因組學研究極為有效手段。利用基於 PCR 的 cDNA-SRAP 分析來檢測編碼區的多態性將簡便、高效、快捷。

Li 等於 2003 年用 SRAP 標記研究擬南芥和甘藍的同源性，發現這兩類基因組的廣泛同一性，在 190 個多態性 cDNA-SRAP 標記中，共有 169 個相似序列；這種同一性集中在某些染色體片而非整個染色體上；甘藍中大多數重複區段集中對應於擬南芥 1 號與 5 號染色體，而擬南芥的 2 號和 4 號染色體的重複序列也出現在甘藍中。

五、SRAP 標記定序與基因克隆

多數 SRAP 標記包含了開放閱讀框架中的外顯子，這為特定性狀基因的分離克隆提供了極大方便。Li 和 Quiros 進一步定序與 Blast 分析發現，通過 RIL 群體獲得 *BoGLS-ALK* 基因的顯性標記 SRAP，與擬南芥中 BAC 克隆 F4C21 中一未知基因的 ORFs 有高度同源，該基因位於 5 號染色體上，此基因座已經定位了一個去飽和基因。據此推測標記 SRAP 也在這個基因內部。

Ding 等 (2007) 也對草魚之 SRAP 特異片段基因進行定序與 Blast 分析，結果發現定序片段中有 8 個片段能在 Genebank 中找到同源性較高的序列，其中有 2 個序列片與 SOX8 基因和分子伴侶基因 (Chaperonine containing TCP1, subunit 3(gamma) CCT3) 具有相似性。此外，也發現含有 7 個類似 SNP 位點、3 個缺失和一個高變區域。

六、其他的應用

為了確定用 SRAPs 標記構造 cDNA 指紋圖譜的可行性，Li 和 Quiros 在研究中國白菜花粉母細胞的基因特異性表達時，對中國白菜的不同組織中分離的 cDNA 進行擴增發現了組織的特異性條帶，這很可能是這些組織基因的特異性表達條帶。因此 SRAP 也能用來作 cDNA 指紋圖譜。

結語

SRAP 是一種新型的分子標記技術，已經在植物的研究中成功地應用，它適於不同物種上用於各種目的的研究，SRAP 標記將會成為育種研究領域的一個有力工具。