

# Application of SRAP Molecular Techniques in Plant Genome Research\*

Yanjin Li, Tingting Tang, Benwen Liu, Lei Jiang, Lei Zhang, Gang Li, Rui Qin, Hong Liu<sup>#</sup>

Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China,  
South-Central University for Nationalities, Wuhan  
Email: <sup>#</sup>liuhong@mail.scuec.edu.cn

Received: May 10<sup>th</sup>, 2013; revised: May 19<sup>th</sup>, 2013; accepted: Jun. 1<sup>st</sup>, 2013

Copyright © 2013 Yanjin Li et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** SRAP is a new type of molecular marker technique developed in recent years with which abbreviated form of a name of sequence-related amplified polymorphism. SRAP has the advantages of easy to operate, low cost, high codominant and high repeatability. The main task of SRAP is to amplify the coding region of gene, and analyze the functional sequence of the gene directionally. It was widely used in genetic analysis, the construction of molecular genetic map, gene mapping and genetic clone because of its unique primer design on genomics. Based on the characteristics of SRAP and its applications in plant genomics, we introduced the principles of SRAP briefly in this paper.

**Keywords:** SRAP; Genomics; SRAP Optimization

## SRAP 分子技术在植物基因组学中的应用\*

李彦锦, 唐婷婷, 刘本文, 江磊, 张磊, 李刚, 覃瑞, 刘虹<sup>#</sup>

中南民族大学南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 武汉  
Email: <sup>#</sup>liuhong@mail.scuec.edu.cn

收稿日期: 2013年5月10日; 修回日期: 2013年5月19日; 录用日期: 2013年6月1日

**摘要:** SRAP 分子标记技术即相关序列扩增多态性分子标记技术, 是近年发展起来的一种新型分子标记技术, 具有操作简便、共显性高、重复性好、费用低等优点, 该技术主要是对基因的编码区进行扩增, 定向分析基因的功能序列。SRAP 以其独特的引物设计在基因组学上广泛应用于遗传分析、分子遗传图谱的构建以及基因定位与克隆等方面。本文对 SRAP 的原理特点及其在植物基因组学上的应用进展进行概述。

**关键词:** SRAP; 基因组学; SRAP 优化

### 1. 引言

相关序列扩增多态性 SRAP(Sequence related amplified polymorphism), 是由美国加州大学作物系 Li

\*基金项目: 湖北省自然科学基金(2010CDZ011); 大学生国家创新创业训练项目基金(GCX12014)资助。

<sup>#</sup>通讯作者。

和 Quiros<sup>[1]</sup>在 2001 年研究芸薹属作物时开发并利用的。该技术以操作简便、共显性高、重复性好、费用低等优点成功应用于植物遗传多样性、遗传连锁图谱构建和 QTL (Quantitative trait locus)定位等<sup>[2]</sup>基因组学研究。作为新型分子标记技术, 其独特之处在于直接检测基因的可阅读框 ORF(Opening reading

frames)区域, 无需任何序列信息即可直接对基因的编码区进行扩增, 从而定向分析基因的功能。现有的分子标记技术大都应用于植物基因组学的研究, 包括: RFLP(Restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)、RAPD(Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性)、ISSR(Inter-simple sequence repeat, 内部简单重复序列)、AFLP(Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)、SSR(Simple sequence repeat, 简单重复序列)和 SNP(Single nucleotide polymorphisms, 单核苷酸多态性)、EST(Expressed sequence tag, 表达序列标签)、SRAP(Sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)等。RFLP 稳定且遍布低拷贝编码序列, 但实验操作繁琐、检测周期长、成本高昂; RAPD 操作简便, 但其稳定性、重复性差, 且产率低; AFLP 技术具有较高的精确性, 并得到广泛应用, 但复杂的操作和成本昂贵限制了其应用; SSR 扩增得到的多为共显性标记, 其引物的开发费时、昂贵, 且多态性较低。与以上多种分子标记技术相比, SRAP 分子标记具备其在植物基因组学研究中的优越性。近年来, SRAP 被越来越多地应用到基因组学的研究中, 在白芨属<sup>[3]</sup>、甘蔗<sup>[4]</sup>、高原青稞<sup>[5]</sup>、*Pistacia*<sup>[6]</sup>、*Punica granatum*<sup>[7]</sup>、棉花<sup>[8]</sup>、苜蓿<sup>[9]</sup>、莲<sup>[10]</sup>、甜麻<sup>[11]</sup>、黄瓜<sup>[12]</sup>、河南小麦<sup>[13]</sup>等植物的遗传多样性分析和构建遗传图谱中均得到成功的应用。

## 2. SRAP 简介

### 2.1. SRAP 的原理

SRAP 技术的基本原理是根据设计的特异性引物对 ORFs 进行扩增。其上游引物一般为 17 bp, 5'端的前 10 bp 为非特异性序列, 然后是 CCGG 序列, 即前 14 bp 序列为上游引物的核心序列, 随后是 3'端的 3 个选择性碱基, 上游引物对外显子进行扩增; 下游引物一般为 18 bp, 前面无特异性序列长为 11 bp, 然后是 AATT, 即该 18 bp 序列为下游引物的核心序列, 同上游引物一样, 下游引物的 3'端为 3 个选择性碱基。下游引物对内含子区域和启动子区域进行扩增。由研究对象的个体不同, 以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。

作为一项新型的分子标记技术, SRAP 分子标记

分析中的引物设计尤为关键, 要遵循以下原则: 引物之间不能形成发夹结构或其他的二级结构, 以防止引物自身发生互补配对; GC 含量在 40%~50%之间, 因为 SRAP 是基于 PCR 扩增的一个分子标记技术, 其复性温度一般在 58℃~62℃之间; 上游和下游引物的填充序列在组成上必须不同, 以防形成引物二聚体, 长度为 10 或 11 个碱基。引物的大小是决定能否扩增出 SRAP 条带的重要因素。Li 和 Quiros<sup>[1]</sup>在建立 SRAP 系统时对引物的大小进行试验发现, 引物过短, 容易产生多重条带, 而且扩增条带不总是一致, 带型分布的可重复性差; 引物过长, 则放射自显影时显示很强的背景。最适的 SRAP 引物的大小一般在 17~18 bp 之间。

### 2.2. SRAP 优化

在 SRAP-PCR 反应体系中要想获得稳定清晰的扩增产物, 对模板的质量与纯度要求很高<sup>[14]</sup>。在 SRAP-PCR 反应体系中, Taq 酶浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度均对扩增效率起着重要影响。Taq 酶活性高度依赖 Mg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>浓度的过高过低均会降低 Taq 酶活性, 从而导致扩增效率显著降低甚至没有产物。过高的浓度的 dNTPs 会导致错误渗入, 过低会导致扩增产率下降而引起浓度过低, 则会使引物与模板的结合率下降, 引物浓度过高则会导致错配和非特异性扩增, 并使引物之间形成二聚体<sup>[15]</sup>。在所有反应体系中, 模板 DNA 由于涉及到基因组结构, 直接影响到引物与模板的结合从而决定扩增特异性。我们此前对红花 11 个不同地方品种的研究也证实了这一点<sup>[16]</sup>, 故根据不同的材料, 反应体系的优化为 SRAP 技术的关键因素之一。

如药用菊花<sup>[17]</sup>与荷花<sup>[18]</sup>的 SRAP-PCR 反应体系相似, 但是与辣椒<sup>[19]</sup>的反应体系差别较大; 另外发现在石蒜<sup>[20]</sup>的 SRAP-PCR 反应体系中, Mg<sup>2+</sup>浓度对扩增的影响最为显著, 而在菊花<sup>[17]</sup>的研究中发现 dNTPs 浓度对体系的影响最大; 在菊花和百里香属<sup>[21]</sup>的研究中发现 DNA 模板的用量对扩增效果有重要影响, 但是在柿属<sup>[22]</sup>以及百里香属植物的研究中发现 TaqDNA 聚合酶用量对体系影响甚微。这些实例说明不同的物种间 SRAP-PCR 反应体系虽然相似, 但会因物种基因组结构的不同导致引物有差异, 从而造成反

应体系彼此之间的差异,因此,SRAP-PCR 技术的应用的关键就是首先必须针对不同的材料建立成熟的反应体系并进行优化。

### 3. SRAP 在基因组学中的应用

在 SRAP 出现以前的遗传多样性分析、基因定位、遗传图谱构建等主要采用 SSR、AFLP、RAPD 等分子标记技术,但都表现出一定的局限性,如成本高,技术复杂,重复性差等缺点。而 SRAP 在 75% 的真核生物具有通用性,而该技术在植物基因组学研究上的运用更是弥补和丰富了同类其它分子标记技术。

#### 3.1. 遗传多样性分析

通过 DNA 对物种遗传多样性进行研究是一种更为直接可靠方式。SRAP 因其快速、简便、多态性高,在经济作物的品种及其野生近缘种的鉴定方面起到很好的作用。

例如王凤涛等<sup>[13]</sup>利用 SRAP 标记对 22 个河南小麦栽培品种进行了遗传多样性分析,利用在已公布的标准的 8 条正向引物和 11 条反向引物中随机组合所获得 10 对引物进行实验。实验结果说明应用 SRAP 标记技术能较真实地反映 22 个河南小麦品种的亲缘关系和遗传距离,说明在小麦品种多样性研究中应用 SRAP 标记技术,可以反映出不同品种间的遗传距离,明确种植地区不同的小麦各品种之间的亲缘关系。

朱英等<sup>[3]</sup>利用 SRAP 对白芨属种类的 17 份材料进行了遗传多样性分析。结果表明 SRAP 的扩增条带多且清晰,易于分辨,特别是 SRAP 引物具有通用性,上游引物和下游引物可以进行不同的组合,提高了引物的利用率,而且具有特异的多态性条带。在扩增产物的检测上科采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染技术提高分辨率,并且多次重复试验结果稳定。

廖诗童等<sup>[4]</sup>采用 100 对 SRAP 引物对 35 个不同耐寒甘蔗品种进行了标记,并筛选出了 72 对多态性较好的 SRAP 引物进行了遗传多样性分析。结果表明 72 对引物共扩增出 1241 条谱带,平均每对引物扩增出 17.2 条谱带,其中多态性条带占 89.36%。品种间的遗传相似系数在 0.5773~0.7264 之间,平均相似系数为 0.6340。聚类分析表明 35 份甘蔗品种可分为 5 个类群,聚类分析结果不能反映供试材料的地域特性;同时,

耐寒性相对较好的品种分散于 4 个类群中,说明聚类分析并不能把耐寒性好的品种聚成一类;而两三个耐寒性较差的品种能够聚在一起,说明 SRAP 标记对耐寒性较差的品种的聚类能起到较好作用。

杨平等<sup>[5]</sup>用 8 个正向引物与 8 个反向引物组成的 64 个引物组合对供试的 25 份四川高原青稞育成品种材料 DNA 进行了扩增。结果表明:64 对引物组合共检测出 999 条清晰条带,62 对可以获得多态性条带,多态性引物组合占 96.9%,共产生 225 条多态性条带,占总条带数的 22.5%。

此外,SRAP 技术在多种植物的遗传多样性分析中均有应用。在国外,Majid Talebi 等<sup>[6]</sup>利用 SRAP 分子标记技术的 30 对引物组合作用于来自伊朗、叙利亚、土耳其和美国的 36 种开心果 pistachio 植物,其中 11 对引物组合扩增出 202 个多态性条带,168 个条带具有多态性,即 83% 具有多态性,平均每个引物扩增出 15.27 个片段,研究结果表明开心果的家养基因型由“Sarakhs”品种进化而来。Mohammad 等<sup>[7]</sup>将 SRAP 用来评估 63 种来自伊朗五个不同地理区域的家养型、野生型和观赏型的石榴品种并确定了石榴品种的遗传多样性和其群体遗传性结构。

由此可见,SRAP 技术的独特引物设计在克隆基因多样性方面能提高扩增效率,更有利于遗传多样性的分析。

#### 3.2. 构建遗传图谱

由于 SRAP 技术的高共显性,易于扩增出目的条带。SRAP 标记具有物种通用性,其上、下游引物可两两搭配,用少量的引物可得到多个引物,科学的测得不同物种之间的遗传距离。很多科学研究者利用 SRAP 来对物种进行遗传图谱的构建,这是对基因组进行系统研究的基础,也是探究物种亲缘关系及种质资源的重要渠道。

如 Sun<sup>[23]</sup>等运用 SRAP 分子技术绘制了一个包含 13,551 个 SRAP 标记的甘蓝型油菜的遗传连锁图谱。林忠旭等<sup>[8]</sup>应用 SRAP 对 285 个标记用 MAPMAKER/EXP3.0 构建了棉花分子遗传连锁图,237 个标记进入 39 个连锁群(LOD  $\geq$  3.0),总长 3030.7 cm,覆盖整个棉花基因组的 65.4%,标记平均间距 12.79 cm。张宇等<sup>[9]</sup>在利用 SRAP 分子标记技术研究紫花苜蓿和黄花

苜蓿种质源遗传多样性实验中, 筛选出 24 对 SRAP 引物组合建立了 DNA 指纹图谱, 较好地扩增出条带, 证明了苜蓿较高的异质性、亲缘关系的远近及分类。

欧阳冬梅等<sup>[10]</sup>通过 SRAP 对莲品种进行了指纹图谱的构建, 将 11 对多态性引物产生的 127 个多态性位点进行排序, 建立品种计算机化的 DNA 指纹, 以区分供试的每个品种。可见, SRAP 技术是对分子遗传图谱的构建和遗传标记的极大丰富与补充。

### 3.3. 基因定位

李小威等<sup>[24]</sup>, 赵立强<sup>[25]</sup>, 孙正文<sup>[26]</sup>等在对功能基因定位研究上主要分别运用 SSR、AFLP、RFLP 等分子标记, 但都表现出一定的缺陷, 而 SRAP 分子标记却可以进行快速定位、选择有效基因, 加快育种进程, 大大弥补了其他分子标记的不足。

陈晖等<sup>[11]</sup>以甜麻(黄麻野生种)和宽叶长果(黄麻栽培品种)为杂交亲本, 构建了 187 个 F<sub>2</sub> 单株作为作图群体, 利用 513 对 SRAP 引物对 3 个质量性状基因(托叶色、叶柄色、叶缘色)进行了定位。3 个花青素质量性状标记定位在遗传连锁图谱上, 它们是托叶色基因与 M18E7 及 M12E18 连锁, 遗传距离分别为 11.2 cm 和 12 cm。

此外, 潘俊松等<sup>[12]</sup>在由黄瓜自交系 S06 与 S52 杂交产生的 F<sub>2</sub> 群体中, 应用 SRAP 标记将黄瓜始花节位形状控制基因 *ffn*(first flower node)定位在第 IX 连锁群上, 与两侧标记 DC1EM5 和 ME7EM2A 的距离分别为 10.3 和 12.2 cm。可见, SRAP 分子技术也可用于功能基因的定位, 为遗传图谱的构建奠定坚实的基础。

## 4. SRAP 技术应用前景

理想的分子标记技术应该具备好的重复性、高共显性、能明确辨别等位基因、遍布整个基因组、检测手段简单、快速、可操作性强、成本低等优点。而 SRAP 分子标记技术恰好具备上述优点, 而且该技术主要用于植物基因组开放阅读框(ORFs)区域的扩增, 是从编码片段的多态性来研究生物个体间基因组结构的差异, 从而分析生物种群的结构。在本实验室中, 目前已完成对国内 11 个红花品种 SRAP 研究分析<sup>[16]</sup>结果表明 SRAP 不仅能进行种间遗传多样性分析, 还能很

好用于种内遗传多样性分析。所以它必将是现在和未来一段时期内理想的分子标记技术之一。在植物学研究领域, SRAP 技术广泛的应用于遗传连锁的构建以及基因定位, 并显示了巨大的应用潜力<sup>[27-30]</sup>。所以, SRAP 分子标记技术必将成为基因组学研究中强有力的技术工具。

## 参考文献 (References)

- [1] G. Li, C. F. Quiros. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction to mapping and gene tagging in *Brossica*. *Theoretical and Applied Genetic*, 2001, 103: 455-461.
- [2] 杨迎花, 李先信, 曾柏全等. 新型分子标记 SRAP 的原理及其研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2009, 5: 15-17.
- [3] 朱英, 刘永翔, 黄永会等. 白芨属种质资源的 SRAP 标记分析[J]. *贵州农业科学*, 2012, 40(9): 10-13.
- [4] 廖诗童, 贤武, 周会等. 不同耐寒甘蔗品种的 SRAP 标记分析[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(4): 1171-1176.
- [5] 杨平, 刘仙俊, 刘新春等. 利用 SRAP 标记研究四川高原青稞育成品种的遗传多样性[J]. *遗传*, 2008, 30(1): 115-122.
- [6] T. Majid, K. Mahboubeh, B. Ebrahim, et al. Molecular diversity and phylogenetic relationships of *Pistacia vera*, *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* and *Pistacia khinjuk* using SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 44: 179-185.
- [7] H. S. Mohammad, T. Majid, E. Badraddin, et al. Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran. *Plant Systematics and Evolution*, 2012, 298(6): 1141-1149.
- [8] 林忠旭, 张献龙, 聂以春等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. *科学通报*, 2003, 48(15): 1676-1679.
- [9] 张宇, 于林清, 慈忠玲等. 利用 SRAP 标记研究紫花苜蓿和黄花苜蓿种质资源遗传多样性[J]. *中国草地学报*, 2012, 34(1): 72-75.
- [10] 欧阳冬梅, 游永宁, 刘凤等. 莲品种 SRAP 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J]. *现代园艺*, 2012, 2: 16-19.
- [11] 陈晖, 陈美霞, 陶爱芬等. 长果种黄麻 SRAP 标记遗传连锁图谱的构建及 3 个质量性状基因定位[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(12): 2422-2430.
- [12] 潘俊松, 王刚, 李效尊等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J]. *自然科学进展*, 2005, 15(2): 167-172.
- [13] 王凤涛, 蔺瑞明, 欧阳宏雨等. 利用 SRAP 标记分析河南小麦栽培品种的遗传多样性[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(4): 517-521.
- [14] 张安世, 邢智峰, 刘永英等. SRAP 分子标记及其应用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(9): 2562-2563.
- [15] 张安世, 刘莹, 徐九文等. 北方粳稻 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. *江苏农业科学*, 2010, 2: 29-32.
- [16] 江磊, 李彦锦, 刘本文等. 红花(*Carthamus tinctorius* L.) SRAP 反应体系建立与优化及对 11 个红花品种基因组的初步分析[J]. *植物学研究*, 2013, 2: 62-66.
- [17] 邵清松, 郭巧生, 房海灵等. 药用菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. *核农学报*, 2009, 5: 820-824.
- [18] 孙祖霞, 刘兆磊, 陈素梅等. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. *南京农业大学学报*, 2011, 34(6): 53-58.
- [19] 任羽, 王得元, 张银东等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(5): 689-693.
- [20] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好等. 石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的建

- 立与优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1-6.
- [21] 权俊萍, 袁菊红, 穆红梅等. 百里香属植物 ISSR-PCR 和 SRAP-PCR 体系的确立及优化[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 2: 1-8.
- [22] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 138-141.
- [23] Z. Sun, Z. Wang, J. Tu, et al. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(8): 1305-1317.
- [24] 李小威, 董志敏, 赵洪锬等. 用 SSR 标记进行野生大豆耐碱基因定位及 QTL 分析[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(03): 15-17, 56.
- [25] 赵立强, 潘文嘉, 马继芳等. 一个谷子新抗锈基因的 AFLP 标记[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4349-4355.
- [26] 孙正文, 黄兴奇, 李维蛟等. 分子标记技术及其在水稻基因定位上的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 78-86.
- [27] Z. Lin, D. He, X. Zhang, et al. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant Breeding*, 2005, 124(2): 180-187.
- [28] A. Levi, C. E. Thomas, T. Trebitsh, et al. An extended linkage map for watermelon based on SRAP, AFLP, SSR, ISSR, and RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2006, 131(3): 393-402.
- [29] J. J. Lu, H. Y. Zhao, N. N. Suo, et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 2012, 137(1): 1-10.
- [30] D. W. Xue, S. G. Feng, H. Y. Zhao, et al. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37(3): 197-204.