

## 研究报告

### A Letter

## 百合 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

陈丽静<sup>1,2</sup>, 曹珊<sup>1</sup>, 王玉坤<sup>1</sup>, 刘烜晨<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 明军<sup>3</sup>, 陶承光<sup>2</sup>, 李天来<sup>1</sup>

1. 沈阳农业大学辽宁省生物技术重点实验室, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 沈阳, 110866

2. 辽宁省农业科学院, 沈阳, 110161

3. 中国农科院蔬菜花卉研究所, 北京, 100081

✉ 通讯作者: chenlijing1997@126.com; ltl@syau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 24 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0024

收稿日期: 2011 年 01 月 11 日

接受日期: 2011 年 02 月 28 日

发表日期: 2011 年 03 月 02 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

陈丽静等, 2011, 百合 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, 分子植物育种 Vol.9 No.24 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0024)

**摘要** 建立适宜百合 DNA 的 SRAP-PCR 扩增体系, 为百合基因图谱的构建和分子标记打下基础。以百合为试验材料, 试验在确定了模板浓度和引物浓度后, 采用二因素交叉试验方法, 对影响百合 SRAP 反应体系的 5 种因素(模板 DNA、引物、Mg<sup>2+</sup> 浓度、dNTPs、Taq 聚合酶用量)进行优化筛选, 建立了适合百合的扩增多态性高、重复性好、带型清晰的最佳 SRAP-PCR 反应体系, 即在 15 μL PCR 反应体系中含有 1.5 μL 10×PCR Buffer、80 ng 模板 DNA、0.11 μmol/L 引物、1.67 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.267 mmol/L dNTPs、1.0 U Taq 聚合酶, PCR 产物变性时用 10 μL 变性剂。

**关键词** 百合; SRAP; 二因素交叉试验设计; 体系优化

## Optimization of SRAP-PCR in *Lilium*

Chen Lijing<sup>1,2</sup>, Cao Shan<sup>1</sup>, Wang Yukun<sup>1</sup>, Liu Xuanchen<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Ming Jun<sup>3</sup>, Tao Chengguang<sup>2</sup>, Li Tianlai<sup>1</sup>

1. Bioscience and Technology institute and Key Laboratory of Protected Horticulture (Ministry of Education) Shenyang Agriculture University, Shenyang, 110161, P.R. China

2. The Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, 110161, P.R. China

3. The institute of vegetables and flowers Chinese academy of agricultural sciences, Beijing, 100081, P.R. China

✉ Corresponding authors, chenlijing1997@126.com; ltl@syau.edu.cn; ✉ Authors

**Abstract** The aim of the research was to establish SRAP-PCR amplification system which was suitable for *Lilium* DNA so as to lay foundation for the construction of gene map and molecular marker in *Lilium*. Being taken as tested materials, SRAP-PCR reaction program in watermelon was investigated and the gradient experiment was conducted on each impact factors in SRAP-PCR reaction system to screen and establish the optimum SRAP-PCR reaction program and system that could amplify high polymorphism, good repeatability and clear band pattern. The optimum SRAP-PCR reaction procedure system (Total of 15 μl) was as follows: 1.5 μL 10×PCR Buffer, DNA 80 ng, primer 0.11 μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.67 μmol/L, dNTPs 0.267 μmol/L, Taq polymerase 1.0 U. The program and system could meet the demands for genome SRAP amplification in *Lilium*. It was feasible to apply SRAP marker in genetic research in *Lilium*. The optimum volume of Loading buffer is 10 μL.

**Keywords** *Lilium*; SRAP; Crossover test of two factors; PCR reaction; Optimization

## 研究背景

SRAP (Sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性) 分子标记技术是由美国加州大学 Li 和 Quiros 博士(2001)在 2001 首先提出, 也称为基于序列扩增多态性(Sequence-based amplified polymorphism, SBAP) (Li et al., 2003), 具有简单、高效、高共显性、重复性、易测序等优点, 适合应用

于遗传图谱构建、基因定位与克隆、比较基因组学、遗传多样性分析等研究领域(Ferriol et al., 2003; Li et al., 2003; Li et al., 2001)。目前已经在辣椒、油菜、大蒜、莴苣、芹菜、马铃薯、苹果、柑橘、樱桃、梅子、棉花、小麦和水稻等植物研究中应用(Ferriol et al., 2003; Li et al., 2003; Li et al., 2001; 李丽等, 2006; 李媛媛等, 2007; 林忠旭等, 2003; 林忠旭等,

2003; 任羽等, 2004; 吴伟怀等, 2004; 武志朴等, 2005)。

SRAP 分子标记是基于 PCR 的标记系统, 因此 PCR 中模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$ 浓度、dNTPs、*Taq* 聚合酶用量以及 PCR 中变性、退火、延伸的温度和时间等因素均会对结果产生影响。本研究拟通过建立百合 SRAP-PCR 反应体系并对其进行优化, 以探索新型分子标记技术 SRAP 在百合遗传图谱构建及分子标记辅助育种研究中应用的可行性, 为百合优质种质资源的科学利用、分子辅助育种和品种鉴定奠定技术基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 模板浓度对 PCR 结果的影响

不同模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增体系有明显影响, 由图 1 可以看出当模板 DNA 的量低于 20 ng 时, 扩增产物的谱带相对较少, 且谱带较淡, 这是因为模板的量太少, 模板与引物不能有效配对, 扩增效率低; 而大于 40ng 时, SRAP 产物基本保持不变, 说明 SRAP 扩增对模板 DNA 的浓度范围可以较宽。

本试验模板 DNA 用量在 10 ng 到 90 ng 之间均能够扩出较为清晰的条带, 但模板量在高于 80 ng

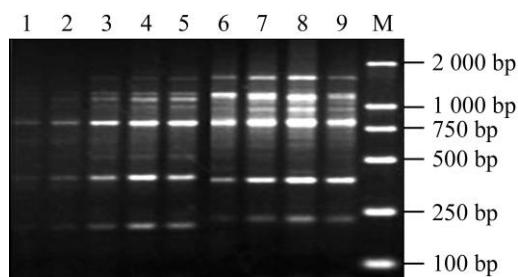


图 1 DNA 浓度对 SRAP 反应的影响

注: M: DL2000 DNA maker; 1: 10 ng DNA/15  $\mu$ L; 2: 20 ng DNA/15  $\mu$ L; 3: 30 ng DNA/15  $\mu$ L; 4: 40 ng DNA/15  $\mu$ L; 5: 50 ng DNA/15  $\mu$ L; 6: 60 ng DNA/15  $\mu$ L; 7: 70 ng DNA/15  $\mu$ L; 8: 80 ng DNA/15  $\mu$ L; 9: 90 ng DNA/15  $\mu$ L

Figure 1 The effects of DNA concentration on SRAP patterns

Note: M: DL2000 DNA maker; 1: 10 ng DNA/15  $\mu$ L; 2: 20 ng DNA/15  $\mu$ L; 3: 30 ng DNA/15  $\mu$ L; 4: 40 ng DNA/15  $\mu$ L; 5: 50 ng DNA/15  $\mu$ L; 6: 60 ng DNA/15  $\mu$ L; 7: 70 ng DNA/15  $\mu$ L; 8: 80 ng DNA/15  $\mu$ L; 9: 90 ng DNA/15  $\mu$ L

和低于 40 ng 时分别出现高分子量条带的模糊和中分子量条带的缺失。推测模板量太低, 影响扩增产物的形成, 而过多的模板 DNA 在扩增产物积累到一定量时会限制反应。通过比较, 本研究选用 80 ng 为最佳模板。

### 1.2 引物浓度梯度试验结果

结果见图 2。从反应结果来看最佳引物浓度十分重要: 较低的引物浓度(A1、A2、B1、B2 所示条带), 引物与模板的结合概率下降, 扩增条带浅, 有的甚至检测不出来。较高的引物浓度(A8、A9、B8、B9 号带)扩增的条带整齐清晰, 效果较好。适中的引物浓度(A3、A4、B3、B4 号带)扩增的条带整齐清晰, 效果也较好, 考虑到较高的引物浓度会引起引物二聚体的产生, 确定引物浓度为 0.11  $\mu$ mol/L。

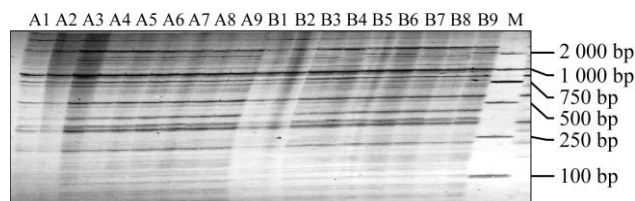


图 2 引物浓度对 SRAP 反应的影响

注: 引物浓度设置见表 2; M: DL2000 DNA maker

Figure 2 The effects of primer concentrations on SRAP

Note: primer concentrations designed in table2; M: DL2000 DNA marker

### 1.3 最佳 $Mg^{2+}$ 浓度的确立

结果如图 3 所示。在引物浓度相同时, 随着  $Mg^{2+}$ 浓度的增加, 产物量先增加后减少。考虑到  $Mg^{2+}$ 浓度过低不利于酶的激活,  $Mg^{2+}$ 浓度太高又容易产生非特异性扩增, 故试验最终选定  $Mg^{2+}$ 浓度为 1.67 mmol/L。

### 1.4 dNTP 浓度对 PCR 结果的影响

$Mg^{2+}$ 浓度为 1.67 mmol  $L^{-1}$ 的情况下, 随着 dNTPs 浓度的增加, PCR 扩增产物的量逐渐增加; 同时非特异性带也随之增加; 当  $Mg^{2+}$ 浓度为 0.83 mmol/L 时, 随着 dNTP 浓度的增加, 扩增产物先增加后减少。这与前人的研究不完全一致(李严等, 2005)。本试验最终选择 dNTP 浓度为 0.267 mmol/L,  $Mg^{2+}$ 浓度为 1.67 mmol/L。结果如图 4 所示。

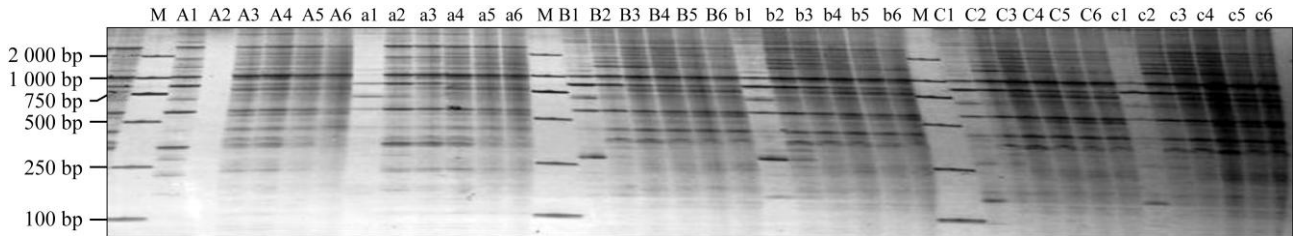


图 3 Mg<sup>2+</sup>和引物浓度对 SRAP 反应的影响

注: Mg<sup>2+</sup>和引物浓度设置见表 2; M: DL2000 DNA maker

Figure 3 The effects of Mg<sup>2+</sup>+concentrations on SRAP

Note: Mg<sup>2+</sup> and primer concentrations designed in table4; M: DL2000 DNA marker

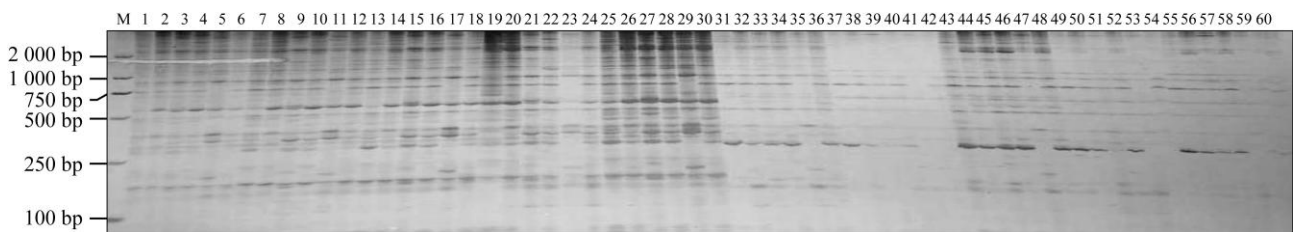


图 4 dNTPs 浓度对 SRAP 反应的影响

注: 引物浓度设置见表 2, M: DL2000 DNA maker

Figure 4 The effects of dNTPs concentrations on SRAP

Note: dNTPs concentrations designed in table5; M: DL2000 DNA marker

### 1.5 Taq 聚合酶的用量对 PCR 结果的影响

试验表明, Taq 酶量在 0.5 U-2 U/15 μL 反应体系时都能得到可重复的清晰条带, 基于经济原因考虑本试验最终选择采用 1 U/15 μL 反应体系, 结果见图 5。

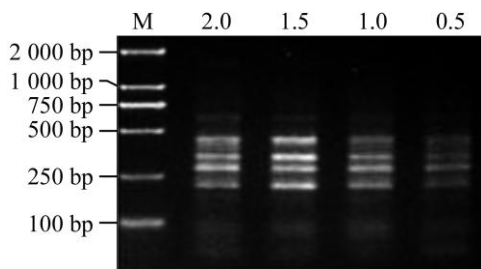


图 5 Taq DNA 聚合酶的纯度和用量对 SRAP 反应的影响

注: 酶浓度从左至右依次为 2.0, 1.5, 1.0, 0.5; M: DL2000 DNA maker

Figure 5 The effects of Taq DNA Polymerase

Note: Taq DNA Polymerase concentrations 2.0, 1.5, 1.0, 0.5; M: DL2000 DNA marker

### 1.6 退火温度和循环次数对扩增的影响

退火温度的高低影响 PCR 的特异性, 退火温度越高, 扩增的特异性越高, 本试验按照 Li 等(2001)

的反应程序对百合 DNA 进行扩增, 电泳结果显示扩增条带不够清晰。因此设计了退火温度梯度试验: 采用了在一个循环体系中采用一低一高两个不同退火温度, 首先在 34℃ 的退火温度下扩增 5 次循环, 然后适当提高退火温度在 50℃ 扩增 35 个循环。可以得到比较理想的扩增结果如图 6 所示。

优化后的程序为: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 34℃ 1 min, 72℃ 1 min, 5 cycles; 接下来将复性温度提高到 50℃, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min,

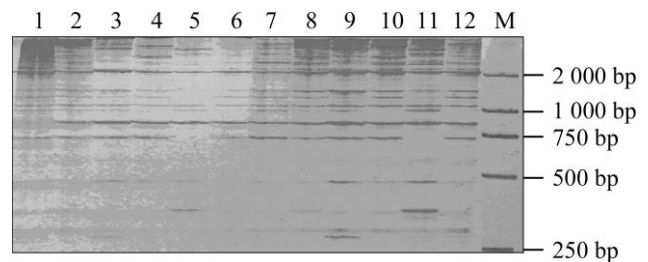


图 6 循环程序对 SRAP 反应的影响

注: 1-6 采用循环程序 1; 7-12 采用循环程序 2; M: DL2000 DNA maker

Figure 6 The effects of circles program on SRAP patterns

Note: 1-6 adopted circles program1; 7-12 adopted circles program2; M: DL2000 DNA marker

35 cycles, 最后 72°C 5 min, 4°C 保存。从图 6 中可以看出能够扩增出清晰稳定的条带, 并有较好的多态性。

### 1.7 SRAP-PCR 体系及反应参数的稳定性检测结果

选择 SRAP 引物组合 me9+em8 进行 PCR, 电泳结果如图 7 所示, 所选择的引物能扩增出清晰、重复性好的条带, 表明优化的反应体系参数稳定可靠。

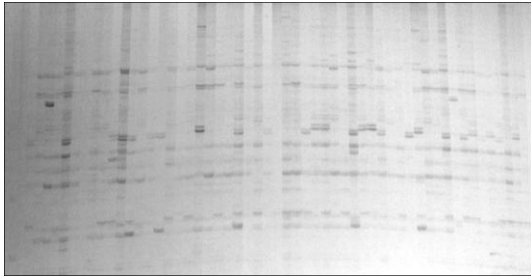


图 7 引物 me9+em8 SRAP 的扩增结果  
Figure 7 The SRAP result with primer me9+em8

## 2 讨论

研究表明, 不同种的试验材料 PCR 扩增反应体系和扩增程序不同, 大多数研究者进行 SRAP 研究时都会对 PCR 扩增反应体系与扩增程序进行优化, 但是通常他们的优化方法都是采用正交实验的方法(杨琦等, 2007; 王振国, 2007; 郭大龙, 2008)。正交实验的优点为: 完成试验要求所需的实验次数少, 数据点的分布很均匀, 可用相应的极差分析方法、方差分析方法、回归分析方法等对试验结果进行分析, 引出许多有价值的结论。但是其缺点也很明显, 即有可能得到的实验条件并不是最优条件。所以本试验在确定了模板浓度和引物浓度后, 主要采用二因素方法确定剩下的反应条件。虽然会加大一定的工作量, 但得到的结果也更加准确可靠。

SRAP 是一种不需要内切酶消化的分子标记技术, 通常适宜植物 PCR 的模板 DNA 量为 1-100 ng。SRAP 的产生是由于遗传材料的基因组 DNA 在特定引物结合区域产生 DNA 片段的插入、缺失或碱基突变后可能导致 PCR 产物增加、缺少或发生变化, 产生特异的条带。因此微量的 DNA 差异也可能导致 PCR 产物的变化。汪小全等(1996)认为模板浓度在一个相当大的范围内不影响扩增结果, 而模板降解程度则会对 SRAP 的结果产生影响。本试验支持汪

小全等的观点。

目前在 SRAP-PCR 中使用 2 种扩增程序。第 1 种由 Li 等(2001)提出的即最初 5 个循环的退火温度设为 35°C。后 30 个循环的退火温度升高为 50°C。第 2 种是 Budak 等(2004)提出的: 94°C 变性 1 min, 47°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min (35 个循环), 72°C 5 min。本试验采用了在一个循环体系采用一低一高两个不同退火温度, 扩增效果较为理想。

关于 SRAP 的反应体系和程序优化的报道(任羽等, 2004; 武志朴等, 2005)很多, 其中模板 DNA、Mg<sup>2+</sup> 浓度、引物浓度、dNTPs、TaqDNA 聚合酶等各组分的用量会影响扩增结果。本试验在优化 SRAP 扩增体系时发现, Mg<sup>2+</sup>、引物、dNTPs、Taq DNA 聚合酶作为 SRAP 扩增的底物, 有一个相对适宜的用量范围, 浓度过低, 不能满足扩增要求; 浓度过高, 组分间可能会产生竞争, 降低各组分的活性, 影响扩增效果。因此, 构建同一物种在相同仪器设备和一定操作规范下的最佳的优化技术体系是进行 SRAP 研究的关键所在。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

亲本材料: 采用实验室胚培养的“雷山一号”与“晶体”做为父母本材料低温冰箱保存备用。

群体材料: 采集 180 株 RIL 群体新生幼嫩叶片低温冰箱保存备用。

### 3.2 基因组 DNA 的提取

参照黄永芳等(2006)提出的改良的 CTAB 法提取百合群体基因组 DNA。用紫外分光光度计测定 DNA 样品的质量和浓度, 并于 1% 琼脂糖凝胶检测。最后将纯化后的 DNA 稀释到 200 ng/μL 用于后续试验。

### 3.3 PCR 反应

PCR 反应在 BIO-RAD 公司的 PTC-100 PCR 仪中进行, 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 1 min, 34°C 1 min, 72°C 1 min, 5 cycles, 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 35 cycles, 最后 72°C 5 min, 4°C 保存。PCR 反应总体积是 15 μL。PCR 产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 银染法染色显影, 在荧光灯上观察分析条带。

### 3.4 PCR 反应体系优化的二因素交叉试验设计

#### 3.4.1 模板浓度对 PCR 结果的影响

不同模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增体系有明显影响, 模板浓度梯度设置如表 1(进行两次重复)所示。

表 1 模板浓度梯度

Table 1 The concentrations gradient of template

| 序号<br>NO. | 模板浓度(ng/15 $\mu$ L)<br>Template concentrations (ng/15 $\mu$ L) | 序号<br>NO. | 模板浓度(ng/15 $\mu$ L)<br>Template concentrations (ng/15 $\mu$ L) |
|-----------|--|-----------|--|
| 1         | 10   | 11        | 10   |
| 2         | 20   | 22        | 20   |
| 3         | 30   | 33        | 30   |
| 4         | 40   | 44        | 40   |
| 5         | 50   | 55        | 50   |
| 6         | 60   | 66        | 60   |
| 7         | 70   | 77        | 70   |
| 8         | 80   | 88        | 80   |
| 9         | 90   | 99        | 90   |

表 2 引物浓度梯度

Table 2 The concentrations gradient of primer

| 序号<br>NO. | 引物浓度( $\mu$ mol/L)<br>Primer concentrations ( $\mu$ mol/L) | 序号<br>NO. | 引物浓度( $\mu$ mol/L)<br>Primer concentrations ( $\mu$ mol/L) |
|-----------|--|-----------|--|
| A1        | 0.05   | B1        | 0.05   |
| A2        | 0.08   | B2        | 0.08   |
| A3        | 0.11   | B3        | 0.11   |
| A4        | 0.14   | B4        | 0.14   |
| A5        | 0.17   | B5        | 0.17   |
| A6        | 0.20   | B6        | 0.20   |
| A7        | 0.23   | B7        | 0.23   |
| A8        | 0.26   | B8        | 0.26   |
| A9        | 0.29   | B9        | 0.29   |

表 3 SRAP 所用引物序列

Table 3 The primer sequences used in SRAP analysis

| 编号<br>Code | 正向引物<br>Forword primers | 编号<br>Code | 反向引物<br>Reverse primers |
|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| me4        | 5'TGAGTCCAAACCGGACC3'   | em6        | 5'GACTGCGTACGAATTAAC3'  |

### 3.4.3 最佳 $Mg^{2+}$ 浓度的确立

最佳引物浓度与最佳  $Mg^{2+}$  浓度的确立显得十分重要, 考虑到引物浓度与  $Mg^{2+}$  浓度互作的影响, 在初步确定引物浓度之后, 在前期所做的工作基础上, 开展引物浓度和  $Mg^{2+}$  浓度的二因素交叉实验, 引物组合采用 me10+em4, 浓度梯度设计如表 4 (重复两次, A, a 重复, B, b 重复, C, c 重复) 所示。

### 3.4.4 dNTP 浓度对 PCR 扩增的影响

针对 dNTP 浓度和  $Mg^{2+}$  的互作效应, 进行了二因素试验设计, 浓度梯度设置见表 5。

反应体系:

*Taq* Enzyme 0.3  $\mu$ L

*Taq* Buffer 1.5  $\mu$ L  
 $Mg^{2+}$  1.8  $\mu$ L  
dNTP Mix 1.2  $\mu$ L  
PrimersFR 1.5+1.5  $\mu$ L  
DNA 1.5  $\mu$ L  
ddH<sub>2</sub>O 5.7  $\mu$ L

### 3.5 优化体系的稳定性检测

选择另外 5 对 SRAP 引物作为检测引物, 用优化的百合 SRAP 反应体系, 对百合基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 每对引物重复 3 次。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后观察结果。检测引物的序列如表 6。

表 4 引物浓度与  $Mg^{2+}$  浓度梯度设置

Table 4 Designed gradients of  $Mg^{2+}$  and primer

| 序号<br>NO. | 引物浓度( $\mu$ mol/L)<br>Primer concentrations | $Mg^{2+}$ 浓度(mmol/L)<br>$Mg^{2+}$ concentrations | 序号<br>NO. | 引物浓度( $\mu$ mol/L)<br>Primer concentrations | $Mg^{2+}$ 浓度(mmol/L)<br>$Mg^{2+}$ concentrations |
|-----------|---|--|-----------|---|--|
| A1        | 0.11  | 0.83   | a1        | 0.11  | 0.83   |
| A2        | 0.11  | 1.67   | a2        | 0.11  | 1.67   |
| A3        | 0.11  | 2.5  | a3        | 0.11  | 2.5  |
| A4        | 0.11  | 3.33   | a4        | 0.11  | 3.33   |
| A5        | 0.11  | 4.17   | a5        | 0.11  | 4.17   |
| A6        | 0.11  | 5  | a6        | 0.11  | 5  |
| B1        | 0.13  | 0.83   | b1        | 0.13  | 0.83   |
| B2        | 0.13  | 1.67   | b2        | 0.13  | 1.67   |
| B3        | 0.13  | 2.5  | b3        | 0.13  | 2.5  |
| B4        | 0.13  | 3.33   | b4        | 0.13  | 3.33   |
| B5        | 0.13  | 4.17   | b5        | 0.13  | 4.17   |
| B6        | 0.13  | 5  | b6        | 0.13  | 5  |
| C1        | 0.16  | 0.83   | c1        | 0.16  | 0.83   |
| C2        | 0.16  | 1.67   | c2        | 0.16  | 1.67   |
| C3        | 0.16  | 2.5  | c3        | 0.16  | 2.5  |
| C4        | 0.16  | 3.33   | c4        | 0.16  | 3.33   |
| C5        | 0.16  | 4.17   | c5        | 0.16  | 4.17   |
| C6        | 0.16  | 5  | c6        | 0.16  | 5  |

表 5 dNTP 浓度与  $Mg^{2+}$  浓度梯度设置Table 5 Designed gradients of  $Mg^{2+}$  and dNTP

| 序号<br>NO. | 材料编号<br>Material<br>code | $Mg^{2+}$ 浓度<br>(mmol/L)<br>$Mg^{2+}$<br>concentrations | dNTP 浓度<br>(mmol/L)<br>dNTP<br>concentrations | 序号<br>NO. | 材料编号<br>Material<br>code | $Mg^{2+}$ 浓度<br>(mmol/L)<br>$Mg^{2+}$<br>concentrations | dNTP 浓度<br>(mmol/L)<br>dNTP<br>concentrations |
|-----------|--------------------------|---|---|-----------|--------------------------|---|---|
| 1         | 1                        | 1.67  | 0.133   | 31        | 1                        | 0.83  | 0.133   |
| 2         | 2                        | 1.67  | 0.133   | 32        | 2                        | 0.83  | 0.133   |
| 3         | 3                        | 1.67  | 0.133   | 33        | 3                        | 0.83  | 0.133   |
| 4         | 4                        | 1.67  | 0.133   | 34        | 4                        | 0.83  | 0.133   |
| 5         | 5                        | 1.67  | 0.133   | 35        | 5                        | 0.83  | 0.133   |
| 6         | 6                        | 1.67  | 0.133   | 36        | 6                        | 0.83  | 0.133   |
| 7         | 1                        | 1.67  | 0.2   | 37        | 1                        | 0.83  | 0.2   |
| 8         | 2                        | 1.67  | 0.2   | 38        | 2                        | 0.83  | 0.2   |
| 9         | 3                        | 1.67  | 0.2   | 39        | 3                        | 0.83  | 0.2   |
| 10        | 4                        | 1.67  | 0.2   | 40        | 4                        | 0.83  | 0.2   |
| 11        | 5                        | 1.67  | 0.2   | 41        | 5                        | 0.83  | 0.2   |
| 12        | 6                        | 1.67  | 0.2   | 42        | 6                        | 0.83  | 0.2   |
| 13        | 1                        | 1.67  | 0.267   | 43        | 1                        | 0.83  | 0.267   |
| 14        | 2                        | 1.67  | 0.267   | 44        | 2                        | 0.83  | 0.267   |
| 15        | 3                        | 1.67  | 0.267   | 45        | 3                        | 0.83  | 0.267   |
| 16        | 4                        | 1.67  | 0.267   | 46        | 4                        | 0.83  | 0.267   |
| 17        | 5                        | 1.67  | 0.267   | 47        | 5                        | 0.83  | 0.267   |
| 18        | 6                        | 1.67  | 0.267   | 48        | 6                        | 0.83  | 0.267   |
| 19        | 1                        | 1.67  | 0.333   | 49        | 1                        | 0.83  | 0.333   |
| 20        | 2                        | 1.67  | 0.333   | 50        | 2                        | 0.83  | 0.333   |
| 21        | 3                        | 1.67  | 0.333   | 51        | 3                        | 0.83  | 0.333   |
| 22        | 4                        | 1.67  | 0.333   | 52        | 4                        | 0.83  | 0.333   |
| 23        | 5                        | 1.67  | 0.333   | 53        | 5                        | 0.83  | 0.333   |
| 24        | 6                        | 1.67  | 0.333   | 54        | 6                        | 0.83  | 0.333   |
| 25        | 1                        | 1.67  | 0.4   | 55        | 1                        | 0.83  | 0.4   |
| 26        | 2                        | 1.67  | 0.4   | 56        | 2                        | 0.83  | 0.4   |
| 27        | 3                        | 1.67  | 0.4   | 57        | 3                        | 0.83  | 0.4   |
| 28        | 4                        | 1.67  | 0.4   | 58        | 4                        | 0.83  | 0.4   |
| 29        | 5                        | 1.67  | 0.4   | 59        | 5                        | 0.83  | 0.4   |
| 30        | 6                        | 1.67  | 0.4   | 60        | 6                        | 0.83  | 0.4   |

表 6 SRAP 所用引物序列

Table 6 The primer sequences used in SRAP analysis

| 编号<br>Code | 正向引物<br>Forward primers | 编号<br>Code | 反向引物<br>Reverse primers |
|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| ME1        | 5'GAGTCCAAACCGGATA3'    | EM1        | 5'GACTGCGTACGAATTAAT3'  |
| ME2        | 5'GAGTCCAAACCGGAGC3'    | EM2        | 5'GACTGCGTACGAATTTGCG3' |
| ME3        | 5'TGAGTCCAAACCGGAT3'    | EM3        | 5'GACTGCGTACGAATTGAC3'  |
| ME4        | 5'TGAGTCCAAACCGGACC3'   | EM4        | 5'GACTGCGTACGAATTTGA3'  |
| ME5        | 5'TGAGTCCAAACCGGAG3'    | EM5        | 5'GACTGCGTACGAATTAAC3'  |
| ME6        | 5'TGAGTCCAAACCGGTAA3'   | EM6        | 5'GACTGCGTACGAATTGCA3'  |
| ME7        | 5'TGAGTCCAAACCGGTCC3'   | EM7        | 5'GACTGCGTACGAATTCAA3'  |
| ME8        | 5'TGAGTCCAAACCGGTGC3'   | EM8        | 5'GACTGCGTACGAATTCTG3'  |
| ME9        | 5'TTCAGGGTGGCCGGATG3'   | EM9        | 5'GACTGCGTACGAATTCGA3'  |
| ME10       | 5'TGGGGACAACCCGGCTT3'   | EM10       | 5'GACTGCGTACGAATACGA3'  |
|            |                         | EM11       | 5'GACTGCGTACGAATTCCA3'  |

#### 4 结论

本试验利用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法研究百合 SRAP 标记的最佳反应体系和反应程序。试验结果表明,百合 SRAP 分析的最优反应体系为:在 15  $\mu\text{L}$  反应体系中模板为 80 ng, 引物浓度为 0.11  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.67  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTP 浓度为 0.267  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1 U 的 *Taq* 酶。百合 SRAP 分析的最佳反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 34 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 5 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环。

#### 作者贡献

作者陈丽静负责本文初稿的执笔,曹珊负责本文初稿的编辑及反复修改,王玉坤和刘烜晨做的聚丙烯酰胺凝胶电泳,张丽引物的筛选,明军提供实验材料及文章的修改思路,陶承光和李天来提供整体科研的思路,经费和文章的修改。

#### 致谢

本研究由辽宁省教育厅项目(L2010495)、中国博士后科学基金面上项目(20100471471)、国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100109)资助。作者感谢天根公司刘玉东在本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢同行评审人的评审建议和修改建议。

#### 参考文献

Budak H., Shearman R.C., and Parmaksiz I., 2004, Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers, *Theor. Appl. Genet.*, 108: 328-324


Ferriol M., Pico B., and Nuez F., 2003, Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using

RAPD and SRAP markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(3): 227-238

- Guo D.L., Hou X.G., Zhang J., and Han L., 2008, The orthogonal optimization of SRAP amplification system in *Paeonia suffruticosa*, *Henan Nongye Kexue (Scientia Agricultura Henan)*, 12: 110-113 (郭大龙, 侯小改, 张静, 韩璐, 2008, 牡丹 SRAP 反应体系的建立及正交设计优化, *河南农业科学*, 12: 110-113)
- Huang Y.F., Yang M.X., Liu J., and Zhou J.P., 2006, DNA extraction and optimization of RAPD reaction system for *Lilium brownii*, *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao (Journal of Tropical and Subtropical Botany)*, 14(3): 251-255 (黄永芳, 杨懋勋, 柳军, 周锦平, 2006, 广东野百合 DNA 提取和 RAPD 条件的优化, *热带亚热带植物学报*, 14(3): 251-255)
- Li G., and Quiros C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*, *Theor. Appl. Genet.*, 103:455-461
- Li G., Gao M., and Yang B., 2003, Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping, *Theor. Appl. Genet.*, 107: 271-282
- Li L., Zheng X.Y., and Liu L.W., 2006, Analysis of genetic diversity and identification of Cucumber varieties by SRAP, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(5): 702-708 (李丽, 郑晓鹰, 柳李旺, 2006, 用 SRAP 标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种, *分子植物育种*, 4(5): 702-708)
- Li Y., and Zhang C.Q., 2005, A molecular marker-SRAP



- technique optimization and application analysis, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 21(5): 108-112 (李严, 张春庆, 2005, 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析, *中国农学通报*, 21(5): 108-112)
- Li Y.Y., Shen J.X., wang t.h., Fu T.D., and Ma C.Z., 2007, Construction of a linkage map using SRAP, SSR and AFLP markers in *Brassica napus* L., *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 40(6): 111-1126 (李媛媛, 沈金雄, 王同华, 傅廷栋, 马朝芝, 2007, 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱, *中国农业科学*, 40(6): 1118-1126)
- Lin Z.X., Zhang X.L., and Nie Y.C., 2003, Construction of Cotton SSR-AFLP based genetic linkage map, *Kexue Tongbao* (Chinese Sci. Bull.), 48(5): 1676-1679 (林忠旭, 张献龙, 聂以春, 2003, 棉花 SRAP 遗传连锁图构建, *科学通报*, 48(5): 1676-1679)
- Lin Z.X., Zhang X.L., and Nie Y.C., 2004, Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of f<sub>2</sub> segregation population and genetic diversity in Cotton, *Yichuan Xuebao* (Acta Genetica Sinica), 31(6): 622-626 (林忠旭, 张献龙, 聂以春, 2004, 新型标记 SRAP 在棉花 F<sub>2</sub> 分离群体遗传多样性评价中的适用性分析, *遗传学报*, 31(6): 622-626)
- Ren Y., Wang D.Y., and Zhang Y.D., 2004, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP): A novel technique for molecular marker, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 209(6): 11-13, 22 (任羽, 王得元, 张银东, 2004, 相关序列扩增多态性(SRAP)一种新的分子标记技术, *中国农学通报*, 209(6): 11-13, 22)
- Ren Y., Wang D.Y., Zhang Y.D., Li Y., and Wang H.M., 2004, Optimization of SRAP-PCR in Hot Pepper, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 2(5): 689-693 (任羽, 王得元, 张银东, 李颖, 王恒明, 2004, 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, *分子植物育种*, 2(5): 689-693)
- Wang X.Q., Zou Y.P., Zhang D.M., Zhang Z.X., and Hong D.Y., 1996, Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics, *Zhiwu Xuebao* (Acta Botanica Sinica), 38(12): 956-962 (汪小全, 邹喻苹, 张大明, 张志宪, 洪德元, 1996, RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题, *植物学报*, 38(12): 956-962)
- Wang Z.G., Zhang H.Y., Yu G.J., Zhang F., Wang Y.J., Xu Y., Guo S.G., and Gong G.Y., 2007, The orthogonal optimization of SRAP amplification system in Cucumber, *Huabei Nongxuebao* (Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 22(4): 112-115 (王振国, 张海英, 于广建, 张峰, 王永健, 许勇, 郭绍贵, 宫国义, 2007, 黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化, *华北农学报*, 22(4): 112-115)
- Wu W.H., Wang L., Cheng G.Z., Zhu Y.Y., and Pan Q.H., 2004, Studies on molecular genetics of rice blast fungus population—Comparison of genetic and pathotypic structures of two rice blast fungus populations derived from Guangdong and Yunnan provinces of China, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 37(5): 675-680 (吴伟怀, 王玲, 程贯忠, 朱有勇, 潘庆华, 2004, 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究——广东省与云南省稻瘟病菌群体遗传及致病型结构的比较分析, *中国农业科学*, 37(5): 675-680)
- Wu Z.P., Yang W.X., Liu D.Q., and Zhang T., 2005, Establishment of SRAP technique system in wheat genome, *Hebei Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Agricultural University of Hebei), 28(3): 66-69 (武志朴, 杨文香, 刘大群, 张汀, 2005, 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究, *河北农业大学学报*, 28(3): 66-69)
- Yang Q., and Zhang L.G., 2007, Optimization of SRAP reaction system in Chinese Cabbage, *Xibei Nongye Xuebao* (Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica), 16(3): 119-123 (杨琦, 张鲁刚, 2007, 大白菜 SRAP 反应体系的建立与优化, *西北农业学报*, 16(3): 119-123)

 5<sup>th</sup>Publisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>