

技术主题

Technology Feature

美国白蜡 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

陈罡[✉], 叶景丰[✉], 马冬菁[✉], 王骞春[✉], 范俊岗[✉], 潘文利[✉]

辽宁省林业科学研究院, 林木生物技术与分析测试中心, 沈阳, 110032

✉ 通讯作者: chengang1625@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 74 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0074

收稿日期: 2011 年 03 月 10 日

接受日期: 2011 年 05 月 25 日

发表日期: 2011 年 06 月 15 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。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:

陈罡等, 2011, 美国白蜡 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, 分子植物育种 Vol.9 No.74 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0074)

摘要 本研究利用正交试验设计 $L_{16}(4^5)$ 对美国白蜡 SRAP-PCR 反应体系的五个因素(Mg^{2+} , dNTP, 引物, *Taq* DNA 聚合酶和模板 DNA)在四个水平上进行优化试验, 结果表明, Mg^{2+} 浓度对反应体系的影响最大; 建立的美国白蜡 SRAP-PCR 最佳体系(25 μ L)为: Mg^{2+} 2.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.4 μ mol/L、模板 DNA 40 ng/ μ L。利用优化后的反应体系对 4 个美国白蜡材料进行了种间多态性检测, 结果表明, 该体系能够很好的满足美国白蜡基因组 SRAP 扩增的要求。这一优化体系的建立为今后利用 SRAP 标记技术对美国白蜡进行分子遗传研究提供基础。

关键词 美国白蜡; SRAP; 正交设计; 体系优化

Optimization for SRAP-PCR System of *Fraxinus Americana* Based on Orthogonal Design

Chen Gang[✉], Ye Jingfeng[✉], Ma Dongjing[✉], Wang Qianchun[✉], Fan Jungang[✉], Pan Wenli[✉]

Liaoning Research Academy of Forestry Sciences, Forestry Biotechnology and Analysis Test Center, Shenyang, 110032, P.R. China

✉ Corresponding author, chengang1625@163.com; ✉ Authors

Abstract The SRAP-PCR system of *Fraxinus Americana* was optimized by the orthogonal design which was in four levels of five factors (Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, dNTPs, Primer, and DNA template). The result showed that the Mg^{2+} concentration was the most dominant factor affected on the result of PCR. The optimum SRAP-PCR system (25 μ L volume) for *Fraxinus americana* included Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.5 U, Primer 0.4 μ mol·L⁻¹, and DNA template 40 ng· μ L⁻¹. Then applied this optimized reaction system to detect the polymorphism of 4 *Fraxinus americana* materials, it was showed that this system could meet the demands for SRAP amplification in *Fraxinus Americana*. This optimized system would provide a foundation for molecular genetics research by using SRAP technique of *Fraxinus Americana* in the future.

Keywords *Fraxinus americana*; SRAP; orthogonal design; system optimization

研究背景

美国白蜡(*Fraxinus americana*)又名白栉, 木犀科落叶乔木, 原产北美, 抗逆性强, 适生范围广, 是良好的水土保持经济树种。另外, 其树型美观, 树冠茂密, 绿叶期较长, 也是城市绿化的优良树种。目前应用分子标记技术在白蜡树种上的研究尚未见报道, 因此, 开展新型分子标记技术研究对促进白蜡育种进程具有重要的指导作用。

SRAP 标记是由美国加州大学 Li 和 Quiros 博士 (Li and Quiros, 2001) 开发的一种基于 PCR 扩增的分子标记技术, 其利用一对正反引物对开放阅读框

(ORFs) 扩增而产生多态性。与其他分子标记相比, 该标记具有简单快速、稳定性好、多态性高、不需预知物种序列等优点, 目前已在植物遗传多样性分析、遗传图谱构建及种质鉴定等领域广泛应用。对于 SRAP-PCR 扩增体系已在多种植物研究中建立, 但在美国白蜡中尚未见报道。本研究利用正交设计, 以美国白蜡为材料, 建立了一套对其适宜的 SRAP-PCR 反应体系, 旨在为进一步开展美国白蜡种质资源遗传多样性研究奠定工作基础。

1 结果与分析

1.1 美国白蜡基因组 DNA 的提取及浓度检测

采用改良的 CTAB 法(钟鸣等, 2002)对美国白蜡基因组 DNA 进行提取, 利用紫外分光光度计及 1%琼脂糖凝胶电泳检测其浓度及质量, 电泳结果图中电泳条带清晰完整(图 1), 所得的 DNA 质量较高, 能够完全满足后续的实验要求。经过稀释使其浓度在 20 ng/μL 左右。

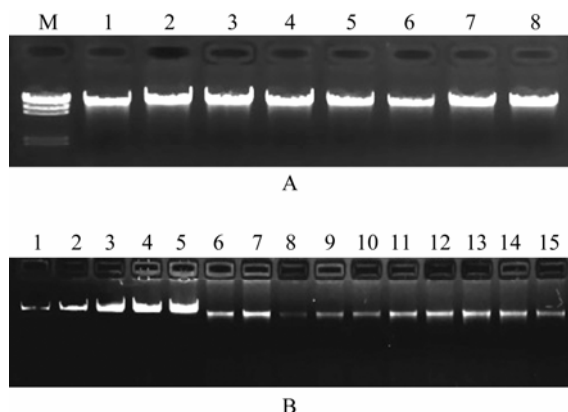


图 1 1%琼脂糖检测基因组 DNA
注: A: M: λDNA/*Hind* III marker; 1~8: 美国白蜡基因组 DNA;
B: 1~5: λDNA, 从左到右分别为 15 ng, 30 ng, 60 ng, 90 ng, 150 ng; 6~15: 稀释后的 DNA
Figure 1 The total DNA isolates checked by 1% Agrose gel
Note: A: M: λDNA/*Hind* III marker; 1~8: The total DNA of *Fraxinus Americana*; B: 1~5: λDNA, from left to right, 15 ng, 30 ng, 60 ng, 90 ng, 150 ng; 6~15: 20 ng/μL dilution

1.2 引物筛选

同一模板 DNA, 16 个不同引物组合对其扩增条带的多少和清晰度都不同, 有的引物组合能够扩增出清晰、丰富的条带, 有的引物组合扩增的条带较少、模糊(图 2)。因此, 在 SRAP-PCR 反应中,

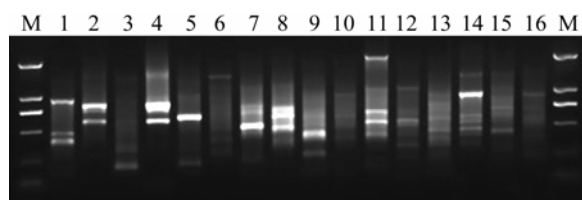


图 2 不用引物组合对扩增结果的影响
注: M: DL2000 marker; 1~16: 16 个 SRAP 引物组合
Figure 2 The influence of different match primers on amplified products
Note: M: DL 2000 marker; 1~16: 16 different match primers combination

应通过不同的引物组合, 筛选条带丰富、清晰的引物作为扩增引物。

1.3 正交试验电泳结果分析

按表 1 设计的 16 个处理进行 PCR 扩增后, 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测(图 3), 根据条带数量丰富度、扩增条带敏感性与特异性进行打分(何正文等, 1998), 即背景深、条带多且清晰的记 16 分, 反之记为 1 分。从两次分别独立的打分结果来看, 两个重复统计比较一致。通过统计分析, 求出各水平的均值 T1、T2、T3、T4 和各因素的极差 R 值。结果表明: 各因素水平变化对 PCR 反应的影响均较大, 其中 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响最大, 引物浓度影响最小。

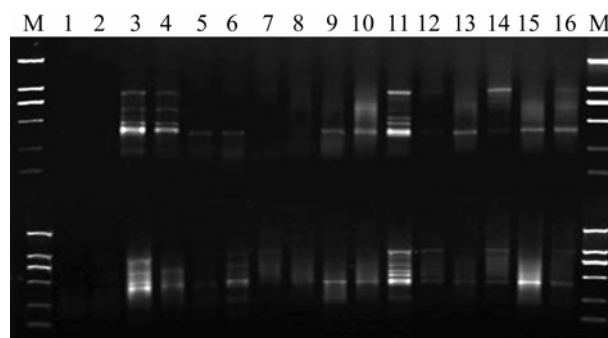


图 3 SRAP-PCR 正交试验设计 PCR 电泳
注: M: DL 2000 marker; 1~16: 处理编号(表 1)
Figure 3 The result of SRAP-PCR products electrophoresis by orthogonal design
Note: M: DL 2000 marker; 1~16: The treatments as showed in table 1

1.4 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

从 Mg^{2+} 浓度与 PCR 评分结果关系来看, Mg^{2+} 浓度各水平间均达到显著水平, 说明 Mg^{2+} 浓度对 PCR 结果的影响较大(图 4)。研究表明, Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的产量和特异性有显著的影响, 当 Mg^{2+} 浓度过低时, 会降低 *Taq* DNA 聚合酶活性, 使反应产物减少; 浓度过高时, 反应特异性降低, 则产生非特异性扩增。本实验结果 1.5 mmol/L~2.0 mmol/L 范围内结果均值随 Mg^{2+} 浓度的增加而下降, 这可能是由于反应各因素的共同作用等原因所致。因此, 选择 2.5 mmol/L 为最佳浓度水平。

表 1 PCR 反应 L₁₆(4⁵)正交设计表

Table 1 L₁₆(4⁵) orthogonal design of PCR reaction

编号 Serial No.	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Taq DNA 聚合酶 (U·25 μL ⁻¹) Taq DNA polymerase (U·25μL ⁻¹)	引物(μmol/L) Primer (μmol/L)	模板 DNA (ng·25 μL ⁻¹) DNA template (ng·25 μL ⁻¹)	得分 Score		平均得分 Average score
						1	2	
1	1.5	150	0.2	0.2	10	1	1	1
2	1.5	200	0.4	0.3	20	1	1	1
3	1.5	250	0.6	0.4	40	12	10	11
4	1.5	300	0.8	0.5	80	10	3	6.5
5	2.0	150	0.4	0.4	80	4	2	3
6	2.0	200	0.2	0.5	40	4	6	5
7	2.0	250	0.8	0.2	20	2	4	3
8	2.0	300	0.6	0.3	10	2	3	2.5
9	2.5	150	0.6	0.5	20	9	9	8
10	2.5	200	0.8	0.4	10	10	8	9
11	2.5	250	0.2	0.3	80	14	16	15
12	2.5	300	0.4	0.2	40	3	5	4
13	3.0	150	0.8	0.3	40	6	4	5
14	3.0	200	0.6	0.2	80	5	7	6
15	3.0	250	0.4	0.5	10	5	6	5.5
16	3.0	300	0.2	0.4	20	9	7	8
T1	4.875	4.25	7.25	3.5	4.5			
T2	3.375	5.25	3.375	5.875	5			
T3	9	8.625	6.875	7.75	6.25			
T4	6.125	5.25	5.875	6.25	7.625			
R	5.625	4.375	3.875	4.25	3.125			

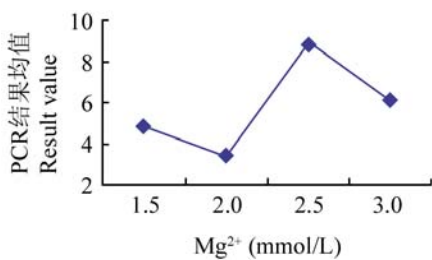


图 4 Mg²⁺浓度与 PCR 评分结果关系图

Figure 4 Relationship between Mg²⁺ concentration and PCR score results

1.5 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响

dNTPs 为 PCR 反应中的原料,其浓度过低会影响扩增效果,降低产率;过高则会影响扩增的准确性,且 dNTPs 能与 Mg²⁺结合,使游离的 Mg²⁺浓度

下降而影响聚合酶活力;同时 dNTPs 浓度过高也会导致不必要的浪费。从 dNTPs 浓度与 PCR 评分结果关系可以看出,在 0.15 mmol/L~0.3 mmol/L 范围内,随着 dNTPs 浓度的增加 PCR 结果均值总体呈上升趋势,在 0.25 mmol/L 时达到最高,随后呈下降趋势;除 0.2 mmol/L 与 0.3 mmol/L 水平间差异不显著外,其余各水平间均差异显著,最终选择 0.25 mmol/L 为最佳浓度水平(图 5)。

1.6 Taq DNA 聚合酶浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Taq DNA 聚合酶浓度是影响 PCR 反应的一个重要因素,酶的浓度过低会影响扩增效率,使扩增产物量减少;浓度太高容易导致非特异性扩增,并且会造成浪费。由 Taq 酶浓度与 PCR 评分结果关系

可知, *Taq* 酶在 0.5 U、1.5 U 和 2.0 U 水平间差异不显著, 而三个水平均与 1.0 U 水平差异显著。0.5 U~1 U 范围内结果均值明显下降, 随后又随酶浓度的升高而上升(图 6), 这一结果可能是由于直观分析以及反应各因素的相互作用等原因所致。催化典型的 PCR 反应约需酶量 2.5 U(总反应体积为 100 μ L)。本实验采取 25 μ L 体积, 而且 0.5 U 时已经达到了较好的扩增效果, 因此选择 0.5 U 为最佳反应水平。

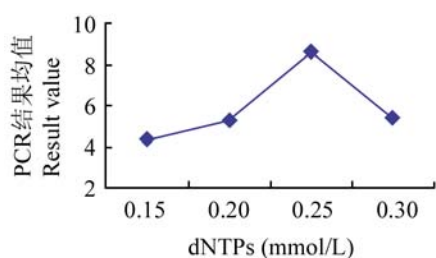


图 5 dNTPs 浓度与 PCR 评分结果关系图
Figure 5 Relationship between dNTPs concentration and PCR score results

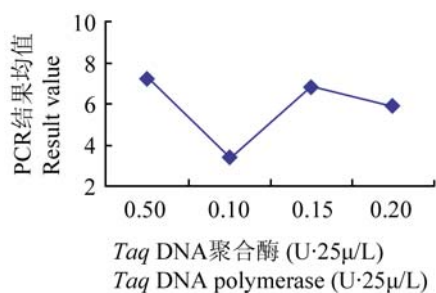


图 6 *Taq* 酶浓度与 PCR 评分结果关系图
Figure 6 Relationship between *Taq* DNA polymerase concentration and PCR score results

1.7 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响

引物浓度过低时, 其与模板 DNA 的结合率降低, 扩增产物量少; 浓度过高时会引起非特异性扩增, 易形成引物二聚体。从引物浓度与 PCR 评分结果关系可以看出, 引物浓度在 0.2 μ mol/L~0.5 μ mol/L 范围内呈先上升后下降的趋势, 0.3 μ mol/L 和 0.5 μ mol/L 水平间差异不显著, 其余每二者之间的差异均达到显著水平。当在 0.4 μ mol/L~0.5 μ mol/L 水平范围内, 随着引物浓度的增高, 结果均值呈下降趋势(图 7), 这说明过高的引物浓度在一定程度上影响了扩增条带的数目和质量, 因此, 选择 0.4 μ mol/L 为最佳浓度水平。

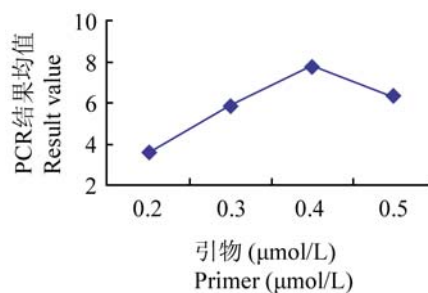


图 7 引物浓度与 PCR 评分结果关系图
Figure 7 Relationship between primer concentration and PCR score results

1.8 模板 DNA 浓度对 PCR 结果的影响

DNA 是 PCR 反应的模板, DNA 浓度过低时扩增条带少且模糊; 浓度过高则易产生非特异扩增, 出现扩增结果不稳定的假象。本试验反应结果, DNA 在 10 ng·25/ μ L 和 20 ng·25/ μ L 水平间差异不显著, 10 ng·25/ μ L~80 ng·25/ μ L 水平呈显著上升趋势, 其余水平间差异极显著(图 8)。已有研究表明, 模板 DNA 的适合范围较宽, 由于低 DNA 浓度容易导致反应体系不稳定, 同时为降低 TE 缓冲液中 EDTA 对反应中 Mg^{2+} 的影响, 综合考虑, 最终选定 40 ng·25/ μ L 为最佳反应浓度。

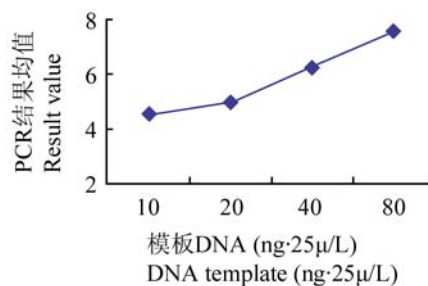


图 8 模板 DNA 浓度与 PCR 评分结果关系图
Figure 8 Relationship between DNA template concentration and PCR score results

1.9 美国白蜡 SRAP-PCR 反应体系的验证及不同种源间多态性检测

为了进一步验证优化扩增体系的有效性, 随机选用 8 对引物组合对 4 个不同种源的美白蜡(亚拉巴马种源, 宾夕法尼亚种源, 密西西比种源及田纳西种源)材料进行 SRAP-PCR 扩增, 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染后检测, 结果均扩增出清晰的谱带并表现出很好的稳定性(图 9), 说明本试验建立

扩增体系是可行的。选用的 8 对引物组合均能在 4 个材料中扩增出多态性条带, 且多态性位点丰富, 说明 SRAP 标记适合用于美国白蜡品种的遗传多样性分析及分子鉴定。

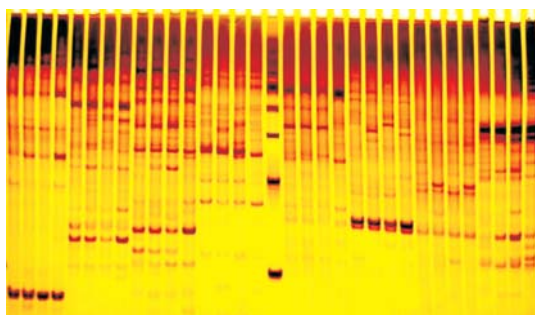


图 9 8 对引物组合在 4 个不同种源美国白蜡材料中扩增出的 SRAP 条带

Figure 9 SRAP fragment amplified by primer combination in different material *Fraxinus americana*

2 讨论

美国白蜡生长速度快, 绿化效果好, 是沿海湿地造林的优良树种之一。因其抗逆性强, 具有优良的抗逆基因资源, 是进行林木抗性育种研究的理想材料。由于美国白蜡遗传基础材料匮乏, 并且为多年生木本植物、世代周期长、遗传高度复杂等原因, 利用传统林木遗传育种的方法难以在分子水平上揭示其遗传基础。DNA 分子标记技术是直接对其 DNA 进行研究, 不受环境和发育阶段的影响, 更具目的性和高效性, 是对其进行遗传图谱构建、不同品种遗传多样性分析、良种鉴定及抗性基因定位等研究的有力工具。

SRAP 标记是目前一种较为理想的分子标记技术, 与其他常用的分子标记相比, 弥补了它们的一些不足, 而且更能反应表型的多样性及进化史 (Ferriol et al., 2003a, 2003b), 提供的信息也更为优良 (Ferriol et al., 2004)。SRAP 标记引物通用性强, 不需要预知物种的序列信息, 因此应用广泛。目前, 已经在蔬菜作物、果树等多种植物的遗传育种研究中成功应用, 在林木指纹图谱建立 (王宇等, 2007, 林业实用技术, (5): 3-5)、种质鉴定 (於朝广等, 2009) 及林木遗传多样性分析 (陈昱等, 2010; 王骞春等, 2010, 辽宁林业科技, (6): 19-21, 48) 等方面研究也已陆续开展, 本试验首次对美国白蜡的 SRAP-PCR

扩增体系进行优化, 建立的扩增体系稳定可靠, 能够很好的用于美国白蜡分子遗传育种研究。

由于 SRAP 标记是一种基于 PCR 的分子标记技术, 扩增结果受反应条件、材料、药品及仪器不同等因素的影响, 因此在应用前应对其扩增体系进行优化, 根据实际所用进行调整。SRAP 体系优化的方法有多种, 本试验对其反应体系中 5 个因素进行正交设计, 得到了美国白蜡 SRAP-PCR 的最佳扩增体系, 试验快捷简便, 结果科学可靠。但该方法也存在一定局限性, 在对扩增谱带的优劣判断上带有一定的主观成分, 不能很好地说明各因素间的互作等, 如果能够建立客观的 PCR 扩增结果评价标准, 则能极大的促进以 PCR 技术为基础的分子标记技术的应用。

3 材料与方法

3.1 试验材料

供试材料为辽宁省林业科学研究院从美国引进不同种源的美国白蜡成熟饱满种子, 经组培扩繁获得实生苗后, 剪取其幼嫩叶片 -70°C 保存备用。

3.2 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法并略加改进后提取基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量及完整性, 并用 UV1102 紫外分光光度计测定其浓度, 选出适宜的作为模板 DNA, 稀释至所需浓度后, -20°C 保存备用。

3.3 引物筛选

SRAP 引物采用已发表 (Li and Quiros, 2001) 的引物组合, 由北京赛百胜生物公司合成。随机选取 16 对引物组合, 参考 Li 和 Quiros 的扩增反应体系及程序, 进行引物筛选, 选择条带丰富清晰的引物组合进行优化实验。

3.4 SRAP-PCR 反应体系及扩增条件

采用正交设计确定 PCR 反应中 5 个因素 (Mg^{2+} , dNTP, 引物, Taq DNA 聚合酶及模板 DNA) 的最佳水平, 正交设计方案 (表 1)。随机选取一个模板按表 1 中的 16 个处理进行实验, 每处理重复 2 次。扩增反应均在 PTC-200 型 PCR 仪 (BIO-RAD) 上进行。反应总体积为 25 μL , 扩增程序首先是 94°C 预变性 5 min; 然后前 5 个循环为: 94°C 变性 30 s, 37°C 退

火 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 随后的 35 个循环为: 94℃ 变性 30 s, 50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 经 EB 染色后在 Gel-2000 凝胶成像系统(BIO-RAD)上观察和记录。以上实验所用试剂均购自北京 TIANGEN 生物有限公司。

3.5 SRAP-PCR 反应体系验证及不同种源美国白蜡多态性检测

在优化后的反应体系基础上, 选取 4 个不同种源的美国白蜡材料进行体系验证, 并对其进行 SRAP 多态性检测。PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 银染法染色显影后, 用数码相机拍照并观察。

作者贡献

陈罡、叶景丰和马冬菁是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 陈罡完成数据分析、论文初稿的写作; 王骞春和潘文利参与实验设计, 试验结果分析; 范俊岗是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家林业局“948”项目(2007-4-15)“抗寒耐盐碱美国白蜡优良种源及盐碱土壤改良技术引进”课题资助。作者感谢辽宁省农业生物技术重点实验室的师生在本实验过程中提供的技术支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关仪器和试剂供应商, 这并非我们为这些仪器和试剂供应商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

Chen G., Xing Z.K., Pan W.L., Guan M.D., Wei Z.P., Ye J.F., Ma D.J., and Gao J., 2010, Genetic diversities of *Populus* in Liaoning area by using SRAP marker, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 38(10): 19-22 (陈罡, 邢兆凯, 潘文利, 关明东, 魏忠平, 叶景丰, 马冬菁, 高军, 2010, 辽宁地区主栽杨树品种的 SRAP 标记遗传多样性分析, 东北林业大学学报, 38(10): 19-22)

Ferriol M., Pico B., Fernandez De Cordova P., and Nuez F., 2004, Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and

AFLP marker, *Crop Science*, 44(2): 653-664

Ferriol M., Pico B., and Nuez F., 2003a, Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers, *Theor. Appl. Genet.*, 107(2): 271-282


Ferriol M., Pico M.B., and Nuez F., 2003b, Genetic diversity of some accession of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(3): 227-238

He Z.W., Liu Y.S., Chen L.H., Cao M.H., and Xia J.H., 1998, Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization, *Hunan Yike Daxue Xuebao (Bulletin of Hunan Medical University)*, 23(4): 403-404 (何正文, 刘运生, 陈立华, 曹美鸿, 夏家辉, 1998, 正交设计直观分析法优化 PCR 条件, 湖南医科大学学报, 23(4): 403-404)

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(2-3): 455-461

Yu C.G., Yin Y.L., and Xu J.H., 2009, Identification of *Taxodium* hybrids by SRAP analysis, *Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae)*, 45(2): 142-146 (於朝广, 殷云龙, 徐建华, 2009, 用 SRAP 标记鉴定落羽杉属植物杂种, 林业科学, 45(2): 142-146)

Zhong M., Niu Y.C., Xu S.C., and Wu L.R., 2002, RAPD markers linked to the stripe rust resistance gene *Yr5* in the wheat variety *Triticum spelta album*, *Yichuan Xuebao (Journal of Genetics and Genomics)*, 29(8): 719-722 (钟鸣, 牛永春, 徐世昌, 吴立人, 2002, 小麦品种 *Triticum spelta album* 中抗条锈病基因 *Yr5* 的 RAPD 标记, 遗传学报, 29(8): 719-722)

 5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线查阅您的论文

- ※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>