

杨树 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

陈 罡, 关明东, 叶景丰, 马冬菁, 潘文利, 刘红民

(辽宁省林业科学研究所 辽宁 沈阳 110032)

摘 要:以辽宁杨为材料,建立了杨树的 SRAP-PCR 扩增体系。利用单因素试验对影响扩增的 5 个组分进行了优化,确定在 25 μ L 反应体系中: Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶浓度为 1.0 U、引物浓度为 0.3 μ mol/L、模板 DNA 浓度 30 ng/ μ L。利用优化后的反应体系对 17 个杨树材料进行了多态性检测,结果表明:该体系能够很好的满足杨树基因组 SRAP 扩增的要求。

关键词:辽宁杨;SRAP;体系优化

中图分类号:S 792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-0009(2010)16-0132-03

相关序列多态性分析(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种以 PCR 为基础的分子标记技术,由美国加州大学蔬菜系 Li 等^[1]于 2001 年提出,其基本原理是通过设计一对正反引物对开放阅读框(Open reading frames, ORFs)进行扩增,正向引物对富含 GC 的外显子进行扩增,反向引物对富含 AT 的内含子、启动子区域进行特异扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。该标记以其操作简便、稳定可靠、多态性高、引物具有通用性、标记分布均匀等特点,而广泛应用于植物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传图谱构建、重要性状基因标记及基因定位等诸多领域^[2]。在利用基于 PCR 反应的分子标记技术进行分析时, DNA 样品所能扩增出条带的数量、清晰度及稳定性影响着多态性条带的统计和分析,因此在使用 SRAP 分子标记技术时,需要先确定其最佳反应体系。目前,对于 SRAP 反应体系的某些影响因素已有一些初步研究,但在杨树中报道较少。该研究对影响 SRAP-PCR 扩增反应的 5 个组分使用浓度进行了优化,旨在建立稳定可靠的杨树 SRAP-PCR 反应体系,为开展杨树分子遗传育种研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

5 月中旬从辽宁省林业科学研究所杨树丰产林基地采集辽宁杨 *Populus × liaoningensis* 幼嫩枝条,置于冰盒中保存带回,水培后,剪取新生的幼嫩叶片进行 DNA

提取。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 CTAB 法^[3](稍加改动)提取杨树基因组 DNA。1%琼脂糖凝胶电泳(1×TBE)和 UV1102 紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,选出合适的样品-20℃保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系 SRAP 引物采用 Li 等^[1]已发表的序列,由北京赛百胜生物公司合成。参考 Li 等^[1]的 SRAP-PCR 反应体系,进行单因素试验,进一步分析 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶及模板 DNA 浓度对杨树 SRAP 扩增结果的影响。反应总体积为 25 μ L,设定的 5 个梯度分别为: Mg^{2+} : 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L; dNTPs: 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L; *Taq* DNA 聚合酶: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U; 引物: 0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 μ mol/L; 模板 DNA: 3.0、15、30、60、120 ng/ μ L。通过对结果进行直观评价,确定杨树 SRAP-PCR 的最佳反应体系。以上试剂均购自北京 TIANGEN 生物有限公司。

1.2.3 SRAP-PCR 扩增程序 扩增反应均在 PTC-200 型 PCR 仪(BIO-RAD)上进行。扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 37℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 5 个循环; 94℃变性 1 min, 50℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 8 min; -4℃保存。PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分离,染色后在 Gel-2000 凝胶成像系统上观察和记录。

1.2.4 不同杨树材料间多态性检测 在优化反应体系的基础上对 17 个杨树材料进行 SRAP 多态性检测,扩增产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液为 1×TBE。电泳时先用 75 W 预电泳至 50℃,上样后 55 W 恒定功率电泳至二甲苯青为胶板 2/3 处停止,电泳后采用银染法进行染色。

第一作者简介:陈罡(1980-),男,硕士,工程师,现主要从事林木生物技术研究工作。E-mail:chengang1625@163.com。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BA03A1401)。

收稿日期:2010-04-10

2 结果与分析

2.1 杨树基因组 DNA 的提取

使用改良 CTAB 法提取杨树基因组 DNA, 白色絮状沉淀能够完全溶解, 分光光度计结果显示, A_{260}/A_{280} 值

位于 1.7~1.9 之间。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1) 可见条带清晰整齐; 与 Marker 对照, 所得的 DNA 分子 量较大, 能够满足 SRAP-PCR 扩增的要求。通过稀释一 定倍数, 使其浓度在 30 ng/ μ L 左右。

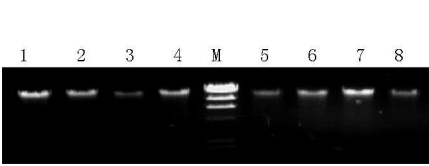


图 1 1% 琼脂糖检测基因组 DNA 质量
注: M: Marker λ DNA/Hind III 1~8; 辽宁杨 基因组 DNA。

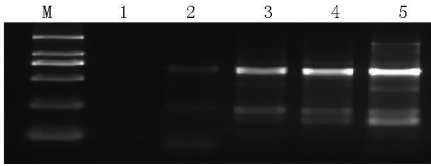


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度梯度的 SRAP 扩增结果
注: M: Marker DL 2 000, 1~5 Mg^{2+} 浓度分 别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L, 引物: ME3/EM7。

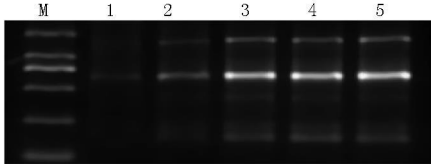


图 3 不同 dNTPs 浓度梯度的 SRAP 扩增结果
注: M: Marker DL 2 000, 1~5 dNTPs 浓度 分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L, 引物: ME3/EM7。

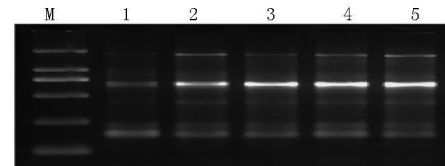


图 4 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度梯度 的 SRAP 扩增结果
注: M: Marker DL 2 000, 1~5 *Taq* DNA 聚 合酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U, 引物: ME3/EM7。

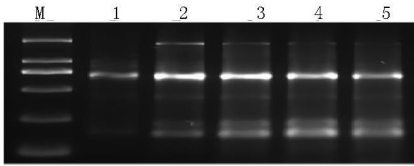


图 5 不同引物浓度梯度的 SRAP 扩增结果
注: M: Marker DL 2 000, 1~5 引物浓度分别 为 0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 μ mol/L, 引物: ME3/EM7。

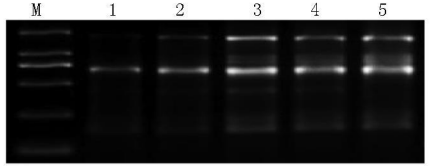


图 6 不同模板 DNA 浓度梯度的 SRAP 扩增结果
注: M: Marker DL 2 000, 1~5: 模板 DNA 浓 度分别为 3.0、15、30、60、120 ng/ μ L, 引物: ME3/EM7。

2.2 SRAP-PCR 反应体系的优化

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响
 Mg^{2+} 是 *Taq* 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 的浓度直接影响 PCR 扩增的特异性和效率。当 Mg^{2+} 浓度过低时, 酶活 力显著下降, 过高时, 则可能催化非特异性扩增。该试 验设定的 5 个 Mg^{2+} 浓度扩增结果见图 2, 当浓度为 1.0 mmol/L 时, 没有扩增产物, 随着 Mg^{2+} 的增加, 扩增谱带 由弱到强, 在浓度为 2.0 mmol/L 即可获得清晰的谱带。

2.2.2 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响
dNTPs 是 PCR 反应的底物, 浓度过低会使产率降低, 浓 度过高会导致 DNA 聚合酶错误掺入。由图 3 可知, 当 dNTPs 浓度为 0.1~0.15 mmol/L 时, 扩增条带数量少 且谱带较弱, 随着 dNTPs 浓度的增加产物量也逐渐增 加。从经济角度来说, dNTPs 浓度以 0.2 mmol/L 为宜。

2.2.3 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 SRAP-PCR 扩增结果 的影响 *Taq* DNA 酶浓度对 PCR 产物的影响至关重 要。酶的浓度过低会使扩增产物量减少, 浓度太高容易 导致非特异性扩增。该试验扩增结果见图 4, 在 0.5 U 时条带有些模糊, 1~2.5 U 时带纹较清晰, 从经济成本 考虑, *Taq* DNA 聚合酶的适宜用量为 1.0 U。

2.2.4 引物浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响 引物 浓度是 PCR 反应体系中一个重要的因素, 引物浓度过低 使扩增产物减少, DNA 检测条带不明显; 引物浓度过高,

会导致非特异性扩增, 而且反应过剩的 2 条引物链容易 配对形成引物二聚体, 从而影响靶序列的产量。从图 5 可以看出, 引物浓度为 0.1 μ mol/L 时扩增条带少且较 弱, 随着引物浓度的增加反应产物量逐渐增加, 但浓度 达到 1.2 μ mol/L 时产物量反而减少, 所以引物用量选 择 0.3 μ mol/L。

2.2.5 模板 DNA 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响
DNA 是 PCR 扩增反应的模板, 其含量是制约扩增产 量及特异性的一个因素。该试验所采用的 5 个模板 DNA 梯度扩增结果见图 6, 当模板 DNA 浓度低于 15 ng/ μ L 时, 扩增条带较少且谱带较弱, 而为 120 ng/ μ L 时, 有些条带消失并出现一定的弥散, 在 30 ng/ μ L 时扩 增效果最佳。综合考虑以上因素, 杨树 SRAP-PCR 扩增 的最佳反应体系为: Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L、dNTPs 浓 度为 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶浓度为 1.0 U、引物 浓度为 0.3 μ mol/L、模板 DNA 浓度为 30 ng/ μ L。

2.3 杨树 SRAP 标记的多态性检测

利用上述建立和优化的 SRAP-PCR 扩增体系, 随机 选用 31 对 SRAP 引物对 17 个生长自辽宁不同地区的杨 树材料进行扩增, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染检 测, 每个样品均能得到清晰谱带, 说明优化后的扩增体 系是可行的。同时可以看出聚丙烯酰胺凝胶电泳比高 浓度琼脂糖凝胶电泳的分辨率高许多, 更适合杨树遗传

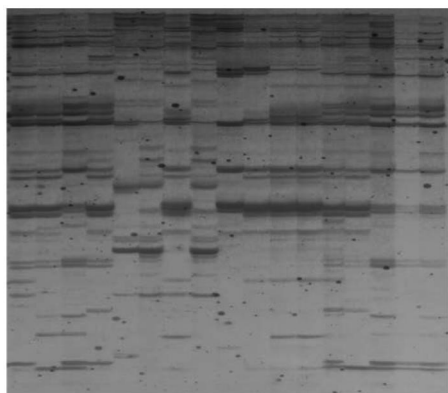


图7 引物组合 ME3/ EM5 在不同杨树材料中扩增出的 SRAP 条带

多样性研究中条带的检测与统计(图7)。试验共检测到685个多态性条带,多态性比率为95.3%,可见杨树的SRAP标记多态性水平较高。

3 结论与讨论

SRAP标记与其它基于PCR的分子标记相比,其独特之处在于它是对开放阅读框(ORFs)进行扩增,因此提高了扩增结果与表现型的相关性。研究表明SRAP标记比AFLP、RAPD等标记更能反应表型的多样性及进化史^[4-5],而且提供的信息比AFLP更为优良^[9]。同时SRAP标记弥补了常用的分子标记的一些不足,如RAPD重复、稳定性较差;SSR检测位点较少,引物开发费时且成本高;AFLP分析程序复杂、成本昂贵等,因此,SRAP标记是目前一种比较理想的分子标记技术,具有广阔的应用范围和前景。

PCR扩增结果受诸多因素影响,对于不同材料,扩增体系所用各组分的浓度也不相同。该试验最终确定的杨树SRAP-PCR扩增体系与前人研究结果在各组分的用量上略有差别,这表明材料来源、所用仪器及药品不同,PCR体系中各成分的最适用量存在一定的差异,应根据自己实际所用来进行调整。该研究对影响杨树SRAP-PCR扩增结果的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA聚合酶及模板DNA浓度进行了单因素试验。试验中发现 Mg^{2+} 浓度对SRAP-PCR结果的影响较大,微小的变动就能引起很大变化;dNTPs、酶及引物浓度的变动对体系影响相对较小;而扩增反应对模板浓度的适应范围比较大,说明SRAP-PCR对模板浓度的要求不高。优化后的体系经反复验证,结果稳定可靠,能够很好的满足杨树基因组SRAP扩增的要求,完全适用于下一步的研究。

参考文献

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), A new marker system based on a simple PCR reaction its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [2] 姜树坤, 钟鸣, 徐正选, 等. RAPD标记进行水稻籼粳分类的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 639-641.
- [3] 陈罡, 冯健, 王春春, 等. SRAP标记及其在林木遗传育种研究中的应用前景[C]//第二届中国林业学术大会—S2功能基因组时代的林木遗传与改良论文集. 南宁: 2009: 328-332.
- [4] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(2): 271-282.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of some accession of Cucurbita maxima from Spain using RAPD and SBAP markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50(3): 227-238.
- [6] Ferriol M, Pico B, Pascual F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (Cucurbita moschata) determined by SRAP and AFLP marker [J]. Crop Science, 2004, 44: 653-664.

Establishment and Optimization of SRAP-PCR Reaction System in *Populus*

CHEN Gang, GUAN Ming-dong, YE Jing-feng, MA Dong-jing, PAN Wen-li, LIU Hong-min
(Liaoning Research Academy of Forestry Sciences Shenyang Liaoning 110032)

Abstract: Taking *Populus* × *liaoningensis* as the experimental materials, the SRAP-PCR reaction system of *Populus* was established. By single factor experiments the five impact factors of SRAP were optimized. The results showed that the optimum system (25 μ L volume) included Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 1.0 U, Primer 0.3 μ mol/L, DNA template 30 ng/ μ L. Then applied this optimized reaction system to detect the polymorphism of 17 *Populus* materials, it was showed that this system could meet the demands for SRAP amplification in *Populus*.

Key words: *Populus* × *liaoningensis*; SRAP; orthogonal design; system optimization