

# 小干松 SRAP-PCR 反应体系的建立

王 骞 春<sup>1</sup>, 黄 夏<sup>1</sup>, 李 光 森<sup>2</sup>

(1. 辽宁省林业科学研究院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁省实验林场, 辽宁 弯甸子 113311)

**摘 要:**以小干松针叶基因组 DNA 为模板, 采用  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计, 对 SRAP-PCR 反应体系中的 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、模板 DNA 和引物 5 个因素在 4 个水平上进行优化。结果表明: 小干松 SRAP-PCR 20  $\mu$ L 反应体系最佳组合为: *Taq* 酶 0.5 U,  $Mg^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L, 模板 DNA 含量 60 ng, 引物 0.2  $\mu$ mol/L。使用 12 对 SRAP 引物, 采用优化后的体系进行 SRAP-PCR 反应, 表明优化的体系很好地满足了小干松基因组 DNA 进行 SRAP 的扩增要求。

**关键词:**小干松; SRAP; 反应体系

**中图分类号:**S 791.256 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0083-04

小干松(*Pinus contorta*)属松科松属植物, 为二针松, 又名扭松、北美黑松。原产地为北美, 水平分布在北纬  $31^{\circ}\sim 64^{\circ}$  和西经  $107^{\circ}\sim 140^{\circ}$  地域, 垂直分布海拔 0~3 600 m 的广大地区, 具有抗旱、抗寒、抗病和抗污染等特性。小干松有 4 个变种, 各变种间形态和抗性有明显差异<sup>[1]</sup>。SRAP 标记(Sequence-Related Amplified Polymorphism)是由 Li 等<sup>[2]</sup>在 2001 年提出的一种基于 PCR 的分子标记技术。该方法具有高共显、中产率、多态性高和重复性好的特点, 已被广泛应用在遗传多样性分析、遗传图谱构建和基因定位、基因分离、品种鉴定等研究工作。多种植物的 SRAP-PCR 反应体系已经建立, 但在小干松中鲜见报道。该研究旨在建立小干松的 SRAP-PCR 反应体系, 为小干松引种、育种工作中的种源分类和鉴定以及其它科学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年在辽宁省灯塔市铍子林场采集小干松当年新发针叶作为试验材料, 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱内。

用于 SRAP-PCR 反应的  $10\times$  PCR buffer、 $MgCl_2$ 、*Taq* 酶和 dNTPs 购自天根生化科技(北京)有限公司, SRAP 引物购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 的提取** 使用改良的 CTAB 法<sup>[3]</sup> 提取材料基因组 DNA, 提取后经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。用紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 将其稀释至 30、60、

90 和 120 ng 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下备用。

**1.2.2 SRAP-PCR 反应体系正交实验** 随机选取了正向引物 ME1: 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3' 和反向引物 EM3: 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3' 组合。扩增程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $35^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 5 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $50^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。SRAP-PCR 产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳后经银染、显影后拍照分析。

### 1.3 数据分析

参照何正文等<sup>[4]</sup>的方法, 根据 PCR 产物扩增条带的数量、特异性、清晰度作为评分标准, 分为 1~16 个等级。条带数量最多、特异性好、并且最清晰的处理记为 16 分, 相反最差的记为 1 分, 2 次重复试验分别独立统计。根据评分进行正交直观分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP-PCR 扩增效果及评分

小干松 SRAP-PCR 反应体系扩增结果见图 1。依处理次序得到的 2 次分数分别记为: 4、4、6、5、6、8、4、16、13、9、5、1、11、4、15、12; 3、5、6、5、5、8、3、16、13、9、5、1、11、4、15、12。从评分结果来看, 每个处理的 2 个重复间得分一致性高, 说明 SRAP-PCR 试验的重复性好。

### 2.2 正交设计直观分析

利用正交设计助手 II v3.1 软件对试验结果进行直观分析, 得出每个因素各水平下的均值  $k_i$  和极差  $R$ , 极差  $R$  反映了影响因素对反应体系的影响,  $R$  值越大, 影响越显著。由表 2 可知, 该试验水平内各因素水平的变化对油茶 SRAP-PCR 反应的影响大小依次为: 引物浓度 > *Taq* DNA 多聚酶含量 > 模板量 > dNTPs 浓度 >  $Mg^{2+}$  浓度。

**第一作者简介:**王骞春(1979-), 男, 硕士, 工程师, 现主要从事林木遗传育种等研究工作。

**基金项目:**国家林业局“948”资助项目(2012-4-39)。

**收稿日期:**2012-10-22

表 1 SRAP-PCR 反应体系的  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计

Table 1  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design of SRAP-PCR reaction system

编号 Serial No.	ddH <sub>2</sub> O / $\mu$ L	10 $\times$ Buffer / $\mu$ L	MgCl <sub>2</sub> 浓度 MgCl <sub>2</sub> concentration / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTPs 浓度 dNTPs concentration / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物浓度 Primer concentration / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 DNA 浓度 Concentration of DNA template / $\text{ng} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$	Taq DNA 多聚酶浓度 Concentration of Taq DNA polymerase / $\text{U} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$
1	15.2	2.0	1.0	0.05	0.1	30	0.5
2	13.8	2.0	1.5	0.10	0.2	30	1.0
3	12.4	2.0	2.0	0.15	0.3	30	1.5
4	11.0	2.0	2.5	0.20	0.4	30	2.0
5	13.4	2.0	1.0	0.10	0.3	60	2.0
6	13.2	2.0	1.5	0.05	0.4	60	1.5
7	13.0	2.0	2.0	0.20	0.1	60	1.0
8	12.8	2.0	2.5	0.15	0.2	60	0.5
9	13.0	2.0	1.0	0.15	0.4	90	1.0
10	12.8	2.0	1.5	0.20	0.3	90	0.5
11	13.4	2.0	2.0	0.05	0.2	90	2.0
12	13.2	2.0	2.5	0.10	0.1	90	1.5
13	13.2	2.0	1.0	0.20	0.1	120	1.5
14	13.4	2.0	1.5	0.15	0.2	120	2.0
15	12.8	2.0	2.0	0.10	0.3	120	0.5
16	13.0	2.0	2.5	0.05	0.4	120	1.0

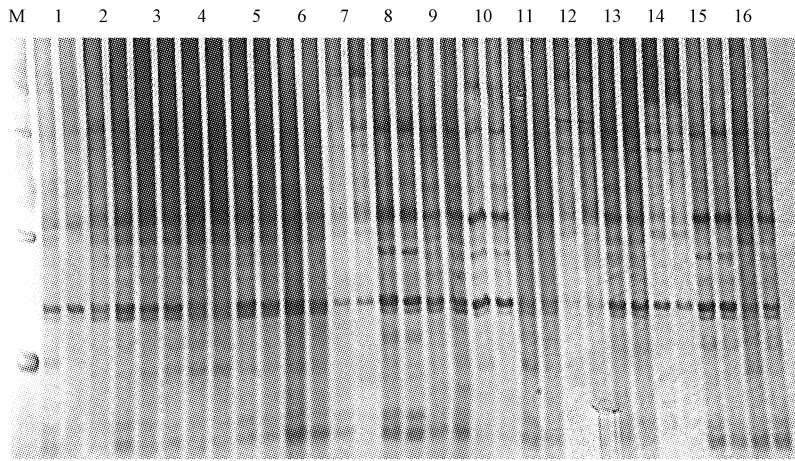


图 1 小干松 SRAP-PCR 正交实验电泳结果

注:M;DL 2 000 marker;1~16;处理编号。

Fig. 3 The result of SRAP-PCR system according to orthogonal design in *Pinus contorta*

Note;M;DL 2 000 marker;1~16;The treatments as showed in table 1.

表 2 正交设计直观分析

Table 2 Intuitive analysis of orthogonal design

因素 Factor	MgCl <sub>2</sub> 浓度 MgCl <sub>2</sub> concentration / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTPs 浓度 dNTPs concentration / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物浓度 Primer concentration / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 DNA 浓度 Concentration of DNA template / $\text{ng} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$	Taq DNA 多聚酶浓度 Concentration of Taq DNA polymerase / $\text{ng} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$
k1	8.25	7.13	3.00	4.75	10.88
k2	6.38	6.50	9.13	8.25	8.25
k3	7.38	9.75	8.13	7.00	6.50
k4	8.50	7.13	10.25	10.5	4.88
R	2.13	3.25	7.25	5.75	6.00

均值  $k_i$  体现了 SRAP-PCR 反应中单个因素在其相应水平下的反应效果,均值越大,表明该因素水平下 PCR 反应效果越好。从表 2 可以看出,选取每个因素对应的最大均值得出的理论最佳水平组合为: Taq 酶 0.5 U,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L, 模板 DNA 含量 120 ng, 引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 。此组合正交实验中没有体现,但与分值最高的处理 8 比较接近,在引物和模板用量上有所不同。

### 2.3 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度分析

研究表明,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度影响 PCR 扩增产量和反应特异性,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过低会使 Taq 酶活性丧失、PCR 产量下降;  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过高反应特异性降低, 出现非特异扩增。由图 2 可知, 1.0~1.5 mmol/L 范围内  $k_i$  均值随  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加而下降, 1.5~2.5 mmol/L 均值随  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加而上升,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L 均值最大。因此选择 2.5 mmol/L 为最佳浓度水平。

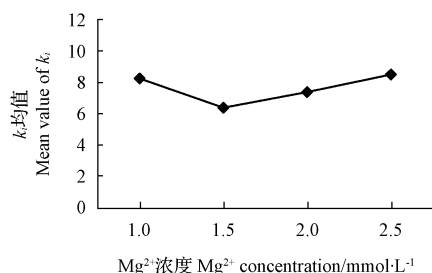
图2 Mg<sup>2+</sup>浓度与PCR评分结果

Fig. 2 Relationship between Mg<sup>2+</sup> concentration and PCR score results

#### 2.4 dNTPs 浓度分析

dNTPs 浓度过高易产生错误碱基的掺入,浓度过低则降低反应产量,dNTP 可与 Mg<sup>2+</sup> 结合,使游离的 Mg<sup>2+</sup> 浓度下降,影响 DNA 聚合酶的活性。由图 3 可知,*k<sub>i</sub>* 均值在 dNTPs 浓度为 0.05~0.15 mmol/L 时,呈现先降后升趋势,dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L 时结果均值最高,在 0.15~0.20 mmol/L 范围内均值下降。所以选择浓度 0.15 mmol/L 为最佳水平。

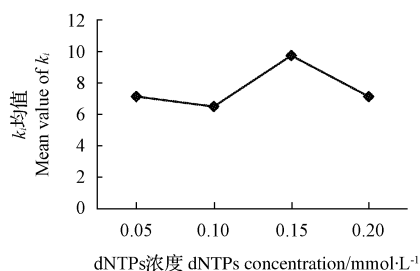


图3 dNTPs 浓度与PCR评分结果

Fig. 3 Relationship between dNTPs concentration and PCR score results

#### 2.5 引物浓度分析

引物浓度过高易导致模板与引物错配,产生非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。引物过低时,则产物量降低。由图 4 可知,在 0.1~0.2 μmol/L *k<sub>i</sub>* 均值呈显著上升趋势,0.2~0.4 μmol/L 范围内均值先降后升,但差异不明显。一般经典 PCR 反应中引物的终浓度为 0.2~1.0 μmol/L,在此范围内,PCR 产物量基本相同。因此从经济方面考虑,选择 0.2 μmol/L 为最佳浓度水平。

#### 2.6 模板 DNA 浓度分析

作为 PCR 反应的模板,DNA 浓度为最低水平时,主要表现为产物丰度低,浓度过高,则可能使引物或 dNTPs 过早耗尽,底物过量扩增,过早进入线性阶段,出现扩增结果不稳定的假象。由图 5 可知,在 30~60 ng/20μL 水平间,均值呈上升趋势,均值在 60~120 ng/20μL 水平间先降后升。已有研究表明,模板 DNA 浓度适合范围较宽,因此选择 60 ng/20μL 为最佳反应浓度。

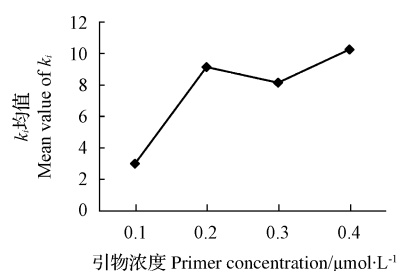


图4 引物浓度与PCR评分结果

Fig. 4 Relationship between primer concentration and PCR score results

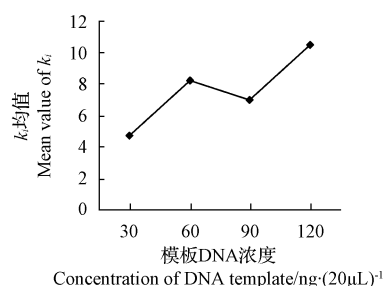


图5 模板DNA浓度与PCR评分结果

Fig. 5 Relationship between DNA template concentration and PCR score results

#### 2.7 Taq DNA 聚合酶浓度分析

Taq DNA 聚合酶浓度是影响 PCR 反应的重要因素,酶量过高可引起反应非特异性扩增,造成浪费;酶量过少则合成产物量减少。由图 6 可知,Taq DNA 聚合酶浓度在 0.5~2.0 U 范围内,结果均值下降明显。催化 1 个典型的 PCR 反应约需酶量 2.5 U(反应体积为 100 μL),该试验反应体积为 20 μL,酶量在 0.5 U 时均值恰好为最高,所以选择 0.5 U 为最佳反应水平。

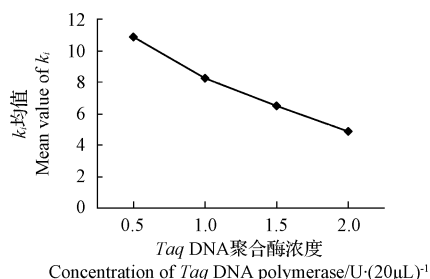


图6 Taq DNA 聚合酶浓度与PCR评分结果

Fig. 6 Relationship between Taq DNA polymerase concentration and PCR score results

#### 2.8 小干松 SRAP-PCR 反应体系的验证

为了验证优化后的扩增体系,随机选用 12 对引物组合,利用优化后的体系进行 SRAP-PCR 扩增,产物经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳银染后检测,结果均扩增出清晰、丰富的条带,说明优化后建立的扩增体系可行(图 7)。



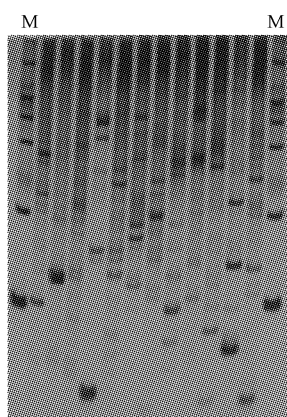


图7 12对引物组合对小干松SRAP-PCR扩增结果

注:M;DL 2 000。

Fig. 7 The result of SRAP-PCR using 12 pairs primer in optimized system

Note:M;DL 2 000 marker.

### 3 讨论

小干松为松科植物,含有大量多酚、多糖和单宁等。常规方法分离出的DNA由于多酚而被氧化成棕褐色,多糖、单宁等物质与DNA会结合成黏稠的胶状物,影响DNA纯度。该试验采用改良的CTAB法提取小干松基因组DNA,对针叶组织匀浆洗涤后再进行DNA提取,可去除大部分多糖等次生代谢物质对提取的干扰。

由于SRAP分子标记技术基于PCR反应,各反应因素都可以影响扩增的结果。如果仅凭借单因素试验,容易忽视反应因素之间的互作效应。而正交试验设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特性,可了解各因素之间的内在规律,较快地找到最优的水平组合<sup>[5]</sup>。该试验采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,试验中因素内水平间的相关性分析结合图表,其规律变化一目了然,具有一定的客观准确性。但正交分析方法对试验结

果本身优劣的判断依据带有主观成分,不能很好地估计试验误差,希望今后能够对PCR扩增条件和结果建立一套客观标准。

SRAP分子标记技术具有成本低、步骤简单、重复性较好,对DNA质量要求低,且多态性丰富等优点,目前已经有多种林木树种应用此分子标记技术在指纹图谱分析、种质鉴定、遗传多样性分析、QTL分析等方面开展研究<sup>[6-8]</sup>。小干松对生长环境有广泛的适应性,同时具有抗旱、耐寒、抗病、抗污染及海风的特性,是环境相对恶劣地区理想的造林树种。但是由于小干松在原产地分布广,自然生态、地理、地势差异巨大,造成小干松变异树种多样化,各种源间的遗传变异水平高,因此小干松种源的分类鉴定意义重大。该研究建立了稳定的小干松SRAP-PCR反应体系,为今后进一步利用该标记技术开展小干松种质资源遗传多样性、品种鉴定及遗传连锁图谱的构建创造条件。

### 参考文献

- [1] 宋晓东. 抗旱耐寒国外松的选择[J]. 辽宁林业科技, 1994(2): 9-13.
- [2] LI G, Quirós 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(8): 455-461.
- [3] 王寿春, 冯建, 陆爱君, 等. 东部白松SRAP反应体系的建立和优化[J]. 北方园艺, 2010(21): 168-171.
- [4] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化PCR条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [5] 郁昭, 李树航, 邵本力. 田间试验与统计分析[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学出版社, 1997: 210-212.
- [6] 於朝广, 殷云龙, 徐建华. 用SRAP标记鉴定落羽杉属植物杂种[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 142-146.
- [7] 陈昱, 邢兆凯, 潘文利, 等. 辽宁地区主栽杨树品种的SRAP标记遗传多样性分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(10): 19-22.
- [8] 王龙, 杨健, 王苏珂, 等. 崇化大梨×新世纪梨F1代分子遗传图谱的构建及两个果实性状的QTL分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 462-467.

## Establishment of the SRAP-PCR Reaction System of *Pinus contorta*

WANG Qian-chun<sup>1</sup>, HUANG Xia<sup>1</sup>, LI Guang-sen<sup>2</sup>

(1. Liaoning Academy of Forestry Science, Shenyang, Liaoning 110032; 2. Liaoning Experimental Forest Farm, Wandianzi, Liaoning 113311)

**Abstract:** To establish the optimal SRAP reaction system of *Pinus contorta*, its genomic DNA was extracted as template and orthogonal experimental design  $L_{16}(4^5)$  were used. Four levels of five factors (*Taq* polymerase,  $Mg^{2+}$ , dNTPs, DNA template and primer) were optimised. The results showed that according to the amplification results, an optimal and stable SRAP-PCR system for *Pinus contorta* was 0.5 U *Taq* polymerase, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.15 mmol/L dNTPs, 60 ng DNA template and 0.2  $\mu$ mol/L primer in total 20  $\mu$ L reaction solution. 12 pairs SRAP primer were used in this optimized SRAP-PCR system, the results showed that this system could meet the requirement for SRAP amplification of *Pinus contorta*.

**Key words:** *Pinus contorta*; SRAP; reaction system