

羽衣甘蓝 SRAP 体系建立与优化

祝朋芳¹, 康耀海¹, 黄娟娟¹, 房霞¹, 刘畅¹, 赵颖^{1,2}

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁城市建设职业技术学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要:以羽衣甘蓝基因组 DNA 为模板,对相关序列扩增多态性聚合酶链式反应(SRAP-PCR)体系的各影响因子进行了单因素梯度设置,并优化了反应程序,筛选和建立了可扩增多态性高、重复性好、带型清晰的最佳 SRAP 反应体系和程序。结果表明:羽衣甘蓝最佳 SRAP-PCR 反应体系总体积 10 μ L,包含 DNA 模板 50 ng,1 \times buffer,dNTPs 0.20 mmol/L,Taq 酶 1 U,引物各 0.60 μ mol/L。羽衣甘蓝最佳 SRAP-PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,35 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。经 22 个羽衣甘蓝 F₂ 群体单株对上述优化的反应体系和程序进行验证,均获得了多态性丰富、条带清晰的扩增图谱,表明该程序和体系能很好地满足羽衣甘蓝基因组 SRAP 扩增要求。

关键词:羽衣甘蓝;SRAP 标记;体系优化

中图分类号:S 635 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)09-0121-04

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*, D. C.)属十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种。植株不结球,以观叶为主,其叶形美观多变,心叶色彩丰富绚丽,耐寒性极强。我国从 20 世纪 90 年代开始引种栽培^[1],可在长江以南地区露地越冬,同时也是我国北方地区早春、晚秋及初冬时节室内外绿化美化的优良草本花卉,还可做切花销售,应用前景广阔。

分子标记技术是植物新品种选育的重要辅助手段之一,其中,相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,SRAP)是基于 PCR 技术的分子标记技术,具有多态性高、产率较好、重复性好、操作简单等优点,在基因组中分布均匀,引物具有通用性,且其上下游引物两两搭配,用少量的引物可得到多个引物对,从而大大降低了试验费用^[2],目前得到了较广泛的应用,尤其在植物种质资源鉴定评价、遗传图谱构建、种缘进化关系等方面^[3-4]。SRAP 标记在西瓜种子纯度的鉴定分析^[5],大白菜耐抽薹基因的连锁关系^[6],芥蓝显性雄性不育基因的定位图谱^[7],亚麻连锁图谱的构建^[8]等方面广泛应用,并在番茄^[9]、甜椒^[10]中将 SRAP 标记成功转化为 SCAP 标记。SRAP 应用于羽衣甘蓝观赏性状研究目前尚鲜见报道。

该试验利用 SRAP 标记技术,以该课题组现有的羽衣甘蓝基因组 DNA 为模板,优化了 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序,旨在为羽衣甘蓝分子标记辅助选择育种研究提供相关技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该研究以 2 份羽衣甘蓝自交系(9 号、7 号)及其部分 F₂ 群体单株(P、W 为试材编号)为试材,基因组 DNA 取自新鲜嫩叶。

用于反应的 10 \times buffer、dNTPs(2.5 mM)、Taq 酶(5 U/ μ L)均购自北京全式金生物技术有限公司,采用 BIO-RAD Mycycler 型 PCR 仪,UMAXPowerLook 2100XL-USB 型凝胶成像仪。SRAP 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1	Primer sequences	
引物组合	引物序列(5'→3')	
Primer combination	Primer sequences(5'→3')	
M6E5	TGAGTCCAAACCGGACA	GACTGCGTACGAATTAAAC
M7E5	GACTGCGTACGAATTGA	GACTGCGTACGAATTAAAC
M3E10	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTGTC
M8E6	TGAGTCCAAACCGGTGT	GACTGCGTACGAATTGCA
M8E7	TGAGTCCAAACCGGTGT	GACTGCGTACGAATTTCG

1.2 试验方法

试验于 2012 年 9~12 月在沈阳农业大学完成。

1.2.1 基因组 DNA 的提取 试验采用天根(TIAN-GEN)新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱 DP320

第一作者简介:祝朋芳(1971-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事观赏植物遗传育种与分子生物学等研究工作。E-mail: pfzhu2013@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101566)。

收稿日期:2013-12-10

型),提取羽衣甘蓝基因组 DNA。用 TE 缓冲液溶解 DNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 质量,存于一20℃备用。

1.2.2 SRAP 反应体系的优化 为摸索 SRAP-PCR 反应体系中各种因素对扩增结果的影响,对各个影响因子

表 2 SRAP 反应体系各成分浓度梯度

Table 2 Concentration grades of constituents in SRAP system

因素 Factors	浓度梯度 Concentration grades					
	1	2	3	4	5	6
DNA 模板 Template DNA/ng	40	50	60	70	80	100
Buffer 浓度 Buffer concentration/time	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
dNTPs 浓度 dNTPs concentration/mmol · L ⁻¹	0.15	0.20	0.25	0.3	0.35	0.40
引物浓度 Primer concentration/μmol · L ⁻¹	0.52	0.60	0.68	0.76	0.84	0.92
Taq 酶浓度 Taq polymerase concentration/U	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00

1.2.3 SRAP 扩增程序的优化 在参考 Li 等^[2] 反应程序的基础上,对其各扩增程序进行了优化。设计了 3 个不同时间梯度的 PCR 扩增程序(表 3)。试验选择了 3

表 3 SRAP-PCR 扩增反应程序

Table 3 The SRAP-PCR amplification reactions program

程序 Program	5 个循环 5 times			35 个循环 35 times			1 个循环 1 times
	变性	退火	延伸	变性	退火	延伸	延伸
1	94℃ 30 s	35℃ 30 s	72℃ 30 s	94℃ 30 s	50℃ 30 s	72℃ 30 s	72℃ 7 min
2	94℃ 45 s	35℃ 45 s	72℃ 45 s	94℃ 45 s	50℃ 45 s	72℃ 45 s	72℃ 7 min
3	94℃ 1 min	35℃ 1 min	72℃ 1 min	94℃ 1 min	50℃ 1 min	72℃ 1 min	72℃ 7 min

1.2.4 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 扩增产物在 DYY-12 型电泳仪上进行检测,采用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,银染 15 min,自然晾干后扫描分析。

2 结果与分析

2.1 羽衣甘蓝基因组 DNA 质量

由图 1 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测的结果可以看出,基因组 DNA 呈现一条亮带,说明提取的 DNA 已合格,可以满足后续的 PCR 扩增要求。

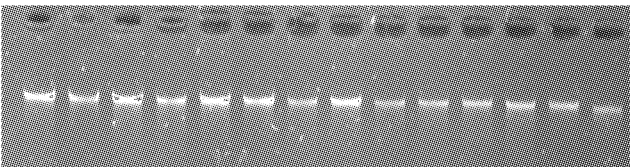


图 1 羽衣甘蓝基因组 DNA 的琼脂糖检测

Fig. 1 The genomic DNA on agarose gel

2.2 SRAP 反应体系的优化

由图 2 反应体系扩增结果可以看出,6 种体系均有一定的扩增产物,体系 1 的条带少且模糊,体系 2 条带丰富、清晰且重复性好,体系 3 条带少而模糊,体系 4 扩增结果不稳定,体系 5 条带不丰富,体系 6 条带不清晰。由此认为体系 2 是羽衣甘蓝 SRAP-PCR 反应的最佳体系,即反应总体积为 10 μL,含 DNA 模板 50 ng,1×buffer,dNTPs 0.20 mmol/L,Taq 酶 1 U,引物浓度

进行了梯度设置,依次设计 DNA 模板、10×buffer、dNTPs、Taq 酶和引物浓度 5 个因素,使每种因素都按从小到大 6 个梯度变化,从而组合成 6 个反应体系(表 2)。扩增后的产物在 5%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳。

对 SRAP 引物 M3E10、M8E6 和 M8E7(表 1)进行 PCR 扩增,扩增后的产物在 5%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测。

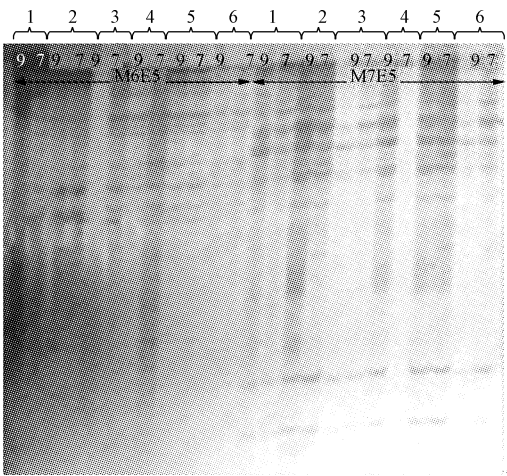


图 2 不同反应体系的 SRAP 扩增结果

Fig. 2 Amplified results of different reaction system

0.60 μmol/L。

2.3 SRAP 扩增程序的优化

根据上述试验结果,利用最佳体系,即体系 2 对 4 个羽衣甘蓝试材进行 PCR 扩增。由图 3 可知,与程序 3 相比,程序 1 和程序 2 扩增条带多且清晰,尤其是扩增到了一些小分子 DNA 片段,这对于后续相关试验具有重要意义。此外,程序 3 所需时间最长,程序 2 其次,而程序 1 仅需 1.4 h,这是因为大大缩短了变性、复性和延伸的时间的原因。程序 1 和程序 2 相比,由于理想条带的数目和清晰程度相差不多,为了节约时间、提高试验效

率,最终确定扩增程序 1 为最佳反应程序,即 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,35℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,5 个循环;94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环;72℃ 终延伸 7 min,4℃ 保存。

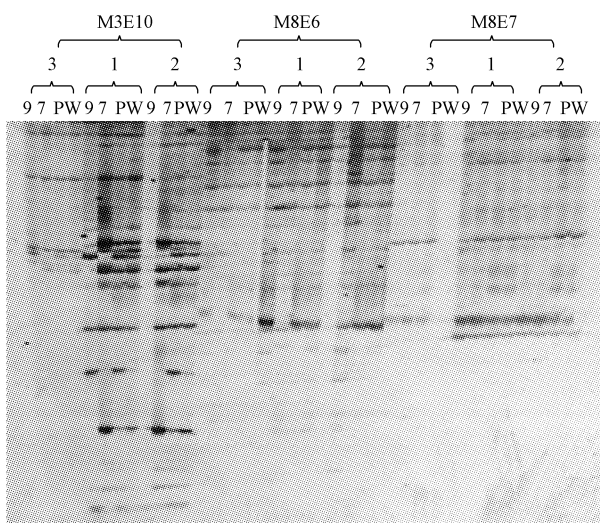


图 3 不同反应程序的 SRAP 扩增结果

Fig. 3 Amplified results of different reaction program

2.4 SRAP-PCR 反应体系和程序稳定性验证

为了验证上述获得的 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序的稳定性和可靠性,该试验以 9、7 和 22 株 F_2 群体 DNA 为模板,利用反应体系 2,采用程序试验中的 3 对引物,用最佳反应体系(体系 2)和最佳扩增程序(程序 1)进行扩增,结果表明,3 对 SRAP 引物组合对每份 DNA 样品均能扩增出多态性丰富、条带清晰、稳定的 DNA 片段(图 4),这说明所优化的 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序稳定可靠,可用于羽衣甘蓝基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增反应的后续试验。

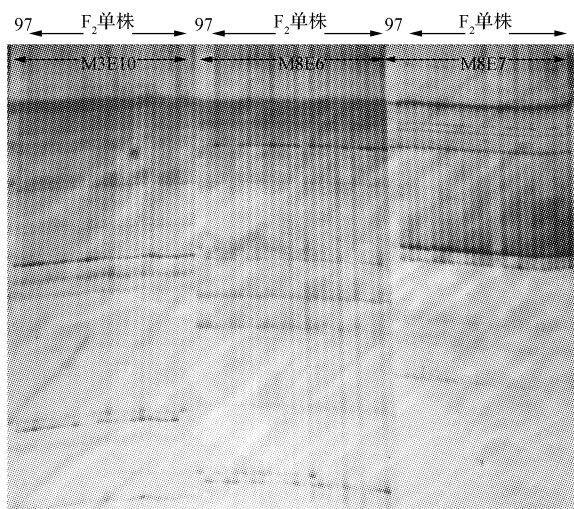


图 4 引物 M3E10、M8E6 和 M8E7 的 PCR 扩增结果

Fig. 4 Amplified results of M3E10, M8E6 and M8E7

3 讨论

PCR 反应体系中的各组分均能影响扩增结果,因此适宜体系的建立对试验成功与否非常重要。该试验通过单因素试验设计,对模板 DNA、buffer、dNTPs、Taq 酶和引物 5 个因素进行梯度试验,最终确定了羽衣甘蓝 SRAP-PCR 扩增的最佳反应体系。试验发现模板 DNA 浓度在 40~100 ng 之间均能扩增出条带,说明羽衣甘蓝 SRAP-PCR 对模板 DNA 浓度的要求范围较宽,这与任羽等^[11]对在辣椒 SRAP 体系中的模板 DNA 浓度的研究基本一致,从经济角度考虑,该试验确定 DNA 浓度为 50 ng。在试验过程中发现,引物浓度是影响 SRAP-PCR 扩增结果的关键因素,浓度的微小变化就能影响扩增结果,而模板浓度、退火温度在一定范围内的变化对反应体系的影响相对较为轻微,这与尹德洁等^[12]在蓝莓 SRAP-PCR 反应体系中的研究结果相似。

SRAP 扩增程序一般采用复性变温法进行扩增,前 5 个循环是在 35℃ 的退火温度下进行的,目的是使在低退火温度下确保引物与目的片段结合;后 35 个循环的退火温度提升到 50℃ 以上,以保证扩增产率。为了研究退火温度对羽衣甘蓝 SRAP-PCR 扩增的影响,该试验对后 1 个循环的退火温度进行了梯度优化,设置的 4 个温度梯度中,50℃ 时扩增条带最丰富、清晰稳定,扩增效率高,这与 Li 等^[2]最初在羽衣甘蓝近缘作物花椰菜中的研究结果是一致的。而当高于 50℃ 时扩增条带随着退火温度的升高逐渐减少,到 56℃ 时几乎没有扩增片段,而当退火温度降到 47℃ 时扩增条带清晰度减弱。当将退火温度确定为 50℃ 时,在较大羽衣甘蓝遗传群体的应用中得到了很好的重复性。

该试验对 SRAP-PCR 各扩增程序的反应时间进行了优化,设计了 3 个不同的 PCR 扩增程序反应时间梯度。结果发现,反应时间为 30 s 时扩增效果最好,扩增条带丰富、带型清晰稳定,随着反应时间的延长扩增条带逐渐减少,当反应时间延长到 1 min 时条带明显减少;当扩增程序的反应时间为 30 s 时,对羽衣甘蓝小分子 DNA 片段有很好的扩增效果,这对丰富扩增条带和检测小分子 DNA 片段很有帮助。此外,反应时间为 30 s 时扩增时间整体减少了 1 h,这有助于加快试验进度,提高试验效率。

该试验还对筛选得到的最优反应体系和扩增程序进行了全面的稳定性检测,发现扩增条带丰富,带型稳定,表明该最佳 SRAP-PCR 体系和程序能很好的用于羽衣甘蓝基因组扩增,课题组利用该反应体系和扩增程序已经开展了羽衣甘蓝基因定位相关工作。

参考文献

- [1] 张淑梅,高慧,蔡龙锡,等. 日本羽衣甘蓝引种栽培试验研究[J]. 延边大学农学报,1998,20(2):133-135.

- [2] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a newmarker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103:455-461.
- [3] 徐莹莹, 屈淑平, 崔崇士. 大白菜 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(8):31-34.
- [4] Rodriguez J M, Berke T, Engle L. Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1999(9):147-156.
- [5] 王从彦, 田朝阳. SRAP 分子标记分析西瓜杂交种种子纯度[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [6] 卓祖闻, 张鲁刚. 大白菜耐抽薹性状遗传规律分析及其分子标记的筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [7] 张新梅, 武剑, 郭蔼光. 甘蓝显性雄性不育基因 CDMs399-3 紧密连锁的分子标记[J]. 中国农业科学, 2009, 42(11):3980-3986.
- [8] 姜硕, 李明. 基于 SRAP 的亚麻 (*Linum usitatissimum*) 连锁图谱及 QTL 研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [9] 郭彩杰, 侯丽霞, 崔娜, 等. 番茄耐低温相关基因的 SRAP 标记筛选[J]. 植物生理学报, 2011, 47(1):102-106.
- [10] 吴国平, 袁稳, 刘金兵. 甜椒胞质雄性不育恢复系 SRAP 及 SCAR 标记[J]. 分子植物育种, 2012, 10(4):446-451.
- [11] 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.
- [12] 尹德洁, 苏淑钗, 刘肖, 等. 蓝莓 SRAP-PCR 反应体系的建立优化及引物筛选[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(2):35-64.

The Optimization of SRAP-PCR Amplification Program and System in Kale

ZHU Peng-fang¹, KANG Yao-hai¹, HUANG Juan-juan¹, FANG Xia¹, LIU Chang¹, ZHAO Ying^{1,2}

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Liaoning Urban Construction Technical College, Shenyang, Liaoning 110122)

Abstract: Taking the genomic DNA extracted from kale leaves as template, each influencing factor of amplified polymorphism polymerase chain reaction (SRAP-PCR) related to the sequence was set by the single factor gradient and the program was optimized, the SRAP which were high polymorphism, good repeatability, clear were screened. The results showed that the optimized protocol was as follows: a total volume of 10 μ L containing 50 ng genomic DNA, $1 \times$ buffer, 0.20 mmol/L dNTPs, 1 U of *Taq* DNA polymerase and 0.60 μ mol/L primers. Protocol run under the following conditions: pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 5 min, then denatured at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealed at 35 $^{\circ}$ C for 30 s, and an extension at 72 $^{\circ}$ C for 30 s for 5 times, denatured at 94 $^{\circ}$ C for 30 s and annealed at 50 $^{\circ}$ C for 30 s, and an extension at 72 $^{\circ}$ C for 30 s for 35 times, extension at 72 $^{\circ}$ C for 7 min at last, then kept at 4 $^{\circ}$ C. The above optimal SRAP-PCR reaction system and amplification procedure were checked by 22 of F_2 individuals. The system and procedure could be used in genomic DNA SRAP-PCR amplification in kale.

Key words: kale; SRAP marker; system optimization

生物有机肥的应用

畜禽粪便生物有机肥施入土壤后,肥料中的有益微生物迅速在土壤中繁殖、分解,调节了土壤 pH 值、增加了有益菌群的数量,能有效抑制有害病原菌生长。改善土壤中作物根系微生物平衡,促进作物对养分的吸收,使作物根系发达,根深叶茂,健壮植株,减轻了病害的发生,提高了作物产量。但使用时应注意在施用生物有机肥的前后 2~3 d 内,禁止使用各类杀菌剂,以避免杀菌剂杀死生物有机肥中的有益菌。

生物有机肥的使用方法有基肥和追肥 2 种。基肥:生物有机肥一般在粮食作物和蔬菜栽培以前作基肥使用。如在玉米地,每 667 m^2 施用量为 100 kg 左右;在蔬菜地,每 667 m^2 施用量为 500 kg 左右,撒后用犁把有机肥翻入地下,用耙将地耙平,然后进行播种。

追肥也有 2 种方式。环施:环施一般在果树 3 年以上树龄施用,每株树用量为 1.0~1.5 kg,围绕果树在滴水线处挖几个坑,深度在 10~20 cm,施后用土覆盖。条施:条施一般在蔬菜根旁作追肥用,每 667 m^2 撒施 30 kg 左右,然后用耙将生物有机肥和泥土搅拌均匀,再用铁锹将它们覆盖在作物根旁。施用畜禽粪便生物有机肥,可以改变因施用化肥而产生的“瓜不香,果不甜,茶无味”的现状,使农产品各项指标达到绿色食品的标准,是生产无公害绿色农产品的首选肥料。特别是在我国烟草栽培地区,由于上茬是种植玉米,玉米根系残留物会抑制下茬作物烟草的生长,生物有机肥中的微生物,会分解土壤中玉米根系分泌出的对其它植物或微生物有害物质,很好地解决了在玉米茬地种植烟草的调茬问题,使烟株根系发达,提高了烟叶产量和品质。

(来源:中国农业信息网)