

# 美国红枫 SRAP 反应体系优化

刘巍<sup>1</sup>, 陈昱<sup>2</sup>, 颜廷武<sup>2</sup>, 郭志富<sup>1</sup>, 尤文忠<sup>2</sup>, 安昕<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省林业科学研究院, 辽宁 沈阳 110032)

**摘要:**以美国红枫基因组 DNA 为模板, 采取  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计, 对影响扩增反应的 5 个主要因素进行优化。结果表明: 在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中, 各因素的最佳配比为  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 1.5 mmol/L, dNTPs 浓度 2.5 mmol/L, 引物浓度 1.5  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 DNA 用量 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶用量 0.5 U。该体系的建立为 SRAP 技术在美国红枫分子辅助育种实践中提供了技术基础。

**关键词:**美国红枫; SRAP; 体系优化

**中图分类号:**S 792.119 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0079-05

美国红枫(*Acer rubrum*)属槭树科(Aceraceae)多年生落叶乔木, 原产于美洲东北部。美国红枫因其秋季色彩绚丽、树冠整洁被广泛应用于各种园林造景以及作为行道树栽种, 深受人们喜爱, 是近几年引进的美化、绿化城市园林的理想珍稀树种之一, 同时也是枫树糖浆及木材的重要原料。我国于 2000 年前引入该树种, 现主要分布于辽宁、山东以及安徽一带。美国红枫未来发展潜力巨大, 已成为国内行道树的首选树种。

相关序列多态性分析(Sequence-related Amplifier Polymorphism, SRAP)是美国加州大学蔬菜作物系 Li 等<sup>[1]</sup>于 2001 年提出的基于聚合酶链式反应(Polymerase Chains Reaction, PCR)的分子标记技术, 该标记通过独特的双引物设计对基因的 ORFs(Open reading frames 开放阅读框)的特定区域进行扩增, 上游引物长 17 bp, 对外显子区域进行特异扩增。下游引物长 18 bp, 对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。此标记最早是在芸香属作物<sup>[1]</sup>中开发利用。因其具有简便、稳定、中等差率和易得到选择条带序列的特点<sup>[2-3]</sup>, 在观赏植物遗传多样性分析<sup>[4]</sup>、亲缘关系<sup>[5]</sup>和遗传连锁图谱构建等研究中的应用逐步增多, 目前已在各种草本植物<sup>[6-7]</sup>及木本植物<sup>[8-11]</sup>上已有许多相关报道。

近年来, 关于美国红枫的研究已有一些报道, 其在

RAPD、AFLP、ISSR 等分子标记技术上已有应用<sup>[12-14]</sup>, 但 SRAP 标记在美国红枫上的研究尚鲜见相关报道。该研究通过 CTAB 法提取美国红枫的基因组 DNA 用于 SRAP-PCR, 通过正交实验设计对美国红枫的 SRAP-PCR 反应体系进行优化, 以期为此标记对美国红枫进行分子辅助育种奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 2012 年栽植于辽宁省林业科学研究院凤城苗圃的美国红枫。选取新生的幼嫩枝条置于冰盒中保存带回, 液氮冻存后放于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

1.1.2 供试试剂 用于 SRAP-PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs 和 Buffer 及凝胶检测的标准分子量(marker)D2000 均购自北京 TIANGEN 生物有限公司。引物由北京赛百盛生物公司合成, 选用引物为 M5E10 (5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3')作为体系优化的固定引物进行体系建立。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 采用 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳(1×TBE)和 UV1102 紫外分光光度计检测 DNA 质量浓度及纯度, 并将其稀释为 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系优化的正交设计 应用统计学原理, 对 SRAP 反应体系中的  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板 DNA 和 *Taq* DNA 聚合酶等 5 种主要影响因素采用  $L_{16}(4^5)$  正交表<sup>[16]</sup>进行试验设计, 见表 1。

1.2.3 PCR 反应 扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪(BIO-RAD)上进行, 扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $37^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 5 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$

**第一作者简介:**刘巍(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。

**责任作者:**陈昱(1980-), 男, 硕士, 高级工程师, 现主要从事林木分子遗传育种等研究工作。E-mail:chengang1625@163.com。

**基金项目:**国家林业局“948”资助项目(2011-4-25); 辽宁省科技计划资助项目(201404214)。

**收稿日期:**2014-09-11

变性 30 s, 50℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 8 min; 于 4℃保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 染色, 在紫外凝胶成像仪下观察并分析条带。

表 1 PCR 反应正交实验设计

Table 1 The orthogonal design of PCR reaction system

处理 Treatment	Mg <sup>2+</sup> (mmol · L <sup>-1</sup> )	dNTPs (mmol · L <sup>-1</sup> )	引物 Primer (μmol · L <sup>-1</sup> )	模板 DNA Template DNA/ng	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase/U
1	1.0	1.0	0.5	25	0.5
2	1.0	1.5	1.0	50	1.0
3	1.0	2.0	1.5	100	1.5
4	1.0	2.5	2.0	200	2.0
5	1.5	1.0	1.0	100	2.0
6	1.5	1.5	0.5	200	1.5
7	1.5	2.0	2.0	25	1.0
8	1.5	2.5	1.5	50	0.5
9	2.0	1.0	1.5	200	1.0
10	2.0	1.5	2.0	100	0.5
11	2.0	2.0	0.5	50	2.0
12	2.0	2.5	1.0	25	1.5
13	2.5	1.0	2.0	50	1.5
14	2.5	1.5	1.5	25	2.0
15	2.5	2.0	1.0	200	1.5
16	2.5	2.5	0.5	100	1.0

### 1.3 数据分析

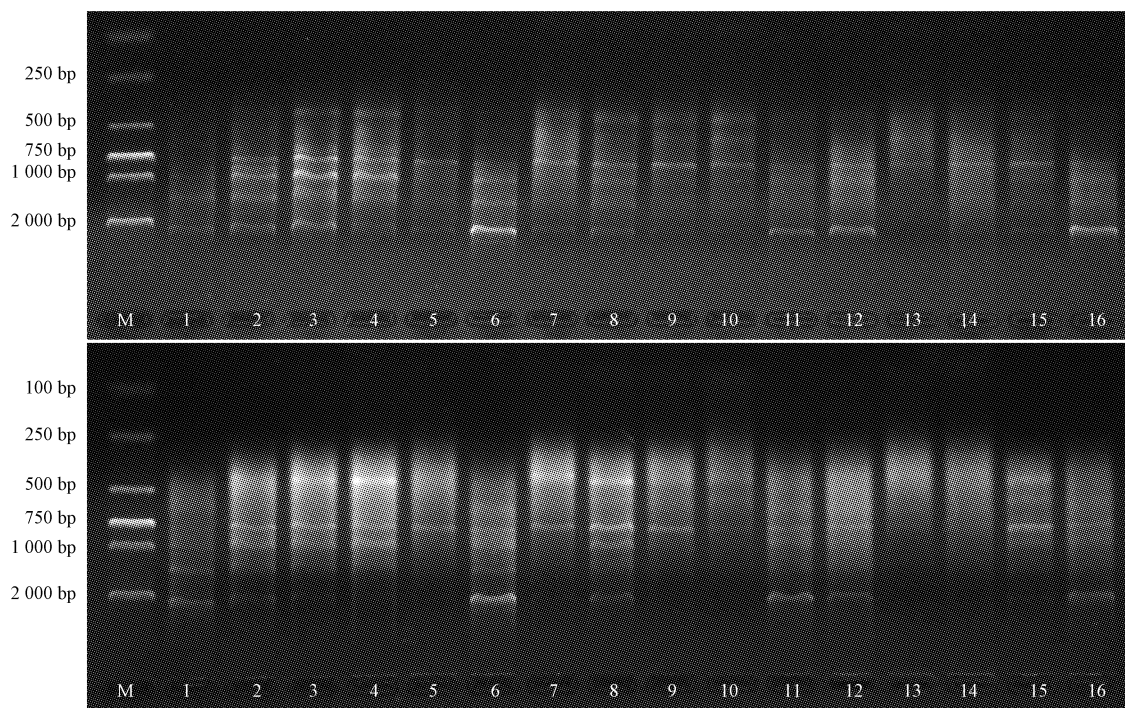
参考何正文等<sup>[17]</sup>的方法, 按照条带数量、清晰度对 16 个组合的电泳条带进行打分, 取 2 次得分的平均值进行直观分析。采用穆立蓄等<sup>[18]</sup>的方法求出每个因素同一水平下的得分总和  $K_i$  及平均值  $k_i$ , 并求出同因素不同水平间的极差  $R$ , 最后对各因素同一水平的结果均值  $k_i$  用 Excel 作图分析, 确定各因素的最佳用量或浓度水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验中各因素对 PCR 反应的影响差异分析

由图 1 可以看出, 由于 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、模板 DNA 和 Taq DNA 聚合酶等 5 种主要影响因素浓度的不同, 扩增效果显著不同。2 次重复中, 第 8 组条带丰富, 清晰度较好, 扩增效果明显优于其它各组, 均值最高, 合得 7 分; 第 14 组几乎没有条带, 扩增效果较差, 均值最低, 合得 1 分 (表 2)。

由表 3 可知, 在影响 PCR 反应的 5 个主要因素中, dNTPs 的  $R$  值最大为 2.3, 对反应体系的影响最大; 引物 (Primer) 的  $R$  值最小为 0.9, 对反应体系的影响最小。综上得出各因素对 PCR 反应的影响大小依次为: dNTPs > Taq DNA 聚合酶 > Mg<sup>2+</sup> > 模板 DNA > 引物。



注: 上下为 2 次重复, 从左至右依次为 M; 2 000 bp DNA ladder; 1~16 为表 1 中处理 1~16。

Note: Duplicates of results were shown from top to bottom. M; 2 000 bp DNA ladder; treatments 1—16 were same as that of table 1.

图 1 正交实验结果

Fig. 1 Results PCR reaction system produced by orthogonal experiment design

表 2

PCR 产物电泳得分

Table 2

Scores of PCR products

重复 Repeat	处理 Treatment															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	3	5	5	4	1	4	2	7	2	3	3	3	1	1	5	4
II	3	5	5	5	4	4	4	7	4	4	3	4	2	1	4	4
平均值 Average	3	5	5	4.5	2.5	4	3	7	3	3.5	3	3.5	1.5	1	4.5	4

表 3

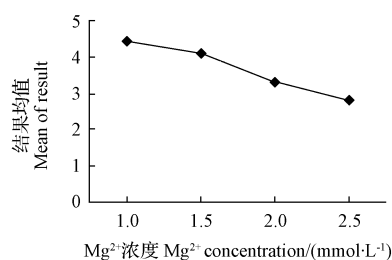
正交结果分析

Table 3 Results analysis for orthogonal experiment

参数 Parameter	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物 Primer	模板 DNA Template DNA	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA Polymerase
K <sub>1</sub>	35	20	28	21	36
K <sub>2</sub>	33	27	31	33	30
K <sub>3</sub>	26	31	32	30	28
K <sub>4</sub>	22	38	25	32	22
k <sub>1</sub>	4.4	2.5	3.5	2.6	4.5
k <sub>2</sub>	4.1	3.4	3.9	4.1	3.8
k <sub>3</sub>	3.3	3.9	4.0	3.8	3.5
k <sub>4</sub>	2.8	4.8	3.1	4.0	2.8
R	1.6	2.3	0.9	1.5	1.7

## 2.2 PCR 反应的单因素试验

2.2.1 Mg<sup>2+</sup> 浓度 PCR 反应体系的影响 从图 2 可知,随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度不断上升,结果均值不断下降。Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1.0~1.5 mmol/L 变化不明显,当浓度增加至 2.0 mmol/L 时,扩增效果明显降低。因为 Mg<sup>2+</sup> 是 Taq DNA 聚合酶的有效激活剂,但同时又与 dNTPs 结合,从而使游离的与酶结合的 Mg<sup>2+</sup> 的量减少。因此 Mg<sup>2+</sup> 浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性,过高又会产生非特异性扩增。所以综合考虑 Mg<sup>2+</sup> 的浓度应在 1.5 mmol/L 为宜。

图 2 Mg<sup>2+</sup> 浓度与结果均值间的关系Fig. 2 Relationship between quantity of Mg<sup>2+</sup> concentration and mean of result

2.2.2 dNTPs 浓度 由图 3 可知,结果均值随 dNTPs 浓度的持续升高而增大,扩增效果明显增加。当 dNTPs 浓度为 1.0~2.5 mmol/L 时,结果均值最大,扩增效果达到最佳。这是因为 dNTPs 的浓度在一定范围内越高,扩增反应的产率也会随之提升。因此,综合分析得出,dNTPs 浓度以 2.5 mmol/L 为最佳。

2.2.3 引物浓度 由图 4 可知,结果均值随引物浓度为 0.5~1.5 μmol/L 呈现缓慢的上升趋势,当引物浓度提高

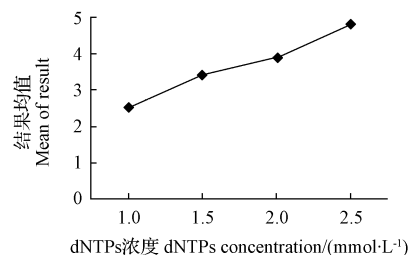


图 3 dNTPs 浓度与结果均值间的关系

Fig. 3 Relationship between quantity of dNTPs concentration and mean of result

到 2.0 μmol/L 时突然显著降低。这说明引物浓度会对 PCR 扩增产物的特异性产生影响,当浓度较低时,扩增效果不明显;而当浓度过高时,会增加非特异性扩增以及产生二聚体的几率。因而最适引物浓度应为 1.5 μmol/L。

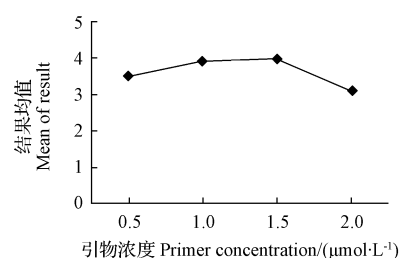


图 4 引物浓度与结果均值间的关系

Fig. 4 Relationship between quantity of primer concentration and mean of result

2.2.4 模板 DNA 用量 由图 5 可知,当模板 DNA 用量为 25~50 ng 时,结果均值明显上升,并在 50 ng 时达到峰值,当 DNA 用量为 100 ng 时,略微有所下降,当模板 DNA 用量增大到 200 ng 时,扩增效果变化不再明显。

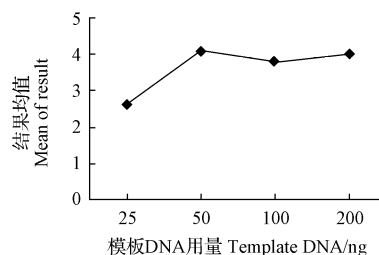


图 5 模板 DNA 用量与结果均值间的关系

Fig. 5 Relationship between quantity of template DNA concentration and mean of result



以上结果说明当模板 DNA 用量不足时,PCR 扩增产率及条带质量偏低;反之,当浓度过高时,引物及 dNTPs 会过快耗尽,底物过量扩增,过早进入线性阶段,导致扩增结果不稳定。所以得出结论,模板 DNA 的最适用量应为 50 ng。

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶用量 由图 6 可知,*Taq* DNA 聚合酶用量为 0.5~2.0 U,结果均值不断减小,扩增效果持续降低。导致该结果产生的原因是当 *Taq* DNA 聚合酶用量过高时,非特异性扩增不断发生,产生大量非特异性条带,并使背景较深,对多态性分析造成困难。因此,*Taq* DNA 聚合酶用量以 0.5 U 为宜。

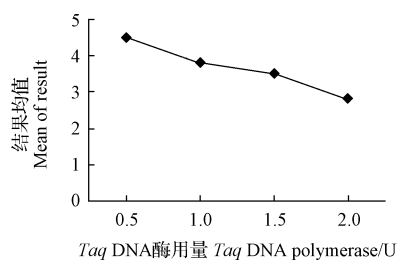


图 6 *Taq* DNA 聚合酶用量与结果均值间的关系

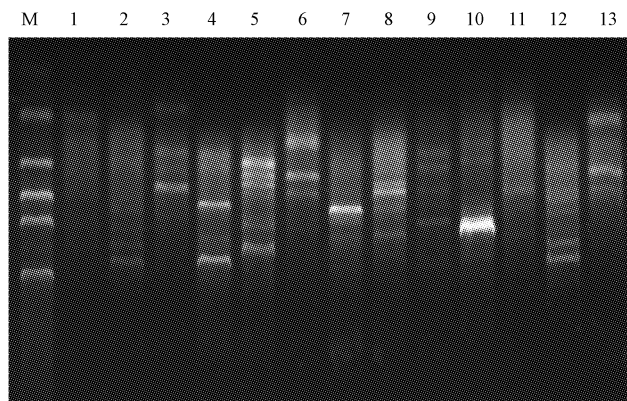
Fig. 6 Relationship between quantity of *Taq* DNA polymerase and mean of result

### 2.3 PCR 反应体系的优化及验证

根据上述结论与分析,最终确定辽宁地区主栽美国红枫 SRAP-PCR 20  $\mu$ L 反应体系的最佳配比为  $Mg^{2+}$  浓度 1.5 mmol/L, dNTPs 浓度 2.5 mmol/L, 引

物浓度 1.5  $\mu$ mol/L,模板 DNA 用量 50 ng,*Taq* DNA 聚合酶用量 0.5 U。

应用优化后的反应体系随机抽取 13 对引物组合对美国红枫基因组 DNA 进行分析,结果显示不同引物组合扩增条带也清晰可辨且较为稳定(图 7)。

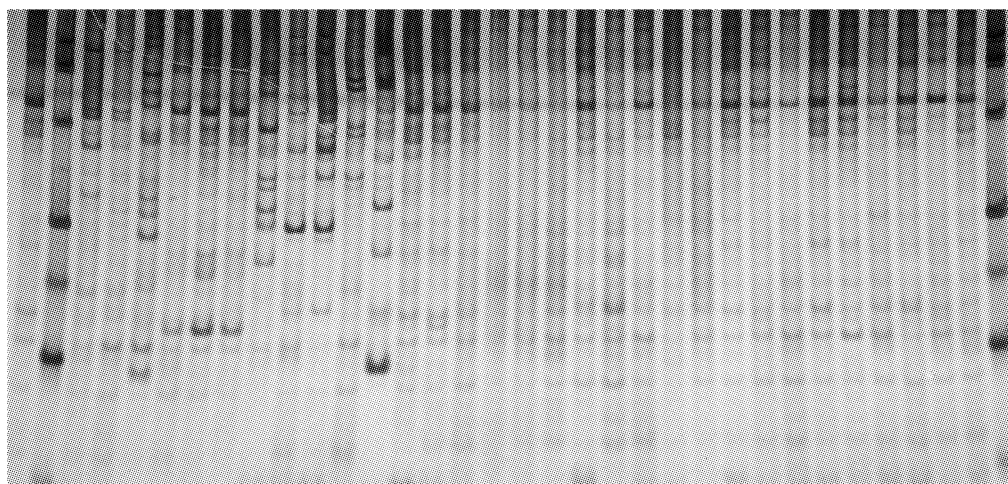


注:M:2 000 bp DNA ladder;1:M5×E3;2:M10×E8;3:M2×E11;4:M8×E7;5:M9×E4;6:M1×E10;7:M7×E6;8:M4×E2;9:M3×E9;10:M8×E1;11:M5×E2;12:M10×E7;13:M1×E3。

图 7 反应体系 13 对引物验证结果

Fig. 7 PCR result of 13 different pairs of primers based on the optimized SRAP-PCR system

对 30 个供试品种的美国红枫 DNA 样品进行聚丙烯凝胶电泳银染后检测,由图 8 可知,所有样品均能扩增出清晰且丰富地条带。说明该体系可靠稳定,适用于美国红枫的 SRAP-PCR 分析。



注:M:2 000 bp DNA ladder;1~30;30 个供试品种美国红枫。  
Note:M:2 000 bp DNA ladder;1~30;30 kinds of *Acer rubrum*.

图 8 反应体系优化验证结果

Fig. 8 The result of the optimized SRAP system

### 3 讨论

目前,集简便、稳定、产率中等、易得到特异性条带于一身的新型的 SRAP-PCR 分子标记技术已被广泛应

用于各物种基因组 DNA 的多态性分析中。然而这种基于 PCR 反应的分子标记技术的最佳反应体系在不同物种及条件上差异十分巨大。因此,该试验对美国红枫

SRAP 反应体系的优化为进一步开展其种质资源遗传多样性研究奠定了工作基础。该研究利用正交实验设计均匀分散、齐整可比的特点,高效、快速、经济的找到了最佳的反应因素配比,探究了影响美国红枫 SRAP-PCR 反应中的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板 DNA 以及 *Taq* DNA 聚合酶等 5 种主要因子的用量,避免了单因素试验结果的不足。结果表明,dNTPs 浓度对美国红枫 SRAP-PCR 反应的影响最为巨大,而引物浓度对反应的影响相对最小。同时,各因素间也会产生相互影响。 $Mg^{2+}$  浓度过低会影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性。而 dNTPs 又能与游离的  $Mg^{2+}$  结合,影响  $Mg^{2+}$  浓度。而且 SRAP-PCR 反应体系的时间及温度设计也是试验成功与否的重要一环。因此不难看出,该反应是一种综合且复杂的反应,各因素之间的相互作用与影响也是不可忽视的。通过与其它物种的对比,说明 SRAP-PCR 反应在种间差异的巨大。因此,针对不同的物种,反应体系的设立也应因地制宜。该研究优化得到的 20  $\mu$ L 反应体系稳定可靠,可广泛应用于美国红枫基因组 DNA 的 SRAP 分析。

由于该试验是针对美国红枫 SRAP-PCR 反应体系的优化,有些结果如反应体系的时间、温度、引物的设计等都是借助前人的经验而设计的,没有进行具体的验证。而且试验中的 2 次重复在统计学上不够科学严谨,还有待于进一步验证。

#### 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] 卢泳全, 吴为人. 应用 SRAP 技术从大米草根中分离盐胁迫应答基因[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(5): 511-514.
- [3] 王刚, 潘俊松, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因的定位[J]. 中国科学 C 辑(生命科学), 2004, 34(65): 510-516.
- [4] 吴伟怀, 王玲, 程贯忠, 等. 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[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 657-680.
- [5] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126.
- [6] 于翠, 金茂勇, 张宝珠, 等. 基于 SRAP 分子标记的安祖花遗传连锁图谱构建[J]. 园艺学报, 2012, 39(6): 1151-1158.
- [7] 王燕青. 利用 SRAP 标记构建菏泽牡丹优良品种指纹图谱[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 王寿春, 冯健, 陈昱, 等. 31 个种源东部白松 SRAP 指纹图谱分析[J]. 辽宁林业科技, 2011(6): 5-7.
- [11] 王宇. 东北地区胡桃楸遗传多样性 SRAP 研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [12] 李珊. 用 RAPD 标记检测庙台槭自然居群的遗传结构和遗传分析[D]. 西安: 西北大学, 2001.
- [13] 钱永生, 王慧中, 黎念林, 等. 十一种槭属植物遗传多样性 AFLP 分析[J]. 浙江林业科技, 2007, 27(1): 1-5.
- [14] 张冬梅, 魏华丽, 苏金乐, 等. 美国红枫 ISSR-PCR 反应体系的确立[J]. 上海农业学报, 2008, 24(1): 51-54.
- [15] Murry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucl Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [16] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 383.
- [17] 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.
- [18] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2006, 42(6): 26-31.

## Optimization of SRAP Reaction System in *Acer rubrum*

LIU Wei<sup>1</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>, YAN Ting-wu<sup>2</sup>, GUO Zhi-fu<sup>1</sup>, YOU Wen-zhong<sup>2</sup>, AN Xin<sup>1</sup>

(1. College of Biosciences and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Liaoning Academy of Forestry Sciences, Shenyang, Liaoning 110032)

**Abstract:** Using the genomic DNA of *Acer rubrum* as template,  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment was designed to optimized the 5 major factors influencing the amplification reaction. The results showed that the optimum ratio of each factor in 20  $\mu$ L reaction system was 1.5 mmol/L of  $Mg^{2+}$  concentration, 2.5 mmol/L of dNTPs concentration, 1.5  $\mu$ mol/L of primer concentration, 50 ng of template DNA, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase. The establishment of this system provided a technological basis for the application of SRAP in molecular assisted breeding in *Acer rubrum*.

**Keywords:** *Acer rubrum*; SRAP; system optimization