

正交直观分析法和新复极差法 优化苦瓜 SRAP 反应体系研究

刘萌芽^{1,2,3}, 黄如葵^{2,3}, 黄玉辉^{2,3}, 黄熊娟^{2,3}, 陈小凤^{2,3}, 冯诚诚²

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007;

3. 广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西 南宁 530007)

摘要:以苦瓜为试材,采用正交直观分析法和新复极差法相结合的方法,对影响苦瓜 SRAP 反应体系的 5 种因素(dNTP 浓度、模板 DNA、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度及 *Taq* DNA 聚合酶)4 个水平进行优化筛选,以期优化苦瓜 SRAP 的 PCR 反应体系。结果表明:苦瓜 SRAP 分析的优化反应体系为 20 μ L PCR 反应体系中含有 $1\times$ PCR buffer, 250 μ mol/L dNTP, 50 ng 模板 DNA, 1.2 μ mol/L 引物, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。

关键词:苦瓜;正交直观分析法;新复极差法;SRAP 分子标记

中图分类号:S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0085-04

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)是一种新型的分子标记,它与 RAPD 很类似,但它能够更优先扩增基因组中的编码区域。李严等^[1]对 SRAP 分子标记的研究表明,SRAP 标记具有多态性高、操作简单、重复性好、产率中等、并且在基因组中分布均匀、较容易对目标片段进行测序、引物也具有通用性及成本低等优势;王军等^[2]对 SRAP-PCR 反应体系研究表明,不同植物材料的最佳体系也不尽相同,PCR 反应体系中的任何一项差异都会导致扩增结果的不同,同时还证明不同型号的扩增仪和不同批号的试验药品都可能影响试验结果。因此,在进行进一步的后续试验研究中必须对苦瓜体系进行优化,以确保试验的可靠性和稳定性。目前 SRAP 分子标记已经广泛应用于各种瓜类作物如苦瓜^[3]、黄瓜^[4]等的各种研究包括图谱构建、基因定位和基因克隆等。该试验通过运用正交直观分析法和新复极差法,以期能够更直观更好更快地找到苦瓜 SRAP-PCR 反应体系的最佳组合。目前,同时利用正交直观分析法和新复极差法进行优化体系的研究报道较少,因此该试验具有一定的新颖性和可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的“桂农科 2 号”苦瓜幼嫩叶片,由广西农业科

第一作者简介:刘萌芽(1989-),女,河南洛阳人,硕士研究生,现主要从事苦瓜抗病性鉴定工作。E-mail:mengya0316@126.com.

责任作者:黄如葵(1969-),女,博士,研究员,现主要从事蔬菜育种及种子学等研究工作。E-mail:rkhuang@gxaas.net.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31240060);广西壮族自治区自然科学基金资助项目(2013GXNSFDA019010)。

收稿日期:2013-11-22

学院蔬菜研究所苦瓜课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法提取供试材料幼嫩叶片基因组 DNA,通过使用分光光度计和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测样品的浓度和纯度,并将提取的 DNA 稀释到 50 ng/ μ L 备用。

1.2.2 SRAP-PCR 扩增反应 SRAP-PCR 反应的扩增程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 5 次循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 次循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存^[3-5]。PCR 产物采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,分别用核酸染料和银染法染色显影,分析并选择适合的凝胶。

1.2.3 SRAP-PCR 反应体系的正交设计优化 试验采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计,对 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、引物浓度等 5 种影响因素设计 4 个水平共 16 个组合,因素水平见表 1,正交实验设计见表 2。总反应体积为 20 μ L(均含 2 μ L 的 $10\times$ PCR buffer)。引物编号 5,引物序列见表 3。

表 1 苦瓜 SRAP 体系的因素与水平

Table 1 SRAP factor and levels in bitter melon

水平 Level	因素 Factor				
	Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration /mmol \cdot L ⁻¹	dNTP 浓度 dNTPs concentration / μ mol \cdot L ⁻¹	模板 DNA Template DNA /ng	<i>Taq</i> 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase /U	引物浓度 Primer concentration / μ mol \cdot L ⁻¹
1	1.5	50	10	0.5	0.3
2	2.0	150	30	1.0	0.6
3	2.5	250	50	1.5	0.9
4	3.0	350	100	2.0	1.2

1.2.4 PCR 产物扩增结果分析 参照何正文等^[6]的方法,对苦瓜 SRAP-PCR 正交体系 16 个组合扩增出来的

表 2 苦瓜 SRAP 正交实验设计 $L_{16}(4^5)$ Table 2 SRAP orthogonal design $L_{16}(4^5)$ in bitter melon

编号 No.	因素 Factors				
	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration /mmol · L ⁻¹	dNTP 浓度 dNTPs concentration /μmol · L ⁻¹	模板 DNA Template DNA /ng	Taq 聚合酶 Taq DNA polymerase /U	引物浓度 Primer concentration /μmol · L ⁻¹
1	1.5	50	10	0.5	0.3
2	2.0	50	30	1.0	0.6
3	2.5	50	50	1.5	0.9
4	3.0	50	100	2.0	1.2
5	2.5	150	10	2.0	0.6
6	3.0	150	30	1.5	0.3
7	1.5	150	50	1.0	1.2
8	2.0	150	100	0.5	0.9
9	3.0	250	10	1.0	0.9
10	2.5	250	30	0.5	1.2
11	2.0	250	50	2.0	0.3
12	1.5	250	100	1.5	0.6
13	2.0	350	10	1.5	1.2
14	1.5	350	30	2.0	0.9
15	3.0	350	50	0.5	0.6
16	2.5	350	100	1.0	0.3

条带数量和明亮度进行分析,明亮记 3 分,亮记 2 分,暗记 1 分,无条带记 0 分。参照王军等^[2]的方法,运用新复极差法对扩增结果进行分析。

1.2.5 SRAP-PCR 体系的稳定性检测 选择另外不同的 4 对 SRAP 引物为检测引物,分别编号为 1~4,运用优化后的苦瓜 SRAP-PCR 反应体系,对苦瓜 DNA 进行扩增,每对引物重复 3 次,产物凝胶电泳后观察结果。检测引物的序列见表 3。

表 3 SRAP 上下游引物序列

Table 3 Sequences of forward and reverse SRAP primers

引物编号 No. of primer	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	下游引物序列(3'-5') Forward primer sequence(3'-5')
1	GTACATAGAACCGGAGT	GACTGCGTACGAATTAT
2	GTACATAGAACCGGAGT	GACTGCGTACGAATTGC
3	GTACATAGAACCGGAGT	GACTGCGTACGAATTGAC
4	GTACATAGAACCGGAGT	GACTGCGTACGAATTGA
5	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTATG

2 结果与分析

2.1 DNA 电泳检测

部分苦瓜基因组 DNA 电泳结果见图 1,苦瓜基因组 DNA 条带清晰,无降解和拖尾现象;电泳孔附近无残留,表明 DNA 中没有其它杂质和蛋白质;紫外分光光度计检测结果,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值范围皆在 1.80 和 1.90 之间,浓度均不低于 2 000 ng/μL,说明该苦瓜 DNA 提取法纯度和浓度都较高,符合下游试验对苦瓜基因组 DNA 的要求。

2.2 PCR 扩增结果

苦瓜 SRAP-PCR 正交体系的扩增电泳结果见图 2。

2.3 SRAP 体系优化结果分析

通过对图 2 中 16 个处理扩增出的条带数和明亮度进行分析,得到 SRAP-PCR 反应中单因素反应条件的最

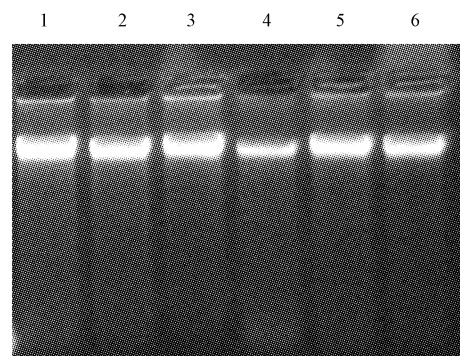


图 1 苦瓜 DNA 检测结果

注:1~6 为苦瓜材料。

Fig. 1 The result of *Momordica charantia* DNA

Note:1~6 were test materials of *Momordica charantia*.

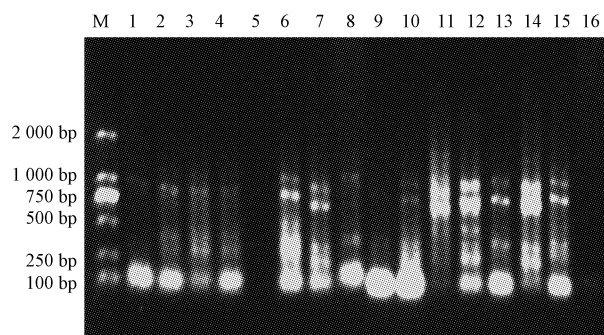


图 2 1.2%琼脂糖凝胶电泳的检测结果

注:M:DL 2 000 DNA Marker;1~16:表 2 组合的编号。下同。

Fig. 2 The analysis of 1.2% agarose gels

Note:M:DL 2 000 DNA Marker;1~16:treatments showed in Table 2. The same as below.

高分值,见表 4。

2.3.1 dNTP 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可以看出,dNTP 浓度为 50 μmol/L 时,平均分最低,6.25 分;dNTP 浓度为 250 μmol/L 时,平均分最高,10.25 分;说明 250 μmol/L dNTP 浓度为苦瓜 PCR 反应的适宜浓度。

2.3.2 模板 DNA 用量对 SRAP-PCR 扩增结果的影响

模板 DNA 用量为 10 ng 时,平均分最低,4.25 分;模板 DNA 用量为 50 ng 时,平均分最高,11.00 分;说明 50 ng 模板 DNA 用量为苦瓜 PCR 反应的适宜用量。

2.3.3 引物浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响 引物浓度为 0.3 μmol/L 时,平均分最低,为 7.50 分;引物浓度为 1.2 μmol/L 时,平均分最高,为 9.50 分;说明 1.2 μmol/L 引物浓度为苦瓜 PCR 反应的适宜浓度。

2.3.4 Mg²⁺ 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时,平均分最低,4.00 分;Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L 时,平均分最高,11.25 分;说明 1.5 mmol/L Mg²⁺ 浓度为苦瓜 PCR 反应的适宜浓度。

2.3.5 *Taq* DNA 聚合酶对 SRAP-PCR 扩增结果的影响 *Taq* DNA 聚合酶为 2.0 U 时, 平均分最低, 6.75 分; *Taq* DNA 聚合酶为 1.5 U 时, 平均分最高, 11.50 分; 说明 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶浓度为苦瓜 PCR 反应的适宜浓度。

表 4

Table 4

极差分析结果

The result of range analysis

水平 Level	dNTP 浓度 Score	dNTP concentration Average	模板 DNA Score	Template DNA Average	引物浓度 Score	Primer concentration Average	Mg ²⁺ 浓度 Score	Mg ²⁺ concentration Average	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 Score	<i>Taq</i> DNA polymerase Average
1	25	6.25	17	4.25	30	7.50	45	11.25	34	8.50
2	40	10.00	42	10.50	35	8.75	33	8.25	28	7.00
3	41	10.25	44	11.00	32	8.00	16	4.00	46	11.50
4	29	7.25	32	8.00	38	9.50	40	10.00	27	6.75
极差 Range	16	4.00	27	6.75	8	2.00	29	7.25	19	4.75

2.3.6 各因素对 SRAP-PCR 反应的影响程度 参照郝凤等^[7]对番茄各因素影响程度分析方法, 通过表 4 可以看出, Mg²⁺ 浓度在极差分析结果中极差值最大, 平均分为 7.25, 由此表明 Mg²⁺ 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响程度最大。依此类推, 模板 DNA 用量对 SRAP-PCR 扩增结果的影响程度次之, *Taq* DNA 聚合酶浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响程度居中, dNTP 浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响程度较小, 引物浓度对 SRAP-PCR 扩增结果的影响最小。也即, 各因素对反应结果的影响大小依次为 Mg²⁺ 浓度 > 模板 DNA > *Taq* DNA 聚合酶 > dNTP 浓度 > 引物浓度。

2.4 2 种凝胶电泳的检测结果的比较

苦瓜 SRAP-PCR 正交体系的扩增电泳结果, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳见图 2, 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 3。从电泳操作步骤来说, 琼脂糖电泳具有易操作、试验方法简单、电泳时间短等优势。但从图 2 可以看出, PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳检测中只能扩增出部分条带, 而在变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测中均能扩增出多条清晰谱带。可见, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在检测和分析扩增产物的多态性和分离微小片段方面皆优于琼脂糖凝胶电泳, 具有分辨率高、多态信息量大等优点。因此, SRAP 的 PCR 扩增产物用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测使结果更准确, 更有助于后续试验的完成。

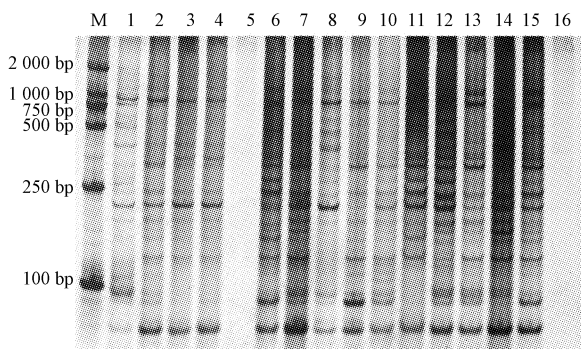


图 3 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 3 The analysis of 7% denaturing polyacrylamide gels

采用极差法对正交实验中各单因素进行分析后得到最佳处理组合即: dNTP 浓度为 250 μmol/L, 模板 DNA 浓度为 50 ng, 引物浓度为 1.2 μmol/L, Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶为 1.5 U。

2.5 苦瓜优化 SRAP 反应体系稳定性的检测结果

随机选择引物组合 me8/em1-em4, 共 4 对 SRAP 引物进行反应体系的稳定性检测。从图 4 可以看出, 相同引物的 3 次 PCR 扩增结果比较, 其多态性、条带强度及背景深浅都相当一致, 说明该体系的稳定性较好。综上所述, 该体系能够扩增出条带清晰、多态性强、稳定性和重复性都较好的结果, 证明该优化的苦瓜 SRAP 反应体系是比较稳定可靠的。

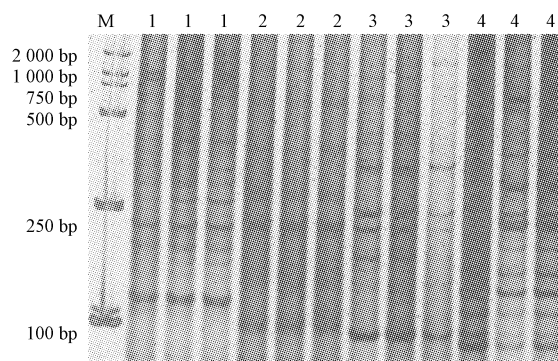


图 4 苦瓜 SRAP-PCR 优化体系的稳定性检测结果

Fig. 4 The stability testing result of optimized SRAP-PCR system

3 讨论

由于 SRAP-PCR 体系对产物影响很大, 因此不同植物材料的最佳体系也不尽相同, 甚至 PCR 反应体系中的任何一项差异都会导致扩增结果的不同^[2,4]。该研究与 琚茜茜等^[8]单因素 SRAP 优化相比, 通过正交设计方法, 具有能够快速直观的获取试验结果以及节省人力物力等优点; 与郭大龙等^[3]正交优化设计实验相比, 利用极差分析法在一定程度上打破了传统正交实验主观性较强的局限, 使试验分析更加可靠, 与此同时该研究第 1 次提出了各单因素在苦瓜 SRAP-PCR 上的影响程度大小。

该研究利用 L₁₆(4⁵) 正交实验设计, 对苦瓜 PCR 反应体系中的 5 种影响因素进行优化, 并结合极差分析法分析, 得出苦瓜 SRAP 反应体系的最佳处理组合为: 在 20 μL PCR 反应体系中含有 1×PCR buffer,

以花椰菜花球为外植体的离体再生体系的建立

黄俊轩, 刘艳军, 李建科, 武春霞, 杨静慧, 徐慧洁

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要:以花椰菜花球切片为外植体,在含有不同激素的培养基上进行再生芽的诱导、伸长和生根培养,从中筛选出最适的培养基配方。结果表明:最适的分化培养基为 MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA;最适的伸长培养基为 MS+0.5 mg/L IAA;最适的生根培养基为 1/2MS+1.0 mg/L IAA。该试验结果为花椰菜基因转化及其进一步组培研究奠定了基础。

关键词:花椰菜;激素;再生;转化

中图分类号:S 635.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0088-03

花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)属十字花科芸薹属植物,它与人们的日常生活密切相关,并已在农

业生产中占有一定的地位,现今在世界各地均有种植。但花椰菜生长期病虫害严重,存在不耐贮、品质差等问题,困扰着广大菜农与菜商。因此,对花椰菜的品种进行改良势在必行。虽然常规的育种方法在花椰菜育种中已经取得了巨大成就,但由于其局限性,使人们迫切希望的一些育种目标难以实现。随着现代生物技术的飞速发展,人们采用基因转化技术使其获得新型重要的园艺性状成为了可能^[1-3]。而基因转化工作的前提就

第一作者简介:黄俊轩(1973-),男,广东河源人,硕士,副教授,现主要从事园林植物等研究工作。E-mail: huangjunxuan@sina.com.

基金项目:国家农业科技成果转化资助项目(2011GB2A100003);国家星火计划资助项目(2012GA60031)。

收稿日期:2013-11-13

250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 50 ng 模板 DNA, 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。采用该体系,随机选取的 4 对引物均可得到清晰明亮、多态性丰富的条带。

参考文献

- [1] 李严,张春庆. 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
- [2] 王军,杨荣萍,洪明伟,等. 石榴 SRAP-PCR 反应体系的正交设计优化及验证[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(3): 376-379.
- [3] 郭大龙,吴正景,郑玉萍,等. 苦瓜 SRAP 反应体系的建立与优化[J].

安徽农业科学, 2008, 36(18): 7583-7585.

- [4] 王振国,张海英,于广建,等. 黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 112-115.
- [5] 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.
- [6] 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): 76-77.
- [7] 郝凤,于铁峰,雷银川. 番茄 SRAP-PCR 反应体系建立与优化[J]. 北方园艺, 2012(3): 107-109.
- [8] 琚茜茜,黄如葵,黄玉辉,等. 苦瓜 AFLP 和 SRAP 的 PCR 反应体系优化及应用比较[J]. 南方农业学报, 2013, 44(2): 195-199.

Orthogonal Design-direct Analysis and SSR for SRAP Amplification System in *Momordica charantia*

LIU Meng-ya^{1,2,3}, HUANG Ru-kui^{2,3}, HUANG Yu-hui^{2,3}, HUANG Xiong-juan^{2,3}, CHEN Xiao-feng^{2,3}, FENG Cheng-cheng²

(1. College of Agricultural, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 3. The Key Laboratory of Crops Genetic Improvement Biological Technology of Guangxi, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Taking *Momordica charantia* as test material, using SSR and orthogonal design-direct analysis to optimize the four levels of five factor (dNTP, template DNA, primer, Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase). The results showed that the optimum SRAP-PCR reaction system contains 1 \times PCR buffer, 250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 50 ng template DNA, 1.2 $\mu\text{mol/L}$ primer, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA polymerase, in a total volume of 20 μL SRAP-PCR system.

Key words: *Momordica charantia*; orthogonal design-direct analysis; SSR; SRAP