

偃麦草 SRAP-PCR 反应体系优化

毛 伟, 李培英, 孙宗玖

(新疆农业大学 草业与环境科学学院, 新疆草地资源与生态自治区重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以偃麦草叶片 DNA 为模板, 利用单因子和 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计对影响偃麦草 SRAP-PCR 反应效果的 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、DNA、*Taq* DNA 聚合酶 5 种因素进行优化, 并比较了不同退火温度对扩增反应的影响, 通过综合比较分析建立偃麦草 SRAP-PCR 的优化反应体系。结果表明: 优化的偃麦草 SRAP-PCR 总体系 20 μ L 中, Mg^{2+} 1.75 mmol/L, 引物 0.15 μ mol/L, dNTPs 0.20 mmol/L, DNA 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U, 2 μ L 10 \times PCR buffer; Mg^{2+} 和引物浓度对扩增效果影响最大, DNA 浓度影响最小; 采用该体系对 32 份偃麦草进行验证, 扩增结果清晰稳定, 此体系的建立为利用 SRAP 分子标记进行偃麦草遗传多样性、抗性标记等研究奠定了技术基础。

关键词:偃麦草; SRAP; 体系优化

中图分类号:S 688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0091-07

偃麦草(*Elytrigia repens* (Linn.) Nevski) 属禾本科小麦族偃麦草属多年生优良禾草, 又称速生草、匍匐冰草, 在我国广泛分布于新疆、内蒙古、宁夏、甘肃、青海、西藏等地; 国外在朝鲜、日本、印度和马来西亚也有分布^[1]。偃麦草具有耐旱^[2-3]、抗寒^[4]、耐盐碱^[5]、侵占能力极强等优良特点, 被认为是一种极具开发价值的生态草种。同时偃麦草也具有耐践踏、成坪速度较快等特点, 被认为是庭院、公园、广场和运动场绿化的理想草坪草品种^[6]。

随着分子生物学的快速发展, 分子标记技术已作为一种快速而有效的技术手段被广泛用于遗传多样性分析、图谱构建、亲缘关系分析、基因定位等多个领域的研究。目前 SSR^[7]、RAPD^[8]、AFLP^[9-10] 等分子标记技术在偃麦草研究中均有应用。SRAP(sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性) 标记是由 Li 等^[11] 于 2001 年开发的一种基于 PCR 的新型技术, 该分子标记在草坪草及牧草等禾本科植物中已被应用, 如狗牙根(*Cynodon dactylon*)^[12]、草地早熟禾(*Poa pratensis*)^[13]、假俭草(*Eremochloa ophiuroides*)^[14]、结缕草(*Zoysia japonica*)^[15]、黑麦草(*Lolium perenne*)^[16]、野牛

草(*Buchloe dactyloides*)^[17] 等植物, 但在偃麦草中尚鲜见报道。开展 SRAP 分析的基础在于具有能清晰、稳定扩增产物的 PCR 反应体系, 目前围绕体系的优化主要有单因子试验和正交实验设计这 2 种方法。单因子试验是通过研究 PCR 反应中的各影响因素的影响情况, 找出各自的最适条件, 利用各因素的最佳浓度组合建立 PCR 的最佳反应体系。正交实验设计最早是由何正文等^[18] 提出, 目前已被应用于 PCR 体系优化中, 此方法具有可以综合考查 PCR 反应体系中各因素及其交互作用, 并能够快速获得满意的试验结果, 减少试验的工作量, 降低试验成本等优点。该研究拟利用单因子及正交实验设计对偃麦草 SRAP-PCR 反应体系进行优化, 明确影响偃麦草 SRAP-PCR 扩增效果的主要因素, 以期为后期利用 SRAP 技术进行偃麦草遗传多样性分析、抗性标记等奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 32 份新疆野生偃麦草为试材, 其中 E06 用于体系优化, 其它材料用于优化体系的验证(表 1), 材料来自于新疆农业大学三坪农场原始材料圃。SRAP 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成, dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 参照周少云等^[19] 的方法并稍加改动。具体为: 取 0.5 g 新鲜幼叶加液氮研磨至粉末后转入 2.0 mL 的离心管中, 加入优化的 1 mL 的

第一作者简介:毛伟(1986-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为草坪及草种资源评价及育种。E-mail: 569646469@qq.com.

责任作者:李培英(1975-), 女, 内蒙古乌兰察布市察右前旗人, 博士, 副教授, 现主要从事草坪及草种资源评价和遗传育种等科研与教学工作。E-mail: nmlpy_1234@sina.com.

基金项目:新疆自然科学基金资助项目(2012211A060)。

收稿日期:2014-09-09

表 1

试验材料编号及来源

Table 1

Materials code and origin

编号 Code	采集地点或引种地 Collecting or introducing site	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Elevation/m	生境 Inhabit
E01	乌鲁木齐市永丰乡	87°18′	43°30′	1 620	农田边
E02	阿勒泰北屯镇	88°03′	47°18′	540	路边
E03	阿勒泰北屯镇	87°48′	47°22′	552	杨树林边
E04	阿勒泰布尔津县	86°53′	47°42′	456	水渠边
E06	阿勒泰福海县	87°27′	47°13′	489	沙枣林内
E07	阿勒泰哈巴河县	86°26′	48°04′	544	农田边
E08	阿勒泰红墩乡	88°14′	47°43′	741	路边
E09	阿勒泰喇玛昭乡	88°23′	47°45′	888	水渠边
E10	阿勒泰喇玛昭乡	88°11′	47°17′	556	额河边
E11	阿勒泰市桦林公园	88°07′	47°52′	936	—
E12	乌鲁木齐后峡乡	87°12′	43°19′	1 950	封育草地
E13	乌鲁木齐永丰乡	87°29′	43°43′	1 120	农田边
E14 *	北京市农林科学院	—	—	—	—
E15 *	北京市农林科学院	—	—	—	—
E16 * *	乌鲁木齐南山	—	—	—	—
E17 *	北京市农林科学院	—	—	—	—
E19	乌鲁木齐三坪农场	—	—	—	—
E21 *	北京市农林科学院	—	—	—	—
E22	阿勒泰市桦林公园	88°07′	47°52′	940	山前荒漠
E23	乌鲁木齐后峡乡	87°11′	43°16′	2 080	森林带下
E24	哈密伊吾乡	—	—	—	盐池边
E25	阿勒泰福海县	87°30′	47°07′	494	农田边
E26	阿勒泰喇玛昭乡	88°23′	47°45′	865	封育草地
E27	焉耆县四十里城	—	—	—	农田边
E28	阿勒泰北屯镇	87°48′	47°22′	552	封育草地
E29	阿勒泰哈巴河县	86°20′	48°06′	515	哈巴河边
E30	阿勒泰布尔津县	86°52′	47°43′	480	农田边
E31	焉耆县四十里城	—	—	—	路边
E32 *	北京市农林科学院	—	—	—	—
E33 * *	昌吉呼图壁县	—	—	—	—
E34 * *	乌鲁木齐市南山	—	—	—	—

注: * 为引种, ** 为多年驯化。

洗涤液(100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH 8.0), 250 mmol/L NaCl)及 20 μ L 的 β -巯基乙醇摇匀后, 9 000 r/min 离心 1 min; 弃上清液向沉淀中加入优化的 3%CTAB(10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA (pH 8.0) 1.4 mol/L NaCl + 3%CTAB + 3%PVP)和 20 μ L 的 β -巯基乙醇混匀后 65℃水浴 60~80 min。利用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度, 并将样品稀释至 50 ng/ μ L, -20℃保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 单因子试验 参照 Li 等^[11]的方法合成 10 条正向引物和 10 条反向引物, 共组成 100 对 SRAP 引物(表 2)。以材料 E06 为模板, 引物组合 Me1+Em5 用于 SRAP-PCR 体系的优化。以王志勇等^[12]优化体系为基础 PCR 体系, 即 Mg^{2+} 1.50 mmol/L、引物 0.20 μ mol/L、dNTPs 0.20 mmol/L、DNA 40 ng/20 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 1.00 U、2 μ L 10 \times PCR buffer, 总体积 20 μ L, 对影响偃麦草 SRAP-PCR 扩增效果的 5 个因素分别进行单因子优化设计, 每个因子均设置 8 个浓度梯度(表 3), 在研究某一因素对 PCR 反应的影响

表 2

SRAP 引物序列

Table 2 Primer sequences used for SRAP analysis

编号 Code	正向引物序列 Forward primer	编号 Code	反向引物序列 Reverse primer
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTATT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGACA	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em5	GACTGCGTACGAATTAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGACC	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em7	GACTGCGTACGAATTAGC
Me8	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em8	GACTGCGTACGAATTTGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em9	GACTGCGTACGAATTCAA
Me10	GACTGCGTACGAATTGAG	Em10	GACTGCGTACGAATTGAG
Me11	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em11	GACTGCGTACGAATTGCC

表 3 SRAP-PCR 体系单因子试验

Table 3 Single factor test of SRAP-PCR system

因素 Factor	水平 Level							
$Mg^{2+}/(mmol \cdot L^{-1})$	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	3.00
引物/ $(\mu mol \cdot L^{-1})$	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
dNTPs/ $(mmol \cdot L^{-1})$	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
模板 DNA/ $(ng \cdot (20\mu L)^{-1})$	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00

时,只改变其中 1 个因素的浓度,其余因素浓度均参照上述体系进行。

1.2.3 SRAP-PCR 反应体系正交实验设计 在单因素试验的基础上,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,对 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、DNA、*Taq* DNA 聚合酶进行 5 因素 4 水平筛选(表 4、表 5)。

1.2.4 SRAP-PCR 扩增程序及扩增产物的检测 SRAP-PCR 扩增程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 50 s, 35℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 50 s, 55℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,32 个循环;循环结束后 72℃延伸 8 min,4℃保存。扩增反应在英国 TECHNE 公司的 TC-5000 型 PCR 仪上进行。扩增产物的检测用 6%聚丙烯酰胺凝胶分离,银染检测。

1.2.5 SRAP-PCR 扩增程序退火温度的优化 采用 Me1+Em5 引物组合,并利用优化后的反应体系进行退火温度试验,以筛选出最佳退火温度。退火温度的梯度设置(PCR 仪:TECHNE TC-5000 自动生成)12 个:49.0、49.2、49.7、50.6、51.6、52.5、53.5、54.4、55.4、56.2、56.8、57.0℃。

表 4 SRAP-PCR 体系的因素和水平

Table 4 Factor and level of SRAP-PCR system

水平 Level	因素 Factor				
	Mg^{2+} /(mmol · L ⁻¹)	引物 Primer /(μmol · L ⁻¹)	dNTPs /(mmol · L ⁻¹)	DNA /(ng · (20μL) ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 polymerase/U
1	1.25	0.15	0.10	20	0.50
2	1.50	0.20	0.15	30	0.75
3	1.75	0.25	0.20	40	1.00
4	2.00	0.30	0.25	50	1.25

表 5 SRAP-PCR[$L_{16}(4^5)$]正交实验设计

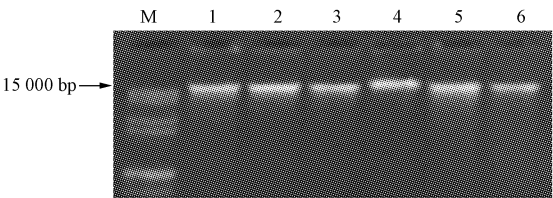
Table 5 [$L_{16}(4^5)$]Orthogonal design for SRAP-PCR

编号 Code	因素 Factor				
	Mg^{2+} /(mmol · L ⁻¹)	引物 Primer /(μmol · L ⁻¹)	dNTPs /(mmol · L ⁻¹)	DNA /(ng · (20μL) ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 polymerase/U
1	1 (1.25)	1 (0.15)	1 (0.10)	1 (20)	1 (0.50)
2	1 (1.25)	2 (0.20)	2 (0.15)	2 (30)	2 (0.75)
3	1 (1.25)	3 (0.25)	3 (0.20)	3 (40)	3 (1.00)
4	1 (1.25)	4 (0.30)	4 (0.25)	4 (50)	4 (1.25)
5	2 (1.50)	1 (0.15)	2 (0.15)	3 (40)	4 (1.25)
6	2 (1.50)	2 (0.20)	1 (0.10)	4 (50)	3 (1.00)
7	2 (1.50)	3 (0.25)	4 (0.25)	1 (20)	2 (0.75)
8	2 (1.50)	4 (0.30)	3 (0.20)	2 (30)	1 (0.50)
9	3 (1.75)	1 (0.15)	3 (0.20)	4 (50)	2 (0.75)
10	3 (1.75)	2 (0.20)	4 (0.25)	3 (40)	1 (0.50)
11	3 (1.75)	3 (0.25)	1 (0.10)	2 (30)	4 (1.25)
12	3 (1.75)	4 (0.30)	2 (0.15)	1 (20)	3 (1.00)
13	4 (2.00)	1 (0.15)	4 (0.25)	2 (30)	3 (1.00)
14	4 (2.00)	2 (0.20)	3 (0.20)	1 (20)	4 (1.25)
15	4 (2.00)	3 (0.25)	2 (0.15)	4 (50)	1 (0.50)
16	4 (2.00)	4 (0.30)	1 (0.10)	3 (40)	2 (0.75)

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的检测结果

从图 1 可以看出,材料基因组总 DNA 条带较亮,点样孔较干净,说明提取的 DNA 量较多且所含蛋白质较少;DNA 条带整齐,无弥散现象,表明 DNA 完整无降解,其质量可以满足 PCR 反应要求。



注:M 为 DL 15 000 DNA marker,下同。编号 1~6 分别为材料 E01、E02、E03、E04、E06、E07。

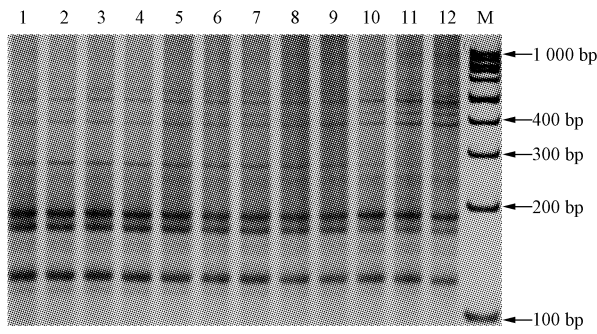
Note:M,DL 15 000 DNA marker,the same below. Number 1—6 refer to E01,E02,E03,E04,E06,E07.

图 1 基因组总 DNA 质量的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA

2.2 退火温度对 SRAP-PCR 体系的影响

退火温度的高低会直接影响到引物与 DNA 模板的特异性结合。较高温度扩增出的产物特异性较高,反之则较低,每个引物的退火温度会有一定的差别,所以有必要进行退火温度的筛选。图 2 表明,不同退火温度下扩增的效果差异不大,温度高于 56.2℃时条带开始减少且有点模糊。52.5~55.4℃条带清晰,杂带也不明显。说明偃麦草 SRAP-PCR 的退火温度范围较大。



注:1~12 的退火温度依次为 49.0、49.2、49.7、50.6、51.6、52.5、53.5、54.4、55.4、56.2、56.8、57.0℃。

Note:1—12 showed temperature was respectively 49.0, 49.2, 49.7, 50.6, 51.6, 52.5, 53.5, 54.4, 55.4, 56.2, 56.8, 57.0℃.

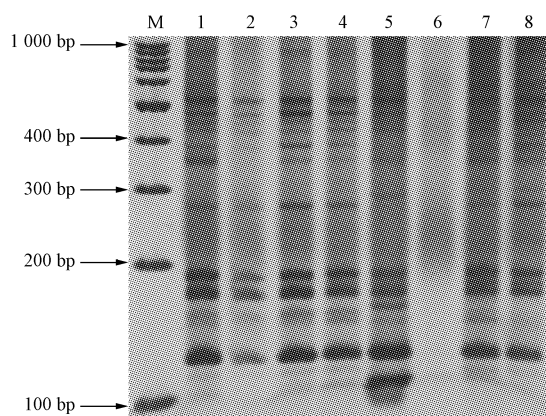
图 2 不同退火温度扩增结果

Fig. 2 SRAP-PCR amplification by different amounts of annealing temperature

2.3 SRAP-PCR 单因子试验扩增结果分析

2.3.1 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 体系的影响 Mg^{2+} 在 PCR 反应体系中起着非常重要的作用,它对 PCR 扩增效率和特异性有一定影响。 Mg^{2+} 过少,会降低酶

活性使得反应产物减少;过高时会出现非特异扩增^[20]。由图3不同 Mg^{2+} 浓度对PCR反应影响结果可知,当 Mg^{2+} 浓度为1.00、1.25 mmol/L时扩增出的条带较模糊;当浓度1.50、1.75 mmol/L时扩增出的条带丰富且清晰;浓度为2.00~3.00 mmol/L时扩增出的条带模糊且杂带较多。综合比较, Mg^{2+} 最适浓度范围为1.50~1.75 mmol/L。



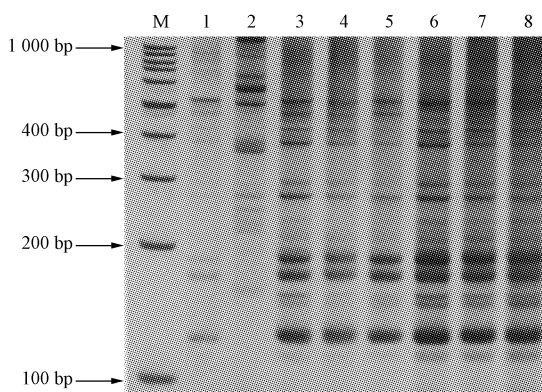
注:1~8表示 Mg^{2+} 浓度分别为1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、3.00 mmol/L。

Note:1~8 showed that concentration of Mg^{2+} were respectively 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 3.00 mmol/L.

图3 SRAP-PCR的 Mg^{2+} 浓度梯度试验

Fig. 3 The test of series of Mg^{2+} concentrations in the SRAP-PCR

2.3.2 引物对SRAP体系的影响 引物浓度会影响PCR扩增的特异性,引物量过低时,会降低产物量;引物浓度过高会导致非特异性产物及引物二聚体的形成。由图4不同浓度引物扩增结果可知,当引物浓度为



注:1~8表示引物浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 μ mol/L。

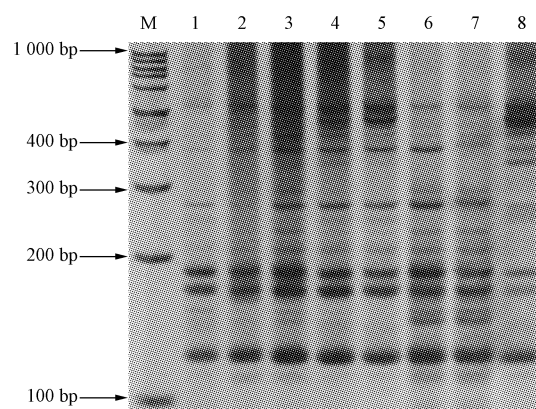
Note:1~8 showed that concentration of primer were respectively 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 μ mol/L.

图4 SRAP-PCR的引物浓度梯度试验

Fig. 4 The test of series of primer concentration in the SRAP-PCR

0.05、0.10 μ mol/L时条带较少、较弱且不清晰,说明扩增产物较少,当浓度在0.15~0.25 μ mol/L时扩增结果无明显差异,均表现为主带清晰且稳定,浓度大于0.30 μ mol/L后扩增条带颜色加深,但有点模糊。综合比较,该试验引物最适浓度范围为0.15~0.25 μ mol/L。

2.3.3 dNTPs浓度对SRAP体系的影响 dNTPs在PCR反应中有着极其重要的作用,浓度过高会增加 Taq DNA聚合酶错配率,导致出现非特异性扩增,而浓度过低会降低扩增产物量。从图5不同dNTPs浓度对试验效果可知,当浓度为0.05、0.10 mmol/L时扩增的条带较少且不清晰,随着dNTPs浓度的增加,条带扩增越来越清晰且稳定。但是浓度为0.40 mmol/L时扩增产物又变得模糊了。综合比较,dNTPs浓度在0.20~0.30 mmol/L时满足该试验要求。



注:1~8表示dNTPs浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mmol/L。

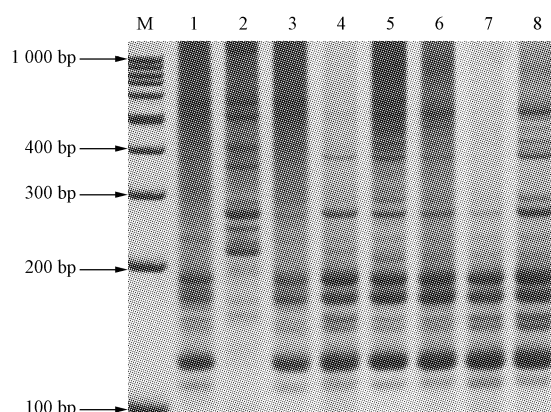
Note:1~8 showed that concentration of dNTPs were respectively 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 mmol/L.

图5 SRAP-PCR的dNTPs浓度梯度试验

Fig. 5 The test of series of dNTPs concentrations in the SRAP-PCR

2.3.4 DNA浓度对SRAP体系的影响 由图6不同DNA浓度PCR扩增试验可知,在20 μ L体系中,DNA浓度在10~30 ng时,扩增的产物较少,且条带不清晰,随着浓度的增加,主带变的更加清晰,50~80 ng试验效果均较理想,但考虑节约材料,建议采用50 ng/20 μ L。

2.3.5 Taq DNA聚合酶浓度对SRAP体系的影响 Taq DNA聚合酶浓度过低时不能扩增或扩增产物较少,条带不够亮;浓度过高会出现非特异性扩增,条带背景较暗。由图7不同 Taq DNA聚合酶浓度试验结果发现, Taq 酶在0.25、0.50 U时扩增出的产物条带较淡且模糊,在0.75、1.00 U时条带较清晰,杂带也较少,大于1.00 U后条带开始变得模糊,杂带也增加,且成本也较高,不宜采用。综合比较, Taq DNA聚合酶最适浓度为0.75~1.00 U。

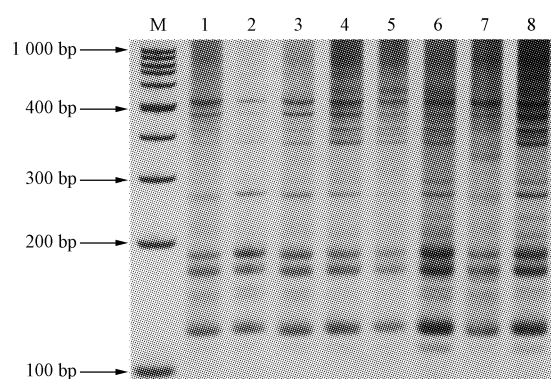


注:1~8 表示 DNA 浓度分别为:10,20,30,40,50,60,70,80 ng/20μL。

Note:1-8 showed that concentration of DNA were respectively 10,20,30,40,50,60,70,80 ng/20μL.

图6 SRAP-PCR 的 DNA 浓度梯度试验

Fig. 6 The test of series of DNA concentrations in the SRAP-PCR

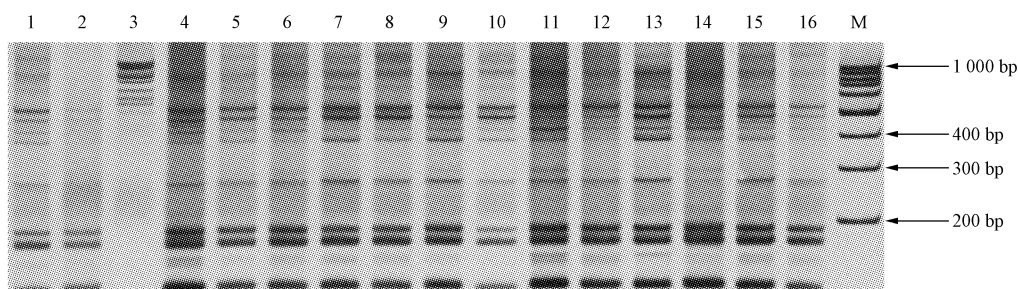


注:1~8 表示 *Taq* DNA 酶浓度分别为 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.50,1.75,2.00 U。

Note:1-8 showed that concentration of *Taq* DNA polymerase were respectively 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.50,1.75,2.00 U.

图7 SRAP-PCR 的 *Taq* DNA 酶浓度梯度试验

Fig. 7 The test of series of *Taq* DNA polymerase concentrations in the SRAP-PCR



注:1~16 为处理组合,见表5。

Note:1-16 mean treatment combinations, shown in table 5.

图8 SRAP-PCR 正交实验设计结果

Fig. 8 Electrophoresis of SRAP-PCR orthogonal design

2.4 SRAP-PCR 正交设计试验结果分析

通过直观分析法对 SRAP-PCR 扩增结果进行打分(图8)。最高为16分,要求条带数量丰富、清晰度高且杂带少;反之最低记为1分。1~16泳道依次评分为:11、2、1、4、10、8、14、13、15、12、5、6、16、3、9、7。得分最高的是组合13和组合9。组合4、11、14的 *Taq* 酶浓度均是1.25 U,扩增出的主带有点模糊,考虑效果及成本不建议采用。组合13和组合9主带均很明显,条带清晰,且杂带少,扩增效果最好。但组合9与组合13相比,其 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 酶浓度均较低,更能减少试验成本。且组合9各浓度参数基本也在单因子试验分析的结果范围内,组合13中的 Mg^{2+} 和 DNA 浓度不在此范围内。因此选择组合9为偃麦草 SRAP-PCR 的最佳反应体系,即5个因素用量分别为 Mg^{2+} 1.75 mmol/L、引物 0.15 μmol/L、dNTPs 0.20 mmol/L、DNA 50 ng/20μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U。

参照穆立菁等^[21]的方法,对这16个组合正交实验结果进行了统计分析(表6),其中 *K* 值表示各个因素在同一水平下的试验分数之和;*k* 值表示每一因素水平下的平均值;*R* 值为极差,即各因素在不同水平下的最大与最小平均值之差。*R* 值的大小反映了各影响因子对试验结果影响的大小,*R* 值越大,其影响越明显。 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、DNA、*Taq* DNA 聚合酶这5个因素对结果的影响由大到小依次为: Mg^{2+} = 引物 > *Taq* DNA 聚合酶 > dNTPs > DNA, *k* 值反映了各影响因素在不同水平下对 PCR 反应体系的影响情况, *k* 值越大,反映水平越好。从 *k* 值结果可以看出, Mg^{2+} 以水平2好,引物以水平1好, dNTPs 以水平4好, DNA 水平2或4好, *Taq* DNA 聚合酶水平1好,即 Mg^{2+} 1.50 mmol/L 引物 0.15 μmol/L、dNTPs 0.25 mmol/L、DNA 30 ng/20μL 或 50 ng/20μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U,该组合在优化体系里没有出现,该组合与组合8和组合13与最接近,其次是与组合9也较接近,二者的引物浓度和 DNA 浓度均一致。说明该结果与直观分析得出结果基本一致,因而进一步确定组合9为最佳组合体系。

2.5 SRAP-PCR 反应优化体系的验证

利用优化后体系,运用 2 对引物组合 Me5+Em10、Me4+Em7 对 32 份偃麦草材料进行 SRAP 扩增,由图 9 和图 10 扩增效果可知,扩增条带清晰且亮度较高、特异性高且稳定性较好,且 32 份偃麦草种质间表现出一定差异,因此该优化反应体系可用于后续偃麦草 SRAP 分子标记方面的研究。

表 6 正交设计直观分析

Table 6 Intuitive analysis of orthogonal design

结果	因素 Factor				
Result	Mg ²⁺	引物 Primer	dNTPs	DNA	Taq DNA 聚合酶
K1	18.00	52.00	31.00	34.00	45.00
K2	45.00	25.00	27.00	36.00	38.00
K3	38.00	29.00	32.00	30.00	31.00
K4	35.00	30.00	46.00	36.00	22.00
k1	4.50	13.00	7.75	8.50	11.25
k2	11.25	6.25	6.75	9.00	9.50
k3	9.50	7.25	8.00	7.50	7.75
k4	8.75	7.50	11.50	9.00	5.50
R	6.75	6.75	4.75	1.50	5.75

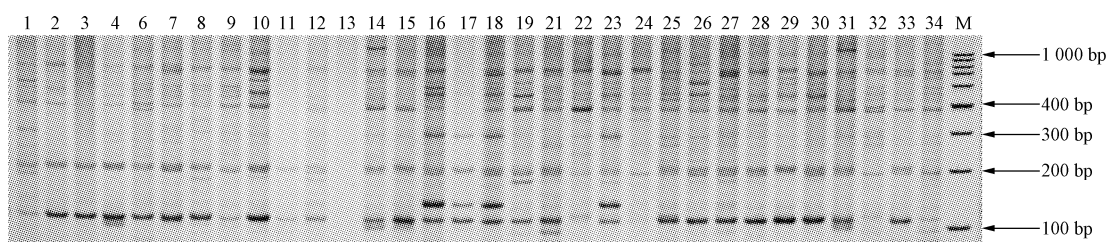


图 9 优化的体系下引物 Me5+Em10 对 32 个样品的 SRAP-PCR 扩增结果

Fig. 9 SRAP-PCR amplification results of 32 accessions by primer Me5+Em10

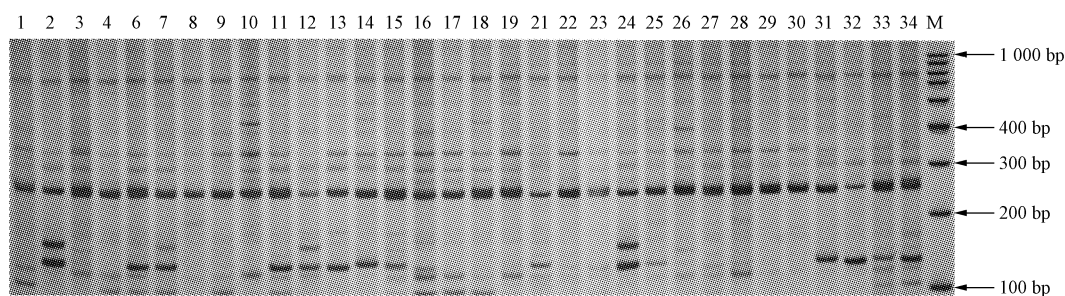


图 10 优化的体系下引物 Me4+Em7 对 32 个样品的 SRAP-PCR 扩增结果

Fig. 10 SRAP-PCR amplification results of 32 accessions by primer Me4+Em7

3 讨论与结论

3.1 SRAP 反应体系中 5 个主要因子对 PCR 反应体系的影响

该研究以偃麦草 DNA 为模板,采用单因子和正交实验 2 种方法对 SRAP-PCR 反应体系进行了优化。试验结果发现 5 个因子对 PCR 扩增产物的生成及质量均有一定的影响。有研究表明^[12-14,16],禾本科不同植物 SRAP-PCR 反应优化体系为 Mg²⁺ 浓度范围在 1.25~2.00 mmol/L; dNTPs 浓度范围在 0.20~0.26 mmol/L; 引物浓度范围在 0.20~0.25 μmol/L; DNA 浓度范围在 40~100 ng/20 μL; Taq DNA 聚合酶浓度范围在 0.5~1.5 U。该试验各因素浓度除了引物(0.15 μmol/L)以外,其余 4 个因素浓度均在此范围内。这可能与试验材料及反应体系浓度的设置有关。5 个因素在 PCR 中的影响大小没有统一的认识,赵杨等^[22]在白桦 SRAP-PCR 体系中认为 Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶这 3 个因子的影响最大;陈万胜等^[23]认为 Taq DNA 聚合酶在烟草

SRAP-PCR 反应体系中影响最大;郑轶琦等^[14]认为 Mg²⁺ 浓度影响最大, Taq DNA 聚合酶的影响最小;薛丹丹等^[20]认为这 5 个因素对结果的影响由大到小依次为 Mg²⁺>DNA>dNTPs>引物>Taq DNA 聚合酶。该试验认为 5 个因素影响大小是 Mg²⁺=引物>Taq DNA 聚合酶>dNTPs>DNA。试验的结果与他人的结果有一些不同,这可能与研究材料不同或主观打分有关。

3.2 单因子试验和正交实验在偃麦草 SRAP-PCR 体系优化中的应用

该研究先利用单因子试验方法建立偃麦草 SRAP-PCR 反应体系中主要成分的适宜浓度范围,再利用正交实验确立最适 SRAP-PCR 反应体系。这 2 种方法所得到的试验结果表明了二者扩增结果差异较小。单因子试验通过对 Mg²⁺、引物、dNTPs、DNA、Taq DNA 聚合酶等 5 个影响因素逐一进行研究来确定各因素的最佳浓度,从而把各因素得到的最佳水平组合起来得到 SRAP 优化体系,该方法的优点在于可以确定各因素的适宜浓

度范围,而缺点是不能兼顾 PCR 体系中各组分之间的交互作用,且过程繁琐,完成时间较长,试验成本也比较高。正交实验通过各因素的相互作用得到最佳的试验条件组合,通过直观分析法可快速得到满意的试验结果,并且可以减少工作量以降低试验成本,但该方法也存在一定的局限性,不能很好地估计试验误差,对结果的评价带有一定的主观成分,使各因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性^[21]。该研究利用这 2 种方法的结合,建立了偃麦草优化反应体系,并经验证发现,该体系扩增的条带清晰、稳定,有一定的应用价值。

该研究通过单因子和正交实验得到偃麦草优化 SRAP-PCR 反应体系为 Mg^{2+} 1.75 mmol/L,引物 0.15 μ mol/L,dNTPs 0.20 mmol/L,DNA 50 ng/20 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.75 U,2 μ L 10 \times PCR buffer,总体积 20 μ L。其中各因素对反应体系的影响大小为 Mg^{2+} = 引物 > Taq DNA 聚合酶 > dNTPs > DNA。此优化体系的建立为今后利用该标记技术进行偃麦草遗传多样性分析、图谱构建、亲缘关系分析、基因定位等研究奠定了技术基础。

参考文献

- [1] 陈默君. 中国饲用植物[M]. 北京:中国农业出版社,2002:38-39.
- [2] 张国芳,孟林,毛培春,等. 偃麦草和中间偃麦草种质材料苗期抗旱性鉴定研究[J]. 华北农学报,2007,22(3):54-59.
- [3] 李培英,孙宗玖,阿不来提,等. 偃麦草种质资源抗旱性评价初步研究[J]. 中国草地学报,2008,30(3):59-64.
- [4] 李岩,龚东芳,杨涛,等. 偃麦草冬季非质体蛋白抗冻活性的研究[J]. 东北农业大学学报,2008,39(11):28-31.
- [5] 张耿,高洪文,王赞,等. 偃麦草属植物苗期耐盐性指标筛选及综合评价[J]. 草业学报,2007,16(4):55-61.
- [6] 孟林,张国芳. 优良的饲用坪用水土保持兼用植物-偃麦草[J]. Grassland and Turf,2003(4):16-18.
- [7] 李潇枫. 偃麦草属植物种质资源遗传多样性分析[D]. 北京:农业大学,2007.
- [8] Mitra S,Bhowmik P C,Idnurm A. Using RAPD markers to identify genetic variation in quack-grass(*Elytrigia repens*) biotypes[J]. Association of Applied Biologists,2000,136:253-25.
- [9] Magdalena S,Elzbieta C,Piotr T B. Morphological and AFLP variation of *Elytrigia repens* (L) Gould(Poaceae)[J]. Cellular and Molecular Biology Letters,2002,7:547-558.
- [10] 朱昊. 新疆野生偃麦草遗传多样性研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2008.
- [11] 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]. Theoretical and Applied Genetics,2001,103:455-461.
- [12] 王志勇,袁学军,刘建秀,等. 狗牙根 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 草业学报,2008,17(3):79-85.
- [13] 任小巍,王瑜,袁庆华,等. 正交设计优化草地早熟禾 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 草业学报,2012,29(3):411-416.
- [14] 郑轶琦,王志勇,郭海林,等. 正交优化假俭草 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 草业学报,2008,17(4):110-117.
- [15] 陈宣,郭海林,薛丹丹,等. 结缕草属植物耐盐性 SRAP 分子标记研究[J]. 草业学报,2009,18(2):66-75.
- [16] 李杰勤,王丽华,詹秋文,等. 20 个黑麦草品系的 SRAP 遗传多样性分析[J]. 草业学报,2013,22(2):158-164.
- [17] Budak H,Shearman R C,Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of *Buffalograss* germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,108(2):328-334.
- [18] 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.
- [19] 周少云,黄春琼,刘国道,等. 狗牙根基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南农业科学,2009(11):8-10,14.
- [20] 薛丹丹,郑轶琦,王志勇,等. 结缕草属植物 SRAP-PCR 体系的建立和优化[J]. 草业学报,2012,17(6):93-101.
- [21] 穆立蕾,刘赢男,冯富娟,等. 紫菀 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学,2006,42(6):26-31.
- [22] 赵杨,李玉璞,代毅,等. 华山松 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 西北林学院学报,2012,27(5):87-90.
- [23] 陈万胜,王元英,罗成刚,等. 利用正交设计优化烟草 SRAP 反应体系[J]. 分子植物育种,2008,6(1):177-182.

Optimization of SRAP-PCR System on *Elytrigia repens*

MAO Wei,LI Pei-ying,SUN Zong-jiu

(College of Pratacultural and Environmental Science,Xinjiang Agricultural University,Key Laboratory of Grassland Resource and Ecology of Xinjiang,Urumqi,Xinjiang 830052)

Abstract: With genetic DNA of the *Elytrigia repens* as template, single factor and orthogonal design were applied to optimize the concentration of Mg^{2+} , primer, dNTPs, DNA, Taq DNA polymerase for SRAP-PCR system of *Elytrigia repens*, the effect of different annealing temperature on reaction was studied by comprehensive analysis, the optimal system of SRAP-PCR was established. The results showed that the optimal system was Mg^{2+} 1.75 mmol/L, primer 0.15 μ mol/L, dNTPs 0.20 mmol/L, DNA 50 ng/20 μ L, Taq DNA polymerase 0.75 U, 2 μ L 10 \times PCR in 20 μ L, concentrations of Mg^{2+} and primer had the highest effect on reaction, DNA concentrations had the least effect. The test of optimal system on 32 kinds of *Elytrigia repens* were done, the result was steady and clear, the establishing of optimal system made the base for the studies including genetic diversity and resistance marker and so on.

Keywords: *Elytrigia repens*; SRAP; system optimization