

魏 博,汪元超,王大玮,等. 思茅松 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):27-30.

# 思茅松 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

魏 博,汪元超,王大玮,许玉兰,田 野,段安安  
(西南林业大学林学院,云南昆明 650224)

**摘要:**对影响思茅松 SRAP-PCR 反应体系的各参数进行分析,建立并优化出一套适合思茅松的 SRAP-PCR 反应体系。在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中,模板 DNA 60 ng、 $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L、引物 1.0  $\mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U;在此基础上,从 100 对引物组合中筛选出条带清晰、多态性丰富的引物组合 24 对。  
**关键词:**思茅松;SRAP;体系建立;引物筛选  
**中图分类号:**S722.3   **文献标志码:**A   **文章编号:**1002-1302(2014)03-0027-03

思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)是我国云南省特有树种,以大面积纯林或针阔混交林的形式集中分布于云南省思茅市、临沧地区、红河州、西双版纳州和德宏州的部分县市<sup>[1]</sup>。思茅松木材广泛用于建筑、家具制造等行业;其树干富含树脂、而且品质优良,已成为除马尾松、湿地松之外我国重要的松脂资源。近年来,思茅松已成为云南省特别是滇南地区人工造林的主要树种,在云南省林业产业结构中占有重要地位<sup>[2]</sup>。

20 世纪 80 年代思茅松的遗传改良工作就已经开展:种源试验及优良林分 and 种源的选择,为思茅松种子调拨区划提供科学依据;无性繁殖技术的不断改良,加速了思茅松良种化的进程<sup>[3]</sup>;优树选择及种子园的建立,为生产提供了宝贵的资源<sup>[4]</sup>。随着分子生物学的高速发展,对思茅松的研究也从宏观进入了分子水平。21 世纪初思茅松的遗传多样性在同工酶水平得到了研究,并提出了相关的遗传资源保护策略<sup>[5]</sup>;随后,思茅松 RAPD、ISSR、AFLP 等分子标记的反应体系相继得以建立<sup>[6-8]</sup>。

SRAP 分子标记技术因操作方便快捷、产率高、多态性丰富、易从条带中得到分离条带等特点已经在植物遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建中得到广泛的应用<sup>[9-10]</sup>,但在思茅松中的研究未见报道。本研究的目的在于对思茅松的 SRAP-PCR 反应体系的各参数进行分析,在此基础上建立和优化一套适合思茅松的 SRAP-PCR 反应体系,并筛选出适合思茅松 SRAP 反应的引物组合,为思茅松的遗传多样性研究及遗传连锁图谱的构建提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

研究材料为云南省普洱市思茅区、景谷县、墨江县及孟连

县的 4 个思茅松自然分布群体。从每个群体中随机采集 5 株长势茂盛、植株健壮的思茅松新鲜松针。采集后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和检测 采用改良的 CTAB 法对采集样本的基因组 DNA 进行提取<sup>[11]</sup>。利用琼脂糖凝胶电泳及核酸蛋白检测仪 2 种方法对提取的思茅松 DNA 进行纯度和浓度的检测。

1.2.2 引物的合成 参照 Li 等序列<sup>[12]</sup>,由北京华大基因科技有限公司合成引物,引物编号和序列见表 1。

表 1 思茅松 SRAP-PCR 引物序列

编号	序列(5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAAC
Me10	TGAGTCCAAACCGGTAG
Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Em2	GACTGCGTACGAATTGTC
Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Em4	GACTGCGTACGAATTGA
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Em9	GACTGCGTACGAATTGAG
Em10	GACTGCGTACGAATTGCC

1.2.3 PCR 扩增程序 扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,37  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,5 个循环;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

1.2.4 SRAP-PCR 反应体系的优化 在 25  $\mu\text{L}$  的反应体系中模板 DNA 用量依次设置了 30、45、60、75、90 ng 5 个梯度; $\text{Mg}^{2+}$  浓度依次设置了 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 5 个梯

收稿日期:2013-10-29  
基金项目:云南省教育厅一般项目(编号:2013Y121);西南林业大学科研启动项目(编号:01102111210)。  
作者简介:魏 博(1987—),男,安徽蒙城人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:1435395492@qq.com。  
通信作者:王大玮,博士,讲师,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:daweiwon@163.com。

度;dNTPs 浓度依次设置了 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L 5 个梯度; *Taq* DNA 聚合酶用量设置了 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 U 5 个梯度; 引物浓度依次设置了 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25  $\mu\text{mol/L}$  5 个梯度。反应结束后, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.5 引物筛选 利用建立的思茅松 SRAP 反应体系, 采用不同地区的思茅松种源对 100 对 SRAP 引物组合(表 1) 进行筛选, 筛选出条带清晰、带型质量好、多态性丰富的引物组合。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测

思茅松松针中含有蛋白质、松脂等不利 DNA 提取的杂质。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 通过改良的 CTAB 法基本排除了蛋白质和其他杂质的干扰, 且在 RNA 酶作用下, 将 RNA 也去除干净, 经过琼脂糖凝胶电泳基本能得到整齐、清晰、含杂质较少的 DNA 条带, 所得 DNA 纯度高(图 1)。核酸蛋白检测仪检测后, 所有思茅松 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值均在 1.8~2.0 之间, 浓度均达到 100 ng/ $\mu\text{L}$  以上(表 2), 表明其纯度和浓度均能满足思茅松 SRAP-PCR 反应的要求。

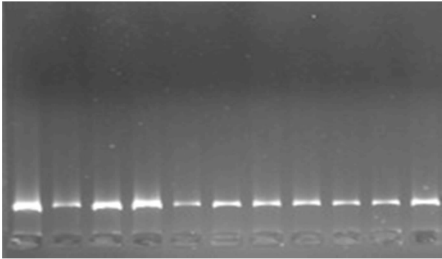


图1 改良的CTAB法提取的思茅松DNA

表 2 思茅松基因组 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值及浓度

编号	浓度 (ng/ $\mu\text{L}$ )	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	编号	浓度 (ng/ $\mu\text{L}$ )	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
PE1	259	1.83	JG1	253	1.88
PE2	311	1.90	JG2	288	1.92
PE3	135	1.94	JG3	354	1.89
PE4	168	1.81	JG4	483	1.91
PE5	193	1.94	JG5	212	1.82
SM1	245	1.89	MJ1	292	1.80
SM2	175	1.85	MJ2	136	1.88
SM3	334	1.96	MJ3	187	1.89
SM4	163	1.92	MJ4	156	1.85
SM5	279	1.92	MJ5	269	1.95

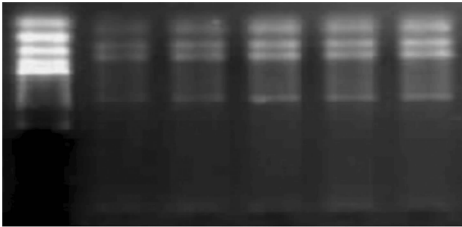
2.2 模板 DNA 用量的优化

电泳结果表明, 模板 DNA 的用量对于 PCR 扩增结果影响较大, 当模板 DNA 的用量小于 60 ng 时, 扩增产物相对较弱, 扩增出的条带模糊不清晰; 当模板 DNA 用量为 60~90 ng 时, 扩增出的条带带型清晰、稳定、分辨率较高(图 2)。DNA 浓度过高会导致模板与引物的直接配对概率降低、模板变性不彻底而引起弥散现象。考虑到节约模板和试验操作稳定性, 在 25  $\mu\text{L}$  体系中 DNA 最佳用量为 60 ng。

2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的优化

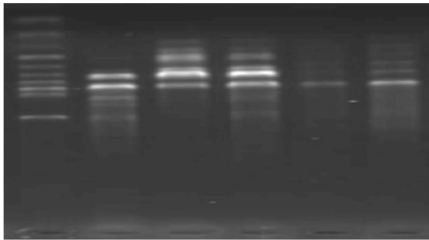
试验结果表明, 当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度小于 1.5 mmol/L 时, 扩增出

的条带较弱、不清晰; 当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度大于 1.5 mmol/L 时, 扩增出的条带相对清晰稳定(图 3)。但考虑到较高  $\text{Mg}^{2+}$  浓度会产生非特异性扩增, 产生非特异性条带, 而且会出现条带不稳定的弥散现象, 在保证特异性 PCR 产物质量较高、特异性较强的情况下, 在 25  $\mu\text{L}$  体系中  $\text{Mg}^{2+}$  最佳浓度为 2.0 mmol/L。



M为100 bp ladder; 1至5分别为30、45、60、75、90 ng DNA 模板的PCR产物

图2 不同DNA浓度对思茅松SRAP-PCR反应的影响

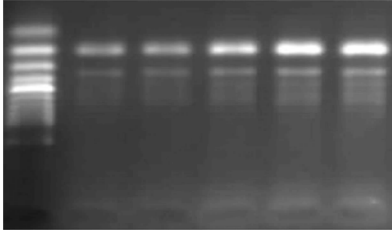


M为100 bp ladder; 1至5分别为3.0、2.5、2.0、1.5、1.0 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  的PCR产物

图3 不同 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度对思茅松SRAP-PCR反应的影响

2.4 dNTPs 浓度的优化

试验结果表明, dNTPs 的浓度小于 0.15 mmol/L 时, 扩增条带较弱, PCR 产物较少, 可能是因为 dNTPs 过早的消耗完而使产物单链化导致扩增效果不佳。当 dNTPs 的浓度为 0.2 mmol/L 时, 扩增的条带稳定、清晰, 扩增产物较佳; 当浓度为 0.25、0.3 mmol/L 时条带明显增亮(图 4)。最终确定在 25  $\mu\text{L}$  体系中 dNTPs 最佳浓度为 0.25 mmol/L。

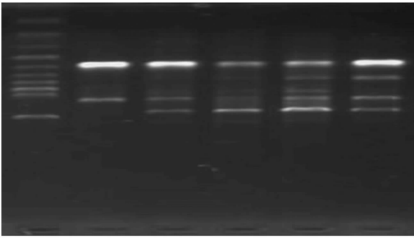


M为100 bp ladder; 1至5分别为0.1、0.15、0.2、0.25、0.30 mmol/L dNTP的PCR产物

图4 不同dNTPs浓度对思茅松SRAP-PCR反应的影响

2.5 *Taq* DNA 聚合酶的优化

试验结果表明, *Taq* DNA 聚合酶用量小于 0.75 U 时, 合成产物量较少, 条带扩增不明显; 当用量在 0.75~1.25 U 之间时, 扩增的条带明亮、清晰(图 5)。考虑到高用量的 *Taq* DNA 聚合酶会出现非特异性扩增现象, 导致假阳性, 甚至出现亮的通带, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1 U 时, 条带最清晰稳定、



M为100 bp ladder; 1至5分别为0.25、0.50、0.75、1.00、1.2 U的*Taq* DNA聚合酶PCR产物

图5 不同*Taq* DNA聚合酶浓度对思茅松SRAP-PCR反应的影响

扩增效果最好,所以在 25  $\mu$ L 体系中 *Taq* DNA 聚合酶最佳浓度为 1 U。

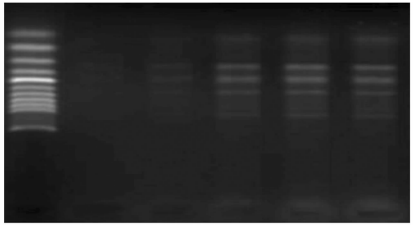
2.6 引物浓度

引物的浓度在一定程度上影响扩增产物的产量。结果表明:引物浓度在 0.25 ~ 0.50  $\mu$ mol/L 之间时,其扩增产物产量较少,条带明显较暗。只有在 1.0  $\mu$ mol/L 时条带清晰稳定,扩增效果最好(图 6)。由于引物浓度过高会产生非特异性扩增和错配,导致引物二聚体的产生,最终确定 1.0  $\mu$ mol/L 引物浓度为最佳反应浓度。

2.7 引物筛选

根据建立和优化的 SRAP - PCR 反应体系,采用 4 个群体共 20 个个体对 100 对 SRAP 引物组合进行筛选,最终筛选

出 Me1 - Em3(图 7)等 24 对多态性好、扩增结果稳定的引物组合(表 3)。



M为100 bp ladder; 1至5分别为0.25、0.50、0.75、1.00、1.25  $\mu$ mol/L 引物的PCR产物

图6 不同引物浓度对思茅松SRAP-PCR反应的影响

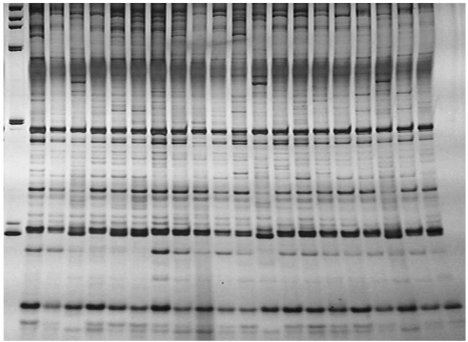


图7 引物组合Me1-Em3对20个个体PCR产物的银染结果

表 3 思茅松 SRAP - PCR 反应引物筛选结果

引物	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1			✓	✓		✓				
Me2						✓			✓	
Me3					✓			✓		✓
Me4									✓	
Me5										✓
Me6		✓	✓		✓				✓	
Me7	✓				✓		✓			
Me8				✓						
Me9						✓	✓		✓	✓
Me10		✓	✓							

注:打“✓”的表示最终筛选出的引物组合,空白表示舍弃的引物组合。

3 结论与讨论

SRAP 标记不需要知道任何基因的序列信息即可进行 PCR 扩增,具有共显性简便、稳定、操作简单、重复性强等优点,因此 SRAP 技术在林木遗传育种中得到了广泛的应用,并且均取得了良好的效果。SRAP 分子标记技术受到反应条件的影响,如 DNA 模板、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$  浓度以及反应程序等,因此在利用 SRAP 分子标记时首先应对其反应体系进行优化,以保证分析结果的可靠性。本研究对 PCR 反应中的各影响因子都设计了 5 个梯度,通过反复试验,最终确定了优化后的思茅松 SRAP 反应体系,该体系总体积为 25  $\mu$ L,其中模板 DNA 用量 60 ng,  $Mg^{2+}$  浓度 2.0 mmol/L, 引物 1  $\mu$ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。

SRAP 分子标记多态性产生的原因在于上游引物与下游引物分别与外显子区域和内含子、启动子区域结合,而内含子和启动子区域在不同个体、物种中又存在差异。可见,SRAP 分子标记中多态性条带的获得取决于引物与基因组的结合状

态。本研究建立的 SRAP - PCR 反应体系,与太行菊<sup>[13]</sup>、茶树<sup>[14]</sup>、柱花草<sup>[15]</sup>、华山松<sup>[16]</sup> 等都有不同,说明不同物种的 SRAP - PCR 反应体系有一定差异。在此基础上利用建立的思茅松 SRAP - PCR 体系成功地从 100 对引物组合中筛选出 24 对条带清晰、多态性丰富的引物组合。表明这套思茅松 SRAP - PCR 反应体系稳定、可靠,为后续的思茅松遗传多样性研究及遗传连锁图谱构建奠定了技术基础。

参考文献:

[1] 耿树香,尹晓兵. 思茅松树脂酸热异构反应的研究[J]. 林业实用技术,2011(6):58-60.  
[2] 陈伟,唐社云,陈宏伟,等. 思茅松优树收集区营建关键技术[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):288-289.  
[3] 唐红燕,许玉兰,唐海英,等. 思茅松嫩枝扦插育苗技术研究[J]. 西南林业大学学报,2011,31(2):24-28.  
[4] 段安安,许玉兰,王秀荣. 思茅松无性系种子园雌雄球花分布特性及人工辅助授粉的研究[J]. 云南林业科技,2002,32(4):22-26.

花 婧,郑斯竹,安榆林,等. 基于线粒体 *COI* 基因的大小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):30-32.

# 基于线粒体 *COI* 基因的大小蠹属昆虫 DNA 条形码研究

花 婧<sup>1</sup>, 郑斯竹<sup>1</sup>, 安榆林<sup>2</sup>, 杨晓军<sup>2</sup>

(1. 苏州出入境检验检疫局, 江苏苏州 215000; 2. 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210000)

**摘要:**大小蠹属昆虫是重要的林木害虫,大部分种类是检疫性有害生物,我国口岸有多次截获记录。为加强对大小蠹属害虫的检疫鉴定,通过线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基 I 基因(*COI*)867 bp 片段序列对大小蠹属 17 个种类进行序列分析,结果表明,线粒体 *COI* 基因可作为大小蠹属昆虫分类的依据;DNA 条形码是生物系统分类分子水平上的依据。

**关键词:**大小蠹属;线粒体基因;遗传距离;*COI* 基因

**中图分类号:** S763.380.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0030-03

目前,世界范围内已报道大小蠹属(*Dendroctonus*)昆虫 19 种<sup>[1-2]</sup>,作为鞘翅目中最进化的 1 个类群,其危害范围较广,是重要的森林害虫。大小蠹属为树皮小蠹类<sup>[3-4]</sup>,全部种类均侵食树干,成虫时初入侵韧皮部,后筑母坑道于形成层与边材之间。一般情况下,大小蠹属只危害活的直立木和由于年龄、干旱或其他生物学因素导致的衰弱木,在盛发期也危害茁壮的健康树,寄主包括松属、云杉属、黄杉属和落叶松属等经济树种。

目前,昆虫鉴定以传统的形态学鉴定为主,该方法存在一定的缺陷,表型可塑性(phenotypic plasticity)和遗传可变性(genetic variability)容易造成鉴定结果不正确,无法鉴定许多群体中普遍存在的隐存分类单元,受生物性别和发育阶段的限制,很多生物无法被鉴定。现代交互式鉴定系统是昆虫鉴定的一个很大进步,但它要求专业技术很高,操作不正确就易导致鉴定错误<sup>[5]</sup>。快速准确的物种鉴定是深入开展行为学、生态学以及生理学等相关研究的必要前提和基础<sup>[6]</sup>。

国内外大小蠹研究多集中于形态学分类,有关该类群分子鉴定技术的研究报道尚少。本研究通过对大小蠹属 *COI* 基因片段序列进行比对,对同源序列碱基多样性及系统进化关系进行分析,以期利用 DNA 条形码技术快速、准确地鉴定大小蠹种类,为进一步研究小蠹科昆虫分子鉴定技术提供理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 昆虫种类及序列信息

本研究以大小蠹属 17 个种类作为研究对象(表 1),序列均从 GenBank 下载。

### 1.2 分析方法

应用 MEGA5.05 软件进行序列比对、拼接和剪切,基于 Kimura 2-parameter 模型,计算各分类单元之间的遗传距离及其标准差、序列碱基组成、保守位点、变异位点、转换/颠换比值等<sup>[7]</sup>。应用 MEGA5.05 软件,使用邻接法(NJ)构建分子系统树,1 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平,碱基转换和颠换赋予相同的加权值,查看系统树<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 mtDNA *COI* 基因序列组成和变异

应用 MEGA 5.05 软件对 17 个大小蠹 *COI* 基因序列比

收稿日期:2013-07-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAK11B03);江苏出入境检验检疫局科技项目(编号:2012KJ55、2013KJ55)。

作者简介:花 婧(1990—),女,江苏苏州人,从事植物保护方面的研究。E-mail:huaj2702@163.com。

[5] Chen S Y, Zhao W S, Wang J. Genetic diversity and genetic differentiation of natural populations of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* [J]. Journal of Forestry Research, 2002, 13(4): 273-276.

[6] 姜远标, 吴 涛, 陈少瑜, 等. 思茅松 RAPD 反应体系的优化[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(9): 16-19.

[7] 王曙光, 杨文武, 普晓兰. 思茅松大配子体 DNA 的提取及 ISSR 反应体系的建立[J]. 四川林业科技, 2012(2): 90-95.

[8] 姚鹏强, 李 培, 王曙光, 等. 思茅松 AFLP 分子标记体系的建立[J]. 西南林业大学学报, 2012, 32(6): 30-33.

[9] 周冬琴, 莫海波, 芦治国, 等. 基于 SRAP 标记的墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(1): 36-41.

[10] 齐 兰, 王文泉, 张振文, 等. 利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1642-1648.

[11] 王大玮, 李 煜, 周 玮, 等. 杜仲 AFLP 反应体系的建立及优化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(6): 88-94.

[12] Li G, Quiors 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.

[13] 高亚芹, 朱广龙, 姬志峰, 等. 太行菊 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 实验室科学, 2012, 15(1): 81-84.

[14] 刘 振, 赵 洋, 杨培迪, 等. 茶树 SRAP 反应体系优化及引物筛选[J]. 茶叶通讯, 2012, 39(4): 18-21.

[15] 张伟丽, 刘凤民, 刘 艾. 柱花草 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析[J]. 草业学报, 2011, 20(4): 159-168.

[16] 赵 杨, 李玉璞, 代 毅. 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, 173.