

张 捷,李勤霞,张 萍,等. 新疆野核桃 SRAP-PCR 反应体系的优化及引物筛选[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):64-66.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.015

新疆野核桃 SRAP-PCR 反应体系的优化及引物筛选

张 捷,李勤霞,张 萍,余 甜

(新疆农业大学林学与园艺学院/新疆教育厅干旱区林业生态与产业技术重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:利用正交设计对新疆野核桃序列相关扩增多态性 PCR (SRAP-PCR) 反应体系中的 5 个因素 (模板 DNA、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶浓度) 在 5 水平上进行优化,对比不同浓度模板 DNA 对扩增结果的影响,建立了新疆野核桃 SRAP 最佳反应体系。结果表明,优化的新疆野核桃 SRAP-PCR 最佳反应体系为:20 μ L 的反应体系中,2.5 μ g/mL 模板 DNA、0.4 μ mol/L 引物、2 mmol/L Mg^{2+} 、0.2 mmol/L dNTPs、25 U/mL *Taq* 酶 U;最佳 PCR 扩增程序的退火温度为 54 $^{\circ}$ C。各因素扩增结果表明, Mg^{2+} 浓度对扩增反应结果影响最大,dNTPs 浓度影响最小。运用该体系对新疆野核桃样本进行了验证,表明该体系扩增稳定可靠。用该体系对 100 个 SRAP 引物组合进行筛选,筛选出 15 个扩增条带清晰且多态性丰富的引物组合,为新疆野核桃种质资源研究奠定了基础。

关键词:SRAP 分子标记;新疆野核桃;正交试验;引物筛选;体系优化

中图分类号:S664.103 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0064-03

新疆野核桃 (*Juglans regia* L.) 是胡桃科胡桃属植物,也是栽培核桃 (*Uuglms regia* L.) 的野生种之一^[1],在我国仅分布于新疆伊犁巩留县 (后称野核桃沟自然保护区) 内,是我国珍贵的天然野生资源^[2-4]。

国内目前对于新疆野核桃领域的研究薄弱,而分子标记技术已经在核桃的遗传多样性分析^[5-13]、分子标记辅助育种^[14]、特异性基因标记^[15-16] 和遗传图谱的构建^[17] 等方面普遍应用,但其饱和程度不高,不能满足科研工作发展的需要。本研究利用正交设计试验对新疆野核桃序列相关扩增多态性 PCR (SRAP-PCR) 反应体系进行了优化^[18-20],考察 SRAP-PCR 反应体系中各因素的相互影响^[21],得到最佳优化组合。与单因素试验相比,不但可以快速获得试验结果,而且减少了试验的成本和工作量。并对 100 对 SRAP 引物进行了多态性

标记筛选,得到一些多态性较高的 SRAP 引物组合^[22-24],为进一步研究新疆野核桃种质资源遗传多样性打下了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料 试验材料为从新疆伊犁巩留县野核桃沟内采集的野核桃叶片。

1.1.2 试剂 根据 Li 等已发表的 SRAP 引物^[25] 设计 10 条正向引物、10 条反向引物序列 (表 1),由深圳华大基因科技服务有限公司合成;10 \times *Taq* Buffer (含 Mg^{2+})、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Ladder (100 bp)、10 \times Loading buffer 均购于北京全式金生物公司。

表 1 筛选所用的 SRAP 引物序列

编号	正向引物	编号	反向引物
F1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	R1	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
F2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	R2	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
F3	5'-TGAGTCCAAACCGGAGG-3'	R3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
F4	5'-TGAGTCCAAACCGGACG-3'	R4	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
F5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	R5	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
F6	5'-TGAGTCCAAACCGGAGA-3'	R6	5'-GACTGCGTACGAATTATT-3'
F7	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	R7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'
F8	5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	R8	5'-GACTGCGTACGAATTTCG-3'
F9	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	R9	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
F10	5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	R10	5'-GACTGCGTACGAATTGCT-3'

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测 以新疆野核桃的幼嫩叶片为材料,利用改良高盐低 pH 值法提取基因组 DNA^[20],干燥后加入 1 \times TE 溶解沉淀,检验质量后于 -20 $^{\circ}$ C 条件下长期保存。试验所提取的 DNA 沉淀为白色,经风干后呈透明黏状。在 0.8% 的琼脂糖凝胶中,于 100 V 电压下电泳 1 h,经 0.5 μ g/mL EB 染色,然后在凝胶成像系统下拍照检测 DNA 质量。

收稿日期:2015-04-08

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31260187);新疆维吾尔自治区森林培育重点学科。

作者简介:张 捷 (1987—),女,甘肃平凉人,硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。E-mail:373264568@qq.com。

通信作者:张 萍,博士,副教授,研究方向为林木遗传育种。E-mail:zhang2003215@126.com。

1.2.2 PCR 反应体系优化的正交试验设计 利用 $L_{25}(5^5)$ 正交设计试验^[21],对模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 *Taq* 聚合酶浓度进行 5 因素 5 水平筛选试验(表 2)。

表 2 新疆野核桃 SRAP-PCR 体系的因素和水平					
水平	模板 DNA 浓度(μg/mL)	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	引物浓度 (μmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶 浓度(U/mL)
1	0.5	1.0	0.2	0.1	25
2	1.5	1.5	0.4	0.2	50
3	2.5	2.0	0.6	0.3	75
4	4.0	2.5	0.8	0.4	100
5	5.0	3.0	1.0	0.5	125

1.2.3 SRAP-PCR 扩增程序及扩增产物的检测 制备总体积为 20 μL 的 PCR 反应体系,除变化因素外,其余的用 ddH₂O 补足,所用的引物组合为 F₂ + R₃,引物序列见表 1。SRAP-PCR 的扩增程序为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 1 min,35 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,5 个循环;94 ℃ 变性 1 min,54 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 8 min,4 ℃ 保存。扩增反应在 Thermal Cycler S1000 型 PCR 仪上进行,扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(电泳仪电源为 DYY-10C 型,电泳仪为 DYCZ-20C 型),快速银染法显色,清水清洗,裹上保鲜膜,最后在胶片观察灯上观察并拍照保存。

1.2.4 多态性 SRAP 引物组合的筛选 根据表 2 设计的正交优化试验方案确定新疆野核桃 SRAP-PCR 的最佳反应体系,用 10 条正向引物和 10 条反向引物组成的 100 对引物组合对 48 份不同区域的新疆野核桃材料进行多态性 SRAP 引物组合的筛选。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

利用改良高盐低 pH 值法所提取的新疆野核桃基因组 DNA,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 DNA 条带清晰,无拖尾现象,表明 DNA 完整(图 1)。通过 UV2000 紫外分光光度计对 DNA 浓度进行检测,测得 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的比值在 1.8~2.0 之间。由此可知,经上述方法提取的新疆野核桃 DNA 的质量较高,能够满足 SRAP 反应对 DNA 的要求。

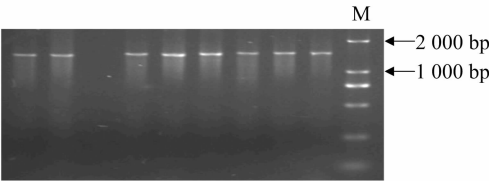


图1 提取的新疆野核桃样品总 DNA 电泳检测结果

2.2 正交设计优化 SRAP-PCR 的结果分析

依据“1.2.2”节中设定的正交试验,进行 PCR 扩增反应和聚丙烯酰胺凝胶电泳,根据电泳结果(图 2),统计扩增条带数量,将结果输入 SPSS 19.0 软件进行方差分析(表 3)。

从电泳结果可以看出,第 6、10、15 泳道电泳条带多且清晰,都可作为新疆野核桃正交试验组合,但从经济性考虑,最后选择第 15 个组合为新疆野核桃 SRAP-PCR 最佳反应组合。

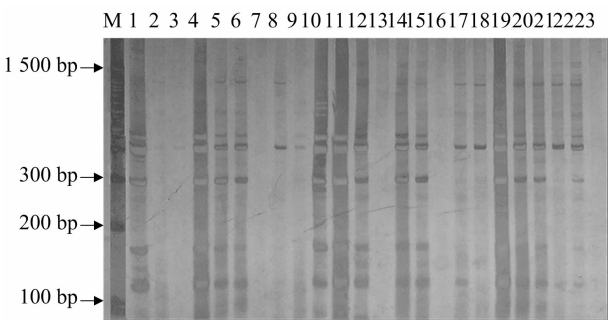


图2 SRAP-PCR 反应体系的正交试验结果

从方差分析中能够看出,5 种 PCR 因子的 *F* 值大小依次为: Mg^{2+} 浓度 > 引物浓度 > *Taq* 酶浓度 > 模板 DNA 浓度 > dNTPs 浓度,这表明 Mg^{2+} 浓度对新疆野核桃 SRAP-PCR 的反应体系有最大的影响。

表 3 方差分析结果			
因素	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值
模板 DNA 浓度	17.6	4	1.000
Mg^{2+} 浓度	42.8	4	2.432
引物浓度	27.2	4	1.545
dNTPs 浓度	10.4	4	0.591
<i>Taq</i> 酶浓度	26.0	4	1.477
误差	17.6	4	

依据上述试验结果,确定新疆野核桃 SRAP-PCR 的最优反应体系为:2.5 μg/mL 模版 DNA、2 mmol/L Mg^{2+} 、0.4 μmol/L 引物、0.2 mmol/L dNTPs、25 U/mL *Taq* 酶,剩余体积用去离子水补齐至 20 μL;最佳 PCR 扩增程序的退火温度为 54 ℃,相应 SRAP-PCR 扩增程序为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 45 s,35 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,5 个循环;94 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 8 min,4 ℃ 保存。

2.3 SRAP-PCR 反应体系的验证

从不同引物组合中随机选取引物分别对 48 个样品 DNA 进行扩增验证(图 3)。结果表明该反应体系能得到较好的结果,且在不同的引物组合之间和不同的 DNA 样品之间带型有明显差异,扩增出的谱带较清晰且多态性较丰富。

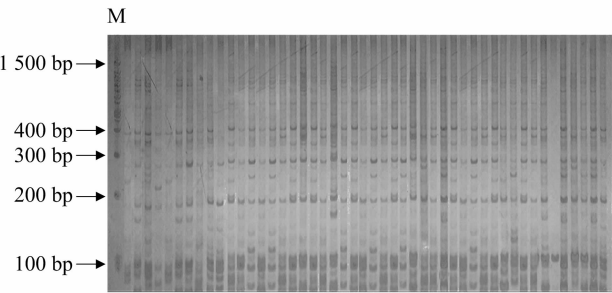


图3 引物 F3/R2 对新疆野核桃48个样品 DNA 的 SRAP 扩增电泳结果

2.4 SRAP-PCR 多态性引物组合的筛选

应用“2.2”节建立的新疆野核桃 SRAP-PCR 的反应体系,用由 10 个上游引物、10 个下游引物组成的 100 对 SRAP-PCR 的引物组合对 48 份新疆野核桃样品进行 SRAP 扩增,每个扩增试验都重复 3 次,并选取条带清晰且重复性较好的结果进行分析。最后筛选出 15 对条带清晰,多态性好的

引物组合: F1/R2、F1/R5、F1/R7、F2/R2、F2/R3、F2/R4、F3/R2、F3/R3、F3/R4、F5/R1、F5/R2、F5/R5、F6/R8、F6/R9、F6/R10。其中 F3/R2 扩增结果见图 4。

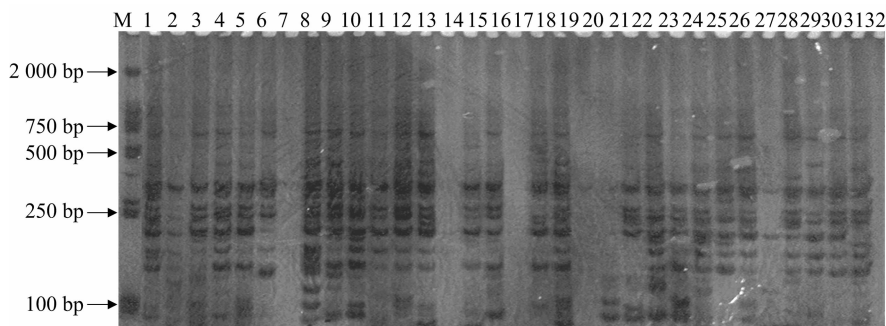


图4 引物 F3/R4 对新疆野核桃 32 个样品 DNA 的特异性标记

3 结论与讨论

SRAP 作为一种新型的分子标记技术,不但具有多态性高、扩增稳定、引物通用和产量中等的特点,而且重复性较好,操作简易。然而,SRAP 分子标记的扩增结果容易受 PCR 反应条件(比如 DNA、dNTPs、 Mg^{2+} 浓度、引物和 *Taq* 聚合酶用量等)和基因组的影响,并且不同的植物对 SRAP-PCR 反应体系的要求也各不相同^[21]。所以,对反应体系进行优化是进行 SRAP 分析的前提条件。

试验结果表明: Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 反应体系的结果影响最大,而模板浓度和退火温度的变化对 SRAP-PCR 反应体系影响相对较为轻微。本试验建立了适合新疆野核桃的 SRAP-PCR 优化体系,模版 DNA 浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L、引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L、*Taq* 酶浓度为 25 U/mL,剩余体积用去离子水补齐至 20 μL 。利用该体系筛选出 15 对扩增产物条带清晰并且多态性较丰富的引物组合。新疆野核桃 SRAP-PCR 优化体系的建立和引物组合的筛选为野核桃种质资源的遗传多样性分析研究奠定了良好的基础。

利用本研究的反应体系,能扩增出条带清晰、多态性丰富的谱带,且重复性好、稳定性强,这为今后新疆野核桃在 SRAP 这种新型分子标记方面的研究提供了依据,也为新疆野核桃通过 SRAP 分子标记技术在种质资源遗传多样性和野核桃遗传图谱的构建方面奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张 钊,严兆福. 新疆野生核桃的调查研究[J]. 新疆农业科学, 1962(10):404-407.
- [2] 张新时. 伊犁野果林的生态地理特征和群落学问题[J]. 植物学报, 1973,15(2):239-253.
- [3] 王家友. 伊犁野生核桃林的初步调查[J]. 新疆林业, 1980(6):27-31.
- [4] 新疆维吾尔自治区自然保护区考察队. 新疆的野核桃林[J]. 林业科技通讯, 1982(10):15-18.
- [5] 金 强,杨 宇,王新建,等. 新疆核桃种质资源遗传多样性 AFLP 分析[J]. 江苏农业科学, 2009(2):28-31.
- [6] 王 磊. 新疆野核桃、野樱桃李和野扁桃[J]. 新疆农业科学, 1990,27(1):33-34.
- [7] 王 磊,李 霞,杨 辽,等. 新疆野核桃种质资源数量分类研究

- [J]. 北方园艺, 1998(1):5-7.
- [8] 王 磊,崔乃然,张汉斐. 新疆野核桃的研究[J]. 干旱区研究, 1997,14(1):17-27.
- [9] 徐德炎. 新疆野核桃生态气候特征的研究[J]. 生态杂志, 1989,8(4):24-27.
- [10] 徐德炎,朱晓专. 新疆野核桃生存繁衍的生态条件研究[J]. 中国林副特产, 1991(4):1-6.
- [11] 余定域. 巩留野核桃林土壤的形成及其特征特性[J]. 干旱区研究, 1994,11(2):11-15.
- [12] 刘立诚,排祖拉,徐华君. 伊犁谷地野核桃林下土壤的形成特点及其系统分类[J]. 新疆大学学报:自然科学版, 1998,15(2):60-65.
- [13] 王肇延. 新疆野核桃资源及遗传多样性的分析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2011:22-27.
- [14] 曾 斌. 新疆野生核桃资源的现状与发展[J]. 北方果树, 2005(4):1-3.
- [15] 张 维,赵 玉,张相锋,等. 新疆伊犁野核桃复叶的表型变异及生长规律[J]. 东北师大学报:自然科学版, 2011,43(1):113-117.
- [16] 刘晓丽,陈学森,张美勇,等. 普通核桃(*Juglans regia*)3 个群体遗传结构的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2008,25(4):526-530.
- [17] 司 鹏. 苹果分子遗传图谱构建及其部分性状 SRAP 分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.
- [18] 杨向晖,黄建峰,傅嘉欣,等. 黄皮 SRAP 反应体系优化正交实验研究[J]. 亚热带植物科学, 2009,38(4):27-30.
- [19] 王 燕,龚义勤,赵统敏. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定[J]. 南京农业大学报, 2007,30(1):23-29.
- [20] 王肇延,董玉芝,陈 虹,等. 适用于新疆野核桃 SSR-PCR 的快速提取 DNA 的方法[J]. 北方园艺, 2011(19):100-103.
- [21] 郑铁琦,王志勇,郭海林,等. 正交设计优化假俭草 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 草业学报, 2008,17(4):110-117.
- [22] 张安世,邢智峰,刘永英,等. SRAP 分子标记及其应用[J]. 安徽农业科学, 2007,35(9):2562-2563.
- [23] 李巧燕,林瑞庆,朱兴全. SRAP 分子标记及其应用概述[J]. 热带医学杂志, 2006,6(4):467-469,封四.
- [24] 李 超,罗淑萍,秦 伟,等. 新疆核桃亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 新疆农业科学, 2010,47(9):1722-1727.
- [25] 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(2/3):455-461.