

倪雅楠,刘 博. 龙爪槐 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):19-22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.005

龙爪槐 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化

倪雅楠,刘 博

(中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081)

摘要:以龙爪槐(*Sophora japonica* f. *pendula* Hort.)叶片为材料,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计试验,对 SRAP-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物和模板 DNA 用量 5 个因素进行优化,并确立适用于龙爪槐 SRAP-PCR 反应的最佳体系。结果表明,龙爪槐 SRAP-PCR 反应的最佳体系为反应总体积 12.5 μ L, *Taq* 酶 0.10 U、 Mg^{2+} 3.0 nmol/L、dNTPs 2.5 nmol/L、正反向引物均为 1.2 nmol/L、DNA 100 ng,其余体积用 ddH₂O 补足。各因素水平变化对反应体系的影响影响大小依次为引物、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶。用 35 个龙爪槐样品对优化体系进行验证,均得到条带清晰、多态性丰富的图谱,证实了该体系的稳定性。

关键词:龙爪槐;SRAP-PCR;正交试验;反应体系优化

中图分类号:S687.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)11-0019-03

龙爪槐(*Sophora japonica* f. *pendula* Hort.)别称蟠槐、倒栽槐、虬龙槐、龙须槐、垂槐等,是国槐的变型^[1],龙爪槐枝条柔软下垂,老枝扭曲向上,曲蟠如龙,因此得名龙爪槐。龙爪槐原产于我国北方,现南北各地广泛栽培。龙爪槐喜光、稍耐阴,尤其能适应北京、河北地区干冷气候;喜土层深厚、湿润肥沃、排水良好的中性沙质壤土,也能在偏碱性的土壤中生长;具有深根性、根系发达、抗风力强^[2]的特点。龙爪槐的基础研究相对薄弱,分子标记技术在龙爪槐上的应用目前还未见报道。

相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP),是美国加州大学蔬菜作物系 Li 等在芸薹属(*Brassica*)中开发出的,利用 1 对独特的引物设计方式实现对开放阅读框架 ORFs 进行扩增的标记^[3],适合于植物的遗传多样性研究、比较基因组学、遗传图谱的构建等领域研究。笔者首次采用 SRAP 技术对龙爪槐的遗传多样性进行分析,因此,须要确定其 SRAP-PCR 的最佳反应体系。

正交试验能综合各因素及其相互作用,快速找到影响因素的最佳水平组合,不仅效率高,且结果稳定可靠。正交试验已被广泛应用到菊花、荷花和番茄的优化体系中,并已确定最佳的反应体系^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为采自北京市 35 株龙爪槐的嫩叶(表 1),硅胶

表 1 供试龙爪槐材料

序号	材料编号	采集地	序号	编号	采集地
1	L1	海淀区	20	L31	东城区
2	L2	海淀区	21	L32	东城区
3	L4-2	海淀区	22	L33	东城区
4	L4-3	海淀区	26	L36	丰台区
5	L6-1	海淀区	27	L39	丰台区
6	L7	海淀区	28	L40	丰台区
7	L8	海淀区	29	L41-1	西城区
8	L13	海淀区	30	L41-2	西城区
9	L14	海淀区	31	L43	西城区
10	L15	海淀区	32	L44-1	西城区
11	L17-1	海淀区	33	L44-2	西城区
12	L19	大兴区	34	L45-1	西城区
13	L20	大兴区	35	L45-2	西城区
14	L23	大兴区			
15	L25-1	大兴区			
16	L25-2	大兴区			
17	L27-1	大兴区			
18	L29	大兴区			
19	L30	大兴区			

注:材料编号为采集点编号。

干燥保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

试验所用的 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、DNA marker 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司,SRAP 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成(表 2)。

表 2 用于龙爪槐基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应的引物序列

编号	正向引物 (5'-3')	编号	反向引物 (5'-3')
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM3	GACTGCGTACGAATTGCA
ME5	GACCAGTAAACCGGATG	EM5	GACTGCGTACGAATTCAA
ME6	TGAGTCTTTCCGGTCC	EM7	GACTGCGTACGAATTCCA
ME8	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM8	GACTGCGTACGAATTCA

收稿日期:2016-02-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400182,31400192);中央民族大学一流大学一流学科建设项目(编号:YLDX01013)。

作者简介:倪雅楠(1990—),女,辽宁朝阳人,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:ni_yanan@sina.com。

通信作者:刘 博,博士,讲师,研究方向为民族植物学与植物资源学。E-mail:boliu@muc.edu.cn。

梯度 PCR 仪 (Eppendorf AG, 22331), 微量高速冷冻离心机 (Beckman, A22R), 凝胶成像系统 (BIO RAD, Gel Doc XR+), 电泳槽 (北京六一仪器厂, DYY-6C)。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取与检测 采用改良的 CTAB 法提取龙爪槐基因组 DNA。DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测纯度, 用紫外分光光度计 (Nano Drop 2000) 检测基因组 DNA 的浓度, 并用缓冲液稀释至 100 ng/μL, -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 SRAP-PCR 反应体系的正交试验 正交试验设计见表 3。

表 3 龙爪槐 SRAP-PCR 正交试验设计

编号	因素和水平				
	Taq 酶 (U)	Mg ²⁺ (nmol/L)	dNTPs (nmol/L)	引物 (nmol/L)	DNA (ng)
1	0.10	1.5	1.0	0.6	40
2	0.10	2.0	1.5	0.8	60
3	0.10	2.5	2.0	1.0	80
4	0.10	3.0	2.5	1.2	100
5	0.15	1.5	2.0	1.2	60
6	0.15	2.0	2.5	1.0	40
7	0.15	2.5	1.0	0.8	100
8	0.15	3.0	1.5	0.6	80
9	0.20	1.5	2.5	0.8	80
10	0.20	2.0	2.0	0.6	100
11	0.20	2.5	1.5	1.2	40
12	0.20	3.0	1.0	1.0	60
13	0.25	1.5	1.5	1.0	100
14	0.25	2.0	1.0	1.2	80
15	0.25	2.5	2.5	0.6	60
16	0.25	3.0	2.0	0.8	40

1.3.3 SRAP-PCR 扩增及检测 扩增程序参照孙荣喜等的反应程序^[7], 反应结束后取 6 μL PCR 扩增产物与 4 μL 核酸染料混合, 以 2 000 bp DNA marker 为质量标准, 采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 1 × TBE, 120 V 电泳 1.5 ~ 2 h, loading buffer 移动到凝胶底部时停止电泳。电泳结束后将凝胶置于凝胶成像系统下拍照保存。

1.3.4 龙爪槐 SRAP-PCR 最佳反应体系验证 以 35 份龙爪槐的基因组 DNA 为模板, 随机选取 2 个 SRAP 引物组合 ME1-EM7、ME8-EM8, 按照上述扩增及检验方法, 对优化的龙爪槐 SRAP-PCR 反应体系进行检测。

1.4 数据的统计与分析

采用 Excel 软件对试验结果进行统计和分析。

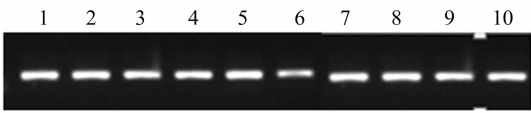
2 结果与分析

2.1 龙爪槐 SRAP-PCR 反应体系的确立

2.1.1 试验材料基因组 DNA 检测 部分试验材料的 DNA 琼脂糖电泳检测结果见图 1, DNA 条带清晰、完整, 符合 SRAP 对 DNA 的要求。

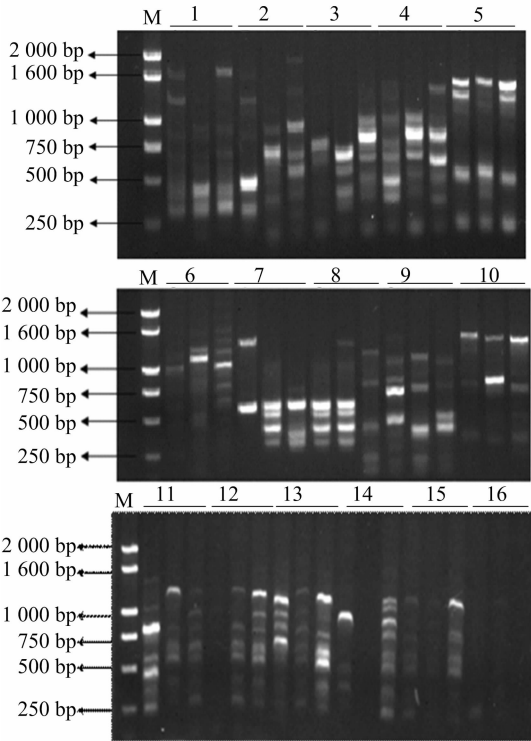
2.1.2 正交试验结果分析 根据正交试验表, 每个处理重复 3 次, 得到的电泳结果见图 2, 采用不同的反应体系扩增结果存在明显差异。第 1、6、9、10、12、14、15、16 组扩增效果较差, 条带不清晰稳定性差; 2、11 组重复性差, 反应体系弥散严重,

条带不清晰; 4、5、7、8 组扩增效果较好, 但 2、3、5、7、8 组条带丰富性差。综合以上分析, 根据条带丰富度、清晰度以及重复性等因素初步确定第 4 组为最佳反应体系。



试验材料编号同表 1

图 1 部分龙爪槐试验材料 DNA 的电泳检测



M—marker 分子标准; 1~16—反应体系编号同表 3;
每个处理组合 3 个泳道为 3 次重复

图 2 龙爪槐 SRAP-PCR 正交试验电泳结果

根据遗传多样性的分析要求, 对 PCR 扩增结果依据扩增条带的丰富度、清晰度、条带的强弱从高到低依次打分, 进行数据分析。16 个组合的分数依次为 6、7、9、16、15、4、10、11、8、5、12、3、14、13、2、1。

对表 4 的统计结果和图 2 的直观分析结果进行综合分析, 统计分析结果与第 4 组体系很接近, 只在 Mg²⁺ 和 DNA 用量上有差异。分析结果显示, Mg²⁺ 用量为 1.5 nmol/L 时得分最高、反应水平最好, 但在 2.5 nmol/L 时反应各组分与 DNA 结合效果较好, 条带表现更为清晰, 综合其他因素的影响和试验总成本将 Mg²⁺ 用量确定为 3.0 nmol/L。DNA 用量在

表 4 龙爪槐 SRAP-PCR 正交试验统计分析结果

水平	得分				
	Taq 酶	Mg ²⁺	dNTPs	引物	DNA
1	9.5	10.75	8.0	6.0	5.75
2	10.0	7.25	11.0	6.0	6.75
3	7.0	6.00	7.5	7.5	10.25
4	7.5	7.75	7.5	14.0	11.25
R	3.0	4.75	3.5	8.0	5.50

100 ng 时得分最高,所以将 DNA 用量确定为 100 ng。

最终确定龙爪槐 SRAP-PCR 最佳反应体系为:反应总体积 12.5 μ L, *Taq* 酶 0.10 U、 Mg^{2+} 3.0 nmol/L、dNTPs 2.5 nmol/L、正反向引物均为 1.2 nmol/L、DNA 100 ng,其余体积用 ddH₂O 补足。

2.2 龙爪槐最佳 SRAP-PCR 反应体系验证

应用上述筛选出的龙爪槐最佳反应体系,选取 2 个引物组合 ME1-EM7 和 ME8-EM8 对 35 个龙爪槐样品进行 PCR 扩增。结果(图 3)显示,随机选取的这 2 个引物组合能应用筛选得到的最佳体系扩增出丰富的条带,且图谱条带清晰、稳定性好,证明该最佳体系可以应用到龙爪槐基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应中。

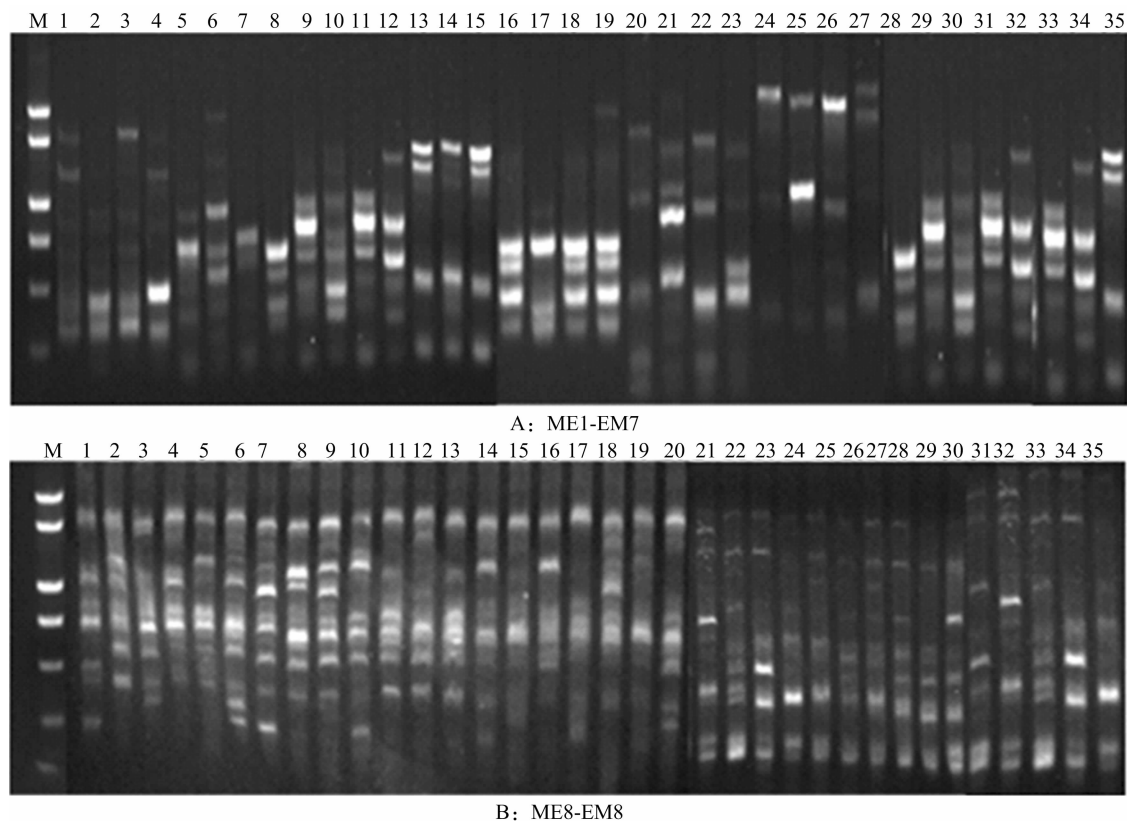


图3 引物 ME1-EM7 和 ME8-EM8 对35个龙爪槐样品的扩增图谱

3 讨论

龙爪槐在我国具有悠久的栽培历史,是园林造景中不可缺少的树种,目前关于龙爪槐的研究仅局限于嫁接技术、虫害防治方面^[8-13],对于龙爪槐分子生物学方面的研究还未见报道,因此本研究旨在探究龙爪槐分子水平上的特征,评价龙爪槐的遗传结构和变异,为龙爪槐种质资源的搜集、保存和利用提供理论依据,并为龙爪槐的分子水平研究奠定一定的基础。

对 PCR 反应体系的优化有单因素试验和正交试验 2 种方法,单因素试验不能兼顾到各因素之间的相互作用,无法分析各组分不同水平对扩增结果影响的差异显著性,且单因素试验次数多,耗时耗力成本较高;正交试验与单因素试验相比节省试验时间,用较少的试验次数便可获得可靠的试验结果,并能通过数据反映出各因素间的交互作用。本研究通过正交试验对影响 SRAP-PCR 的 5 个因素和 4 个水平进行优化和筛选,最终确定龙爪槐 SRAP-PCR 的最佳反应体系为反应总体积 12.5 μ L, *Taq* 酶 0.10 U、 Mg^{2+} 3.0 nmol/L、dNTPs 2.5 nmol/L、正反向引物均为 1.2 nmol/L、DNA 100 ng,其余体积用 ddH₂O 补足。

反应体系中的各个因素之间会产生相互作用,每种因素发生变化都可能影响扩增的结果。本试验研究结果显示,各

个因素对龙爪槐 SRAP-PCR 的影响大小依次为引物、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶。通过查阅相关文献发现,SRAP-PCR 反应体系针对不同物种的分析中,每个反应因素对物种的影响程度均有所不同,因此 SRAP-PCR 反应体系必须针对对不同物种和试剂的差异对主要的影响因素进行优化,保证试验结果的稳定性和可靠性。

随着分子生物学的不断发展,分子标记技术已被广泛应用于植物的遗传多样性研究中^[14]。陈兴彬利用筛选出的多态性高、扩增稳定的 7 对引物对 11 个黑松群体进行扩增,共扩增出 73 个条带,其中 59 个多态性条带,多态性条带比率为 80.82%,平均每对引物扩增出 10.4、8.4 个多态性条带^[15];Pinar 等用过 SRAP 标记对地中海地区 57 株野生杏的遗传多样性进行分析,其中 19 对引物中有 16 对可以扩增出多态性条带,扩增出的 87 段条带中,有 56 段具有多态性,多态性条带比率为 64.37%^[16]。在本试验中应用 SRAP 技术,使用随机选取的 2 个引物对,对 35 份龙爪槐样品进行分析,获得 32 个条带,多态性条带有 26 条,多态性比率为 81.25%。以上研究可以看出,SRAP 技术扩增条带丰富度、多态性均较高,且试验过程中具有较高的稳定性和重复性;SRAP 技术可以在未知基因组序列信息的条件下使用,所用引物也具有通用性,因此,SRAP 技术适用于龙爪槐遗传多样性的研究,同时

刘 蕾, 宋 佳, 王 辉. 甘蓝硫苷生物合成相关基因 $FM O_{GS-OXS}$ 的预测与分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 22–25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.006

甘蓝硫苷生物合成相关基因 $FM O_{GS-OXS}$ 的预测与分析

刘 蕾, 宋 佳, 王 辉

(青岛农业大学园艺学院/青岛市遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:以拟南芥中控制硫苷生物合成相关基因家族 $FM O_{GS-OX}$ 位点基因全长编码区及蛋白为参考序列, 在甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 基因组数据库中进行 Blastn 和 Blastp 检索, 得到具备 Score ≥ 100 、E 值 $\leq 10^{-10}$ 、coverage $\geq 70\%$ 条件的甘蓝注释基因作为候选拟南芥 $FM O_{GS-OX}$ 的同源基因, 并进一步进行同源性比较、基因结构比较及序列聚类分析。结果显示, 在甘蓝中发现 3 个旁系同源基因 Bol010993、Bol029100、Bol031350。甘蓝和拟南芥 $FM O_{GS-OX}$ 同源基因之间在核酸水平上的相似性为 69.4% ~ 83.0%; 甘蓝 3 个 $FM O_{GS-OX}$ 旁系同源基因间的相似性保持在 70.0% ~ 84.0%。甘蓝 Bol010993 与拟南芥 $FM O_{GS-OX1} \sim FM O_{GS-OX4}$ 的结构较为相似, 而 Bol029100、Bol031350 与拟南芥 $FM O_{GS-OX5}$ 的结构较相似。系统进化分析及共线性分析初步确定, 甘蓝中分别存在 1 个 $FM O_{GS-OX2}$ (Bol010993) 和 2 个 $FM O_{GS-OX5}$ (Bol029100、Bol031350) 基因。

关键词: 十字花科; 甘蓝; 硫代葡萄糖苷; $FM O_{GS-OX}$ 基因

中图分类号: S635.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0022-04

甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 是十字花科芸薹属一年生或两年生的草本植物。甘蓝比较耐寒, 在一定程度上也可以适应高温条件。甘蓝的品种类型丰富多样, 营养价值较高, 是我国重要的周年供应蔬菜之一, 也是农产品对外出口创汇方面

的重要蔬菜之一^[1-2]。甘蓝的种子提取物有一定的抑菌作用, 还可以保护人类的胃部器官和细胞, 有利于人体某些激素的产生。近几年的一些研究证明, 人们多吃甘蓝等十字花科蔬菜, 在一定程度上可以降低癌症发生的概率^[3]。

人们对甘蓝的重视主要源于甘蓝中含有一种重要的植物次生代谢产物——硫代葡萄糖苷, 它影响着十字花科植物的风味, 同时在医学上具有一定的保健功能, 还有生物防御功能。硫代葡萄糖苷 (简称硫苷), 又叫芥子油苷, 甘蓝等十字花科植物中含有硫代葡萄糖苷, 硫代葡萄糖苷的基本结构为 1 个 β -D-葡萄糖, 连接 1 个磺酸盐醛基团和 1 个来源于氨基酸的侧链^[4]。目前已经有很多科学家研究植物中的硫

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 山东省青岛市应用基础研究计划项目 (编号: 14-2-4-112-jch)。

作者简介: 刘 蕾 (1991—), 女, 山东沂水人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究。E-mail: 491504222@qq.com。

通信作者: 王 辉, 博士, 讲师, 主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究。E-mail: fromstick@163.com。

也为对龙爪槐进行资源鉴定、基因定位等方面的研究奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 40 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 田国丰. 推新出奇话龙爪[J]. 河北林业, 2010(2): 37.
- [3] 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): 455–461.
- [4] 张 飞, 陈发棣, 房伟民, 等. 菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3): 44–49.
- [5] 郭彩杰, 侯丽霞, 崔 娜, 等. 利用正交设计优化番茄 SRAP-PCR 反应体系[J]. 中国蔬菜, 2011(2): 48–52.
- [6] 孙祖霞, 刘兆磊, 陈素梅, 等. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(6): 53–58.
- [7] 孙荣喜, 宗亦臣, 郑勇奇. 国槐 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 广西林业科学, 2014, 43(4): 343–350.

- [8] 聂洪国, 吕开伟. 龙爪槐培育技术要点[J]. 山东林业科技, 2001(6): 25.
- [9] 曹 健. 龙爪槐高枝插皮嫁接与修剪方法技术[J]. 现代园艺, 2011(13): 34.
- [10] 钟泰林. 用改良插皮接法嫁接龙爪槐[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(2): 193–194.
- [11] 夏志会, 季卓瑛. 龙爪槐嫁接试验初探[J]. 河北林业科技, 2004(3): 17.
- [12] 王海英, 纪全武, 敖 曼. 相关因素对龙爪槐嫁接成活率的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2009(5): 71–72.
- [13] 林顺权. 园艺植物生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [14] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19–21.
- [15] 陈兴彬. 沿海防护林黑松的 SRAP 遗传多样性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [16] Pinar H, Unlu M, Ercisli S, et al. Determination of genetic diversity among wild grown apricots from Sakit valley in Turkey using SRAP markers[J]. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2013, 86: 55–58.