

白羽,丁海麦,石松利. 濒危植物蒙古扁桃 SRAP 反应体系优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):46-48.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.011

# 濒危植物蒙古扁桃 SRAP 反应体系优化

白羽<sup>1</sup>,丁海麦<sup>2</sup>,石松利<sup>1</sup>

(1. 包头医学院药学院,内蒙古包头 014000; 2. 包头医学院基础医学与法医学院,内蒙古包头 014000)

**摘要:**为利用 SRAP 技术研究蒙古扁桃资源遗传多样性评价和种质资源鉴定,利用正交试验法  $L_{16}(4^5)$  正交设计,对影响蒙古扁桃 SRAP-PCR 反应体系的  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶量、引物浓度 4 个因素以及模板 DNA 浓度进行筛选。优化的蒙古扁桃 SRAP-PCR 最佳反应体系为  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, 模板 DNA 浓度为 100 ng, *Taq* 酶浓度为 2.00 U, 引物浓度 1.0  $\mu$ mol/L, 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 总体积为 25  $\mu$ L。筛选结果表明,对蒙古扁桃 SRAP-PCR 扩增结果影响最大的是 *Taq* 聚合酶浓度,最小的是 dNTPs 浓度。运用该体系对 144 个随机 SRAP 引物组合进行筛选,筛选出 12 个条带清晰、多态性高的引物组合,为蒙古扁桃种质资源的研究奠定了基础。

**关键词:**蒙古扁桃;分子标记;SRAP;正交试验;反应体系;优化

**中图分类号:** S567.1<sup>+</sup>90.24 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0046-03

蒙古扁桃是蔷薇科李属的多年生木本植物<sup>[1]</sup>,是传统的中药材,种仁可入药,主治干咳、阴虚便秘等病症。蒙古扁桃为亚洲中部戈壁地区特有的旱生种类,分布于我国的戈壁荒漠草原区<sup>[2]</sup>,是国家三级保护植物<sup>[3]</sup>。近年来蒙古扁桃的研究主要体现在生理<sup>[4-5]</sup>、药理性<sup>[6-7]</sup>、组织培养<sup>[8-10]</sup>、有效成分鉴定分离<sup>[11-13]</sup>等方面,但对于蒙古扁桃资源的遗传多样性

研究和种质资源鉴定仍不多。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,简称 SRAP)是一种以 PCR 标记技术为基础的分子标记技术,该技术重复性高、简便、快速,以广泛应用于药用植物的种质资源鉴定、遗传多样性研究、指纹图谱和亲缘关系等方面的研究。本研究利用正交试验设计对蒙古扁桃 SRAP-PCR 反应体系进行了优化,分析 SRAP-PCR 反应体系中各因素的相互影响<sup>[14]</sup>,得到最佳优化的组合,并对 144 对引物进行了 SRAP-PCR 分子标记,筛选一些多态性高的引物组合,为进一步研究蒙古扁桃种质资源和遗传多样性打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 材料 所选材料为蒙古扁桃的种仁,采集于阿拉善诺

收稿日期:2017-10-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:81102760);内蒙古自然科学基金(编号:2015MS0808)。

作者简介:白羽(1991—),男,内蒙古兴安盟人,硕士研究生,主要从事中蒙药遗传多样性研究。Tel:(0472)7167855;E-mail:18247269257@163.com。

通信作者:石松利,教授,硕士生导师,主要从事中蒙药化学与分子生物学研究。Tel:(0472)7167855;E-mail:shisongli122@126.com。

[5] Natori S, Kubo T, Nomura A, et al. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). [J]. International Journal of Developmental Biology, 1992, 36(3):391-8.

[6] Kitabayashi A N, Arai T, Kubo T, et al. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(10):785-790.

[7] 柳晓磊, 翁群芳, 胡美英, 等. 昆虫化学感受蛋白基因的进化分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 2(2):177-181.

[8] 阎伟, 吕宝乾, 李洪, 等. 椰子织蛾传入中国及其海南省的风险性分析[J]. 生物安全学报, 2013, 22(3):163-168.

[9] 李洪, 刘丽, 阎伟. 新入侵害虫椰子织蛾的发生及防治[J]. 中国森林病虫, 2015, 4(4):10-13.

[10] 陆永跃, 王敏. 椰子织蛾的形态特征识别[J]. 环境昆虫学报, 2013, 35(6):838-842.

[11] 刘向蕊, 吕宝乾, 金启安, 等. 5 种杀虫剂对入侵害虫椰子织蛾的室内毒力测定[J]. 生物安全学报, 2014, 23(1):13-17.

[12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.

[13] Dyrlov B J, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4):783-795.

[14] Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, et al. The 20 years of PROSITE [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36:D245.

[15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8):1596-1599.

[16] Vieira F G, Rozas J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system [J]. Genome Biology and Evolution, 2011, 3:476-490.

[17] 刘金香, 钟国华, 谢建军, 等. 昆虫化学感受蛋白研究进展[J]. 昆虫学报, 2005, 48(3):418-426.

日公。

1.1.2 试剂 *Taq* DNA 聚合酶,CTAB,MgCl<sub>2</sub>,dNTPs,10 × PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> free),参照 Li 等发表的 SRAP 引物<sup>[15]</sup> 设计 12 条正向引物、12 条反向引物,均由上海生工生物技术服务有限公司合成;离心机(飞鸽,上海安亭科学仪器厂);微量紫外可见分光光度计(Nano Drop);凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);PCR 仪(Biometra 公司);电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取及检测 以蒙古扁桃的种仁为材料,利用改良的 CTAB 法提取基因组的 DNA,DNA 干燥风干后溶解沉淀于 1 × TE 溶液中,并采用微量紫外分光光度计及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测供试 DNA 的纯度和浓度。

1.2.2 SRAP-PCR 体系的优化 利用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交设计 PCR 反应试验,对 DNA 模板浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度和 dNTP 浓度,进行 5 因素 4 水平筛选(表 1)。

1.2.3 SRAP-PCR 扩增程序 制备总体积为 25 μL 的 SRAP-PCR 反应体系,除表中变化因素外,每管中加入 10 × PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> free)2.5 μL,其余的补加 ddH<sub>2</sub>O。模板为采集于赵长城的蒙古扁桃种仁 DNA,所选用的引物组合为 F5 + R7,引物序列见表 2。SRAP-PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,35 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min

表 1 蒙古扁桃 SRAP-PCR 体系的因素和水平

处理号	引物浓度 (μmol/L)	Mg <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	DNA 浓度 (ng)	<i>Taq</i> 酶浓度 (U)
1	1.0	1.5	0.15	50	1.25
2	1.0	2.0	0.20	75	1.50
3	1.0	2.5	0.25	100	2.00
4	1.0	3.0	0.30	125	2.50
5	1.5	1.5	0.20	100	2.50
6	1.5	2.0	0.15	125	2.00
7	1.5	2.5	0.30	50	1.50
8	1.5	3.0	0.25	75	1.25
9	2.0	1.5	0.25	125	1.50
10	2.0	2.0	0.30	100	1.25
11	2.0	2.5	0.15	75	2.50
12	2.0	3.0	0.20	50	2.00
13	2.5	1.5	0.30	75	2.00
14	2.5	2.0	0.25	50	2.50
15	2.5	2.5	0.20	125	1.25
16	2.5	3.0	0.15	100	1.50

30 s,5 个循环;94 °C 变性 1 min,50 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。扩增反应在 PCR 仪上进行,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察并拍照。依照条带多少及条带强弱做 1 ~ 16 积分,分数越高,表明特异性、敏感性好。

表 2 筛选所用的正向和反向的 SRAP 引物

编号	正向引物(5'→3')	编号	反向引物(5'→3')
F1	TGAGTCCAAACCGGACCACC	R1	GACTGCGTACGAATTGAC
F2	TGAGTCCAAACCGGACCTAA	R2	GACTGCGTACGAATTGGA
F3	TGAGTCCAAACCGGACCTCC	R3	GACTGCGTACGAATTGAT
F4	TGAGTCCAAACCGGACCATA	R4	GACTGCGTACGAATTCAG
F5	TGAGTCCAAACCGGACCAGC	R5	GACTGCGTACGAATTCTC
F6	TGAGTCCAAACCGGACCACC	R6	GACTGCGTACGAATTCAA
F7	TGAGTCCAAACCGGACCAAT	R7	GACTGCGTACGAATTCTG
F8	TGAGTCCAAACCGGACCAGA	R8	GACTGCGTACGAATTAAT
F9	TGAGTCCAAACCGGACCACA	R9	GACTGCGTACGAATTGTC
F10	TGAGTCCAAACCGGACCTGC	R10	GACTGCGTACGAATTAAC
F11	TGAGTCCAAACCGGACCAGA	R11	GACTGCGTACGAATTGCA
F12	TGAGTCCAAACCGGACCACG	R12	GACTGCGTACGAATTGTC

1.2.4 优化体系的检测 根据以上试验结果确定 SRAP-PCR 的最佳反应体系,从预筛选引物中随机选取引物组合,对 5 个不同居群的样品 DNA 进行 SRAP 扩增,检测优化的 SRAP-PCR 体系及扩增程序的稳定性。

1.2.5 引物筛选 根据 SRAP 的正向引物 12 条,反向引物 12 条,随机组成 144 对引物组合,采用优化的 SRAP-PCR 组合,对采集于赵长城地的蒙古扁桃进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.5% 琼脂糖检测,从而选择出多态性高的引物。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

利用改良的 CTAB 法提取蒙古扁桃种仁 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,结果显示 DNA 条带清晰,无降解,表明 DNA 完整(图 1)。通过紫外分光光度计对蒙古扁桃种仁 DNA 样品浓度进行检测,D<sub>260 nm</sub>/D<sub>280 nm</sub> 比值在 1.80 ~ 1.95 之间,说明经改良的 CTAB 法提取 DNA 的提取质量较高,满足

PCR 的要求。

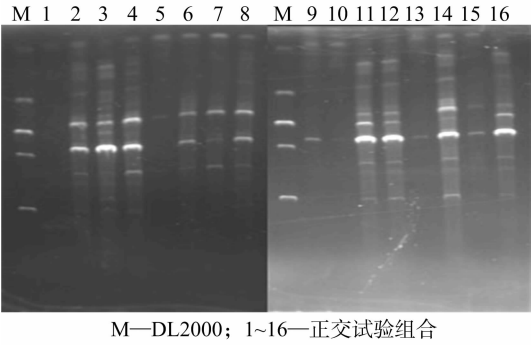


图1 SRAP-PCR 反应体系的正交试验结果

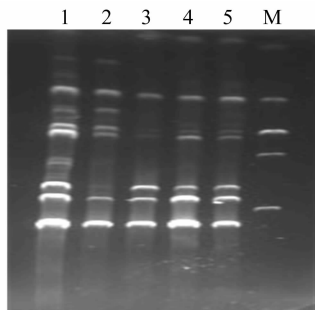
2.2 SRAP-PCR 反应体系的正交优化设计

正交试验电泳结果见图 1,根据主要条带的多少、清晰度打分,效果最佳 16,最差的 1 分,各体系得分依次为 1、12、14、4、2、6、6、8、2、1、15、15、2、16、3、14。从电泳结果可以看出,第

3、11、12、14 泳道的主条带清晰且多,副条带明显,表明这几个组合多态性高,都可以作为蒙古扁桃正交试验组合,但从经济性考虑,最后选择第 3 组作为蒙古扁桃 SRAP-PCR 最佳反应组合。直观分析 12 个组合的条带数,5 因素间各水平具有不同显著性,对扩增效果的影响顺序依次为 *Taq* DNA 聚合酶 > 引物 >  $Mg^{2+}$  > 模板 DNA > dNTPs。即在 25  $\mu$ L 体系中,2.00 U/mL *Taq* 酶,1.0  $\mu$ mol/L 引物、2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、0.25 mmol/L dNTPs、100 ng 模板 DNA 是最佳反应体系。

### 2.3 体系优化稳定性的检测

根据上述正交试验设计优化的 SRAP-PCR 反应体系,利用 F6/R9 引物组合,对 5 份不同种质材料的 DNA 进行 PCR 扩增的结果见图 2,条带清晰且多,特异性强,能够区分 5 种蒙古扁桃种质,表明该试验优化的 SPAP-PCR 反应体系能够有效地区用于蒙古扁桃遗传多样性分析和种质资源鉴定等方面。

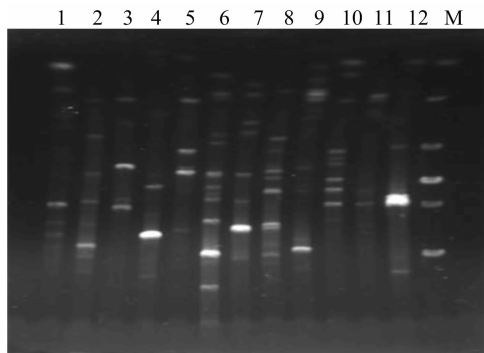


M—DL2000; 1~5—不同的蒙古扁桃样本

图2 引物 F6/R9 对蒙古扁桃 5 个不同产地样品 DNA 的扩增电泳结果

### 2.4 多态性引物组合的筛选结果

应用优化后的 SRAP 反应体系,用 12 条上游引物、12 条下游引物组成的 144 对引物组合对蒙古扁桃样品进行 PCR 扩增,并筛选多态性好、条带清晰、重复性好的结果进行分析。最终从 144 对引物中筛选出 12 对多态性好、条带清晰的引物组合,分别为 F1/R22、F2/R22、F3/R6、F4/R7、F5/R7、F6/R9、F7/R9、F8/R6、F9/R5、F10/R3、F11/R3、F12/R7。检测结果如图 3 所示。



1~12—12 对随机引物组合; M—DL2000

图3 SRAP-PCR 反应体系部分引物筛选结果

## 3 讨论与结论

SRAP 是一种新型的基于 PCR 反应的分子标记,不但具有扩增稳定、多态性强,而且还快速简单、重复性好。然而,反应体系中各因素水平浓度不同会对 SRAP 分子标记的结果产

生影响,并且不同的植物对 SRAP-PCR 反应体系的要求也各不相同<sup>[16]</sup>。正交试验设计优化体系与传统的单因素体系优化方法相比,优点在于考虑到了试验中各反应条件间的相互影响,能迅速找到理想中的引物组合。因而,对体系的优化是进行 SRAP 反应的关键。正交优化设计一般采用的主观打分手段,易造成结论偏差,本试验利用了凝胶成像系统 Gel-Pro Analyzer4 图像处理软件,对 SRAP-PCR 建立起客观的评价标准,更好地促进正交优化的应用。

本试验建立的适合蒙古扁桃的 SRAP 反应体系为模板 DNA 浓度为 100 ng,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L, *Taq* 酶浓度为 2.00 U, 引物浓度 1.0 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25  $\mu$ L。同时,本试验利用该体系从随机组成的 144 对引物组合中筛选出 12 对扩增产物多态性高、条带清晰的引物组合,为后续研究蒙古扁桃种质资源奠定了基础,也为用 SRAP 分子标记法研究蒙古扁桃种质遗传多样性、亲缘关系等方面提供了依据。

### 参考文献:

- [1] 斯琴巴特尔. 蒙古扁桃[J]. 生物学通报, 2003, 38(8): 23-24.
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [3] 马 骥, 倪细炉, 史宏勇, 等. 蒙古扁桃的开花生物学研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1134-1141.
- [4] 邹林林, 红 雨, 任国学. 濒危植物蒙古扁桃和柄扁桃种子萌发率和幼苗生长比较研究[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2008, 37(6): 791-794.
- [5] 斯琴图雅. 土壤干旱胁迫对蒙古扁桃种子及根系生理活动的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2007: 6.
- [6] 王登奎, 石松利, 程向晖, 等. 蒙古扁桃对高脂血症大鼠血清脂质过氧化物的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 625-626.
- [7] 赵云山, 吴培赛, 张慧文, 等. 蒙古扁桃药材正丁醇提取物降血脂作用的量效关系化学成分的研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 348-352.
- [8] 杨开恩, 孙建忠, 杨雪梅. 蒙古扁桃种子育苗技术和幼苗生长过程[J]. 甘肃科技, 2011, 27(22): 160-162.
- [9] 方海涛. 蒙古扁桃水浸提液对几种植物种子萌发的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 682-683.
- [10] 刘建泉, 王 零, 王多尧, 等. 濒危植物蒙古扁桃种子的形态与萌芽过程及成苗生长状态的研究[J]. 西部林业科学, 2010, 39(1): 36-42.
- [11] 石松利, 白迎春, 程向晖, 等. 蒙古扁桃药材中总黄酮提取及含量测定[J]. 包头医学院学报, 2012, 28(1): 12-13.
- [12] 刘慧娟, 刘桂香, 刘果厚, 等. 蒙古扁桃种仁油理化性质及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2016, 41(8): 98-101.
- [13] 白万富, 石松利, 郑倩男, 等. 不同产地蒙古扁桃叶中鞣质含量的比较研究[J]. 西部中医药, 2016, 29(3): 30-32.
- [14] 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.
- [15] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), 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.
- [16] 郑铁铸, 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.