

牡丹 SRAP 反应体系的建立及正交设计优化

郭大龙, 侯小改, 张 静, 韩 璐
(河南科技大学, 河南 洛阳 471003)

摘要: 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 对牡丹 SRAP(sequence related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 聚合酶、dNTPs 浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度 5 因素 4 水平正交优化, 建立了适合于牡丹基因组的 SRAP-PCR 优化扩增反应体系, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L , dNTPs 为 0.3 mmol/L , *Taq* 酶 1.5 U , 引物为 $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA $1.0\text{ ng}/\mu\text{L}$, 总体积 $20.0\text{ }\mu\text{L}$ 。

关键词: 牡丹; SRAP; 优化; 正交试验

中图分类号: S685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0110-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)为芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paeonia* L.)牡丹组(Sect. *Mouton* D.C.)多年生落叶灌木, 名贵的观赏植物和

药用植物, 其花朵硕大, 色彩艳丽, 富贵端庄, 芳香溢人, 倍受国人和世界人民的推崇和偏爱。近几年来, 分子标记技术的快速发展为在 DNA 水平上估计牡

收稿日期: 2008-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC: 30800742); 河南省自然科学基金(611030700); 河南科技大学博士科研启动经费(09001168); 河南科技大学科研基金(2007QN014)

作者简介: 郭大龙(1978-), 男, 湖北十堰人, 副教授, 博士, 主要从事种质资源的研究。

大, 对上述其他指标多表现出降低效应, 对菊花观赏价值表现出不同程度的负效应。这也与 AMP 和 MH 处理对菊花绿蕾期形态和营养物质能力的影响相一致。

根据本试验结果, 采用叶面喷施 AMP 和不同浓度 MH 对秋菊品种在短日照条件下的开花时间和观赏品质均具有明显的调节效应, 其重要原因可能在于其对菊花绿蕾期和花期物质合成与积累能力的影响。在秋冬季菊花栽培中使用外源物质调控开花选择 AMP 对提早始花时间可望明显获得较好的效果, 而 MH 则可起到相反的效果。但总的来说, 本试验采用外源物质处理方法与缩短或延长光照方法相比仍有一定差距, 在实践中有待进一步研究与探索。

参考文献:

- [1] 吴应祥. 菊花[M]. 北京: 金盾出版社, 1991.
- [2] Larson R A. Growth regulator in floriculture[J]. Horticultural Reviews, 1985, 7: 399—481.
- [3] 穆鼎. 鲜切花周年生产[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997.
- [4] 何清正. 花卉生产新技术[M]. 广州: 广东科技出版社,

1991.

- [5] 黄章智. 花卉的花期调节[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.
- [6] Wilfret G J. Comparative effects of foliar sprays of growth regulator on potted chrysanthemum proceedings of the Florida State[J]. Horticultural Society, 1990, 103: 197—201.
- [7] Zimmer kand K. Bahnemann effect of gibberellic acid on chrysanthemum cultivar Aste Lee' Ganten[J]. Bau-wissenschaft, 1980, 45(2): 49—55.
- [8] Furutani S G Sakai W S. NAA-induced leaf epinasty in chrysanthemum [J]. Hortscience, 1987, 22(1): 100—101.
- [9] 刘萍, 刘海英, 齐付国, 等. NCT、NAA、青霉素及氨卞青霉素对菊花水培扦插生根的影响[J]. 河南师范大学(自然科学版), 2002, 30(4): 77—80.
- [10] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 201.
- [11] 龚富生, 张嘉宝. 植物生理学实验[M]. 北京: 气象出版社, 1995: 7—9, 144—145.
- [12] 赵世杰, 刘华山, 董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 68—72.

丹种质的遗传差异提供了更准确、更高效的方法^[1~3]。因此,探索牡丹基因组研究方法对于牡丹遗传育种研究有其重要意义。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是 Li 和 Quiros^[4]发展的新型分子标记,该标记通过独特的引物设计对可读框(open reading frames, ORFs)进行扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。该标记将 AFLP 和 RAPD 两者的优点有机的结合起来,具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点。SRAP 标记是对基因的重要组成部分 ORFs 进行扩增,基因的多样性更能反映遗传资源的多样性,SRAP 标记在这方面的应用较为广泛^{5~7]}。

不同种类的植物基因组存在着很大的差异,因而同一种分子标记技术应用于不同种类的植物其方法应有程度不同的修正;目前,SRAP 应用于花生的研究还很少。就不同植物类群而言,SRAP 的最佳反应条件会有所差别,主要的影响因子有 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 聚合酶浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度等。目前,对于 SRAP 反应体系的某些影响因子已有一些初步的研究,但在牡丹中尚未见报道。本研究通过正交试验设计对于牡丹 SRAP—PCR 分析的反应体系进行优化,以期对牡丹的分子生物学研究提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 DNA 的提取

取洛阳红牡丹的幼嫩真叶,用改良 CTAB 法提取 DNA,参照王佳^[8]的方法,略有改动。紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量。稀释至所需浓度后, -20℃保存。

1.2 PCR 反应

反应体系总体积为 20 μ L,扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭(EB)染色后在 SYNGENE BTS—20M 凝胶成像分析系统上采集图像。

1.3 SRAP 反应体系的优化

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,对 SRAP 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 聚合酶浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度进行 5 因素 4 水平 16 个

组合的筛选分析,方案见表 1 和表 2。SRAP 引物根据 Li 和 Quiros^[4] 公布的引物序列,由上海生物工程公司合成。

表 1 牡丹 SRAP-PCR 反应的因素与水平

水平	模板 DNA (ng/ μ L)	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	引物 (μ mol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶 (U)
1	1.0	1.5	0.2	0.2	0.5
2	1.5	2.0	0.3	0.3	1.0
3	2.0	2.5	0.4	0.4	1.5
4	2.5	3.0	0.5	0.5	2.0

表 2 SRAP—PCR 反应因素水平 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计

组合 编号	Mg^{2+} (mmol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶 (U)	dNTPs (mmol/L)	引物 (μ mol/L)	模板 DNA (ng/ μ L)
1	1.5	0.5	0.2	0.2	1.0
2	2.0	1.0	0.3	0.3	1.0
3	2.5	1.5	0.4	0.4	1.0
4	3.0	2.0	0.5	0.5	1.0
5	1.5	2.0	0.3	0.4	1.5
6	2.0	1.5	0.2	0.5	1.5
7	2.5	1.0	0.5	0.2	1.5
8	3.0	0.5	0.4	0.3	1.5
9	1.5	1.0	0.4	0.5	2.0
10	2.0	0.5	0.5	0.4	2.0
11	2.5	2.0	0.2	0.3	2.0
12	3.0	1.5	0.3	0.2	2.0
13	1.5	1.5	0.5	0.4	2.5
14	2.0	2.0	0.4	0.2	2.5
15	2.5	0.5	0.3	0.5	2.5
16	3.0	1.0	0.2	0.3	2.5

1.4 反应体系稳定性的检测

选择另外 3 对 SRAP 引物作为检测引物,用优化的牡丹 SRAP 反应体系,对随机选取的丛中笑、蓝田玉、盛丹炉 3 个牡丹基因组 DNA 进行 PCR 扩增,每对引物重复 3 次。对优化过的牡丹扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后观察结果。检测引物的序列如表 3。

表 3 检测用的 SRAP 引物序列

编号	正向引物
Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
Me3	5'-TGAGTCCAAACCGAAT-3'
Me6	5'-TGAGTCCAAACCGTAA-3'
Em2	5'-GACTGCGTACGAATTGCG-3'
Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'

2 结果与分析

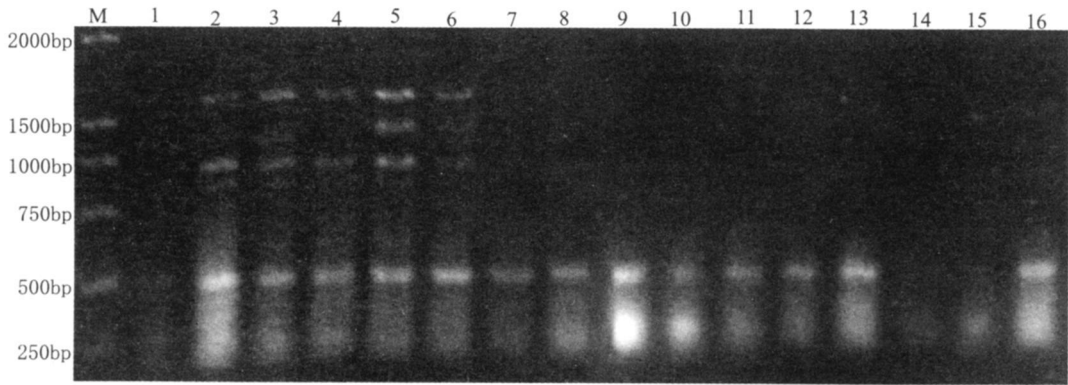
2.1 牡丹 SRAP 反应体系的正交优化

正交试验设计 SRAP—PCR 反应体系,选取 Me3/Em2 作为扩增引物,以洛阳红 DNA 为模板进行扩增,电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,不同的

组合, 由于各因素浓度不同, 因此扩增结果存在明显的差异。结果显示第 3, 5, 6 组合扩增的结果比较理想, 谱带不仅清晰, 并且多态性较好, 主带较明显, 尤其 3, 5 最优。第 1, 2, 4 组合扩增出的结果, 谱带多态性也较高, 但谱带强度和主带较差, 其他组合只能扩增出较弱的谱带或几乎扩增不出条带。

从图 1 正交设计 SRAP 反应体系的扩增结果可以看出, 不同的引物浓度和 DNA 模板量是 SRAP-PCR 反应的主要影响因素。组合 1—6 中, 随着 *Taq* 酶浓度的增高, 条带相对增强, 条带较为清晰且亮度较大, 尤其 3, 4, 5, 6 组合 *Taq* 酶浓度相对都较高, 扩增结果较好, 组合 1 中 *Taq* 酶浓度较低, 几乎无多态性。从经济的角度来看, dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L 较为合适。在组合 2, 3, 5 中, 其 dNTPs 浓度均是较合适浓度 (0.3, 0.4 mmol/L)。组合 1—6 中, Mg^{2+} 浓度几个水平都存在, 在其他因素比较适宜时, Mg^{2+} 浓度较低时也有较好结果, 比如组合 5, Mg^{2+} 浓度高低对试验结果影响不大, 所

以 Mg^{2+} 不是此反应的限制因子。dNTPs 浓度较低 (0.2 mmol/L), 其扩增条带较弱, 扩增效果较差。在 dNTPs 浓度为 0.3, 0.4 mmol/L 时, 即 3 和 5 组合, 扩增产物较好, 组合 4 由于 dNTPs 浓度过高 (0.5 mmol/L), 扩增条带的效果也较差。由于 DNA 模板量较高, 7—16 扩增产物多态性都较差。由图 1 可以看出, 引物浓度在 4 个水平变化时, 扩增产物电泳条带差异比较明显, 最好的产物谱带 3 和 5 组合, 引物浓度均为 0.4 μ mol/L, 产物谱带比引物在其他浓度时产物谱带质量较高。其中组合 5 尽管 *Taq* 酶用量均较高, 但其他组分用量是低水平, 因此扩增产物表现也较好。相反, 组合 4 和 6 中引物用量是最高水平 (0.5 mmol/L), 尽管模板 DNA 和 *Taq* 酶用量中等, 但其扩增效果比组合 5 差, 说明过高的引物浓度不利于扩增。由此可见, 引物用量也是 SRAP 反应的主要影响因素之一。由此可知, DNA 模板量和引物用量为牡丹 SRAP 反应的主要影响因素之一。



1—16 为组合编号
图 1 引物的正交设计 PCR 反应体系扩增结果

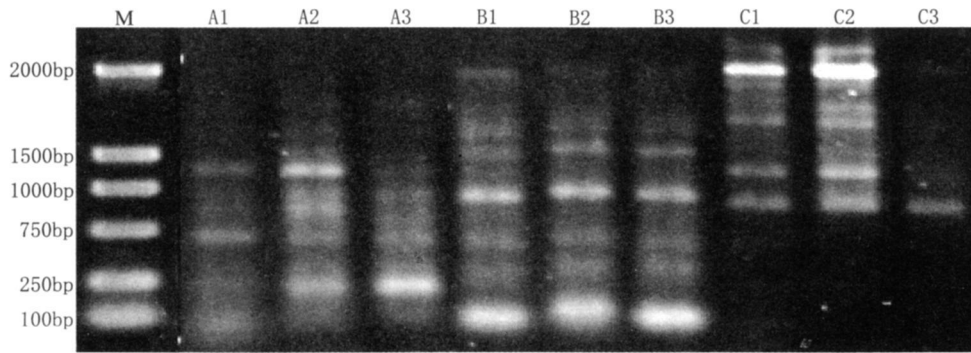
从图 1 还可以看出, 在 16 个组合中, 由于 dNTPs、*Taq* 聚合酶、引物、模板 DNA 和 Mg^{2+} 5 大影响因素浓度组合的不同, 扩增结果存在着明显的差异。由于理想组合应具备条带清晰、多态性高和重复性好的特点, 经试验发现, 组合 7—16 扩增的条带数目很少甚至没有条带, 条带的强度也较弱, 扩增的效果较差。组合 2—6 扩增的条带多且强度强, 但组合 2, 4, 6 的扩增带较弱, 多态性差。综合各因素考虑, 3 和 5 号组合为最佳组合, 其条带多、清晰、亮度高、重复性较好。

综合看来, 最优组合为: Mg^{2+} 为 1.5 mmol/L, dNTPs 为 0.3 mmol/L, *Taq* 酶为 1.5 U, 引物为 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 为 1.0 ng/ μ L。该体系与最优反应 3 和 5 的组成基本一致。

2.2 反应体系的确定
选择引物组合 Me3/Em4, Me2/Em4, Me6/Em3, 随机挑选 3 个牡丹品种, 对反应体系的稳定性进行检测。从图 2 可见, 每个反应都能扩增出多态性强, 条带清晰, 重复性好的结果, 表明, 此反应条件适合于牡丹的 SRAP-PCR 反应体系。

3 讨论

由于 SRAP 分子标记技术基于 PCR 反应, 而 PCR 反应又受多种反应因素的影响, 不同物种对反应条件的要求也存在一定的差异。因此, 采用 SRAP 分子标记技术时应首先对其反应体系进行优化。国内有关反应体系的优化研究, 大多采用单因素试验的方法, 在多种组分中, 逐一变化其中一种组



M: DL2000marker; A, B, C 分别为引物组合 Me3/Em4, Me2/Em4, Me6/Em3; 1, 2, 3 分别代表丛中笑、蓝田玉、盛丹炉品种

图2 牡丹 SRAP 优化体系的检测结果

分浓度而固定其余几种,从中分析得到每一组分
的最佳浓度,最后组合成为最佳反应体系。单因素
试验法的缺点在于,当变化一个因素固定其余几
种因素时,往往靠经验或参考相近物种确定,这
样既不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用,
也不能保证各组分最佳浓度的组合就是最佳反
应体系^[9]。

与以往的单因素 PCR 优化设计相比,利用正
交试验直观分析方法,能迅速获得满意的试验结
果,而且试验规模小,节省人力物力。但该方法
亦有一定的局限性,如对试验结果本身优劣的判
断带有主观上的成分^[10],一般是根据电泳条带
的清晰度及数目是否合适判断试验结果的好坏。

杨琦等^[11]利用正交设计优化了大白菜 SRAP
反应体系。汪结明等^[12]采用正交设计方法得到
了适合杨树的 ISSR 反应体系。目前有关用正交
设计法优化牡丹 SRAP 反应体系的研究还未见
报道。本试验通过对影响牡丹 SRAP 反应的各
因子进行正交设计试验,得到牡丹最佳的反应
体系和反应程序试验结果表明,最终确定的适
合于牡丹的 SRAP 体系,在 Mg^{2+} , dNTPs 以及
引物浓度上与杨琦等^[11]对大白菜研究中的用
量有一定差别,原因可能是基因组大小不同或
使用的药品、仪器产地不同所致。这表明 SRAP
最佳扩增体系的建立应根据自己所用仪器及
药品对影响扩增的主要因子调整,以建立一套
适合所研究作物使用的体系。

这一优化的牡丹 SRAP-PCR 反应体系为进
一步利用 SRAP 分子标记技术对牡丹的资源鉴
定、分类和分子遗传图谱的构建及基因定位奠
定了良好的试验基础。

参考文献:

[1] 侯小改,尹伟伦,李嘉珏,等.部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析[J].中国农业科学,2006,39(8):1709—

1715.

[2] Suo Z L, Li W Y, Yao J *et al.* Applicability of leaf morphology and intersimple sequence repeat markers in classification of tree peony (*Peoniaceae*) cultivars [J]. Hort Science, 2005, 40(2): 329—334.

[3] 高双成,施江,王世华,等.一种牡丹花瓣总 RNA 的提取方法[J].河南农业科学,2007(10):93—94.

[4] 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]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455—461.

[5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271—282.

[6] 郭大龙,罗正荣.部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J].果树学报,2006,23(1):138—141.

[7] 海燕,何宁,康明辉,等.新型分子标记 SRAP 及其应用[J].河南农业科学,2006(9):9—12.

[8] 王佳,胡永红,张启翔.牡丹 ISSR-PCR 反应体系正交优化设计[J].安徽农业科学,2006,34(24):6465—6466,6484.

[9] 杨云水,李续娥,吴明宇,等.正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用[J].生物数学学报,2005,20(2):202—206.

[10] 沙伟,滕兆岩,倪红伟.正交设计优化星星草 ISSR-PCR 反应体系研究[J].中国草地学报,2006,28(6):52—55.

[11] 杨琦,张鲁刚.大白菜 SRAP 反应体系的建立与优化[J].西北农业学报,2007,16(3):119—123.

[12] 汪结明,项艳,吴大强,等.杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J].核农学报,2007,21(5):470—473.