

旱柳 SRAP-PCR 体系的建立与优化

王红玲，张 珏，教忠意，隋德宗

(江苏省林业科学研究院，江苏南京 211153)

摘要：为了丰富柳树分子标记的手段，以旱柳 *Salix matsudana* 为材料，通过正交实验设计法，获得适于旱柳的相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)-聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)体系；对SRAP-PCR扩增过程中的2次退火温度进行优化。结果如下：优化反应体系，25.00 μL反应液中，含20.84 nkat的Taq酶，2.00 μL Mg²⁺(25.00 mmol·L⁻¹)，2.50 μL 碱基混合物(脱氧核糖核苷酸dNTPs, 各2.50 mmol·L⁻¹)，1.50 μL 引物(20.00 μmol·L⁻¹)，100.00 ng DNA模板，2.50 μL 10×Taq酶缓冲液。扩增程序，94 °C 2.0 min; 94 °C 1.0 min, 38 °C 1.0 min, 72 °C 1.5 min, 5个循环；94 °C 1.0 min, 54 °C 1.0 min, 72 °C 1.5 min, 30个循环；72 °C 10.0 min。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测，特征性条带清晰，信息量大，完全可用于旱柳基因组的研究分析。图4表2参12

关键词：林木育种学；旱柳；相关序列扩增多态性(SRAP)；正交实验设计

中图分类号：S722.3 文献标志码：A 文章编号：1000-5692(2010)06-0945-05

Establishing and optimizing the SRAP-PCR system for *Salix matsudana*

WANG Hong-ling, ZHANG Jue, JIAO Zhong-yi, SHI De-zong

(Forest Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 211153, Jiangsu, China)

Abstract: To enrich the molecular marker method for willow trees, an improved reaction system from a sequence-related amplified polymorphism-polymerase chain reaction (SRAP-PCR) of *Salix matsudana* (Hankow willow) was obtained with an orthogonal design. In addition, the temperatures for two annealing methods were optimized in the PCR amplifier and a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was employed. Results showed that the reaction system was 20.84 nkat Taq, 2.00 μL Mg²⁺(25.00 mmol·L⁻¹), 2.50 μL deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs)(2.50 mmol·L⁻¹ each), 1.50 μL primer(20.00 μmol·L⁻¹), 100.00 ng template, and 2.50 μL 10×Taq buffer in 25.00 μL. The program was as follows: 94 °C for 2.0 min; then, for 5 cycles, 94 °C for 1.0 min, 38 °C for 1.0 min, and 72 °C for 1.5 min; next, at 30 cycles, 94 °C for 1.0 min, 54 °C for 1.0 min, and 72 °C for 1.5 min; and finally 72 °C for 10.0 min. Results of PAGE showed that clarity and amount of information increased with the new procedure. Thus, this superior method could be used for research on *S. matsudana*. [Ch, 4 fig. 2 tab. 12 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Salix matsudana*; SRAP; orthogonal design

柳树泛指杨柳科 Salicaceae 柳属 *Salix* 树种，分布广泛，种类繁多，全世界约有 520 种，其中产于中国的有 257 种 122 个变种 33 个变型，各省、市、自治区都有天然分布^[1]。柳树分子标记研究始于 20 世纪 90 年代，主要在国外开展，广泛用于遗传图谱的构建、抗性基因数量性状位点(quantitative trait locus, QTL) 分析和性别连锁标记等；所用的标记方法主要是随机扩增多态性 DNA(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)，扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)，简单重复序列(simple sequence repeat, SSR) 等^[2-4]，其中效率较高的 SSR 标记信息至今没有

收稿日期：2009-12-28；修回日期：2010-05-13

基金项目：“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD09A04)

作者简介：王红玲，硕士，从事柳树育种研究。E-mail: whl_ling@126.com

完全公布。国内有研究人员利用杨柳同科，尝试将杨树 SSR 标记应用于柳树中，虽然部分标记能获得多态性，但在遗传图谱构建等方面的应用不尽如人意^[2,5]。相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增的新型分子标记技术^[6]，目前在作物和蔬菜中应用已经比较成熟^[7-9]，但在国内林业研究中的尚处于起步阶段^[10-12]。不同物种的基因组之间存在差异，因而同一种分子标记技术应用于不同物种时，其方法需要进行适当的调整和优化。正交试验设计法是优化常用的试验设计方法，然而单个因素对优化效果的影响也不可忽视。笔者主要利用正交试验设计法，优化旱柳相关序列扩增多态性-聚合酶链式反应(SRAP-PCR)的反应体系，在此基础上探究各单因素对反应的影响，对反应体系进一步优化；并对扩增程序中的退火温度进行比较优化，以期为 SRAP 技术在柳树研究中的广泛应用提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料旱柳 *Salix matsudana*, 由涂忠虞先生于1978年采自河南民权，现保存于江苏省林科院亲本园中。本研究中所用引物是 Me1 ~ Me5 和 Em1 ~ Em5 引物，由上海英俊生物公司合成，用于旱柳 SRAP 反应体系的建立。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和全引物筛选 本研究以十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取柳树叶片中的总DNA，并针对其多糖(主要是纤维)含量高而稍作改良，即在酚氯仿抽提后，将所得上清置于-20℃冷冻24 h 以后，缓慢吸取上清液进一步纯化，获得旱柳基因组总DNA。将5条Me引物和5条Em引物两两随机配对，获得25对引物，依照Taq酶供应商所提供的方案进行(表1)；扩增程序依据参照Li等^[6]，进行全引物筛选实验。引物命名：primer，Me引物序号，Em引物序号，如Me1和Em5配对成的引物记为 primer 15。扩增程序：94℃ 2.0 min；94℃ 1.0 min，37℃ 1.0 min，72℃ 1.5 min，5个循环；94℃ 1.0 min，50℃ 1.0 min，72℃ 1.5 min，30个循环；72℃ 10.0 min；4℃永久。

表1 反应体系

Table 1 Content per reagents for PCR

模板/ μg	引物($20.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/ μL	10×Taq 酶缓冲液/ μL	Mg^{2+} ($25.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)/ μL	dNTPs($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)/ μL	Taq 酶/nkat	双蒸水/ μL
<0.50	0.50	2.50	1.50	2.00	41.68	25.00

1.2.2 PCR 反应体系的优化 PCR 的扩增效果受多个因素的影响，主要有Taq 酶， Mg^{2+} ，脱氧核糖核苷酸(dNTPs)，引物和DNA 模板等。Taq 酶缓冲液由Taq 酶公司提供，一般不需要在反应中优化。因而针对这5个因素，采用正交试验设计 $[L_{16}(4^5)]$ 进行优化，共16个反应(表2)。引物具有特异性，扩增产物中条带的数量和大小往往在不同的引物、品种之间存在较大差异。因此，本研究在1.2.1全引物筛选的基础上，分别选取其中扩增条带数目较少和较多的引物用于反应体系优化，各4次重复。

1.2.3 PCR 扩增程序的优化 SRAP 的扩增程序主要包括2个部分，即35℃的1次低温复性阶段和50℃的2次复性阶段^[6]。本研究利用PCR仪的Gradient Calculator 程序，对这2次复性温度分别进行独立优化，即保持其中一个复性温度不变，优化另一个。温度范围分别为32.00 ~ 42.00℃(32.00, 32.30, 32.90, 33.70, 34.80, 36.30, 38.00, 39.40, 40.50, 41.20, 41.80, 42.00)和45.00 ~ 55.00℃(45.00, 45.30, 45.90, 46.70, 47.80, 49.30, 51.00, 52.40, 53.50, 54.30, 54.80, 55.00)。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取和全引物筛选试验

经Quantity One 软件分析凝胶电泳图片，得5.00 μL DNA 样品种中含DNA 502.43 ng。将DNA 原液稀释至 $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，用于SRAP 全引物筛选。经扩增，25 对引物均获得扩增产物，从中选取条带少

的 primer 41, primer 42 和条带数目较多的 primer 33, primer 34 作为正交试验优化引物。

2.2 PCR 反应体系的优化

2.2.1 正交试验结果分析 4 个引物按照表 2 正交实验设计的 16 个反应体系进行扩增, 结果如图 1 所示。扩增体系是否适合, 关键是扩增结果中所反应的信息量, 即凝胶电泳图片中的有效条带数量, 所以本研究以条带的数量和清晰度作为评价标准。评分公式: $N_{\text{um}} = \text{主带数} + \text{清晰度}$ 。其中主带数目指扩增条带中明显且完整的条带的数目; 清晰度主要针对主条带而言, 分 0~4 个等级, 没有条带为 0, 模糊为 1, 少部分条带清晰为 2, 大部分条带清晰为 3, 所有条带清晰为 4; N_{um} 为单个泳道得分。总分则为 4 个引物的 4 个重复, 共计 16 个 N_{um} 值的总和, 按总

分大小得扩增体系的优次顺序为 3>4>2>14>6>11>12>13>7>10>8>5>15>1>9>16。方差分析表明: 不同反应体系之间, 主条带数目和清晰度的差异均达到极显著(P 值分别为 0.05 和 0.01)。

2.2.2 各因素对 PCR 反应的影响 正交实验设计虽然包含了各因素在各水平下的大部分可能, 但仍然有部分被遗漏的信息。因此, 本研究在正交试验设计的基础上, 将扩增结果按照各因素分别统计分析, 结果表明 *Taq* 酶和 Mg^{2+} 对 PCR 扩增产物的影响较大, 尤其是对条带数目影响; dNTPs 和引物对条带的清晰程度影响较大(数据未列出)。较高浓度 DNA 的扩增效果优于低浓度; 然而, 在一定的浓度范围内, DNA 的浓度对扩增效果影响差别不明显。所以在 25.00 μL 体系中, 各因素最佳配比分别为 20.84 nkat *Taq* 酶, 2.00 μL Mg^{2+} (25.00 mmol· L^{-1}), 3.00 μL dNTPs(各 2.50 mmol· L^{-1}), 1.00 μL 引物(20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 100.00 ng 模板; 该体系(17 号)与正交设计中得分最高的 2, 3, 4 等 3 个体系较接近。将这 3 个体系的 DNA 浓度增至 100.00 ng, 与该体系(17 号)一同扩增, 结果如图 2 所示(从左至右分别为 17, 2', 3', 4 体系)。由图 2 可见, 17 号和 2' 号条带较弱; 4 号扩增产物不清晰, 清晰度不高; 3' 号体系为最理想的旱柳 SRAP-PCR 反应体系。

2.3 PCR 扩增体系的优化

扩增程序优化的结果如图 3 所示, 包括 2 次退火温度的优化(按温度由高到低)。结果显示: 第 1 次复性温度对反应的影响相对更为明显; 2 次退火温度宜分别选用 38 °C 和 54 °C。

2.4 优化体系的应用

应用优化的反应体系和扩增程序, 旱柳的基因组总 DNA 的 25 对 SRAP 引物扩增结果如图 4 所示。优化之前(左), 虽然 25 对引物均有扩增产物, 但扩增条带数目较少。经过优化(右), 各引物的扩增产物的条带数目均有明显增加, 信息量倍增。

3 讨论

SRAP 技术在农业中已经有较为广泛的应用, 在林业上还不成熟。本研究基于 10 条 25 对引物,

表 2 PCR 反应体系正交试验设计表 $L_{16}(4^5)$ (25.00 μL 反应体系)

Table 2 Program of orthogonal experimental design, $L_{16}(4^5)$ in 25.00 μL for PCR system

处理	<i>Taq</i> 酶/nkat	Mg^{2+} (25.00 mmol· L^{-1})/ μL	dNTPs(各 2.50 mmol· L^{-1})/ μL	引物(20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/ μL	模板(0.025 g· L^{-1})/ μL
1	20.84	1.00	1.50	0.50	0.50
2	20.84	1.50	2.00	1.00	1.00
3	20.84	2.00	2.50	1.50	1.50
4	20.84	2.50	3.00	2.00	2.00
5	41.68	1.00	2.00	1.50	2.00
6	41.68	1.50	1.50	2.00	1.50
7	41.68	2.00	3.00	0.50	1.00
8	41.68	2.50	2.50	1.00	0.50
9	62.51	1.00	2.50	2.00	1.00
10	62.51	1.50	3.00	1.50	0.50
11	62.51	2.00	1.50	1.00	2.00
12	62.51	2.50	2.00	0.50	1.50
13	83.35	1.00	3.00	1.00	1.50
14	83.35	1.50	2.50	0.50	2.00
15	83.35	2.00	2.00	2.00	0.50
16	83.35	2.50	1.50	1.50	1.00

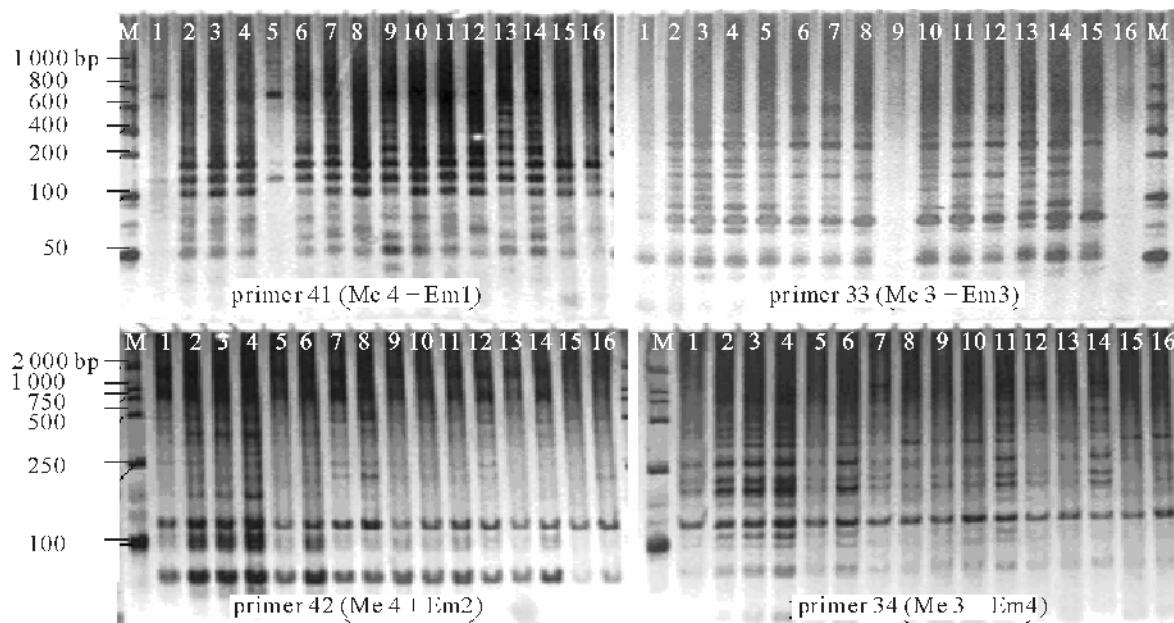


图1 PCR扩增正交试验电泳结果

Figure 1 Electrophoresis results of the PCR by orthogonal experimental design

优化旱柳 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序, 最终获得适合旱柳 SRAP 分子标记的方法程序: 25.00 μL 反应液中, 含 20.84 nkat *Taq* 酶, 2.00 μL Mg^{2+} (25.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2.50 μL dNTPs(各 2.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.50 μL 引物(20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 100.00 ng 模板, 2.50 μL 10 \times *Taq* 酶缓冲液; PCR 扩增中, 先以 38 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度扩增 5 个循环, 再以 54 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 30 个循环。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)扩增检测, 效果良好, 特征性条带清晰, 能够应用于旱柳的分子标记分析, 为该体系在乔木柳乃至整个柳属中的成熟应用提供了借鉴和参考。

SRAP 扩增产物条带多, 信息丰富, Li 等^[6]用大胶(34.00 cm \times 45.00 cm)进行分析检测, 条带清晰, 扩增信息得到较为充分的展示。受实验条件等因素的影响, 本研究中所用的是普通垂直电泳槽(10.50 cm \times 18.50 cm), 部分条带有堆积的现象, 影响条带的清晰度, 信息量也有所减少。但其中特征条带提供的信息量已经较优化前有了明显的提高。大电泳设备意味着较高的实验费用, 研究人员可以视研究的具体要求, 使用不同规格的电泳槽, 以达到预期效果。

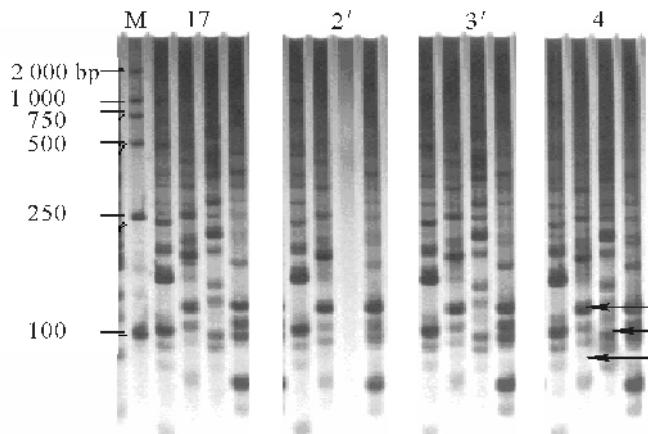


图2 4个较优PCR扩增体系的电泳结果

Figure 2 Electrophoresis results of four better systems for PCR

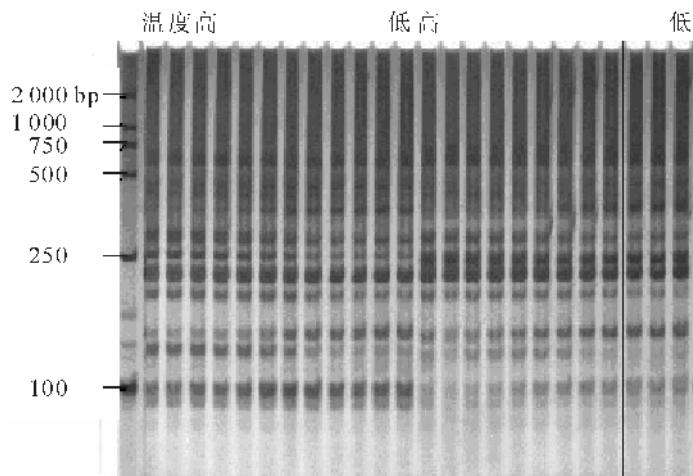


图3 2次退火温度对PCR扩增的影响

Figure 3 Effect of the two annealing temperature on the PCR

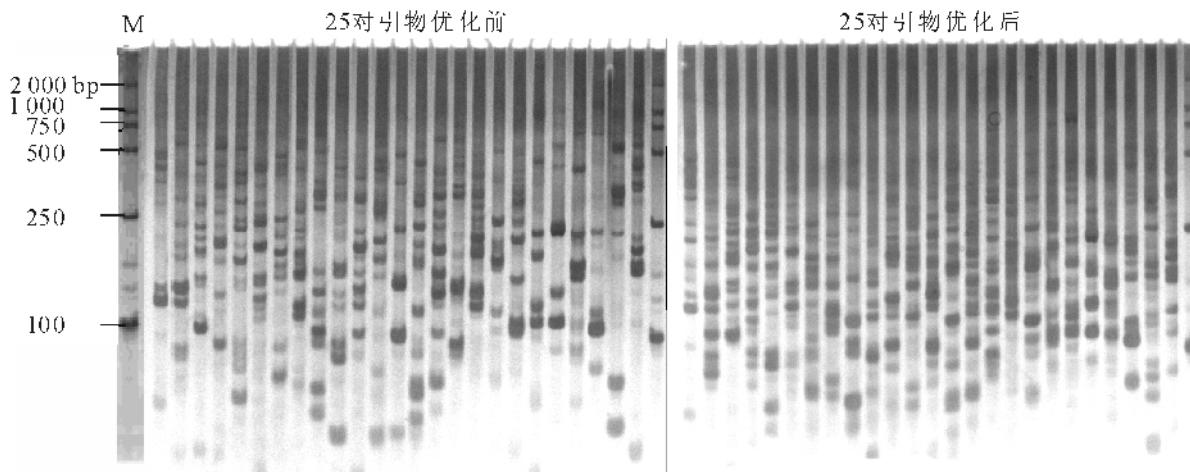


图 4 优化前后 PCR 扩增结果比较

Figure 4 Results of the PCR before and after the optimization

参考文献:

- [1] 王战, 方振富. 中国植物志: 第 20 卷第 2 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984; 89.
- [2] HANLEY S, BARKER J H A, VAB OOIJEN J W, et al. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, **105**: 1087 – 1096.
- [3] TSAROUHAS V, GULLBERG U, LAGERCRANTZ U. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) affecting autumn freezing resistance and phenology in *Salix* [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **108**: 1335 – 1342.
- [4] RÖNNBERG-WÄSTLJUNG A C, GLYNN C, WEIH M. QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* × *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, **110**: 537 – 549.
- [5] 王源秀, 徐立安, 黄敏仁. 杞柳和簸箕柳候选杂交亲本 SSR 指纹分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32** (2): 1 – 5.
WANG Yuanxiu, XU Lian, HUANG Minren. Analysis of fingerprinting of *Salix intagra* Thunb and *Salix suchowensis* Cheng using microsatellite (SSR) markers [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2008, **32** (2): 1 – 5.
- [6] 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.
- [7] OKAZAKI K, SAKAMOTO K, KIKUCHI R, et al. Mapping and characterization of FLC homologs and QTL analysis of Xowering time in *Brassica oleracea* [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, **114**: 595 – 608.
- [8] HE Daohua, LIN Zhongxu, ZHANG Xianlong, et al. QTL mapping for economic traits based on a dense genetic map of cotton with PCR-based markers using the interspecific cross of *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* [J]. *Euphytica*, 2007, **153**: 181 – 197.
- [9] FUFA H, BAENZIGER P S, BEECHER B S, et al. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars [J]. *Euphytica*, 2005, **145**: 133 – 146.
- [10] 於朝广, 殷云龙. 落羽杉属树木基因组总 DNA 的提取及 SRAP 反应体系的优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28** (1): 109 – 114.
YU Chaoguang, YIN Yunlong. Extraction of genomic DNA and optimization of SRAP reaction system in *Taxodium* plants [J]. *Geno Appl Biol*, 2009, **28** (1): 109 – 114.
- [11] 谭碧玲, 王源秀, 徐立安. 杨树基因组 SRAP 扩增体系的建立与优化 [J]. 林业科技开发, 2009, **23** (2): 25 – 29.
TAN Biyue, WANG Yuanxiu, XU Li'an. Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system of *Populus* [J]. *China For Sci Technol*, 2009, **23** (2): 25 – 29.
- [12] 刘艳萍, 郭志富, 刘玉东, 等. 应用 SRAP 标记分析新疆地区主要杨属树种的遗传多样性 [J]. 植物生理学通讯, 2008, **44** (2): 225 – 228.
LIU Yanping, GUO Zhifu, LIU Yudong, et al. Genetic diversities of *Populus* in Xinjiang based on SRAPs markers [J]. *Plant Physiol Commun*, 2008, **44** (2): 225 – 228.