



陈丽君, 刘明骞, 廖柏勇, 等. 苦楝 SRAP-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 104-108.

苦楝 SRAP-PCR 反应体系的建立及优化

陈丽君^{1,2}, 刘明骞¹, 廖柏勇¹, 邓小梅¹, 陈晓阳¹

(1 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室/华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642;
2 华南农业大学 教学科研基地管理中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】应用 SRAP 技术对苦楝 *Melia azedarach* 遗传多样性、种质资源鉴定等开展研究, 对苦楝 SRAP-PCR 体系中的模板 DNA、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物和 *Taq* DNA 聚合酶 5 个组分浓度进行优化, 建立适合苦楝的 SRAP-PCR 反应体系。【方法】采用单因素试验对反应体系中的 5 个因素分别设置 8 个浓度梯度水平, 确定浓度范围后进行 L16(4⁵) 正交试验设计, 并对结果进行打分, 确定优化体系。【结果和结论】SRAP 对苦楝 DNA 浓度的要求不高, 有一个较宽的浓度适宜范围; dNTPs 在 0.1 ~ 0.2 mmol · L⁻¹ 范围内, 能扩增出条带基本相同的清晰谱带; Mg^{2+} 为 2.0 mmol · L⁻¹ 左右时扩增条带较清晰且数量多; 引物介于 0.48 ~ 0.64 μmol · L⁻¹ 均能扩增出带型基本保持一致且清晰的谱带; *Taq* DNA 聚合酶在 0.50 ~ 2.00 U 范围内可以得到清晰的带型。根据正交试验设计 16 个处理的得分, 确定优化的反应体系为: 模板 DNA 30 ng、dNTPs 0.125 mmol · L⁻¹、 Mg^{2+} 2.25 mmol · L⁻¹、引物 0.48 μmol · L⁻¹、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U, 反应总体积 25 μL。

关键词: 苦楝; SRAP-PCR; 体系优化; 正交试验设计
中图分类号: S792.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2015)03-0104-05

Establishment and optimization of SRAP-PCR system in *Melia azedarach*

CHEN Lijun^{1,2}, LIU Mingqian¹, LIAO Boyong¹, DENG Xiaomei¹, CHEN Xiaoyang¹

(1 Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm/College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Center for Teaching and Research Base, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】In order to study the genetic diversity and evaluate the germplasm resources of *Melia azedarach* using SRAP markers, the concentration of DNA template, dNTPs, Mg^{2+} , primer and *Taq* polymerase were tested to determine their optimal levels and establish the optimal SRAP reaction system in *M. azedarach*. 【Method】Five factors, each with 8 concentration levels, were conducted to screen their feasible concentration range using single factor experiment, and then the orthogonal experiment L16(4⁵) was carried out and the optimized system was determined. 【Result and conclusion】The concentration range of DNA template was wider in SRAP system in *M. azedarach*. When the concentration of dNTPs ranged from 0.1 to 0.2 mmol · L⁻¹, the bands were steady; when the concentration of Mg^{2+} was around 2.0 mmol · L⁻¹, more bands were amplified and clear. The band type was consistent and clear when the primer concentration ranged from 0.48 to 0.64 μmol · L⁻¹. When the *Taq* polymerase ranged from 0.50 to 2.00 U, more bands were amplified and clear. The optimum SRAP-PCR system was established on the basis of orthogonal experiment, which was DNA template 30 ng, dNTPs 0.125 mmol · L⁻¹, Mg^{2+} 2.25 mmol · L⁻¹, primers 0.48 μmol · L⁻¹, and *Taq* DNA polymerase 0.75 U in the 25 μL reaction system.

Key words: *Melia azedarach*; SRAP-PCR; optimization; orthogonal design

苦楝 *Melia azedarach* 又名翠树、楝树、紫花树、森树等,为楝科楝属落叶乔木,分布于中国、韩国、日本、印度、斯里兰卡、印度尼西亚和澳大利亚等地,欧洲、美洲也有栽培^[1]. 苦楝在我国分布广泛,水平分布为北纬 18°~40°,南至海南省崖县,北到河北保定和山西运城、陕西渭南、陇南地区,东至台湾、沿海各省,西到四川、云南保山^[2]. 它生长速度快、木材材质优良、纹理美丽,易加工,可用于家具、建筑、农具、船舶、乐器制作等方面,木材抗白蚁、抗虫蛀、耐腐. 苦楝耐烟尘,能大量吸收有毒有害气体,是优良的城市及工矿区绿化树种,也是我国南方四旁绿化常用树种^[3-4]. 苦楝的根、皮、花、果均可入药,也可作为植物源农药^[5]. 遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分,SRAP (Sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性) 结合了 AFLP 及 RAPD 各自的优点,方便快捷,只需要极少量 DNA 材料,且不需要预先知道 DNA 序列信息,即可快速获得大量的信息,试验结果稳定可靠,且再现性较高,重复性较好^[6-7]. 目前为止,国内对于苦楝的遗传多样性分析,鲜见开展过 SRAP 的研究. 本试验采用单因素和正交试验设计从 DNA、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物和 *Taq* DNA 聚合酶 5 个组分浓度对苦楝 SRAP-PCR 反应体系进行优化,旨在寻找一种高效、快速、经济的试验方法,建立适合苦楝的 SRAP-PCR 反应体系,为进一步应用 SRAP 技术对苦楝群体遗传多样性、种质资源鉴定等研究提供参考^[7].

1 材料与方法

1.1 材料

苦楝幼叶于 2013 年 7 月取自华南农业大学苗圃,随用随采,用于苦楝基因组 DNA 的提取,采集叶片分别为海南三亚、广东兴宁、广西梧州、福建建瓯、江西南昌、安徽利辛、陕西蒲城、河北邯郸种源. 所用正向引物序列为 Me19 (TGAGTCCAAACCGGTTG) 和 Me27 (TG GGGACAACCCGGCTT), 反向引物序列为 Em2 (GACTGCGTACGAATTTGC)、Em4 (GACTGCGTACG-AATTTGA) 和 Em5 (GACTGCGTACGAATTAAC).

1.2 主要试剂和仪器

用于 SRAP-PCR 反应的 *Taq* 酶、dNTPs、 Mg^{2+} 为 TaKaRa 公司产品,引物由北京华大基因研究中心合成,PCR 反应在东胜创新生物技术有限公司的 PCR 扩增仪上进行,DNA 浓度和纯度使用超微量紫外分

光光度计 (Thermo Nanodrop 2000) 检测.

1.3 基因组 DNA 的提取

苦楝基因组 DNA 提取参照上海生工生物工程有限公司柱式基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行. 所提取的基因组 DNA 用 $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测品质,并采用超微量紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,然后将 DNA 稀释至 $50\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用.

1.4 PCR 扩增

SRAP-PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 5 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 扩增产物采用 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳,电泳后在自动凝胶图像分析仪上拍照分析.

1.5 PCR 反应体系单因素分析

对影响苦楝 SRAP-PCR 反应的主要因素 (模板 DNA、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物和 *Taq* 酶) 进行单因子试验. 对各影响因子分别设置 8 个梯度处理: 模板 DNA 为 0、10、20、30、40、50、60 和 70 ng; dNTPs 为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 和 $0.35\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Mg^{2+} 为 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 $4.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 引物为 0、0.16、0.24、0.32、0.40、0.48、0.56 和 $0.64\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; *Taq* DNA 聚合酶为 0、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 和 2.00 U.

1.6 PCR 反应体系的正交试验

在对影响苦楝 SRAP-PCR 反应的模板 DNA、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物和 *Taq* 酶进行单因子试验后采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,共 16 个处理,每个处理设 2 个重复,各因素水平见表 1. 根据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色进行打分. 最优的得 5 分,最差的得 1 分,并计算每个因素在不同水平下的平均得分^[8].

2 结果与分析

2.1 单因素试验分析

以 SRAP-PCR 反应产物电泳得到的条带数目较多且清晰为筛选原则,对反应体系中起主要作用的 5 个因素进行单因素浓度梯度筛选试验^[9-12],每个因素设置 8 个浓度梯度. 试验结果表明:在 $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中,模板 DNA 为 25 ~ 40 ng、dNTPs 为 $0.125 \sim 0.200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Mg^{2+} 为 $1.75 \sim 2.25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物为 $0.40 \sim 0.52\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶为

0.50 ~ 1.25 U时扩增效果好,条带较多且清晰,故将其选为后续正交试验的适宜浓度范围.

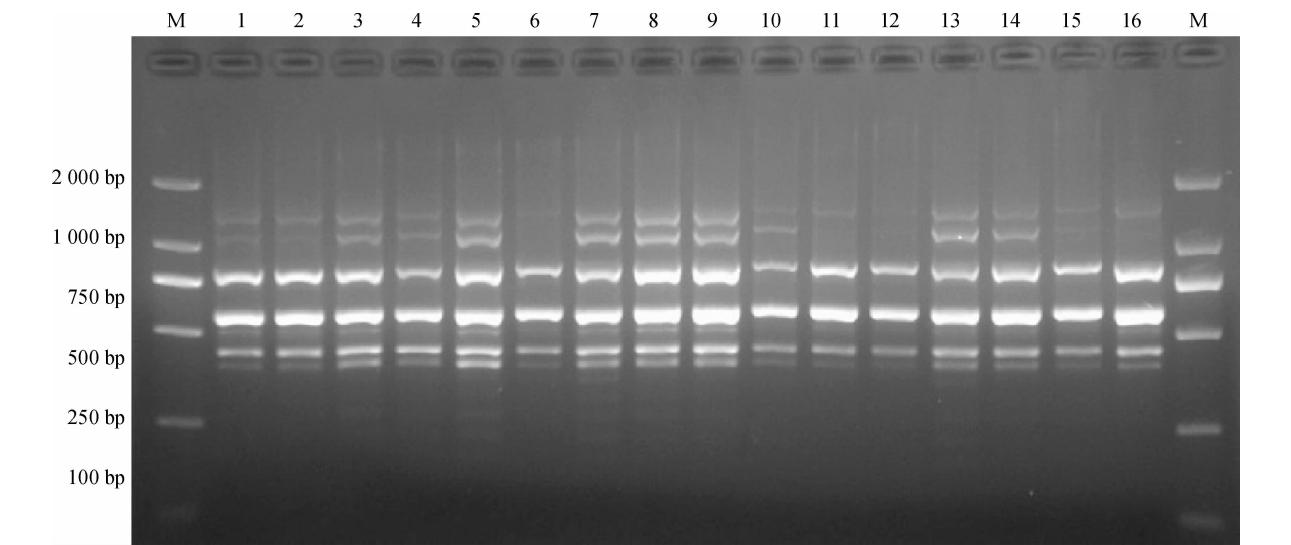
2.2 苦楝 SRAP-PCR 正交反应体系的优化

以上述单因素试验确定的各因素适宜浓度范围为基础,采用 L 16(4⁵) 正交设计对 SRAP-PCR 反应体系进行优化(表 1),并根据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色(图 1)对 16 个处理进行打分,打分结

果如表 1 所示,从 2 次的得分来看,重复间差异不大,试验的一致性较好,其中处理 5、处理 7、处理 8 和处理 9 效果较好,评分均为 4 分,而处理 15 效果不好,评分仅为 1.0 分.从图 2 可见,模板 DNA 30 ng、dNTPs 0.125 mmol · L⁻¹、Mg²⁺ 2.25 mmol · L⁻¹、引物 0.48 μmol · L⁻¹、Taq DNA 聚合酶 0.75 U、反应总体积 25 μL 时得分较高,实现最佳扩增,确定为最优组合.

表 1 SRAP-PCR 正交试验设计 L 16(4⁵) 及试验结果
Tab.1 L 16(4⁵) Orthogonal designs and results of SRAP-PCR reaction

处理号	<i>m</i> (模板 DNA)/ ng	<i>c</i> (dNTPs)/ (mmol · L ⁻¹)	<i>c</i> (Mg ²⁺)/ (mmol · L ⁻¹)	<i>c</i> (引物)/ (μmol · L ⁻¹)	<i>Taq</i> 酶/ U	得分 1	得分 2	平均得分
1	25	0.125	1.75	0.40	0.50	2	2	2.0
2	25	0.150	2.00	0.44	0.75	2	2	2.0
3	25	0.175	2.25	0.48	1.00	4	2	3.0
4	25	0.200	2.50	0.52	1.25	3	3	3.0
5	30	0.125	2.00	0.48	1.25	5	3	4.0
6	30	0.150	1.75	0.52	1.00	1	3	2.0
7	30	0.175	2.50	0.40	0.75	4	4	4.0
8	30	0.200	2.25	0.44	0.50	5	3	4.0
9	35	0.125	2.25	0.52	0.75	5	3	4.0
10	35	0.150	2.50	0.48	0.50	2	4	3.0
11	35	0.175	1.75	0.44	1.25	1	4	2.5
12	35	0.200	2.00	0.40	1.00	1	2	1.5
13	40	0.125	2.50	0.44	1.00	3	3	3.0
14	40	0.150	2.25	0.40	1.25	3	3	3.0
15	40	0.175	2.00	0.52	0.50	1	1	1.0
16	40	0.200	1.75	0.48	0.75	2	2	2.0



M: DNA maker DL2000; 1 ~ 16: 处理 1 ~ 16(陕西蒲城种源).

图 1 SRAP-PCR 反应体系正交试验结果

Fig. 1 Amplified patterns of the SRAP-PCR based on orthogonal design

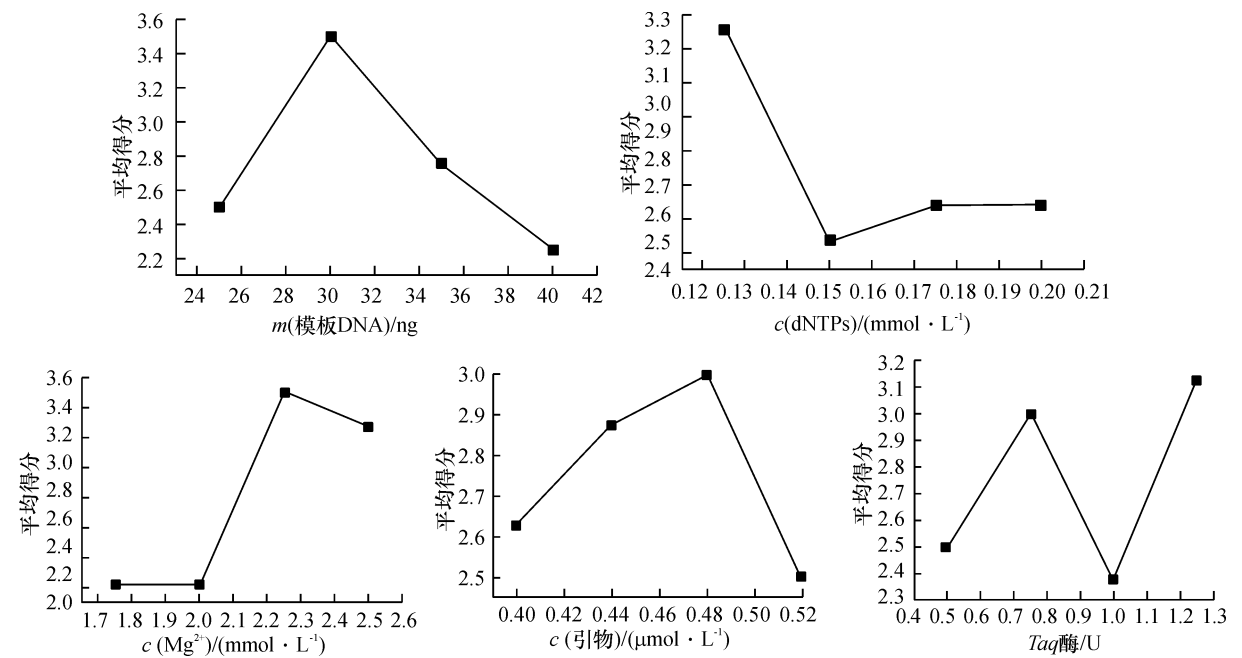


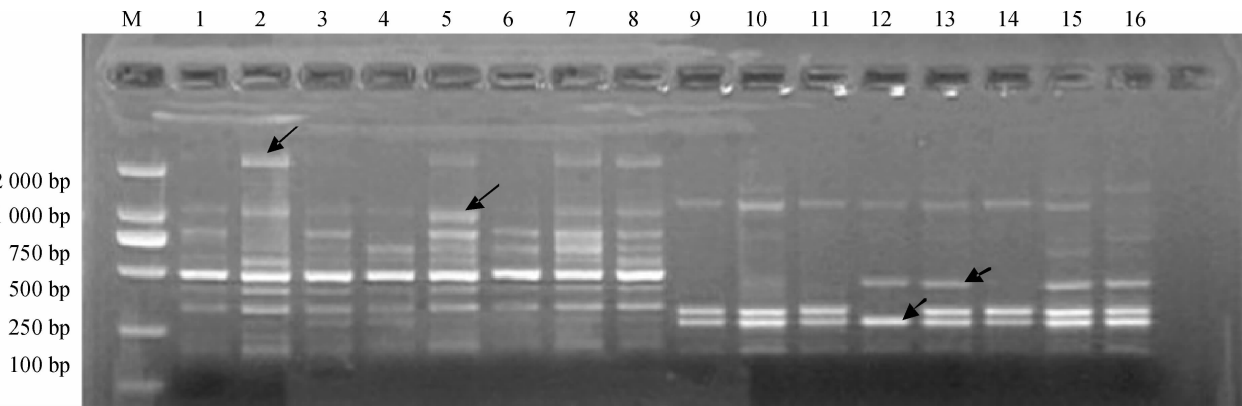
图2 模板 DNA、dNTPs、Mg²⁺、引物、*Taq* DNA 聚合酶与平均得分的关系

Fig. 2 Relationship between concentrations and mean scores of template DNA, dNTPs, Mg^{2+} , primer and *Taq* polymerase

2.3 苦楝 SRAP-PCR 反应体系稳定性的检测

为了验证体系的准确性,以来自海南三亚、广东兴宁、广西梧州、福建建瓯、江西南昌、安徽利辛、陕西蒲城、河北邯郸的 8 个苦楝种源 DNA 为模板,选取引物 Me27/Em2、Me27/Em4 进行 SRAP-PCR 验

证,其结果如图 3 所示,每个种源对每个引物均有清晰的条带,且不同种源间条带有差异.由此可见,本试验建立的 SRAP-PCR 体系稳定可靠,适用于苦楝后续的 SRAP 分析.



M: DNA maker DL2000; 1 ~ 8: 引物 Me27/Em2; 9 ~ 16: 引物 Me27/Em4; 自 1 和 9 开始,从左到右依次为海南三亚、广东兴宁、广西梧州、福建建瓯、江西南昌、安徽利辛、陕西蒲城、河北邯郸种源 DNA.

图3 SRAP-PCR 反应体系稳定性检测

Fig. 3 The verification of *Melia azedarach* SRAP-PCR reaction system

3 结论

本试验建立并优化了适应苦楝 SRAP-PCR 的反应体系,前期对苦楝模板 DNA、Mg²⁺、引物和 *Taq* 酶进行单因子试验,研究发现,SRAP 对苦楝 DNA 浓度的要求不高,有一个较宽的浓度适宜范围,在 25 μL 体系中,模板 DNA 为 10 ~ 70 ng 时都扩增出了

较清晰、带型基本相同的谱带;dNTPs 设计的 8 个浓度梯度中,0.1 ~ 0.2 mmol · L⁻¹ 范围内能扩增出清晰谱带,且条带基本相同,浓度低于 0.1 mmol · L⁻¹ 时,扩增条带弥散,高于 0.2 mmol · L⁻¹ 时,出现条带丢失的现象; Mg^{2+} 为 2.00 mmol · L⁻¹ 左右时扩增条带较清晰且数量多;引物介于 0.48 ~ 0.64 μmol · L⁻¹ 之间均能产生较为清晰的条带,且带型基本上

保持一致,条带数并没有随着浓度的增加而增加;*Taq DNA* 聚合酶用量在 0.50~2.0 U 范围内均可以得到清晰的带型,对其用量要求不高.进一步对苦楝 SRAP-PCR 的反应体系进行正交试验,并根据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色对 16 个处理进行打分,从 2 次的得分来看,重复间差异不大,试验的一致性较好,其中处理 5、处理 7、处理 8 和处理 9 效果较好,评分均为 4.0 分,而处理 15 效果不好,评分仅为 1.0 分.根据得分可知,在 25 μL 反应体系中,当模板 DNA 30 ng、dNTPs 0.125 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Mg^{2+} 2.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物 0.48 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq DNA* 聚合酶 0.75 U 时,实现最佳扩增,确定为最优组合.以来自海南三亚、广东兴宁、广西梧州、福建建瓯、江西南昌、安徽利辛、陕西蒲城、河北邯郸的 8 个苦楝种源 DNA 为模板,选取引物 Me27/Em2、Me27/Em4 进行 SRAP-PCR 反应体系稳定性验证,结果表明,筛选体系能很好地满足苦楝基因组 SRAP-PCR 扩增的要求且不同种源间条带有差异.

参考文献:

[1] 杨湘. 不同种群苦楝中苦楝素含量变化规律研究 [D]. 南京:南京林业大学,2011.

[2] 程诗明. 苦楝聚合群体遗传多样性研究与核心种质构建 [D]. 北京:中国林业科学研究院,2005.

[3] 刘丽云. 苦楝栽培技术及应用价值 [J]. 北方园艺,

2009 (9): 144-145.

[4] 曾东东. 家具用苦楝集成材的研究 [D]. 南京:南京林业大学,2011.

[5] 程诗明,顾万春. 苦楝遗传资源学研究进展及其展望 [J]. 浙江林业科技,2007, 27(2): 64-69.

[6] 董星光,樊丽,王志刚,等. 梨 SRAP 体系的正交优化研究 [J]. 江苏农业科学,2009 (2): 51-53.

[7] 张晓蕾,张凯旋,杨传平,等. 白桦 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 东北林业大学学报,2010, 38 (9): 1-3.

[8] 刘明泰,李杨,刘小林,等. 皱纹盘鲍 SRAP 反应体系的正交优化 [J]. 大连海洋大学学报,2013, 28 (1): 12-16.

[9] 闫建勋,刘念,黄邦海. 姜黄属 SRAP 反应体系的优化与建立 [J]. 广东农业科学,2011, 38 (1): 152-154.

[10] 高亚卉,朱广龙,姬志峰,等. 太行菊 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 实验室科学,2012, 15 (1): 81-84.

[11] 井赵斌,俞靓,魏琳,等. 本氏针茅 SRAP—PCR 反应体系的建立及引物筛选 [J]. 草业科学,2012, 29 (2): 219-228.

[12] 尹德洁,苏淑钗,刘肖,等. 蓝莓 SRAP—PCR 反应体系的建立优化及引物筛选 [J]. 东北林业大学学报,2013, 41 (2): 35-39.

【责任编辑 李晓卉】