

基于毛细管电泳技术的牡丹 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选

史倩倩, 王雁, 周琳, 黄国伟

(中国林科院 林业研究所 林木遗传育种国家重点实验室 北京 100091)

摘要:以牡丹叶片 DNA 为模板,对 SRAP-PCR 反应程序进行研究,确定适合的反应程序,即 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 33 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 随后 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。基于毛细管电泳技术,采用正交设计 $L_{18}(3^7)$ 对牡丹 SRAP-PCR 反应体系的 5 因素(*Taq* 酶, Mg^{2+} , 模板 DNA, dNTP, 引物) 3 个水平进行了优化,构建了牡丹 SRAP 最佳反应体系: 模板 DNA 50 ng, dNTP 0.25 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L, 引物浓度 0.4 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 总体积为 25 μ L。各因素对扩增结果影响程度均不同: dNTPs > 引物 > DNA 模板 > Mg^{2+} > *Taq* 酶。运用该体系从 756 个 SRAP 引物组合中筛选出多态性好、条带清晰的 26 个引物组合,并证明了该体系稳定可靠。该体系的建立以及引物组合的确定为今后利用 SRAP 分子技术进行牡丹的相关研究奠定了科学基础。

关键词:牡丹; SRAP; 毛细管电泳; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: S685.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0158-07

Optimization of SRAP-PCR System and Selection of Primers for *Paeonia suffruticosa* Andr. Based on Capillary Electrophoresis

SHI Qian-qian, WANG Yan, ZHOU Lin, HUANG Guo-wei

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: In this study, the procedure of SRAP-PCR was determined: an initial denaturing step was performed at 94 °C for 5 min; followed by 5 cycles at 94 °C for 1 min, 33 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The orthogonal design was used to optimize SRAP-PCR system with five factors at three levels respectively based on capillary electrophoresis. The results showed that the optimized SRAP reaction mixtures for *Paeonia suffruticosa* Andr.: (total volume 25 μ L) 50 ng DNA template, 0.25 mmol/L dNTP, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.4 μ mol/L primer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase. The concentration of dNTP had the greatest effect and DNA template had the least effect on the result. And twenty-six pairs of primers were selected with abundant polymorphism above 70% from 756 pairs of primers. The optimized SRAP-PCR system and pairs of primers could be applied to related research of *Paeonia suffruticosa* Andr.

Key words: *Paeonia suffruticosa* Andr.; SRAP marker; capillary electrophoresis; optimization; selection of primers

收稿日期: 2011-09-29 修回日期: 2011-11-18

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(200904050)

作者简介: 史倩倩(1987—),女,硕士生,主要从事园林植物应用研究, E-mail: shiqianqian2005@163.com。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) ,世界著名观花灌木,是中国传统名花的优秀代表,已经有 1500 多年的栽培历史^[1]。随着牡丹现代品种的不断出现,牡丹传统品种产业化程度相对较低,面临着品种流失、信息断代和栽培技艺失传的现状,因此保存和鉴定牡丹传统品种核心种质对传统品种的开发利用具有重要意义。目前随着 DNA 分子标记技术的快速发展,许多学者从 DNA 水平上深入研究了牡丹种间、种与品种间及种群间的相互关系,而对牡丹传统品种的鉴定及分类研究甚少。因此开展新型标记技术研究对完善牡丹研究具有重要意义。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是 Li^[2] 等开发的新型分子标记。该标记结合了 RAPD 和 AFLP 两者的优点,具有操作简便、多态性丰富、重复性好,无需预知物种序列信息,便于克隆目标片段的特点。目前广泛应用在植物遗传多样性分析^[3]、种质资源鉴定^[4]、杂种优势预测^[5]、基因克隆及基因定位^[6]、遗传图谱构建^[7]等方面。本研究采用毛细管电泳分离技术,扩增产物在高分辨率毛细管中电泳分离,电泳结果通过软件自动统计分析并转化为“0、1”,省去了传统测序胶脱色固定、冲洗、银染、显影、定影等步骤,极大地缩短了分析时间,并提高了分辨率,但牡丹的 SRAP-毛细管电泳反应体系还未见报道。本研究基于毛细管电泳技术,通过正交试验设计对牡丹 SRAP-PCR 体系进行优化,以期得到牡丹的 SRAP 最佳毛细管电泳反应体系;同时对 756 对 SRAP 引物组合进行了多态性筛选,希望获得一些多态性丰富的引物组合,为传统牡丹品种的鉴定及分类研究提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验材料为牡丹品种“鲁荷红”(“Lu He Hong”)、“春红娇艳”(“Chun Hong Jiao Yan”)、“豆绿”(“Dou Lü”)和“黄翠羽”(“Huang Cui Yu”),采自中国林业科学研究院玉泉山牡丹基地。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和检测 以幼叶为材料,利用改良 CTAB 法^[8]提取基因组 DNA,通过微量紫外分光光度计和 $\rho = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量,并稀释至 20 ng/L,检测合格的样品 DNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.2 SRAP-PCR 扩增程序的选择 SRAP 反应采用的是复性变温法,选用 3 种扩增程序:(1) $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 5 个循环;随后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。(2) Li G 和 Quiros C F^[2] 的程序;即循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 5 个循环;随后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。(3) 梁景霞等^[9]稍加修改的程序;即 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 5 个循环;随后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。所有的 PCR 扩增反应都在 Biometra T-Gradient Thermoblock 基因扩增仪上进行。扩增产物用 $\rho = 2\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 SRAP 反应体系正交试验设计 采用 $L_{18}(3^7)$ 正交设计方法,模板 DNA、 Mg^{2+} 浓度、dNTP、引物浓度、Taq DNA 聚合酶 5 个因素设置 3 个水平筛选,试验设计见表 1、表 2。正交设计中的 18 个处理重复 3 次,在 Biometra T-Gradient Thermoblock 基因扩增仪上进行。总反应体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,反应程序参照上述筛选出的合适的程序。

表 1 SRAP-PCR 反应体系的因素水平

Tab.1 Factors and levels of SRAP-PCR system

水平 Levels	因素 Factors				
	模板 DNA/ng Template	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	Mg ²⁺ / (mmol · L ⁻¹)	引物/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Primer	Taq/U
1	30	0.15	1.5	0.3	0.5
2	40	0.2	2.0	0.4	1.0
3	50	0.25	2.5	0.5	1.5

表 2 SRAP-PCR 反应体系的因素水平 $L_{18}(3^7)$ 正交试验设计

Tab.2 $L_{18}(3^7)$ orthogonal design for the factors and levels of SRAP-PCR system

编号 No.	模板 DNA/ng DNA template	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	Mg ²⁺ /(mmol · L ⁻¹)	引物/(μmol · L ⁻¹) Primer	Taq/U	得分 Score			平均分 Average score
						1	2	3	
1	1	1	1	1	1	7	7	7	7.00
2	1	2	2	2	2	4	6	4	4.67
3	1	3	3	3	3	9	9	8	8.67
4	2	1	1	2	2	3	2	5	3.33
5	2	2	2	3	3	11	11	12	11.33
6	2	3	3	1	1	10	10	10	10.00
7	3	1	2	1	3	15	16	16	15.67
8	3	2	3	2	1	2	3	2	2.33
9	3	3	1	3	2	14	13	11	12.67
10	1	1	3	3	2	16	15	14	15.00
11	1	2	1	1	3	8	7	9	8.00
12	1	3	2	2	1	6	5	6	5.67
13	2	1	2	3	1	1	1	1	1.00
14	2	2	3	1	2	12	14	15	13.67
15	2	3	1	2	3	13	12	13	12.67
16	3	1	3	2	3	18	18	18	18.00
17	3	2	1	3	1	5	4	3	4.00
18	3	3	2	1	2	17	17	17	17.00
K ₁	49.01	60	47.67	71.34	30				170.67
K ₂	52	44	55.34	46.67	66.34				
K ₃	69.67	66.67	67.66	52.66	74.33				
X ₁	8.17	10	7.95	11.89	5				
X ₂	8.67	7.33	9.22	7.78	13.12				
X ₃	11.61	11.11	11.28	8.78	12.39				
R	3.44	2.33	3.33	4.11	8.12				

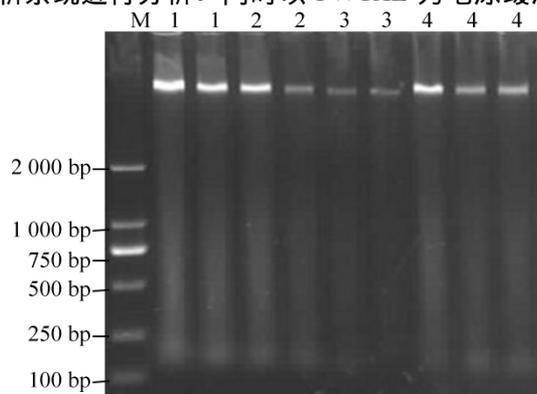
扩增产物采用 Qiaxcel 全自动毛细管核酸分析系统进行分析。同时以 $1 \times TAE$ 为电泳缓冲液,天根 DL2000Marker 作对照,将扩增产物用 $\rho = 2\%$ 琼脂糖凝胶以 $4 V/cm$ 的电压电泳分离,然后在 Syncene BTS - 20M 凝胶成像仪上采集图像并进行验证。

1.2.4 SRAP 引物组合的筛选 基于上述试验优化出的 SRAP - PCR 最佳反应体系,首先利用 2 个 DNA 模板对表 3 所示的由 27 条正向引物和 28 条反向引物组合成的 756 对随机引物进行筛选,选出有扩增条带且清晰的引物组合,然后再进行复筛。复筛用 4 个 DNA 模板对初筛出的引物组合再进行筛选,最终选择出多态性好,带型清晰的引物组合用于牡丹传统品种和近缘栽培品种的遗传多样性分析。

2 结果与分析

2.1 牡丹品种基因组 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法提取牡丹基因组 DNA,分光光度计结果显示 A_{260}/A_{280} 值在 $1.8 \sim 2.0$ 。经 $\rho = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)可以看出条带清晰整齐。能够满足 SRAP - PCR 扩增的要求。



1 - 4 分别代表“鲁荷红”、“春红娇艳”、“豆绿”、“黄翠羽”4 个牡丹品种。

No. 1 - 4, “Lu He Hong”, “Chun Hong Jiao Yan”, “Dou Lü” and “Huang Cui Yu”.

图 1 “鲁荷红”、“春红娇艳”、“豆绿”、“黄翠羽”4 个样本的 DNA 模板

Fig. 1 DNA templates of “Lu He Hong”, “Chun Hong Jiao Yan”, “Dou Lü” and “Huang Cui Yu”

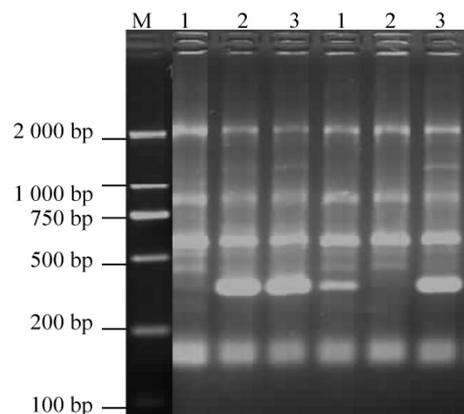
表 3 SRAP 标记的正向引物、反向引物序列(5' - 3')

Tab. 3 Sequences(5' - 3') of SRAP forward and reverse primers used in this study

正向引物 Forward primer	Forward primer	反向引物 Reverse primer	Reverse primer
Me1	TGA GTC CAA ACC GG ATA	Em1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
Me2	TGA GTC CAA ACC GG AGC	Em2	GAC TGC GTA CGA ATT ATT
Me3	TGA GTC CAA ACC GG ATG	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me4	TGA GTC CAA ACC GG ACA	Em4	GAC TGC GTA CGA ATT ATG
Me5	TGA GTC CAA ACC GG AAT	Em5	GAC TGC GTA CGA ATT AGC
Me6	TGA GTC CAA ACC GG ACC	Em6	GAC TGC GTA CGA ATT ACG
Me7	TGA GTC CAA ACC GG AAA	Em7	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me8	TGA GTC CAA ACC GG ACG	Em8	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me9	TGA GTC CAA ACC GG AGA	Em9	GAC TGC GTA CGA ATT GGT
Me10	TGA GTC CAA ACC GG AGT	Em10	GAC TGC GTA CGA ATT GAG
Me11	TGA GTC CAA ACC GG AGG	Em11	GAC TGC GTA CGA ATT GCC
Me12	TGA GTC CAA ACC GG GAT	Em12	GAC TGC GTA CGA ATT GTA
Me13	TGA GTC CAA ACC GG GCT	Em13	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me14	TGA GTC CAA ACC GG GAC	Em14	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Me15	TGA GTC CAA ACC GG GTA	Em15	GAC TGC GTA CGA ATT TCA
Me16	TGA GTC CAA ACC GG GGT	Em16	GAC TGC GTA CGA ATT TAG
Me17	TGA GTC CAA ACC GG TAA	Em17	GAC TGC GTA CGA ATT TCG
Me18	TGA GTC CAA ACC GG TGC	Em18	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
Me19	TGA GTC CAA ACC GG TCC	Em19	GAC TGC GTA CGA ATT CCT
Me20	TGA GTC CAA ACC GG TTG	Em20	GAC TGC GTA CGA ATT CTC
Me21	TGA GTC CAA ACC GG TGT	Em21	GAC TGC GTA CGA ATT CTT
Me22	TGA GTC CAA ACC GG TCA	Em22	GAC TGC GTA CGA ATT CAC
Me23	TGA GTC CAA ACC GG TAG	Em23	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Me24	TGA GTC CAA ACC GG CAG	Em24	GAC TGC GTA CGA ATT CGG
Me25	TGA GTC CAA ACC GG CTA	Em25	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me26	TGA GTC CAA ACC GG CTT	Em26	GAC TGC GTA CGA ATT CGA
Me27	TGA GTC CAA ACC GG AAG	Em27	GAC TGC GTA CGA ATT CAT
			Em28GAC TGC GTA CGA ATT CCA

2.2 SRAP 扩增程序的选择

利用“鲁苜红”DNA 模板对两种程序进行了 3 次重复筛选。从图 2 可以看出,程序 3 扩增出的条带较清晰且带数多,说明程序 3 所得的扩增效果较好。同时考虑到退火温度决定着 PCR 的特异性,程序 3 中前 5 个循环中 33 °C 的退火温度有利于正反引物与靶 DNA 位点结合,后 35 个循环中 52 °C 退火温度增加了反应的特异性,本实验采用程序 3 作为牡丹 SRAP-PCR 反应的程序,并用于 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选的研究,即 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 33 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 随后 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min,



1 - 3 SRAP-PCR 反应程序编号。

1 - 3 No. of the procedure on SRAP-PCR.

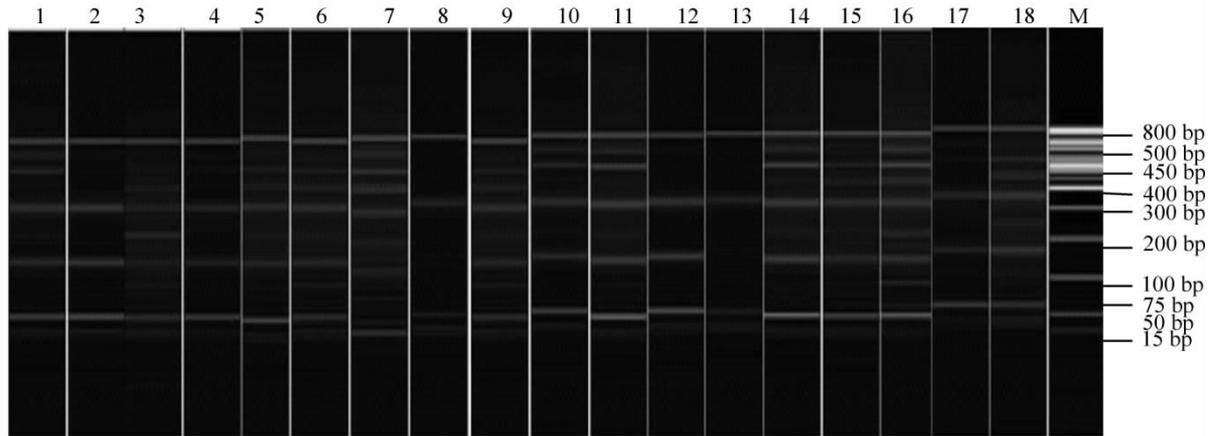
图 2 SRAP-PCR 反应程序的影响

Fig. 2 The effects of the procedure on SRAP-PCR

72 °C 延伸 1 min ,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

2.3 牡丹 SRAP 反应体系的正交优化

根据毛细管电泳结果(图 3),参照何正文^[10]和张丽等^[11]的方法,对扩增结果进行直观分析。按照条带数量多、清晰度高的原则,依次给 18 个处理打分,最佳产物记为 18 分,最差的记为 1 分。3 次重复分别统计。评分结果及分析见表 2。



1 - 18 ,表 2 的处理组合编号。

1 - 18 ,treatment composition in Table 2.

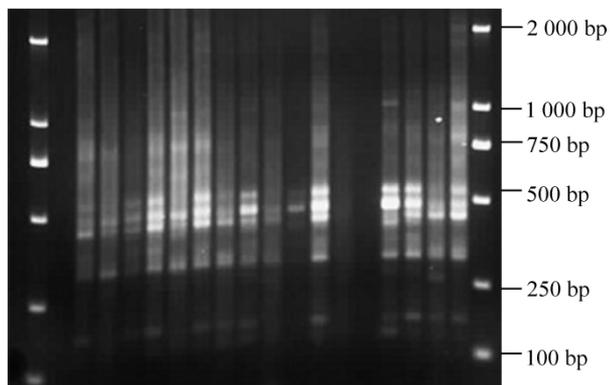
图 3 正交设计 SRAP-PCR 反应体系的毛细管电泳扩增结果

Fig. 3 The results of SRAP-PCR system with orthogonal design by capillary electrophoresis

表 2 中 *R* 值为某因子的极差,反映了该因子对试验结果影响的大小。从表中可以看出 5 个因素对 PCR 反应的影响程度为: dNTPs > 引物 > DNA 模板 > Mg²⁺ > *Taq* 酶。*X* 值反映了各因素各水平对反应体系的影响,*X* 值越大,反应水平越好,

从 *X* 值结果来看,dNTP 以 2、3 水平最好,引物浓度以 1 水平最好,DNA 模板量 3 水平为最好,Mg²⁺ 浓度各水平间的差异较大,以 3 水平为最好,*Taq* 酶的 1、3 水平间的差异不大,扩增效果较 2 水平好。即组合 16、18 扩增效果较好。图 4 的毛细管电泳峰图所示的结果与图 3、表 2 显示的结果基本一致。得分比较高的组合 10、14、16、18 的峰多,且峰值也相对较高些,而得分较低的组合 8、13、17 的峰很少且峰值低。这说明了 SRAP-PCR 体系选择组合 16 比较合适,即模板 DNA 50 ng、dNTP 0.25 mmol/L、Mg²⁺ 浓度 2.5 mmol/L、引物浓度 0.4 μmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U,总体积为 25 μL。同时用琼脂糖凝胶电泳也验证了此体系是可靠的(图 4)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M



1 - 18 ,表 3 的处理组合编号。

1 - 18 ,treatment composition in Table 3.

图 4 正交设计 SRAP-PCR 反应体系的琼脂糖凝胶电泳扩增结果

Fig. 4 The results of SRAP-PCR system with orthogonal design by electrophoresis through a 2% (w/v) agarose gel

2.4 多态性引物组合的筛选及反应体系的验证

利用上述优化得到的 SRAP-PCR 最佳反应体系和 2 个 DNA 模板对 756 对引物组合进行初筛、复筛,最后选择了条带比较清晰且多态性好的 26 个引物组合(表 4)。

其中 26 个引物组合共产生 360 个条带,平均每对引物产生 13.85 个。26 个引物总共产生 278 个多态性带,平均每个引物组合扩增出 10.69 个多态性带,平均多态性为 77.26%。多态性最高的引物组合是 Me1-Em4,最低的是引物组合 Me13-Em15 表现出了丰富的多态性。同时也验证了优化的 SRAP-PCR 体系是稳定的。同样利用该优化体系进行了牡丹 SRAP 毛细管电泳,得到了清晰且条带较多的电泳图

表 4 SRAP 引物组合扩增带数及多态性带数

Tab.4 Number of total and polymorphic fragments per SRAP primer combination

引物组合 Primer combination	条带数 No. of fragments	多态性条带 No. of polymorphic fragments	多态性/% Percentage of polymorphic fragments	引物组合 Primer combination	条带数 No. of Fragments	多态性条带 No. of polymorphic fragments	多态性/% Percentage of polymorphic fragments
Me1 - Em2	10	9	90.00	Me12 - Em3	12	9	75.00
Me1 - Em4	18	17	94.44	Me13 - Em15	17	12	70.59
Me1 - Em5	20	15	75.00	Me14 - Em11	20	16	80.00
Me1 - Em8	13	10	76.92	Me14 - Em15	14	10	71.43
Me1 - Em24	18	13	72.22	Me17 - Em20	9	7	77.78
Me2 - Em18	10	8	80.00	Me20 - Em9	10	8	80.00
Me3 - Em1	15	11	73.33	Me25 - Em1	19	16	84.21
Me3 - Em24	18	14	77.78	Me25 - Em22	11	8	72.73
Me4 - Em9	14	10	71.43	Me26 - Em8	10	8	80.00
Me5 - Em1	12	9	75.00	Me26 - Em12	11	8	72.73
Me5 - Em8	7	5	71.43	Me26 - Em15	11	9	81.82
Me6 - Em4	12	10	83.33	Me26 - Em16	15	11	73.33
Me7 - Em18	16	12	75.00	Me27 - Em7	18	13	72.22
总数	360	278					
平均	13.85	10.69	77.22				

(图5、图6)。从图5、6可以看出经2次筛选出的SRAP引物组合是可靠的,并且优化的体系可以应用于牡丹SRAP毛细管电泳技术。

3 讨论

SRAP - 毛细管电泳相对传统的凝胶分析更加简便,无需传统的凝胶配制,银染、漂洗等步骤,极大地缩小了工作量。本试验主要是构建SRAP - 毛细管电泳体系,因此重点对毛细管电泳上样前的扩增体系进行了优化。试验结果表明,采用不同反应体系对牡丹的毛细管电泳结果影响很大,各因素对条带数及峰值高低影响不同。

扩增程序对PCR扩增结果影响不明显,但采用程序3扩增出的条带较清晰,说明退火温度决定着PCR的特异性。试验结果证明程序3中前5个循环较低的退火温度33℃有利于两引物与靶DNA上位点的结合,后35个循环较高的退火温度

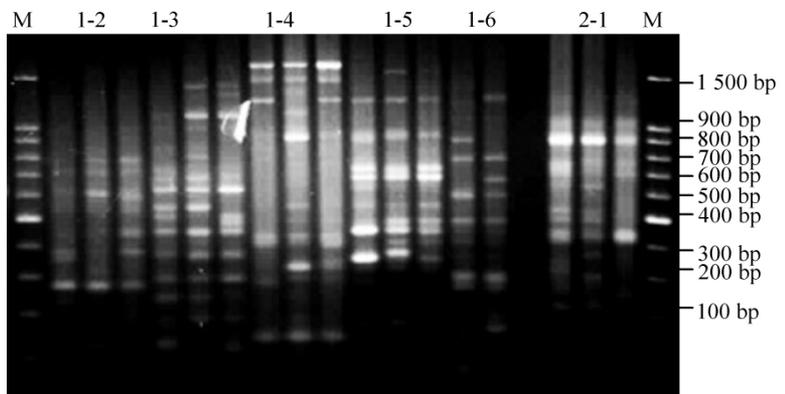


图5 引物 Me1 - Em2、Me1 - Em3、Me1 - Em4、Me1 - Em5、Me1 - Em6 和 Me2 - Em1 扩增 4 个样本的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.5 Result of SRAP-PCR products of four DNA templates with Me1 - Em2、Me1 - Em3、Me1 - Em4、Me1 - Em5、Me1 - Em6 and Me2 - Em1 by electrophoresis through a 2% (w/v) agarose gel

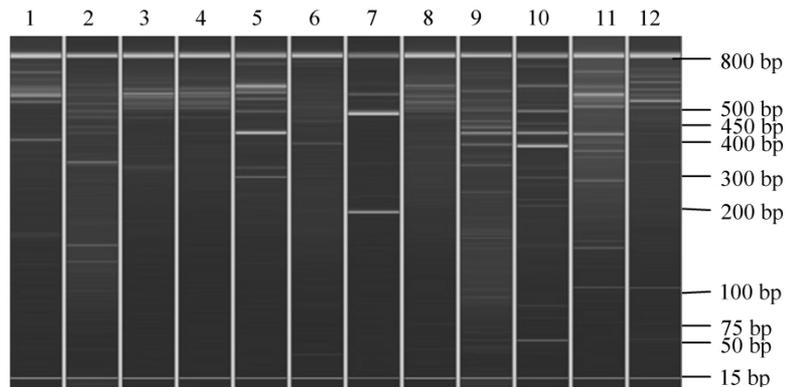


图6 引物 Me1 - Em2 扩增 12 个样本的毛细管电泳

Fig.6 Result of SRAP-PCR products of twelve DNA templates with Me1 - Em2 by capillary electrophoresis

52 ℃提高了扩增的特异性。李莉等^[12]在优化枣 SRAP-PCR 反应体系试验中也验证了这点。

通过 5 个因素 3 个水平的正交试验优化出牡丹 SRAP 毛细管电泳最佳反应体系: 模板 DNA 50 ng, dNTP 0.25 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L, 引物浓度 0.4 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 总体积为 25 μ L。与王燕青^[13]优化牡丹的 SRAP 扩增体系(25 μ L 反应体系: 模板 DNA 50 ng, dNTP 0.20 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, 引物浓度 0.3 μ mol/L, *Taq* 酶 0.5 U) 基本一致。各因素对扩增反应结果影响不同, 其中以 dNTPs 影响最大, *Taq* 酶影响最小。本试验得到的毛细管电泳体系和扩增程序具有较强的可重复性, 能很好地满足牡丹基因组 SRAP 扩增的要求, 可应用于中原牡丹栽培品种间遗传关系的研究。同时在 756 个引物对中共得到多态性在 70% 以上的引物组合 26 个并且也验证了该反应体系稳定可靠, 可用于牡丹的 SRAP 分子标记研究。

该 SRAP 毛细管电泳体系为牡丹 SRAP 分析提供了比较简便的方法, 及 26 个引物组合均可用于今后牡丹的遗传多样性分析、品种鉴定、亲缘关系分析、遗传图谱构建等诸多领域。

参考文献:

- [1] 李嘉珏, 张西方, 赵孝庆, 等. 中国牡丹[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011.
- [2] 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.
- [3] Youssef M, James A C, Rivera - Madrid R, et al. Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP[J]. Mol Biotechnol, 2011, 47(3) : 189-99.
- [4] 叶青雷, 曾宪云. 麻栎 SRAP-PCR 体系优化与遗传多样性分析[J]. 生物技术, 2009, 19(3) : 24-27.
- [5] Hale A L, Farnham M W, Nzaramba M N, et al. Heterosis for horticultural traits in Broccoli[J]. Theoretical and Applied Genetics 2007, 115: 351-360.
- [6] 张四普, 汪良驹, 吕中伟. 石榴叶片 SRAP 体系优化及其在白化芽变鉴定中的应用[J]. 西北植物学报, 2010, 30(5) : 911-917.
- [7] Liu L, Ma X, Wei J, et al. The first genetic linkage map of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) based on ISSR and SRAP markers[J]. Genome 2011, 54(1) : 19-25.
- [8] 郭先锋, 王莲英. 部分芍药种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(5) : 1321-1326.
- [9] 梁景霞, 新建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4) : 33-38.
- [10] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4) : 403-404.
- [11] 张丽, 周兰英, 肖千文, 等. 正交试验设计在建立杜鹃花 RAPD-PCR 反应体系中的应用[J]. 北方园艺, 2007(5) : 124-126.
- [12] 李莉, 彭建营, 郑宝强. 枣 SRAP-PCR 体系的正交优化[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2) : 361-362.
- [13] 王燕青. 利用 SRAP 标记构建菏泽牡丹优良品种指纹图谱[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.