

# 刨花润楠SRAP-PCR体系建立与优化\*

周鹏<sup>1,2</sup> 林玮<sup>2</sup> 周祥斌<sup>2</sup> 陈晓阳<sup>2</sup>

(1. 广东生态工程职业学院, 广东 广州 510520; 2. 华南农业大学林学与风景园林学院 / 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

**摘要** 以刨花润楠 (*Machilus pauhoi*) 1.5 a 生小苗幼嫩叶片为试材, 对影响刨花润楠 SRAP-PCR 扩增的模板 DNA 量、引物、dNTP 和  $Mg^{2+}$  体积摩尔浓度、Taq DNA 聚合酶、退火温度 6 个主要因素进行优化。结果表明, SRAP-PCR 的最佳反应体系为: 25  $\mu$ L 的 SRAP-PCR 反应体系中, 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer、模板 DNA 量 60 ng、 $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L、dNTP 0.225 mmol/L、引物 0.3  $\mu$ mol/L 和 Taq DNA 聚合酶 1.25 U。对优化的反应体系和扩增程序的验证结果表明, 优化的刨花润楠 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序是稳定可行的。

**关键词** 刨花润楠; SRAP-PCR; 体系优化

中图分类号: S718.43, S792.23 文献标识码: A 文章编号: 2096-2053 (2017) 04-0029-05

## Establishment and Optimization of SRAP-PCR System for *Machilus pauhoi*

ZHOU Peng<sup>1,2</sup> LIN Wei<sup>2</sup> ZHOU Xiangbin<sup>2</sup> CHEN Xiaoyang<sup>2</sup>

(1. Guangdong Eco-engineering Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

**Abstract** *Machilus pauhoi* is a tree specie with variety of economic value and development prospects. This study aimed to establish an optimized SRAP-PCR system for *M. pauhoi*, and the young leaves of the 1.5 years old seedlings were used as test materials. Six quality factors including the template DNA, primer concentration, dNTP concentration,  $Mg^{2+}$  concentration, Taq DNA polymerase, and annealing temperature were optimized for *M. pauhoi* SRAP-PCR assay. The obtained results suggested a optimized reaction system of SRAP-PCR (total 25  $\mu$ L) involving 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 60 ng DNA, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.225 mmol/L dNTP, 0.3  $\mu$ mol/L primer, 1.25 U Taq DNA polymerase. The verification results showed that the optimized SRAP-PCR reaction system and amplification program were stable and feasible.

**Key words** *Machilus pauhoi*; SRAP-PCR; system optimization

刨花润楠 (*Machilus pauhoi*), 又名刨花楠、粘柴 (福州市)、刨花 (广东省), 属樟科 (Lauraceae) 润楠属植物, 为常绿大乔木, 产于长江以南各省, 主要分布在海拔 300~1 200 m 的山坡及沟谷

地带。刨花润楠全身是宝, 是一种极具经济价值和开发前景的阔叶树种, 其树干通直, 生长迅速, 出材量大, 6 a 生林木可进行采伐利用, 且其砍伐后萌芽力强, 更新快。从该树种叶片中提取的精

\* 基金项目: “十二五” 国家科技支撑项目 “刨花润楠和黄樟良种选育研究” (2012BAD01B04); 广东省林业科技创新项目 “樟科、樟科优质速生树种良种选育和高效栽培技术研究与示范” (2011KJCX002)。

第一作者: 周鹏 (1989—), 男, 助教, 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: zhoupeng\_0119@163.com。

通信作者: 陈晓阳 (1958—), 男, 教授, 主要从事林木良种选育与生物技术研究, E-mail: xychen@scau.edu.cn。

油是优良的天然香料,具有独特药用价值,而树皮富含树脂和橡胶,种子含油率高达50%,可作为优良的工业润滑油,或供制皂及制蜡用<sup>[1-2]</sup>。此外,刨花润楠树形高大美观,枝繁叶茂,四季常青,嫩叶呈粉红色或红棕色,也是优良的园林绿化树种<sup>[3]</sup>。目前,对刨花润楠的研究主要集中在生物量结构、生长规律、育苗技术和观赏性等方面<sup>[4-7]</sup>,有关刨花润楠种质资源保存与开发利用、种质分子鉴别等方面尚未见报道。

SRAP分子标记是由美国加州大学Li与Quiros博士提出的一种研究DNA多态性的有效新型分子标记技术<sup>[8]</sup>。该分子标记稳定可靠,信息量大,多态性及共显性高,引物具有通用性,且该技术操作简单,成本低廉<sup>[9]</sup>。目前在作物和蔬菜的遗传图谱构建、遗传多样性分析、比较基因组学和品种分子鉴定等研究领域已得到广泛应用<sup>[10-15]</sup>。近年来,逐步应用于林木的指纹图谱构建、遗传多样性分析及指纹检索等研究中<sup>[16-20]</sup>。本试验通过摸索适于刨花润楠SRAP-PCR扩增的技术条件,以期SRAP分子标记技术应用于樟科润楠属植物的鉴别及遗传多样性的研究提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

供试的刨花润楠种子采于广西壮族自治区,在华南农业大学启林北苗圃播种育苗。随机选取10个家系(分别为广西贺州4个家系,广西兴安4个家系,广西昭平2个家系),每个家系选取1株生长良好的幼苗,苗龄为1.5 a生,取幼嫩叶片,在-80℃下保存备用,用于提取总DNA。电泳检测时选用DL2000 DNA Marker(M)进行比对参照物,所选用SRAP引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取及检测 李荣华等<sup>[21]</sup>认为,在提

取DNA过程中加入预冷异丙醇和24:1的氯仿:异戊醇混合液,可有效去除叶片中所含的多酚、蛋白质、脂类、多酯的角质等不利于DNA提取的干扰物质,同时适当加大β-巯基乙醇的用量,可进一步减少褐变。本实验对OMEGA试剂盒(EasyPure Plant Genomic DNA Kit)加以调整改进(在提取DNA过程中加入预冷异丙醇和24:1的氯仿:异戊醇混合液)后,提取基因组总DNA。经1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量后,稀释至所需质量体积浓度(25 ng/μL),在-20℃下保存备用。

1.2.2 引物的筛选 按照随机抽样方式从100对SRAP引物中选取10对进行PCR扩增,选择条带较为丰富的2对引物组合Me3(5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3')/Em4(5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3')和Me4(5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3')/Em4(5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3')进行优化实验<sup>[22]</sup>。

1.2.3 SRAP-PCR的基础扩增程序 PCR反应在多功能PCR仪中进行,循环程序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,35℃退火1 min,72℃延伸1 min,5个循环;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;最后再72℃延伸10 min;10℃保存。扩增结果用2%琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外凝胶成像系统上观察和记录。

1.2.4 SRAP-PCR反应体系的建立与优化验证 选择5个25 μL的PCR扩增体系,采用模板2、4号样本DNA(DNA样品点样点为2 μL),选用引物组合(Me3/Em4、Me4/Em4)进行扩增,从中筛选出1个较好的反应体系;在此体系的基础上,针对影响PCR反应的6个因素,分别对DNA模板用量、引物、dNTP和Mg<sup>2+</sup>摩尔体积浓度、Taq DNA聚合酶和退火温度设置不同的梯度(表1)进行单因素试验,在PCR扩增仪上进行扩增,对所产生的结果进行直观分析,以确定最佳反应体系<sup>[23]</sup>。并运用不同引物组合(Me18/Em7、Me18/

表1 SRAP反应体系梯度设置

因素	水平												
DNA模板用量/ng	5	10	20	30	40	50	60	70	80				
引物/(μmol·L <sup>-1</sup> )	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0				
dNTP/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.125	0.150	0.175	0.200	0.225	0.250	0.275	0.300	0.325				
Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	0	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6					
Taq DNA聚合酶/U	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00					
退火温度/℃	50.0	50.5	51.2	52.1	53.5	54.7	55.6	56.9	58.1	59.1	59.7	60.0	

Em6 和 Me24/Em9) 分别对刨花润楠 8 个不同家系样品 (选取了上述 10 个家系中的 8 个, 分别是广西贺州 4 个家系, 广西兴安中的 2 个家系, 广西昭平 2 个家系) 进行反应体系的验证。

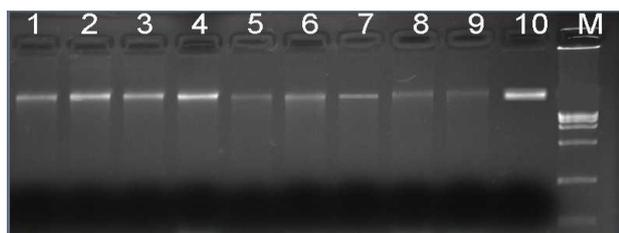
## 2 结果与分析

### 2.1 刨花润楠叶片总 DNA 提取

由图 1 可以看出, 刨花润楠总 DNA 的电泳图谱清晰完整, 片段大于 20 kb, 无降解拖尾现象产生, 无明显 RNA 存在, 点样孔附近无滞留物。经估算, 蛋白快速检测仪检测所提取 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值均为 1.73~1.92, 质量体积浓度为 20~80 ng/ $\mu$ L, 符合 SRAP-PCR 模板要求。

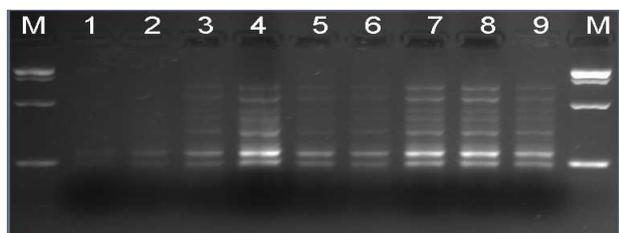
### 2.2 刨花润楠 SRAP-PCR 反应体系的优化

**2.2.1 DNA 模板用量** 模板 DNA 用量直接影响 SRAP-PCR 扩增结果的条带。对刨花润楠总 DNA 进行 PCR 扩增, 电泳检测扩增结果见图 2。结果显示, DNA 模板量对反应的影响相对较大, 但 DNA 用量在 10~80 ng 时均可扩增出条带, 而以模板用量为 60~80 ng 时最为稳定; 模板用量低于 60 ng 时, 扩增条带较少。结合本试验的结果, 确定 60 ng 为最佳 DNA 模板用量。



注: 材料为 1.5 a 生幼苗幼嫩叶片。

图 1 刨花润楠 10 株不同幼苗基因组总 DNA 提取电泳图



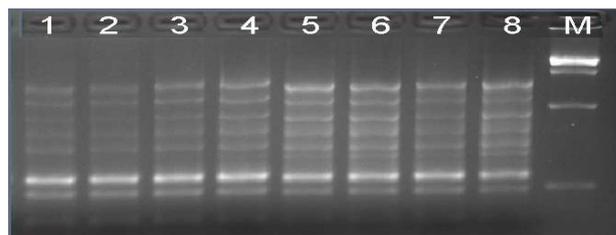
注: 1~9 分别为模板 DNA 用量 5、10、20、30、40、50、60、70、80 ng。

图 2 基因组 DNA 模板量对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响

**2.2.2 Taq DNA 聚合酶浓度** Taq DNA 聚合酶的

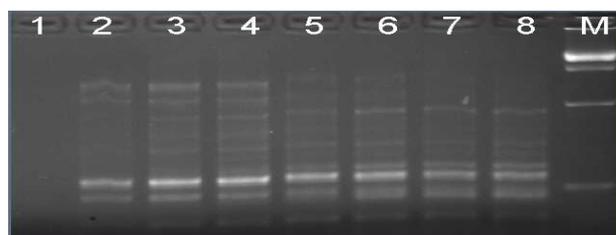
活性和用量对 SRAP-PCR 反应影响较大。由图 3 可以看出, 0.25~2.00 U 都可以得到扩增条带, 聚合酶用量过低时, PCR 反应无法完全进行, 条带较为模糊; 1.25~1.50 U 时效果最好, 扩增结果稳定性好、多态性高; 随着酶用量增大, 易产生部分非特异性产物且出现拖尾现象。据此, 本试验最终采用的 Taq 酶适宜用量为 1.25 U。

**2.2.3  $Mg^{2+}$  浓度**  $Mg^{2+}$  摩尔体积浓度是影响 SRAP-PCR 反应的主要因素之一。本研究中对不同摩尔体积浓度的  $Mg^{2+}$  进行 PCR 扩增, 结果 (图 4) 表明,  $Mg^{2+}$  摩尔体积浓度对反应的影响较为明显, 当  $Mg^{2+}$  为 0 时无扩增条带出现; 随着  $Mg^{2+}$  的增加, 扩增条带亮度明显增大; 当增至 2.0 mmol/L 时, 条带清晰, 此时效果最佳; 当  $Mg^{2+}$  为 3.6 mmol/L, 产生的扩增条带模糊且特异性差。故选择 2.0 mmol/L 为最佳。



注: 1~8 分别为 Taq 酶 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 U。

图 3 TaqDNA 聚合酶量对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响



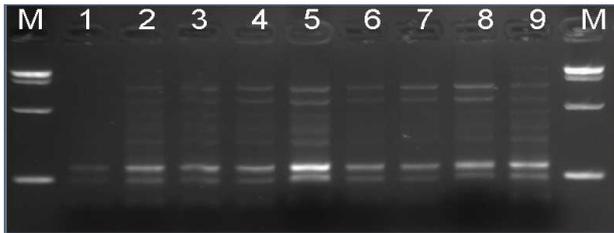
注: 1~8 分别为  $Mg^{2+}$  摩尔体积浓度 0、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 mmol/L。

图 4  $Mg^{2+}$  摩尔体积对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响

**2.2.4 dNTP 浓度** dNTP 是 SRAP-PCR 扩增反应的原料。由图 5 可知, 当 dNTP 为 0.125~0.325 mmol/L 时, 都能扩增出条带, dNTP 介于 0.125~0.225 mmol/L 之间时, 扩增条带相对较少且较为模糊, 当 dNTP 为 0.225 mmol/L 时, 此时扩增条带最多且最为清晰; dNTP 大于 0.225 mmol/L, 随着摩尔体

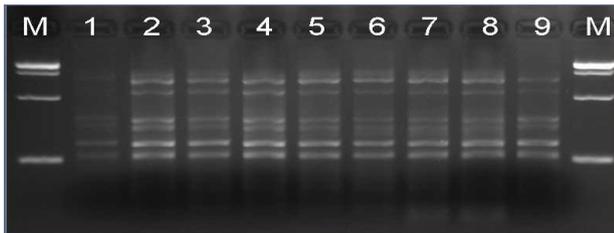
积浓度增加,扩增条带逐渐减弱。据此,本试验最终确定 dNTP 的摩尔体积浓度为 0.225 mmol/L。

**2.2.5 引物浓度** 引物的浓度直接影响 PCR 扩增效果。由图 6 可知,当引物低于 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ,扩增产物较少;当引物在 0.3~0.5  $\mu\text{mol/L}$  时,扩增产物条带多且条带清晰稳定。之后,随着引物增加,扩增条带清晰度降低。根据该试验结果,将适宜的引物摩尔体积确定为 0.3  $\mu\text{mol/L}$ 。



注: 1~9 分别为 dNTP 摩尔体积浓度 0.125、0.150、0.175、0.200、0.225、0.250、0.275、0.300、0.325 mmol/L。

图 5 dNTP 摩尔体积浓度对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响



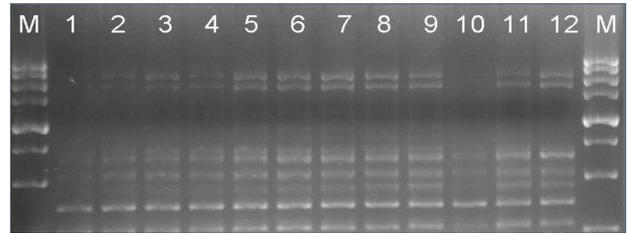
注: 1~9 分别为引物摩尔体积浓度 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。

图 6 引物摩尔体积对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响

**2.2.6 退火温度** 退火温度直接影响引物与模板 DNA 的特异性结合能力。由图 7 可知,本试验中,当退火温度为 54.7~56.9  $^{\circ}\text{C}$  时,扩增出的谱带多且清晰明亮,故确定 PCR 反应体系中退火温度为 56  $^{\circ}\text{C}$ 。在引物筛选时,针对不同引物退火温度可做适当的调整。

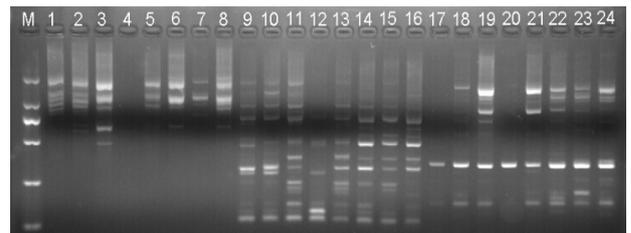
**2.2.7 SRAP-PCR 最佳反应体系的验证** 综合以上各试验及所获结果,从扩增产物条带稳定性和节约成本角度考虑,刨花润楠 SRAP-PCR 最佳反应体系为: 25  $\mu\text{L}$  的 SRAP-PCR 反应体系中, 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer、模板 DNA 量 60 ng、 $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L、dNTP 0.225 mmol/L、引物 0.3  $\mu\text{mol/L}$  和 Taq DNA 聚合酶 1.25 U。运用不同引物组合 (Me18/Em7、Me18/Em6 和 Me24/Em9) 分别对刨花润楠 8 个家系样品进行验证 (图 8), 检验结果

表明引物能对绝大多数的个体扩增出清晰谱带,说明优化的刨花润楠 SRAP-PCR 反应体系和扩增程序是稳定可行的。



注: 1~12 分别为退火温度 50.0、50.5、51.2、52.1、53.5、54.7、55.6、56.9、58.1、59.1、59.7、60.0  $^{\circ}\text{C}$ 。

图 7 退火温度对刨花润楠 SRAP-PCR 反应的影响



注: 泳道 1~8 为 Me18/Em7 扩增产物条带, 泳道 9~16 为 Me18/Em6 扩增产物条带, 泳道 17~24 为 Me24/Em9 扩增产物条带。

图 8 应用 SRAP-PCR 优化体系对刨花润楠不同样本进行多态性检测

### 3 结论与讨论

本试验使用 omega 试剂盒,采用改良 CTAB 法提取刨花润楠的基因组 DNA,试验中发现,在提取过程中,加入 24:1 的氯仿:异戊醇混合液充分振荡混匀后,在 18~20  $^{\circ}\text{C}$  环境中离心,可有效提高 DNA 得率及质量。

对于不同的林木材料,扩增体系所用的 DNA 模板量、Taq 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP、引物摩尔体积浓度差异均很大,本试验所得到的 SRAP-PCR 扩增体系与麻疯树 (*Jatropha carcas*)<sup>[24]</sup>、石斛 (*Dendrobium nobile*)<sup>[25]</sup>、杨树 (*Populus sp.*)<sup>[26]</sup>、油茶 (*Camellia oleifera*)<sup>[27]</sup> 等的扩增体系及循环条件都有所不同,这可能与不同材料的基因组和材料本身的特殊性以及对试验结果条带的判断具有主观性等有关,因而需要对 PCR 体系进行不断优化。PCR 循环条件中的退火温度对反应影响较大,该反应中退火温度相比其他已报道麻疯树、石斛、油茶、杨树等植物偏高,筛选出的适宜退火温度 (56  $^{\circ}\text{C}$ ) 与理论退火温度 (50  $^{\circ}\text{C}$ )<sup>[28]</sup> 存在较大差异。但同时退火温度过高或过低都不能

得到良好的扩增产物; 扩增体系中 DNA 模板量和  $Mg^{2+}$  浓度对反应的影响相对较大, 微量变化就有可能导致 SRAP-PCR 的结果发生较大变化, 合理调整 DNA 模板和  $Mg^{2+}$  摩尔体积浓度对反应的扩增很重要。

利用本试验优化所得的 SRAP-PCR 反应体系, 对刨花润楠 23 个种源进行 SRAP 扩增, 扩增结果表明在不同种源的刨花润楠中均能获得清晰稳定的条带, 不同种源间表现出明显的多态性<sup>[29]</sup>。由此可见, 该反应体系可用于刨花润楠的遗传多样性分析。

### 参考文献

- [1] 胡希华. 刨花润楠的优良特性及育苗栽培技术[J]. 湖南林业科技, 2006, 33(1): 65-66.
- [2] 吴振伙, 吴兆平, 全尚龙. 刨花润楠综合利用价值及其育苗技术[J]. 现代农业科技, 2008(20): 55.
- [3] 钟智群, 谭梓峰, 杨志玲, 等. 刨花楠生长发育特点及开发前景分析[J]. 湖南林业科技, 1997, 24(2): 50-51.
- [4] 程栋梁, 靳冰洁, 徐朝斌, 等. 年龄对刨花楠胸径生长速率的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(1): 28-31.
- [5] 徐朝斌, 钟全林, 程栋梁, 等. 江西4刨花楠种源苗木叶片表型性状与生物量分配的比较[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(6): 920-924.
- [6] 张冬生, 谢金兰, 叶雪兰, 等. 基于层次分析法与熵技术法的野生刨花润楠观赏性评价[J]. 林业与环境科学, 2016, 32(1): 23-30.
- [7] 罗阿水. 刨花楠容器育苗技术研究[J]. 福建林业科技, 2012, 39(3): 126-129.
- [8] 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 genotyping in Brassica[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [9] 王国泽, 左福元, 曾兵. SRAP分子标记的研究进展及在植物上的应用[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(9): 92-95.
- [10] LI G, GAO M, YANG B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(1): 168-180.
- [11] 井赵斌, 徐明, 雷玉山. 猕猴桃SRAP-PCR体系的建立及品种资源亲缘关系研究[J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 337-346.
- [12] 李达, 熊兴耀, 于晓英, 等. 红花檵木SRAP反应体系的建立及优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(5): 22-27.
- [13] 刘君, 李东, 曾林, 等. SRAP分子标记分析辣椒种质资源遗传多样性研究[J]. 中国调味品, 2015, 12(40): 48-51.
- [14] 王燕, 龚义勤, 赵统敏, 等. 番茄SRAP-PCR体系优化与品种分子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 23-29.
- [15] 李怀志, 张峻, 李翔, 等. 应用SRAP标记对茄子品种进行遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4): 18-22.
- [16] 艾鹏飞, 苏姗, 靳占忠. 仁用杏品种SRAP遗传多样性分析及指纹检索系统的开发[J]. 园艺学报, 2014, 41(6): 1191-1197.
- [17] 廖柏勇, 王芳, 陈丽君, 等. 基于SRAP分子标记的苦楝种质资源遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2016, 52(4): 48-58.
- [18] 李培, 阙青敏, 欧阳昆啼, 等. 不同种源红椿SRAP标记的遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2016, 52(1): 62-70.
- [19] 杨会肖, 刘天颐, 罗锐, 等. 用SRAP标记构建松树良种指纹图谱方法的研究[J]. 广东林业科技, 2012, 28(5): 1-8.
- [20] 刘振, 赵洋, 杨培迪, 等. SSR、SRAP、ISSR分子标记在茶树品种亲本鉴定上的比较分析[J]. 茶叶科学, 2014(6): 617-624.
- [21] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的CTAB法提取植物DNA的方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
- [22] 李建军, 刘志坚, 肖层林, 等. SRAP技术在遗传的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 783-786.
- [23] 刘玉香, 宋晓琛, 江香梅. 润楠ISSR-PCR优化反应体系建立及引物筛选[J]. 林业科技开发, 2013, 27(5): 24-28.
- [24] 仲丛来, 丁贵杰, 沈凌. 麻疯树SRAP-PCR反应体系的优化[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(4): 19-22.
- [25] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 石斛属植物SRAP反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6S): 153-156.
- [26] 谭碧玥, 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.
- [27] 祝全东, 张党权, 李晓云, 等. 油茶SRAP标记的PCR体系建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(3): 57-62.
- [28] 卢盛栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458-463.
- [29] 周鹏, 林玮, 朱芹, 等. 基于SRAP分子标记的刨花润楠遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(9): 16-24.