

温郁金 SRAP-PCR 反应体系建立及条件优化

王晓慧^{1,2}, 吴亮², 姜程曦^{2*}

1. 吉林省农业科学院 农业资源与环境研究所, 吉林 长春 130033

2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 研究温郁金 *Curcuma wenyujin* 的 SRAP-PCR 扩增体系最适宜的条件。方法 以提取纯化温郁金基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增技术, 对 SRAP 反应中主要影响因素 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 质量浓度、引物浓度、Taq 聚合酶浓度进行优化。结果 根据实验确定的最佳体系为 25 μ L SRAP 反应体系, 其中 Mg^{2+} 2.0 mmol/L, Taq 聚合酶 2.0 U, 引物浓度 1.6 μ mol/L, 模板 DNA 0.4 ng/ μ L, dNTP 2.0 mmol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L。结论 通过扩增条件优化实验, 扩增的产物条带清晰明亮、重复性好, 确定的反应体系及反应程序适用于温郁金的 SRAP 分子标记, 为今后温郁金的遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 温郁金; 基因组 DNA; SRAP-PCR 反应体系; SRAP 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)14-2515-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.021

Optimization of SRAP-PCR reaction systems for *Curcuma wenyujin*

WANG Xiao-hui^{1,2}, WU Liang², JIANG Cheng-xi²

1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China

2. School of Pharmaceutical Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To research on the most appropriate SRAP-PCR amplification system of *Curcuma wenyujin*. **Methods** The concentration of Mg^{2+} , dNTP, template DNA, primer, and Taq polymerase was optimized by amplifying technology and method of PCR based on isolating genomic DNA from *C. wenyujin*. **Results** The best amplification system for *C. wenyujin* was as follows: total reaction volume of 25 μ L, including Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.0 μ L, Taq polymerase (5 U/ μ L) 0.4 μ L, random primer (20 μ mol/L) 2 μ L, template DNA (5 ng/ μ L) 2.0 μ L, dNTP (25 mmol/L) 2.0 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L. **Conclusion** The stripes of amplification products are clearness, high brightness, and good reproducibility. It indicates that the reaction system and reaction procedures which are confirmed in this experiment are applied to the SRAP molecular markers in *C. wenyujin*, based for the genetic diversity of *C. wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; genomic DNA; SRAP-PCR reaction system; SRAP molecular markers; genetic diversity

温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 是浙江省著名道地药材, 为《中国药典》多版收载品种, 根茎干燥后为温莪术, 是我国常用名贵中药材, 其性味辛、苦、温, 归肝、脾经。具行气破血、消积止痛功效。药理研究显示, 其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗早孕、抗菌、升高白细胞、保肝、抑制血小板聚集和抗血栓形成等作用。临床用量和工业化生产用量十分巨大, 现代研究表明, 莪术的主要成分为挥发油, 挥发油中含有牻牛儿酮、莪术二酮、莪术醇等^[1-3]。但是由于温郁金道地性强, 农民连年种植, 再加上长期

过度采收, 野生资源急剧减少, 导致遗传变异逐渐减少, 利用 DNA 分子标记技术对温郁金种质资源的遗传多样性进行研究, 进而选育温郁金优异品质是提高其遗传多样性的方法之一^[4]。

相关序列多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 又称为基于序列扩增多态性 (sequence-based amplified polymorphism, SBAP), 是近年发展起来的一种新型分子标记系统, 由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年提出^[5]。具有简便、稳定、中等产率、高共显性、

收稿日期: 2016-06-01

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAI04B04); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H280014); 云南大理药业股份有限公司课题 (KJHX1603)

作者简介: 王晓慧 (1981—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为药用植物栽培。Tel: 13504700957 E-mail: nongdawxh@126.com

*通信作者 姜程曦 (1971—), 男, 安徽青阳人, 副研究员, 博士, 研究方向为中药学。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

易于测序等优点。它利用独特的引物设计对基因的可译框 (ORFs) 区域进行扩增, 正、反引物分别与外显子和内含子 (或启动子) 区域配对, 因不同物种、不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性^[6-7]。SRAP-PCR 扩增程序采用复性变温法, 前 5 个循环复性温度为 35 °C, 后 35 个循环为 50 °C。它既克服了 RAPD 重复性差的缺点, 又克服了 AFLP 技术复杂、成本昂贵的缺点, 以其操作简便迅速、成本低、可靠性好、重复性高、易于测序等特点迅速被各国分子生物学家所接受。目前 SRAP 已在植物图谱构建、遗传多样性评价、基因定位和比较基因组学等方面成功应用^[8-11]。然而, SRAP 技术结果受到 Mg^{2+} 、dNTP 浓度、模板 DNA 浓度等因素的影响, 各因素对不同的反应条件和物种影响有所不同^[12], 所以, 本实验对 SRAP-PCR 反应体系的各影响因素进行优化, 以期建立一个稳定可靠的反应体系, 为探索温郁金遗传多样性提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

11 批样品采自于温州陶山镇 (1~4)、马甲镇 (5~8)、仙降镇 (9~11), 经成都中医药大学李敏教授鉴定为温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 叶片, 样品采集后, 立即密封, 放入冰桶内, 回到实验室后, 及时清洗, 并存放于 -70 °C 超低温冰箱, 备用。

1.2 基因组 DNA 的制备

叶片用液氮研磨, 采用改良的 CTAB 法提取^[13]。

1.3 DNA 样品的检测

所提取的 DNA 用紫外可见分光光度计, 以 A_{260} 与 A_{280} 的比值计算样品 DNA 纯度, A_{260}/A_{280} 均在 1.7~1.9, 符合 PCR 对 DNA 纯度的要求。然后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和凝胶自动成像系统检测所提 DNA 的完整性, PCR 扩增检测 DNA 提取的效果。DNA 质量浓度定为 5 ng/ μ L, 于 -20 °C 冰箱中保存、备用。

1.4 SRAP 反应体系主要因素用量筛选

分别将 SRAP-PCR 反应体系的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 质量浓度、引物浓度以及 Taq 聚合酶量进行考察, 并进行优化筛选。PCR 扩增程序为 1 个循环的 94 °C 预变性 5 min; 5 个循环的 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 复性 1 min, 35 个循环的 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 复性 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min。

25 μ L 反应终产物中, 吸取 6 μ L 反应液与 2 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合, 扩增产物在含 0.5 μ L 溴化乙锭 (EB) 的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE, 电泳强度为 5 V/cm, 电泳完毕, 凝胶成像系统下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 温郁金叶片基因组的质量

对温郁金叶片 DNA 进行抽提, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪中分析结果见图 1, 结果显示温郁金 DNA 相对分子质量在 15 000 以上, 确定为基因组 DNA, 提取的 DNA 只有 1 条带, 说明其具有良好的完整性, 经紫外分光光度计检测, 其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 左右, 可用作 SRAP 的模板。

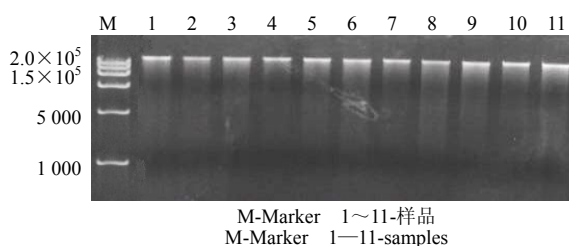


图 1 温郁金叶片基因组 DNA 的质量图谱

Fig. 1 Quality of genomic DNA from leaves of *C. wenyujin*

2.2 SRAP 引物筛选

不同引物的扩增结果各不相同。因此选择条带数较多且清晰、稳定性好的扩增引物非常重要。从 10 条上游引物和 10 条下游引物随机组合中选出 10 种组合能在所有的温郁金中扩增出片段多, 亮度大的条带, 本实验采用 1 号引物用于 SRAP 分析 (表 1)。

2.3 电泳检测方法分析

琼脂糖电泳检测方法最为简单、快捷, 但是其电泳后的条带过于模糊, 不容易辨认; 聚丙烯酰胺银染方法比较烦琐、耗时, 并且显色时间不容易控

表 1 SRAP 扩增引物筛选结果

Table 1 Screening result of SRAP amplification primer

序号	上游核苷酸碱基序列 (5'-3')	下游核苷酸碱基序列 (5'-3')
1	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTC
2	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTCGA
3	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTC
4	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTCGA
5	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTC
6	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAAT
7	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTCGA
8	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTC
9	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTC
10	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAAT

制。染色时间过短，条带没有全部显现出来，染色时间过长又不容易分辨条带；聚丙烯酰胺 EB 染色相对来说耗时中等，但其最大的优点就是染出来的条带清晰，所以本实验采用这种电泳检测方法。

2.4 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 反应的影响

Mg^{2+} 不仅影响酶的活性，还影响扩增的真实性和扩增产物的特异性， Mg^{2+} 浓度过低会使带型较少，过高则产生弥散现象，条带减少出现非特异性扩增，所以选择合适的 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 反应至关重要^[14]。不同浓度 Mg^{2+} (0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mmol/L，编号 1~7) 对 SRAP 扩增结果的影响如图 2-A 所示， Mg^{2+} 浓度过低扩增的条带数过少， Mg^{2+} 浓度高于 2.5 mmol/L 时，扩增的条带亮度降低，根据实验结果， Mg^{2+} 浓度确定为 2.0 mmol/L。

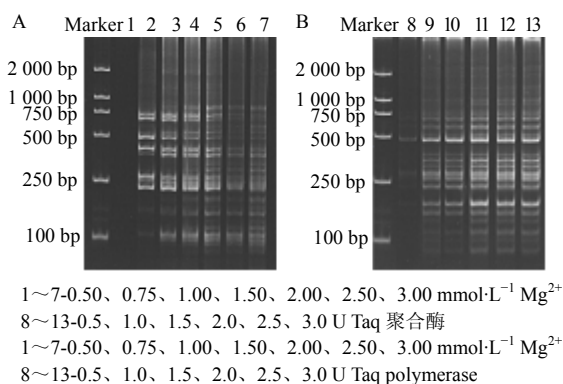


图 2 Mg^{2+} (A) 和 Taq 聚合酶 (B) 浓度梯度的 SRAP 扩增
Fig. 2 SRAP amplification of Mg^{2+} (A) and TaqE (B)

2.5 Taq 聚合酶浓度对 SRAP-PCR 反应的影响

Taq 聚合酶浓度过高，会增加非特异性扩增产物，使电泳图谱背景呈弥散状；浓度过低，则无法增加产物或产物不稳定^[15]。考察不同浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U，编号 8~13) Taq 聚合酶浓度优化的扩增结果，见图 2-B。25 μ L 反应体系中，Taq 聚合酶浓度为 0.5~1.0 U 时，条带少且弱。Taq 聚合酶浓度为 1.5~3.0 U 时，条带多且亮度好，最终确定 Taq 聚合酶为 2.0 U。

2.6 引物浓度和模板 DNA 用量对 SRAP-PCR 反应的影响

引物浓度和模板 DNA 用量是影响 PCR 反应的重要因素。通过对不同引物浓度 (0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 μ mol/L，编号 1~7) 和不同模板质量浓度 (0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 ng/ μ L，编号 8~13) 的实验，最终确定引物浓度和模板 DNA 用量分别为 1.6 μ mol/L 和 0.4 ng/ μ L (图 3)。

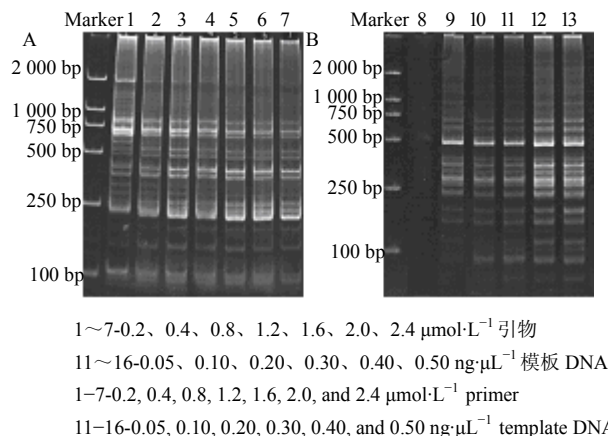


图 3 引物浓度 (A) 和模板 (B) DNA 浓度的 SRAP 扩增结果
Fig. 3 SRAP amplification of primer (A) and template (B) concentraion

2.7 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 反应的影响

考察不同 dNTPs 浓度 (1.0、1.5、1.8、2.0、2.2、2.5、2.8 mmol/L，编号 1~7) 对 PCR 反应的影响，结果显示，当 dNTPs 浓度过低或过高时，均不能扩增出较好的条带；dNTPs 的浓度在 2.0~2.5 mmol/L 时，反应体系扩增出的条带较好，但从实验的总体和经济角度来看，最后确定 dNTPs 的浓度为 2.0 mmol/L，见图 4。

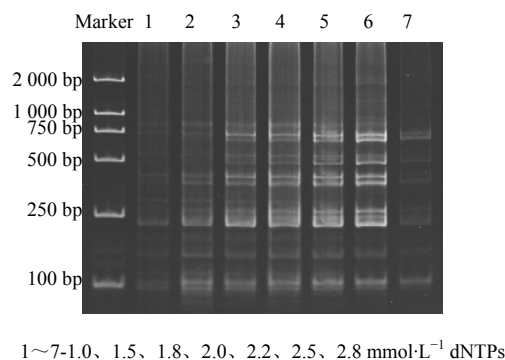


图 4 dNTPs 浓度梯度的 SRAP 扩增结果
Fig. 4 SRAP amplification of dNTPs concentration

3 讨论

PCR 反应体系直接影响 PCR 扩增多态性位点的数量及遗传多样性结果的正确性，建立适宜的 PCR 反应体系是进行遗传多样性研究的首要条件，扩增条件的变化会对 SRAP 图谱产生较大的影响，从而影响 SRAP 分析的准确性^[13]。从实验结果可以看出温郁金 SRAP 分析较适宜的扩增条件为总体积 25 μ L 时， Mg^{2+} 2.0 mmol/L，Taq 聚合酶 2.0 U，引物浓度 1.6 μ mol/L，模板 DNA 0.4 ng/ μ L，dNTP 2.0 mmol/L，10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L；PCR 扩增程序

为 1 个循环的 94 °C 预变性 5 min; 5 个循环的 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 复性 1 min, 35 个循环的 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 复性 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min。

DNA 分子标记技术是基于生物个体间或种群间基因组 DNA 某一片段的不同而反映生物个体或种群间的差异, 被广泛应用于遗传多样性分析。目前, 应用较广泛的分子标记技术有 RAPD、ISSR 和 SRAP 技术^[16]。其中, SRAP 技术因操作简单、方便而应用最广泛, PCR 反应体系是 SRAP 分子标记的基础环节, 利用 SRAP 技术进行辅助的应用繁多^[17]。本课题组用 RAPD-PCR 和 ISSR-PCR 反应体系对温郁金的基因组 DNA 进行扩增, 并进行遗传多样性分析, 发现 SRAP-PCR 反应体系的稳定性最好, 扩增的条带清晰明亮, 3 种方法中, SRAP-PCR 反应体系的可重复性最强。林戎斌等^[18]对姬松茸菌株的研究也发现, SRAP 标记比 ISSR 标记和 RAPD 标记能发现更大的遗传差异。

PCR 反应体系的合适与否直接影响 PCR 扩增多态性位点的数量及遗传多样性结果的精确性, 因此建立一个适宜的 PCR 反应体系是进行遗传多样性研究的首要条件。目前, 应用于 PCR 体系优化的方法较多, 其中以正交试验设计和单因素法应用最多。刘颖等^[19]和吴莺莺等^[20]采用正交设计对山野豌豆 SRAP-PCR 体系进行研究, 叶新如等^[17]和李红双等^[21]采用单因素试验法对西瓜和萝卜的 SRAP-PCR 体系进行研究。正交试验设计是统计数学的重要分支, 运用这种方法可以达到减少试验次数, 缩短试验周期, 降低试验和生产成本, 迅速找到优化方案, 实现最大效益的目的; 但该方法也有一定的局限性, 如对试验结果本身优劣的判断具有主观性, 不能很好地估计试验误差, 也不能表明各试验因素水平的交互作用^[22]。单因素分析法可直观快速地得到该因素对扩增程序的影响, 工作量较小, 能够快速确定各因素的最佳浓度, 但是忽略了各因素间的相互作用^[23]。本实验用单因素分析法研究各因素对 SRAP-PCR 体系的影响, 下一步将继续采用正交试验法研究各因子之间的交互作用。

参考文献

- [1] 王艳红, 朱艳萍, 杨信东, 等. 温郁金抗炎抗氧化活性内生真菌的筛选 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 90-94.
- [2] An Y W, Hu G, Yin G P, et al. Quantitative analysis and discrimination of steamed and non-steamed rhizomes of

- Curcuma wenyujin* by GC-MS and HPLC [J]. *J. Chromatogr Sci*, 2014, 52: 961-970.
- [3] 祝明, 张鹏, 唐登峰, 等. 莪术油的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 81-84.
- [4] 王晓慧, 汤晓闯, 杨恩秀, 等. 温郁金 RAPD-PCR 反应体系建立及条件优化 [J]. 北方园艺, 2008(4): 226-229.
- [5] 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.
- [6] 李仁伟, 王晨, 戴思兰, 等. 菊花品种表型性状与 SRAP 分子标记的关联分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1355-1364.
- [7] 彭邵锋, 张党权, 陈永忠, 等. 14 个油茶良种遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(1): 80-85.
- [8] 王硕, 何金宝, 农民英, 等. 薏苡种质资源的 SRAP 分子标记研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 112-117.
- [9] 刘晨, 高明伟, 刘超, 等. 基于表型和 SRAP 标记的唐菖蒲品种遗传多样性分析 [J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(5): 57-65.
- [10] 柴锐, 刘红昌, 李金玲, 等. 基于 SRAP 分子标记的天麻遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2974-2981.
- [11] 邹自征, 陈建华, 栾明宝, 等. 应用 RSAP、SRAP、SSR 分析苧麻种质亲缘关系 [J]. 作物学报, 2012, 38(5): 840-847.
- [12] 赵艳琴, 吴元华, 赵秀香, 等. 烟草靶斑病菌 (*Rhizoctonia solani*) SRAP-PCR 体系建立及优化 [J]. 中国烟草学报, 2014, 20(3): 96-101.
- [13] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. 热带亚热带学报, 2003, 11(1): 15-20.
- [14] 令狐斌, 侯思宇, 孙朝霞, 等. 苦荞 SRAP 分子标记体系优化与遗传多样性分析 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 20(1): 37-43.
- [15] 王新民, 郑仁华, 陈金慧, 等. 杉木 SRAP-PCR 体系优化 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(1): 15-20.
- [16] 宗成堃, 宋振巧, 陈海梅, 等. 利用 SSR、SRAP 和 ISSR 分子标记构建首张丹参遗传连锁图谱 [J]. 药学报, 2015, 50(3): 360-366.
- [17] 叶新如, 朱海生, 温庆放, 等. 丝瓜 SRAP 反应体系的优化 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(3): 673-678.
- [18] 林戎斌, 张慧, 林陈强, 等. ISSR、RAPD 和 SRAP 分子标记技术在姬松茸菌株鉴定上的应用比较 [J]. 福建农业学报, 2012, 27(2): 149-152.
- [19] 刘颖, 王显国, 张巨明, 等. 正交设计优化山野豌豆 SRAP-PCR 反应体系与引物筛选 [J]. 草业学报, 2012, 21(5): 325-330.
- [20] 吴莺莺, 彭方仁, 郝明灼, 等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立 [J]. 南京林业大学学报, 2011, 35(5): 112-116.
- [21] 李红双, 邱杨, 李锡香. 萝卜 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 华北农学报, 2009(24): 91-95.
- [22] 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.
- [23] 王方, 袁庆华. 冰草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 草地学报, 2009, 17(3): 354-357.