

胡黄连 SRAP 反应体系的建立与引物筛选^{*}

任李玥^{1,2}, 刘小莉^{1△}

(1. 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500; 2. 云南省食品药品检验所, 云南昆明 650011)

[摘 要] 目的: 建立胡黄连 SRAP 的反应体系, 并筛选出适合胡黄连的引物组合, 为胡黄连的遗传多样性研究奠定基础。方法: 采用 5 因素 (dNTP、 Mg^{2+} 、Taq 酶、引物、DNA) 4 水平正交试验一步法建立 SRAP-PCR 的反应体系, 采用梯度温度法筛选 PCR 反应程序的最佳退火温度, 对已发表的 SRAP 引物组合进行了筛选。结果: 胡黄连 SRAP-PCR 的最佳反应体系, 即 20 μ L 反应体系: 10 $\times$ buffer 2 μ L, dNTP 150 μ mol $\cdot$ L⁻¹, Mg^{2+} 3 mmol $\cdot$ L⁻¹, Taq 酶 2 U, 引物为 0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹, DNA 为 20 ng, DMSO 1 μ L; 最适的退火温度是 30.0 $^{\circ}$ C ~ 33.2 $^{\circ}$ C; 最适的引物组合为 Me1Em1, Me1Em2, Me1Em3, Me3Em3, Me1Em4, Me2Em4, Me3Em4, Me4Em4, Me1Em5, Me3Em5, Me4Em5, Me3Em6, Me4Em6。结论: 该体系是适合胡黄连 SRAP-PCR 反应的最适宜体系, 为今后胡黄连遗传多样性研究奠定了基础。

[关键词] 胡黄连; SRAP; 引物筛选

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2011)06-0007-04

胡黄连 *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Pennell) Hong 为玄参科 Scrophulariaceae 胡黄连属 *Neopicrorhiza* 的多年生草本植物, 分布区狭窄, 特产东喜马拉雅和横断山区^[1]。根状茎为重要的中、藏药材, 具有清湿热, 除骨蒸、消痞热的功效^[2]。由于过度采挖, 资源濒临枯竭, 作为国家二级保护植物, 列入《中国珍稀濒危保护植物名录》中^[3]。对其继续科学保护和合理利用已刻不容缓。

相关序列扩增多态性 (SRAP, Sequence-related Amplified Polymorphism) 是由 Li 和 Quiros^[4] 于 2001 年发展起来的一种分子标记。其原理是针对基因外显子中 GC 含量丰富, 而启动子、内含子中 AT 含量丰富的特点来设计两组引物进行 PCR 扩增, 因不同个体的内含子、启动子与外显子间隔区长度不等而产生多态性。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点, 已成功地应用于多个物种遗传多样性分析^[5-6]、遗传图谱的构建^[7]等方面。对不同植物类群而言, SRAP 的最佳反应条件会有所差别, 本实验拟摸索适合胡黄连 SRAP 扩增反应的条

件, 为后续基于 SRAP 探讨胡黄连的遗传多样性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用样品采自西藏定日县 (N86 $^{\circ}$ 26', E28 $^{\circ}$ 08', 4 248 m) 胡黄连幼嫩叶片, 硅胶干燥后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2 试剂

琼脂糖购自 GENE TECH (SHANGHAI) COMPANY LIMITED; Tris-HCl、EDTA 购自美国 AM-Resco 公司; 二甲基亚砜购自云科生物工程公司; SRAP 引物由上海生物工程有限公司合成; dNTPs、RNA 酶、Taq 酶购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 仪器

Eppendorf AG 离心机, Biometra PCR 仪, BIO-RAD 凝胶成像系统, BIO-RAD 电泳仪, Bio-Photometer plus 核酸蛋白测定仪, XW-80A 型漩涡混合器等。

1.4 实验方法

1.4.1 基因组 DNA 提取与检测

* 基金项目: 云南省自然科学基金面上项目 (NO: 2010CD073)

收稿日期: 2011-06-20 修回日期: 2011-06-28

作者简介: 任李玥 (1985 ~), 女, 云南思茅人, 中药师, 主要从事进行食品药品检验工作。△通讯作者: 刘小莉, E-mail: kmxunzi@yahoo.com.cn

采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性，根据样品 OD260/OD280 计算 DNA 纯度；根据 OD260 值计算样品 DNA 浓度，稀释至 $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.4.2 正交反应体系建立

由于本课题组前期研究发现，模板 DNA 在很大的一个浓度范围内对 PCR 反应体系均无影响，因此本文未对 DNA 模板浓度进行优化，而是在 $20\mu\text{L}$ 反应体系中直接选用 20ngDNA 作为模板。参考狗牙根^[5]、丹参^[8] 的 SRAP 反应条件，初设 dNTP、Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物浓度、模板浓度各 4 个水平，dNTP 分别为 150，200，250， $300\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；Taq 酶分别为 0.5，1.0，1.5， 2.0U ； Mg^{2+}

分别为 1.5，2.0，2.5， $3.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；引物浓度分别为 0.2，0.3，0.4， $0.5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；模板浓度 5，10，15， 20ng 形成 5 因素 4 水平的试验方案。反应选用引物 Me4Em3，反应体系为 $20\mu\text{L}$ ，内含 $10 \times \text{PCR buffer}$ $2\mu\text{L}$ ，DNA 浓度 20ng ，其余成分按照表 1 进行，建立 16 个反应组合。反应程序为： $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min ，反应前 5 个循环 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1min ， $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1min ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min 。之后 35 个循环复性温度提高到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，最后延伸 1min ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5min ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在含溴化乙锭的 1.8% 琼脂糖凝胶中，以 $0.5 \times \text{TBE}$ 为电泳缓冲液电泳分离，最后用紫外成像系统（Tanon GIS — 2009）观察并成像（见表 1）。

表 1 胡黄连 SRAP L16 (4) 正交试验组合

组合	因子				
	dNTP ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Taq 酶 (U)	Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DNA (ng)
1	150	1.5	0.5	0.2	5
2	150	2.0	1.0	0.3	10
3	150	2.5	1.5	0.4	15
4	150	3.0	2.0	0.5	20
5	200	1.5	1.5	0.3	20
6	200	2.0	2.0	0.2	15
7	200	2.5	0.5	0.5	10
8	200	3.0	1.0	0.4	5
9	250	1.5	2.0	0.4	10
10	250	2.0	1.5	0.5	5
11	250	2.5	1.0	0.2	20
12	250	3.0	0.5	0.3	15
13	300	1.5	1.0	0.5	15
14	300	2.0	0.5	0.4	20
15	300	2.5	2.0	0.3	5
16	300	3.0	1.5	0.2	10

1.4.3 引物筛选

引物采用 Li 和 Quiros^[4] 已发表的引物进行两两配对，共产生 30 对引物组合，以随机选取的胡黄连 DNA 作为模板，采用正交试验中初选出来的

反应体系进行 PCR 扩增。

1.4.4 退火温度筛选

本实验设置了 30.0，30.2，30.9，32.0，33.2，34.4，35.6，36.8，38.0，39.1，39.8，

40.0 ℃共 12 个退火梯度, 共进行两组 PCR 扩增, 第一组每个 PCR 反应体系中加入 1μL 5% 的 DM-SO, 第二组不加, 作为对照。

2 结果与分析

2.1 反应条件的建立

16 个正交实验结果从图 1 可以看出, 6 号以及 9~16 号无扩增产物, 其余均有扩增产物。其中 1, 2, 7, 8 号扩增的条带弱, 3~5 号条带较清楚, 但 3 号和 5 号扩增条带数少, 均予以淘汰。只有 4 号所扩增的条带清晰且条带数多。因此, 确定 16 个组合中第 4 号组合的体系为最理想的 SRAP-PCR 反应体系。



(M: maker; 1~16 代表正交试验的 16 个组合)

图 1 胡黄连正交试验扩增图

2.2 引物筛选

30 条引物组合中有 27 条引物组合能够扩增出片段, 这 27 条引物组合中, 有 13 对引物组合的扩增片段多、清晰、重复性较好 (见表 2), 这 13 对引物组合可以作为胡黄连后续研究的引物。

表 2 30 对 SRAP 引物的筛选结果

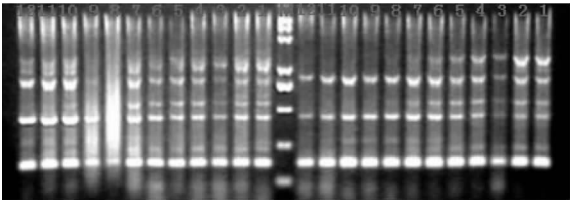
引物	em1	em2	em3	em4	em5	em6
me1	++	++	++	++	++	+
me2	+	+	+	++	+	+
me3	+	+	++	++	++	++
me4	+	+	+	++	++	++
me5	+	+	+	—	—	—

注: + 表示有扩增产物, ++ 表示扩增效率高, - 表示无扩增产物

2.3 退火温度和图谱背景优化

从图 2 可见, 在 30.0~40.0 ℃的退火温度下,

均有扩增, 且退火温度越高, 扩增出的条带越少, 退火温度在 30.0~33.2 ℃范围内均扩增出比较理想的带型。在 PCR 反应体系中添加 5% DMSO 和不加 DMSO 的两组相比较, 前者的图谱背景比不加的要清晰。



泳道 1~12 温度分别是 30.0, 30.2, 30.9, 32.0, 33.2, 34.4, 35.6, 36.8、38.0, 39.1, 39.8, 40.0℃; M - marker; maker 左边的泳道为不加 DMSO, 右边为加 DM-SO。

图 2 不同退火温度对扩增结果的影响

3 讨论

影响 SRAP-PCR 反应的因素相对复杂, 不同植物适合的 SRAP 反应体系不同, 且各因素之间存在互作效应, 4 个因子之间的浓度配比只有达到最佳状态时, 才能得到稳定的、可重复的扩增结果^[9], 本实验采用了一次正交实验, 即建立了适合胡黄连的 SRAP 反应体系: 20μL 反应体系 (含 10 × buffer), dNTP150 μmol · L⁻¹, Mg²⁺ 3.0 mmol · L⁻¹, Taq 酶 2U, 引物 0.5μmol · L⁻¹, DNA 20ng。

Li 和 Quiros^[4]的程序中, 为了让上、下游引物与 DNA 模板能部分配对, 最初 5 个循环的退火温度较低, 设置为 35 ℃, 为了提高引物扩增的特异性, 后 35 个循环反应的退火温度升 50 ℃。由于 SRAP 引物具有通用性, 不同种植物所用的引物组合往往相同, 因此扩增程序差异不大。本研究对 PCR 结果影响较大的退火温度进行了梯度比较试验, 筛选出了 30.0~33.2 ℃的最佳退火温度。

本研究对比了在琼脂糖中添加终浓度 5% 的 DMSO 与对照组 (不加 DMSO) 对电泳图谱背景清晰度的影响, 结果显示加入终浓度 5% 的 DMSO 的电泳图谱的背景明显清晰。据此确定 SRAP 反应最终反应体系为 20μL 反应体系 (含 10 × buffer 2μL), dNTP150μmol · L⁻¹, Mg²⁺ 3.0mmol · L⁻¹, Taq 酶 2U, 引物 0.5μmol · L⁻¹, DNA 20ng, 1μL DMSO, 无菌水补齐, 凝胶电泳时在琼脂糖中添加

5% 的 DMSO。

本实验建立了适用于胡黄连稳定的、重复性强、中等产率的 SRAP - PCR 反应体系，并对 30 条引物组合进行了初步筛选，从 30 对引物组合中筛选到了 13 对扩增片段多、清晰、重复性较好引物组合，结果为 SRAP 技术应用到胡黄连的遗传多样性分析中奠定了基础。

[参考文献]

[1] 吴征镒, 周浙昆, 李德铎, 等. 世界种子植物科的分布区类型系统 [J]. 云南植物研究, 2003, 25 (3): 245 - 257

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 167.

[3] 国家环境保护局. 中国珍稀濒危保护植物名录 (第 1 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1987.

[4] 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 tag-

ging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455 - 461.

[5] 杨益洁, 张新全, 黄琳凯, 等. 野生狗牙根种质遗传多样性的 SRAP 研究 [J]. 遗传, 2008, 30 (1): 94 - 100.

[6] 王常林, 郭巧生, 武玉妹. 明党参遗传多样性的 SRAP 分子标记 [J]. 中国中药杂志. 2009, 24 (34): 3 180 - 3 183.

[7] 高丽霞, 刘念, 黄帮海. 姜黄属 SRAP 分子标记连锁图谱构建 [J]. 云南植物研究, 2009, 31 (4): 317 - 325.

[8] 李廷春, 高正良, 汤志顺. 丹参 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 生物学杂志, 2008, 25 (1): 40 - 44.

[9] 陈大霞, 李隆云, 瞿显友, 等. 正交设计优选味连简单序列重复间扩增多态性反应体系的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (1): 11 - 12.

(编辑: 岳胜难)

Establishment of SRAP Reaction System and Primers Screen for *Neopicrorhiza scrophulariiflora*

REN Li - yue^{1,2}, LIU Xiao - li^{1Δ}

(1. The Centre for Reproducing Fine Varieties of Chinese Medicinal Plants,

Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500, China;

2. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming Yunnan 650011, China)

[ABSTRACT] OBJECTIVE: To develop sequence - related amplified polymorphism reaction system and select suitable primers for *Neopicrorhiza scrophulariiflora*, laying a foundation for subsequent genetic diversity study. METHODS: The orthogonal test with five factors (dNTP、Mg²⁺、Taq polymerase、Primer、DNA) at four levels were designed, then gradient annealing temperature for PCR was used in the test. Thirty pairs primers published were screened as well. RESULTS: The optimum system for *N. scrophulariiflora* in 20μL reaction system was as follows: 10 × buffer 2μL, dNTP150 μmol · L⁻¹, Mg²⁺ + 3 mmol · L⁻¹, Taq polymerase 2 U, primer 0. 5μmol · L⁻¹, DNA 20 ng, DMSO 1μL. The optimum gradient anneal temperature ranged from 30. 0℃ to 33. 2℃ and the best primers were Me1Em1, Me1Em2, Me1Em3, Me3Em3, Me1Em4, Me2Em4, Me3Em4, Me4Em4, Me1Em5, Me3Em5, Me4Em5, Me3Em6, Me4Em6. CONCLUSION: This is the optimum system for SRAP - PCR reaction of *N. scrophulariiflora*, and this research may lay foundations for the further genetic diversity of *N. scrophulariiflora*.

[KEY WORDS] neopicrorhiza scrophulariiflora; SRAP; primer screening