

马铃薯 SRAP-PCR 反应体系优化及验证

张旭, 赵兴奎, 耿淑娟, 彭锁堂, 段永红

(山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 为建立马铃薯最佳的 SRAP-PCR 反应体系, 以马铃薯基因组 DNA 为模板, 采用单因素和正交试验相结合的方法, 对影响 SRAP-PCR 反应体系的 5 个因素(引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度和 Taq DNA 聚合酶用量) 进行优化, 建立马铃薯优化的 SRAP-PCR 反应体系。结果表明: 马铃薯 SRAP-PCR 最佳反应体系中模板 DNA 用量为 60 ng, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, 引物浓度为 0.60 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶用量为 0.75 U。各因素对扩增结果影响依次是: Mg^{2+} 浓度 > Taq DNA 聚合酶用量 > 模板 DNA 用量 > 引物浓度 > dNTPs 浓度。用 6 份马铃薯样品 DNA 对优化体系进行验证, 扩增结果清晰稳定, 可用于马铃薯遗传多样性分析和遗传图谱构建等研究。

关键词: 马铃薯; SRAP-PCR; 体系优化; 单因素试验; 正交设计

Optimization and Validation of SRAP-PCR Reaction System in Potato

ZHANG Xu, ZHAO Xing-kui, GENG Shu-juan, PENG Suo-tang, DUAN Yong-hong

(College of Agriculture, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801)

Abstract: The purpose of this study was to optimize the SRAP-PCR reaction system for potato genomic DNAs. By combining the single factor with the orthogonal experimental design, five factors including the concentration of template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA polymerase and primers were tested, in order to establish the optimal SRAP-PCR reaction system for potato. The results showed that the optimal PCR reaction mixture for SRAP-PCR contained 60 ng template gDNA, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTPs, 0.60 μ mol/L each primer and 0.75U Taq DNA polymerase in a 20 μ L of reaction volume. The PCR amplification in 6 potato DNA samples showed clear and reproducible polymorphic bands. We observed that the contributions of each factor in PCR reaction were variable (Mg^{2+} > Taq DNA polymerase > DNA template > primer > dNTPs). Thus, the optimized SRAP-PCR system can be applied in analysis of the genetic diversity and construction of the genetic map in potato.

Key words: potato; SRAP-PCR; optimization of system; single factor test; orthogonal design

马铃薯蔬粮兼用、营养价值高^[1], 2015 年国家农业部将马铃薯列为我国四大粮食作物之一。为推进马铃薯主食化进程, 优质马铃薯品种的选育成为当前马铃薯产业的重中之重^[2-4]。马铃薯传统育种是通过双亲杂交产生子代, 进行多代无性世代性状评价和选择, 进而培育优良品种。传统的选育方法对双亲的要求较高、受环境因素影响且育种时间较长^[5]。随着分子生物学的飞速发展, 通过分子标记

技术可从分子水平上对马铃薯种质资源进行准确的选择、评价和鉴定, 可为马铃薯优良品种的选育提供可靠、直接的依据, 也极大地缩短了育种进程^[6]。

相关序列扩增多态性 (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) 作为一种新式的分子标记技术, 利用特有的引物设计对开放读码框进行扩增, 具有简单、稳定、高共显性、条带易于分离及成本低等优点^[7-8], 目前在植物遗传多样性分析^[9-10]、遗传图

收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-03-08 网络出版日期: 2018-05-24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180523.1553.001.html>

基金项目: 山西省自然科学基金(201701D121105); 山西省财政支农项目(2015TGSF-10)

第一作者研究方向为基因组学与分子育种; E-mail: zhangxu92525@163.com

通信作者: 段永红, 研究方向为作物分子育种。E-mail: duanyonghongok@163.com

谱构建^[11-12]以及目的基因克隆等研究中广泛应用。近年来,SRAP 标记已被成功应用于多种作物,如甘薯、核桃、南瓜、大豆、水稻、薏苡和葡萄等。同样地,关于 SRAP 反应体系的优化已在香果树、龙爪槐、高粱、红椿和丝瓜等作物上明确了最佳的扩增体系^[13-17],但马铃薯仅有单因子优化试验的研究^[18],通过单因素试验和正交试验相结合确定马铃薯最佳 SRAP-PCR 反应体系的研究还尚未报道。

为此,本研究以山西省主栽马铃薯基因组 DNA 为模板,采用单因素试验和正交试验相结合的方法,对影响 SRAP-PCR 反应体系的引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度和 Taq DNA 聚合酶用量 5 个因素进行优化,建立适合马铃薯的最佳 SRAP-PCR 反应体系,为马铃薯遗传多样性分析、遗传图谱构建以及基因定位等研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选用的马铃薯品种皆为山西省主栽品种(表 1),其中,希森 8 号用于 SRAP-PCR 体系优化,荷兰 15 号、希森 5 号、希森 6 号、希森 8 号、晋薯 24 号和大同里外黄用于最佳体系的验证。SRAP-PCR 体系优化选用引物组合: Me9/Em7、Me1/Em2。SRAP-PCR 最佳反应体系验证选用引物组合: Me4/Em3、Me4/Em8。SRAP 引物序列参照 Li 等^[8]的文献,由生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 2。dNTPs、 $MgCl_2$ 、Taq DNA 聚合酶和 10 × PCR Buffer 等均购自 TaKaRa 公司。PCR 仪产自北京百泰克生物技术有限公司,型号为 GT612。

表 1 供试品种

Table 1 Tested cultivars

序号 No.	品种名称 Name of variety	品种审定编号 Approval number
1	荷兰 15 号	青审薯 2007001 号
2	希森 5 号	蒙审薯 2015002 号
3	希森 6 号	蒙审薯 2016003 号
4	希森 8 号	蒙审薯 2016004 号
5	晋薯 24 号	晋审薯 2014002 号
6	大同里外黄	晋审薯 2013001 号

表 2 SRAP 引物组合序列

Table 2 SRAP primers combination used in this study

引物组合 Primer combination	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequences(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequences(5'-3')
Me1-Em2	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGCG
Me4-Em3	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4-Em8	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTCAT
Me9-Em7	TGAGTCCAAACCGGTCA	GACTGCGTACGAATTCAC

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯基因组 DNA 的提取和检测 采用经改良的 CTAB 法^[19]对采集的马铃薯嫩叶片来进行马铃薯基因组 DNA 的提取。称取马铃薯嫩叶片 1~2 g,放入研钵经液氮研磨至粉末状导入灭菌的离心管,加入 600 μ L 提前在 65 $^{\circ}$ C 预热的 2 × CTAB 和 20 μ L 巯基乙醇,置于 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 60 min,每 10 min 轻轻晃动离心管。再加入 1 mL 的氯仿-异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀 10 min 后放入离心机室温 12000 r/min 离心 10 min,转移上清液于另一新的离心管。加入等体积的异丙醇,放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱 30 min 后会出现絮状沉淀,后经 12000 r/min 离心 10 min 回收沉淀。最后用 70% 无水乙醇清洗沉淀 2~3 次,吹干后溶于 50 μ L ddH₂O 中在 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min。DNA 的浓度和纯度通过核酸检测仪测定并通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。最后将 DNA 的浓度稀释到 50 ng/ μ L 保存至-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.2 马铃薯 SRAP 扩增程序及扩增产物检测 马铃薯 SRAP 扩增程序^[8]:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;5 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,35 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。扩增结果通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(8%)检测。

1.2.3 SPAP-PCR 单因素试验 对影响 SPAP-PCR 扩增的 5 个因素分别进行优化,每个因素设置 8 个浓度梯度水平(表 3)。在研究某一单一因素时,其余因素按参照基础体系进行。马铃薯 SPAP-PCR 扩增反应基础体系为 20 μ L: DNA 50 ng/20 μ L, Mg^{2+} 1.75 mmol/L, dNTPs 0.20 mmol/L, 引物 0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 0.75U/20 μ L, 2 μ L 10 × PCR buffer,其余部分 ddH₂O 补足。

表 3 马铃薯 SRAP 扩增反应单因素试验各因素水平设置

Table 3 The gradients in single factor test of SRAP in potato

因素 Factors	水平 Levels							
	1	2	3	4	5	6	7	8
模板 DNA (ng) Template DNA	10	20	30	40	50	60	70	80
Mg ²⁺ 浓度 (mmol /L) Mg ²⁺ concentration	1. 25	1. 50	1. 75	2. 00	2. 25	2. 50	2. 75	3. 00
dNTPs 浓度 (mmol /L) dNTPs concentration	0. 05	0. 10	0. 15	0. 20	0. 25	0. 30	0. 35	0. 40
引物浓度 (μmol /L) Primer concentration	0. 10	0. 20	0. 30	0. 40	0. 50	0. 60	0. 70	0. 80
Taq DNA 聚合酶 (U) Taq DNA polymerase	0. 25	0. 50	0. 75	1. 00	1. 25	1. 50	1. 75	2. 00

1.2.4 SPAP-PCR 正交试验的设计 为研究 DNA、Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶 5 个因素的浓度或用量分别对 SRAP-PCR 反应体系的影响以及 5 个因素之间的相互作用,参照单因素试验的结果,采用 L₁₆(4⁵) 正交试验设计进行五因素四水平的筛选(表 4、表 5),每个处理重复 3 次。根据电泳条带的强弱、扩增条带的特异性、条带的清晰度以及杂带的数量来对试验结果进行评定打分^[20],最高分为 16 分,最低分为 1 分。通过对评分结果进行极差分析以及利用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 Duncan 多重比较确定马铃薯 SRAP-PCR 最佳反应体系。

表 5 马铃薯 SRAP-PCR L₁₆(4⁵) 正交试验设计

Table 5 L₁₆(4⁵) orthogonal design of SRAP-PCR in potato

组别 No.	因素和水平 Factors and levels					评分结果 Score		
	模板 DNA	Mg ²⁺ 浓度	dNTPs 浓度	引物浓度	Taq DNA	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3
	(ng)	(mmol /L)	(mmol /L)	(μmol /L)	聚合酶 (U)			
	Template DNA	Mg ²⁺ concentration	dNTPs concentration	Primer concentration	Taq DNA polymerase			
1	1(50)	1(1. 25)	1(0. 10)	1(0. 30)	1(0. 50)	1	1	1
2	1(50)	2(1. 50)	2(0. 15)	2(0. 40)	2(0. 75)	12	12	13
3	1(50)	3(1. 75)	3(0. 20)	3(0. 50)	3(1. 00)	5	5	5
4	1(50)	4(2. 00)	4(0. 25)	4(0. 60)	4(1. 25)	7	7	7
5	2(60)	1(1. 25)	2(0. 15)	3(0. 50)	4(1. 25)	15	14	15
6	2(60)	2(1. 50)	1(0. 10)	4(0. 60)	3(1. 00)	16	15	16
7	2(60)	3(1. 75)	4(0. 25)	1(0. 30)	2(0. 75)	11	11	10
8	2(60)	4(2. 00)	3(0. 20)	2(0. 40)	1(0. 50)	2	3	2
9	3(70)	1(1. 25)	3(0. 20)	4(0. 60)	2(0. 75)	14	16	14
10	3(70)	2(1. 50)	4(0. 25)	3(0. 50)	1(0. 50)	10	10	11
11	3(70)	3(1. 75)	1(0. 10)	2(0. 40)	4(1. 25)	13	13	12
12	3(70)	4(2. 00)	2(0. 15)	1(0. 30)	3(1. 00)	6	6	6
13	4(80)	1(1. 25)	4(0. 25)	2(0. 40)	3(1. 00)	9	9	9
14	4(80)	2(1. 50)	3(0. 20)	1(0. 30)	4(1. 25)	8	8	8
15	4(80)	3(1. 75)	2(0. 15)	4(0. 60)	1(0. 50)	4	4	4
16	4(80)	4(2. 00)	1(0. 10)	3(0. 50)	2(0. 75)	3	2	3

1.2.5 马铃薯 SRAP-PCR 最佳体系的验证 以 6 个山西省主栽马铃薯品种(荷兰 15 号、希森 5 号、希森 6 号、希森 8 号、晋薯 24 号、大同里外黄)基因组 DNA 为

表 4 SRAP-PCR 正交试验各因素水平设置

Table 4 Factors and levels in orthogonal design of SRAP-PCR reaction

因素 Factors	水平 Levels			
	1	2	3	4
模板 DNA (ng) Template DNA	50	60	70	80
Mg ²⁺ 浓度 (mmol /L) Mg ²⁺ concentration	1. 25	1. 50	1. 75	2. 00
dNTPs 浓度 (mmol /L) dNTPs concentration	0. 10	0. 15	0. 20	0. 25
引物浓度 (μmol /L) Primer concentration	0. 30	0. 40	0. 50	0. 60
Taq DNA 聚合酶 (U) Taq DNA polymerase	0. 50	0. 75	1. 00	1. 25

模板,随机选用两组引物(Me4/Em3、Me4/Em8)对马铃薯 SRAP-PCR 最佳体系进行稳定性检验。

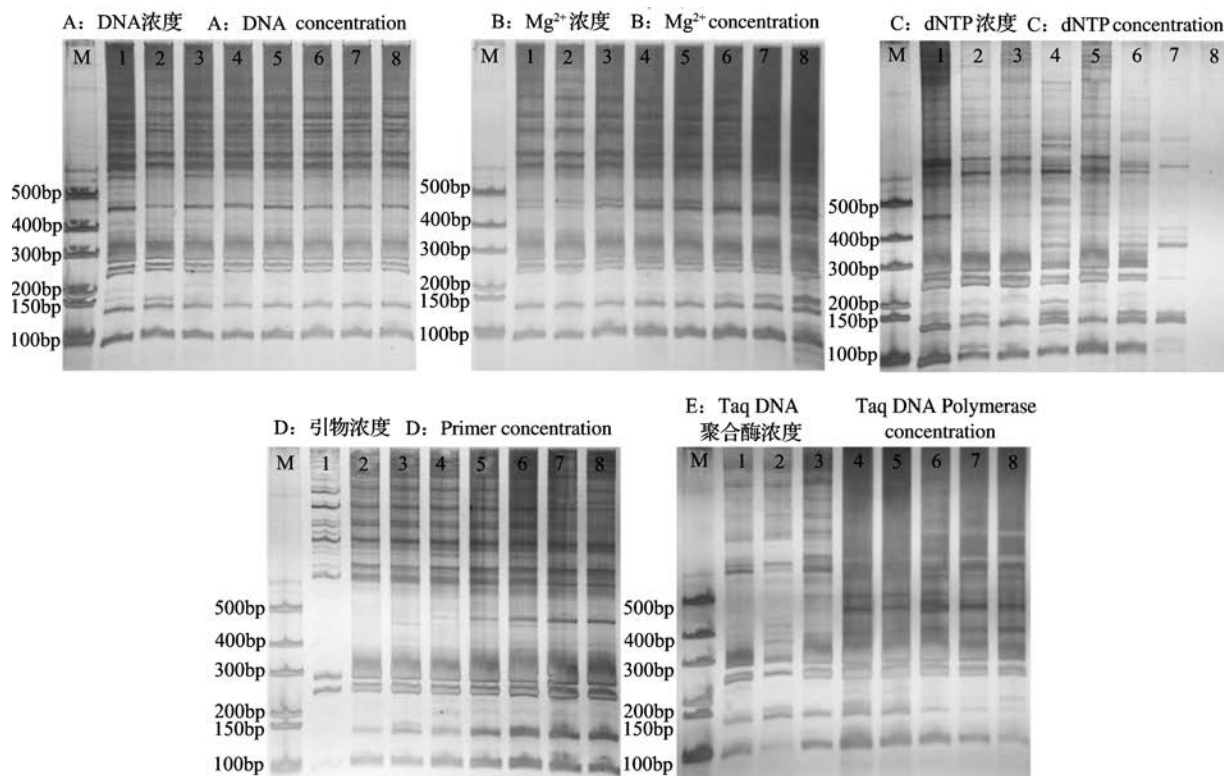
2 结果与分析

2.1 马铃薯 SRAP-PCR 单因素试验结果分析

2.1.1 DNA 用量对 SRAP-PCR 扩增影响分析

模板 DNA 的用量和纯度是 SRAP-PCR 扩增的关键因素。由图 1(A) 不同模板 DNA 用量对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系影响结果可以看出,本研究设

置不同的 DNA 用量均能扩增出完整的条带,可见马铃薯 SRAP 扩增对 DNA 用量的要求范围较宽。但从扩增产物条带可以看出用量在 10 ~ 30 ng 之间,条带相对模糊,随着 DNA 用量的递增,条带清晰度逐渐递增。在 50 ~ 80 ng 时,条带清晰整齐。经过对扩增结果和试验成本综合考虑,筛选出的模板 DNA 的最佳用量是 50 ng。



模板:希森 8 号;引物组合:Me9/Em7。M:均代表 DL500 DNA marker;A:1~8 表示 DNA 用量分别为:10,20,30,40,50,60,70,80 ng/20 μ L;

B:1~8 表示 Mg^{2+} 浓度分别为 1.25,1.5,1.75,2.00,2.25,2.5,2.75,3.00 mmol/L;C:1~8 表示 dNTPs 浓度分别为 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40 mmol/L;D:1~8 表示引物浓度分别为 0.10,0.20,0.30,0.40,0.50,0.60,0.70,0.80 μ mol/L;

E:1~8 表示 Taq DNA 聚合酶用量分别为 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.50,1.75,2.00 U/20 μ L

Template:Xisen8,Primer combination:Me9/Em7。M:DL500 DNA ladder marker,A:DNA concentrations in lane 1~8 are 10,20,30,40,50,60,70,80 ng/20 μ L respectively,B: Mg^{2+} concentrations in lane 1~8 are 1.25,1.5,1.75,2.00,2.25,2.5,2.75,3.00 mmol/L,respectively,

C:dNTPs concentrations in lane 1~8 are 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40 mmol/L,respectively,

D:Primer concentrations in lane 1~8 are 0.10,0.20,0.30,0.40,0.50,0.60,0.70,0.80 μ mol/L,respectively,

E:Taq DNA polymerase concentrations in lane 1~8 are 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.50,1.75,2.00 U/20 μ L,respectively

图 1 模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 Taq DNA 聚合酶不同浓度水平下的 SRAP-PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification results of different concentrations of template DNA, Mg^{2+} , dNTPs,primers and Taq DNA polymerase in SRAP-PCR

2.1.2 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 扩增影响分析

Mg^{2+} 的浓度会影响 PCR 反应体系中 Taq DNA 聚合酶的活性,浓度过高会导致 PCR 扩增的特异性降低,浓度过低则会使 PCR 扩增产物减少。由图 1(B) 不同 Mg^{2+} 浓度对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系影响结果可以看出,在浓度为 1.25 ~ 2.00 mmol/L,扩增产物丰富、条带相对清晰整齐。随着 Mg^{2+} 浓度的递增

至 3.00 mmol/L,条带背景颜色逐渐变深,带型逐渐模糊。当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时,扩增条带清晰丰富,扩增效果最佳。所以筛选出的最佳 Mg^{2+} 浓度是 1.5 mmol/L。

2.1.3 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 扩增影响分析

dNTPs 是 4 种核苷酸的混合物,主要作用是在 PCR 延伸的过程中,核苷酸通过碱基互补原则在酶的作用

用下与模板链进行连接,从而达到复制模板链的目的。dNTPs 的浓度与 PCR 扩增效率紧密相关。浓度过高会增加 DNA 聚合酶错配率,降低特异性扩增,而浓度过低会使扩增产物减少。由图 1(C)不同 dNTPs 浓度对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系影响结果可以看出,第一泳道 dNTPs 浓度为 0.05 mmol/L 时,条带背景相对较深,扩增条带部分模糊。随着浓度增加,当浓度为 0.25 mmol/L 时,扩增产物丰富,清晰度高,但当浓度增加到 0.30 mmol/L 时,扩增产物逐渐减少。所以筛选出的最佳 dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L。

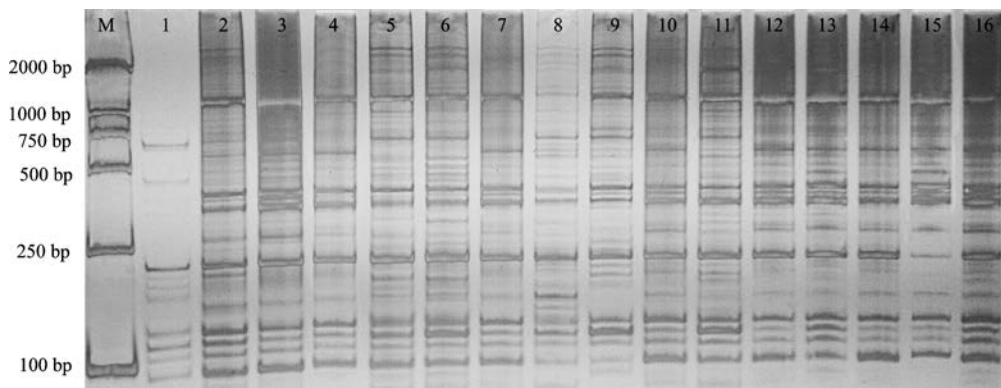
2.1.4 引物浓度对 SRAP-PCR 扩增影响分析 引物是 PCR 反应体系中的重要因素,引物作为 DNA 复制开始时 DNA 聚合酶的结合位点,浓度过高会导致模板与引物的错误结合率以及形成引物二聚体的几率增加,降低扩增反应的特异性,扩增产物减少。由图 1(D)不同引物浓度对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系影响结果可以看出,当引物浓度较低为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物较少。随着引物浓度从 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 增加至 0.5 $\mu\text{mol/L}$,扩增产物丰富,条带清晰稳定。当引物浓度增加到 0.80 $\mu\text{mol/L}$,部分带型逐渐模糊。当引物浓度为 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增效果最好,所以此浓度为最佳扩增引物浓度。

2.1.5 Taq DNA 聚合酶用量对 SRAP-PCR 扩增影响分析 Taq DNA 聚合酶作用是通过构建磷酸二酯键将脱氧核苷酸聚合形成脱氧核苷酸链,从而形成双链 DNA 分子。其浓度对 SRAP 扩增有重要的影响,浓度过高会致使特异性降低,浓度过低会影响扩增产物的产生。由图 1(E)不同 Taq DNA 聚合酶用量对马铃薯 SRAP-PCR 反应体系影响结果可得,当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.25 ~ 0.5 U 时,扩增产物相对丰富,但条带模糊。当 Taq DNA 聚合酶的用量高于 1 U 时,泳道背景加深,部分扩增条带缺失。当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.75 U 时,扩增产物丰富,条带清晰,扩增效果最好。

综上所述,单因子试验所得的 SRAP-PCR 的优化体系(20 μL)为:模板 DNA 用量为 50 ng/20 μL , Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L,引物浓度为 0.50 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶用量为 0.75 U/20 μL 。

2.2 马铃薯 SRAP-PCR 正交试验结果分析

马铃薯 SRAP-PCR 正交试验 16 个处理的扩增结果如图 2 所示:5、6、9 组合扩增产物多且条带清晰,扩增效果较好;2、3、4、7、10、11、12、13、14、15、16 组合部分条带模糊或缺失,有杂带产生,泳道背景较深;1、8 组合扩增产物较少,扩增效果相对较差。根据 SRAP-PCR 扩增结果进行直观分析评定打分(表 5)。



模板:希森 8 号;引物组合:Me1/Em2。M:均代表 DL2000 DNA marker
Template: Xisen8, Primer combination: Me1/Em2. M: DL2000 DNA ladder marker

图 2 马铃薯 SRAP-PCR 正交试验 16 个处理扩增结果

Fig. 2 The result of SRAP orthogonal design in potato

通过对正交试验结果的评定得分进行极差分析(表 6),计算 R 值和 k_i 值。R 值为同一因素下各水平得分平均值的最高与最低的差值,代表各因素对 SRAP-PCR 体系扩增结果的影响程度,R 值越大,代表该因素对 SRAP-PCR 体系扩增结果的影响越大,相反则越小。从表 6 马铃薯 SRAP-PCR 正交试验结

果统计分析的 R 值可以看出,各因素对 SRAP-PCR 体系扩增结果影响从大到小依次是: Mg^{2+} 浓度 > Taq DNA 聚合酶用量 > 模板 DNA 用量 > 引物浓度 > dNTPs 浓度。 k_i 值为同一因素下各水平得分的平均值,代表各因素下各个水平对 SRAP-PCR 体系扩增结果的影响程度, k_i 值越大,则该因素下该水平扩

增效效果最好。通过表 6 可知,模板 DNA 用量为水平 3 时扩增效果最好, Mg^{2+} 浓度扩增效果最好的是水平 2,dNTPs 浓度扩增效果最好的是水平 2 和 4,引物浓度扩增效果最好的是水平 4,Taq DNA 聚合酶浓度扩

增效效果最好的是水平 4,则对应的反应体系是模板 DNA 浓度为 70 ng/20 μ L, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.15/0.25 mmol/L,引物浓度为 0.60 μ mol /L,Taq DNA 聚合酶用量为 1.25 U/20 μ L。

表 6 马铃薯 SRAP-PCR 正交试验极差分析

Table 6 Range analysis of orthogonal design in potato

组别 No.	因素 Factors				
	A:模板 DNA (ng)	B: Mg^{2+} 浓度 (mmol /L)	C:dNTPs 浓度 (mmol /L)	D:引物浓度 (μ mol /L)	E:Taq DNA 聚合酶(U)
	Template DNA	Mg^{2+} concentration	dNTPs concentration	Primer concentration	Taq DNA polymerase
k ₁	6.33	9.83	8.00	6.42	4.42
k ₂	10.83	11.58	9.25	9.08	10.08
k ₃	10.92	8.08	7.50	8.17	8.92
k ₄	5.92	4.50	9.25	10.33	10.58
R	5.00	7.08	2.00	3.92	6.17
因素主次顺序 Factor order	B > E > A > D > C				
最优水平 Best level	A3	B2	C2/C4	D4	E4

通过对正交试验结果的评分进行方差分析(表 7),根据方差分析结果中影响马铃薯 SRAP-PCR 扩增反应的 5 个因素的 P 值($P < 0.01$)可知,每个因素对 SRAP-PCR 扩增反应影响程度达极显著

水平。根据 F 值可知,各因素对 SRAP-PCR 体系扩增结果影响从大到小依次是: Mg^{2+} 浓度 > Taq DNA 聚合酶用量 > 模板 DNA 用量 > 引物浓度 > dNTPs 浓度,这一结果与极差分析结果一致。

表 7 马铃薯 SRAP-PCR 正交试验方差分析

Table 7 Variance analysis of orthogonal design in potato

变异来源 Source of variation	III 型平方和 Type sum of squares	df	均方 Mean square	F	Sig.
校正模型 Correction model	1012.000 ^a	15	67.467	269.867	0.000
截距 Intercept	3468.000	1	3468.000	13872.000	0.000
模板 DNA(ng) Template DNA	271.833	3	90.611	362.444	0.000
Mg^{2+} 浓度 (mmol /L)	329.500	3	109.833	439.333	0.000
Mg^{2+} concentration					
dNTPs 浓度 (mmol /L)	28.500	3	9.500	38.000	0.000
dNTPs concentration					
引物浓度 (μ mol /L)	97.833	3	32.611	130.444	0.000
Primer concentration					
Taq DNA 聚合酶(U)	284.333	3	94.778	379.111	0.000
Taq DNA polymerase					
误差 Inaccuracy	8.000	32	0.250		
总计 Total	4488.000	48			
校正的总计 Corrected total	1020.000	47			

a: $R^2 = 0.992$ (调整 $R^2 = 0.988$)

a: $R^2 = 0.992$ (Adjusted $R^2 = 0.988$)

为了确定每个因素的最适浓度水平,对 5 个因素进行了各水平之间的多重比较(表 8)。根据多重比较结果可知,模板 DNA 用量的 3 水平在直观统计分析中评分最高,与 2 水平无显著差异,与 1 水平、4 水

平的差异显著。考虑到试验成本,模板 DNA 的最适用量为 60 ng。 Mg^{2+} 浓度在 2 水平时直观统计分析评分最高,与 3、4 水平的差异显著,所以 Mg^{2+} 的最适浓度定位为 1.50 mmol /L。dNTPs 浓度和引物浓度的 4

个水平之间均无显著差异,均选择评分结果最高的 4 水平, dNTPs 浓度为 0.25 mmol /L, 引物浓度为 0.60 μmol /L。Taq DNA 聚合酶用量的 2、3、4 水平之间差异不显著,均与 1 水平存在显著的差异,为了节约试验成本以及考虑到评分结果,Taq DNA 聚合酶的最适用量为 0.75 U。综上所述,则确定的反应体系

是模板 DNA 浓度为 60 ng/20 μL, Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L,引物浓度为 0.60 μmol /L,Taq DNA 聚合酶用量为0.75 U/20 μL。该结果与正交试验极差分析以及单因素试验结果基本一致,在模板 DNA 的用量和 Taq DNA 聚合酶用量方面因考虑到试验成本问题稍有调整。

表 8 各因素水平间 Duncan 多重比较

Table 8 Duncan multiple comparisons among different factors

模板 DNA (ng)	均值	Mg ²⁺ 浓度 (mmol /L)	均值	dNTPs 浓度 (mmol /L)	均值	引物浓度 (μmol /L)	均值	Taq DNA 聚合酶(U)	均值
Template DNA	Average value	Mg ²⁺ + concentration	Average value	dNTPs concentration	Average value	Primer concentration	Average value	TaqDNA polymerase	Average value
3(70)	10.91 a	2(1.50)	11.58 a	4(0.25)	9.25 a	4(0.60)	10.33 a	4(1.25)	10.58 a
2(60)	10.83 a	1(1.25)	9.83 ab	2(0.15)	9.25 a	2(0.40)	9.08 a	2(0.75)	10.08 a
1(50)	6.33 b	3(1.75)	8.08 b	1(0.10)	8.00 a	3(0.50)	8.17 a	3(1.00)	8.92 a
4(80)	5.92 b	4(2.00)	4.50 c	3(0.20)	7.50 a	1(0.30)	6.42 a	1(0.50)	4.42 b

表中同列不同的小写字母代表在 0.05 水平差异显著

The lowercase letters in the same column in the table represent significant differences at the 0.05 level

最终确定马铃薯 SRAP-PCR 最佳反应体系是:反应总体积 20 μL,模板 DNA 用量为 60 ng,Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L,引物浓度为 0.60 μmol /L,Taq DNA 聚合酶用量为 0.75 U,另包含 2 μL 10 × PCR buffer,其余部分 ddH₂O 补足。

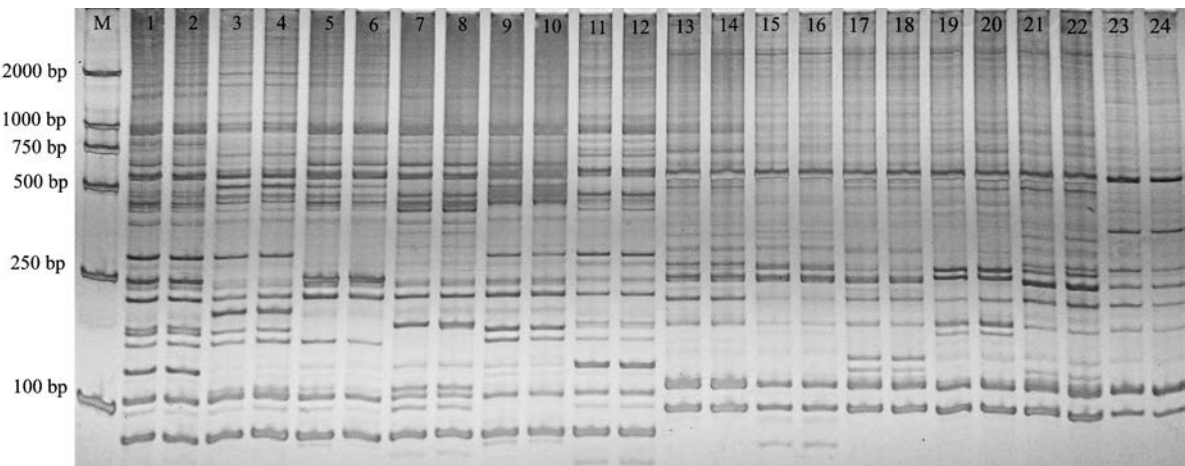
2.3 马铃薯 SRAP-PCR 最佳体系的验证

应用本研究得出的马铃薯 SRAP-PCR 最佳反应体系,选用 Me4/Em3、Me4/Em8 两对引物对 6 个山西省主栽马铃薯品种基因组 DNA 进行 SRAP-PCR

体系稳定性检验均能扩增出丰富的条带且特异性强、稳定性高,证明该体系可以应用于马铃薯基因组 DNA SRAP 扩增反应中(图 3)。

3 讨论

PCR 反应体系主要通过单因素试验和正交试验设计两种方法来进行优化与建立。单因素试验主要通过对影响 SRAP-PCR 反应体系的 5 个因素进行逐个优化,将结果所得 5 个因素的最适浓度组合得



1~12 泳道扩增所用引物组合为 Me4/Em3,扩增模板为荷兰 15 号、希森 5 号、希森 6 号、希森 8 号、晋薯 24 号和大同里外黄,每个模板 2 次重复; 13~24 泳道扩增所用引物组合为 Me4/Em8,扩增模板为荷兰 15 号、希森 5 号、希森 6 号、希森 8 号、晋薯 24 号和大同里外黄,每个模板 2 次重复

The primer combinations were Me4/Em3 used in lane 1~12,the templates for amplification were Helan15(Premature),Xisen5,Xisen6,Xisen8,Jinshu24 and Datongliwaihuang,Repeat twice for each template;the primer combinations were Me4/Em8 used in lane 13~24, the templates for amplification were Helan15(Premature),Xisen5,Xisen6,Xisen8,Jinshu24 and Datongliwaihuang,Repeat twice for each template

图 3 马铃薯 SRAP-PCR 最佳体系的验证

Fig.3 Verification of the optimum SRAPsystem in potato

到最佳反应体系。单因素试验只能考虑到单一因素对反应体系的影响,并且耗时较长、试验成本较高。正交试验相比单因素试验更加全面科学可靠,它可以考虑到各因素的影响以及各因素的交互作用。正交试验用时较短,节约成本,有效弥补了单因素试验的不足。但是最后对正交试验结果的评价是通过直观分析来进行打分确定最佳体系,存在一定由主观因素引起的误差。本研究通过单因素试验确定各因素的适宜浓度范围,再通过设计正交试验,根据正交试验结果进行极差分析和方差分析以及 Duncan 多重比较来确定因素的最佳水平组合,最终综合考虑单因素试验结果、正交试验的极差分析和方差分析的结果确定最佳优化体系,试验结果更全面、更准确。

PCR 扩增中每个因素浓度的改变以及各因素间的交互作用都会影响体系的优化结果。根据正交试验统计分析中的极差分析以及方差分析均得出,5 个因素对 SRAP-PCR 反应体系的影响程度排序为: Mg^{2+} 浓度 > Taq DNA 聚合酶用量 > 模板 DNA 用量 > 引物浓度 > dNTPs 浓度。本研究中对试验结果影响较大的因素是 Mg^{2+} 浓度和 Taq DNA 聚合酶的用量,这一结果与白桦、荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化研究结果一致^[21-22],而龙爪槐的体系优化研究中影响最大的因素为引物^[14],梨属、甘草的优化试验中认为 dNTPs 浓度影响最大^[23-24],但是在本研究中 dNTPs 浓度影响程度最小。分析不同物种的 SRAP-PCR 反应体系,由于不同物种基因组 DNA 的差异,反应中每个因素的影响程度也不同,因此 SRAP-PCR 反应体系必须针对不同物种和不同的试验环境以及试剂对主要的影响因素进行优化,保证试验结果的稳定性和可靠性。

4 结论

本研究以山西省主栽马铃薯基因组 DNA 为模板,采用单因素试验和正交试验相结合的方法,确定了影响 SRAP-PCR 反应体系的引物、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶 5 个因素的浓度或用量,得到了马铃薯 SRAP-PCR 最佳反应体系 (20 μ L): 60 ng 模板 DNA, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTPs, 0.60 mmol/L 引物, 0.75 U Taq DNA 聚合酶,另包含 2 μ L 10 \times PCR buffer,其余部分 ddH₂O 补足。该最佳体系的验证结果也显示该体系稳定可靠,可用于后续马铃薯 SRAP 分子标记方面的研究,为进一步对马铃薯进行种质资源鉴定、遗传连锁图谱构建和基因定位等方面的研究提供

基础。

参考文献

- [1] 曾凡达,许丹,刘刚. 马铃薯营养综述. 中国马铃薯,2015,29(4):233-243
- [2] 赵玉娟,郝伯为. 马铃薯加工利用及其产业市场特点. 现代农业科技,2014(22):269,277
- [3] 陈锋. 马铃薯加工及产业现状的研究. 中国农业信息,2016(20):155-156
- [4] 陈萌山,王小虎. 中国马铃薯主食产业化发展与展望. 农业经济问题,2015,36(12):4-11
- [5] 徐建飞,金黎平. 马铃薯遗传育种研究:现状与展望. 中国农业科学,2017,50(6):990-1015
- [6] 苏成付. 分子标记辅助选择育种发展策略. 安徽农业科学,2014,42(15):4591-4592,4598
- [7] 卢超,张美德,何银生,刘海华,艾伦强. SRAP 技术在植物遗传育种中的应用. 现代农业科技,2014(16):18-19,24
- [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 gene tagging in Brassica. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2-3):455-461
- [9] Liu L J, Peng D X, Wang B. Genetic relation analysis on ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud.) inbred lines by SRAP markers. Agricultural Sciences in China 2008, 7(8):944-949
- [10] Wu Y G, Guo Q S, He J C, Lin Y F, Luo L J, Liu J D. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(1):63-72
- [11] 华树妹,贺佩珍,陈芝华,雷伏贵,曹奕鸯,黄玉仙,黄姗. 应用 SRAP 标记构建山药种质资源 DNA 指纹图谱. 植物遗传资源学报,2014,15(3):597-603
- [12] 陶爱芬,魏嘉俊,刘星,徐建堂,朱忠南,祁建民. 应用 SRAP 标记绘制 88 份南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱. 植物遗传资源学报,2017,18(2):225-232
- [13] 牛艳丽,彭焱松,宋莉,周赛霞,魏宗贤,宋满珍,黄江,张平贤,高浦新,杜娟,虞志军. 濒危植物香果树 (*Emmenopterys henryi*) SRAP 反应体系的建立与引物筛选. 分子植物育种,2017,15(8):3136-3144
- [14] 倪雅楠,刘博. 龙爪槐 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化. 江苏农业科学,2017,45(11):19-22
- [15] 段永红,渠云芳,王铭,王长彪,司浩浩,张旭,孙毅. 高粱抗丝黑穗病基因 SRAP 体系优化. 分子植物育种,2017,15(2):611-617
- [16] 李培,阙青敏,王芳,李俊成,朱芹,廖柏勇,陈晓阳. 红椿 SRAP 反应体系优化及引物筛选. 林业科学研究,2017,30(1):10-17
- [17] 叶新如,朱海生,温庆放,陈敏氢,林碧英. 丝瓜 SRAP 反应体系的优化. 分子植物育种,2016,14(3):673-678
- [18] 阮先乐,陈龙. 马铃薯 SRAP-PCR 反应体系的优化. 安徽农业科学,2009,37(25):11892-11894
- [19] 熊黎,何艳梅,李茂林,曲继鹏. 探索提取马铃薯总 DNA 的优化方案. 技术与市场,2012,19(4):178,180
- [20] 何正文,刘运生,陈立华,曹美鸿,夏家辉. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件. 湖南医科大学学报,1998(4):76-77
- [21] 陆爱君,陈罡,顾宇书,韩友志,高英旭,刘红民. 白桦 SRAP-PCR 反应体系的优化. 辽宁林业科技,2015(2):16-19
- [22] 孙祖霞,刘兆磊,陈素梅,陈发棣,楼望淮,郭海林. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立. 南京农业大学学报,2011,34(6):53-58
- [23] 梁婷婷,马燕,臧德奎. 梨属野生种质资源 SRAP-PCR 反应体系优化研究. 山东农业科学,2014,46(12):7-10
- [24] 艾鹏飞,苏姗,靳占忠. 甘草 SRAP-PCR 正交试验设计优化及引物筛选. 河北工业科技,2017,34(1):7-11