

宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系的优化及引物筛选

梁芳瑜¹, 何茂秋¹, 徐昌艳¹, 杨小生^{2,3}, 杨娟^{2,3}, 罗忠圣^{2,3}, 覃容贵^{1*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025;

2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;

3. 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014)

[摘要] 目的:建立宽叶缬草的相关序列扩增多态性(SRAP)-聚合酶链式反应(PCR)反应体系,为宽叶缬草良种选育提供理论和技术基础。方法:采用单因素试验考察 *Taq* Mix 用量, Mg^{2+} 浓度, 模板 DNA 浓度, *Taq* DNA 聚合酶浓度对宽叶缬草 SRAP-PCR 扩增结果的影响,以此为基础进行正交试验,优化宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系,并在最优反应体系条件下筛选可用于宽叶缬草遗传多样性研究的有效引物。结果:单因素实验结果表明 *Taq* Mix 用量为 8~11 μ L 时扩增效果较佳;加入低浓度 Mg^{2+} 可获得较佳扩增效果;中低浓度模板 DNA 用量可提高扩增效果;加入少量 *Taq* DNA 聚合酶可增加扩增结果丰富度。正交实验结果表明各因素对宽叶缬草 SRAP-PCR 扩增结果的影响程度大小依次为 *Taq* Mix 用量>*Taq* DNA 聚合酶加入量> Mg^{2+} 加入量>模板 DNA 用量。适于宽叶缬草的最优反应体系为 *Taq* Mix 11 μ L, 模板 DNA 30 ng, Mg^{2+} 0.025 mmol·L⁻¹, *Taq* DNA 1.5 U, 正向引物与反向引物各 5 μ mol·L⁻¹, 用双蒸水补足体系至 20 μ L。最优退火温度为 36.8 °C。应用最优体系从 88 对引物中筛选出 17 对适用于宽叶缬草 SRAP-PCR 的条带清晰、多态性较高的有效引物。结论:建立的宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系稳定性良好,可用于宽叶缬草遗传多样性研究。

[关键词] 宽叶缬草; 相关序列扩增多态性(SRAP); 体系优化; 引物筛选; 正交试验设计

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0163-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211412

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210924.2100.006.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 9:08

Optimization of SRAP-PCR System for *Valeriana officinalis* var. *latifolia* and Primer Screening

LIANG Fang-yu¹, HE Mao-qiu¹, XU Chang-yan¹, YANG Xiao-sheng^{2,3}, YANG Juan^{2,3},
LUO Zhong-sheng^{2,3}, QIN Rong-gui^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China;

3. State Key Laboratory of Function and Applications of Medicinal Plants, Guiyang 550014, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the sequence-related amplified polymorphism (SRAP)-polymerase chain reaction (PCR) system for *Valeriana officinalis* var. *latifolia*, so as to lay the theoretical and technical foundations for the breeding of *V. officinalis* var. *latifolia*. **Method:** Single factor test was applied to investigate the effects of *Taq* Mix dose, Mg^{2+} concentration, template DNA concentration, and *Taq* DNA polymerase content

[收稿日期] 20210826(008)

[基金项目] 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教科合 KY 字[2018]183);2019年大学生创新创业训练计划项目(20195200144);贵州省发改委工程中心项目(黔财建[2019]303号);贵州省教育厅高等学校特色重点实验室平台项目(黔教合 KY 字[2020]018号)

[第一作者] 梁芳瑜,在读硕士,从事中药资源保护与应用研究工作,E-mail:457164470@qq.com

[通信作者] *覃容贵,博士,教授,从事中药资源保护与应用研究工作,E-mail:1346812934qq.com

on SRAP-PCR amplification of *V. officinalis* var. *latifolia*, based on which the orthogonal experiments were performed to optimize the SRAP-PCR system for *V. officinalis* var. *latifolia*. The effective primers that could be used for genetic diversity studies of *V. officinalis* var. *latifolia* were selected under the optimal reaction condition. **Result:** The results of the single factor test showed that *Taq* Mix dose within the range of 8-11 μL resulted in better amplification. The addition of a low concentration of Mg^{2+} , the medium to low concentrations of template DNA, or the low concentration of *Taq* DNA polymerase enhanced the amplification efficiency or richness. As demonstrated by the orthogonal experiments, the influencing degrees of related factors on SRAP-PCR amplification of *V. officinalis* var. *latifolia* were sorted in a descending order as follows: *Taq* Mix dose > *Taq* DNA polymerase content > Mg^{2+} concentration > template DNA concentration. The optimal reaction system for *V. officinalis* var. *latifolia* was determined to consist of 11 μL of *Taq* Mix, 30 ng of template DNA, $0.025 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ forward primer, and $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ reverse primer, which was supplemented to 20 μL with ddH_2O . The optimal annealing temperature was $36.8 \text{ }^\circ\text{C}$. A total of 17 pairs of effective primers with high band resolution and polymorphism were selected from 88 primer pairs for SRAP-PCR of *V. officinalis* var. *latifolia*. **Conclusion:** The established SRAP-PCR system for *V. officinalis* var. *latifolia* is stable, which can be used for genetic diversity studies of *V. officinalis* var. *latifolia*.

[Keywords] *Valeriana officinalis* var. *latifolia*; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); system optimization; primer screening; orthogonal design

宽叶缬草为败酱科缬草属植物^[1],主要以根及根茎入药,性味辛、苦、温,具有理气止痛、祛风除湿、宁心安神的功效^[2-3],现代药理学研究表明宽叶缬草具有镇静安神、抗抑郁、扩张冠状动脉、调节血脂和抗脂质过氧化等作用。

宽叶缬草挥发油广泛应用于药品、保健品,以宽叶缬草为主要成分的复方缬草片和复方缬草牙痛酊用于治疗失眠和牙痛,疗效显著。随着宽叶缬草需求的日益增长,人工种植产业已形成规模化生产,但是过度的人工干预导致产量提升的同时出现了品种退化、药材质量下降、产油率降低等问题^[4],有必要利用分子标记技术对其遗传多样性进行研究和评价,从而为良种选育奠定理论和技术基础。

目前基于DNA的分子标记技术现已发展至第四代。第一代分子标记技术如限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)被广泛应用于临床研究癌细胞和病毒^[5-6]。第二代和第三代分子标记技术如简单重复序列标记(SSR),简单重复序列间扩增(ISSR),随机扩增多态性DNA标记(RAPD)多用于植物遗传多样性研究,如对植物的转录组及传代进行标记与鉴定^[7],对植物的遗传特征和关联图谱进行研究^[8]。近年来有研究者采用分子标记技术研究缬草属植物的遗传多样性,SINGH等^[9]利用RAPD技术分析缬草属植物蜘蛛香的遗传多样性,并将13个种群划分成7大类。但是上述分子标记方法的稳定性和重复性易受多种因素影响,结果导致重现性较

差。相关序列扩增多态性(SRAP)作为第四代分子标记技术,具有快速、重复性好、操作简便等特点^[10]。AGYENIM-BOATENG等^[11]利用SRAP分析野生蓖麻的遗传多样性,发现野生蓖麻遗传分化的特点。KUMAR等^[12]利用ISSR和SRAP分子标记研究乐园树的遗传多样性和群体遗传结构。课题组前期采用RAPD,ISSR分子标记技术研究宽叶缬草遗传多样性^[13-14],在遗传相似系数为0.88时,将20个宽叶缬草样本进行区分。为进一步完善宽叶缬草遗传多样性相关研究工作,本文对宽叶缬草SRAP-PCR反应体系影响因素进行优化及分析,并筛选出有效引物,以期采用SRAP分子标记技术更深入研究宽叶缬草遗传多样性,找出其遗传变异规律,为宽叶缬草甄选优质种质、科学育种提供理论依据。

1 材料

1.1 植物 12个宽叶缬草样品主要采自贵州省宽叶缬草种植基地。供试药材经贵州医科大学中药学教研室覃容贵教授鉴定为缬草科植物宽叶缬草 *Valeriana officinalis* var. *latifolia*。每个基地取样5株,每株取3~5片新鲜嫩叶,装入离心管中并标记,迅速放入冰盒中,将样品带回实验室保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中,备用。具体样品采集信息见表1。

1.2 试剂 MgCl_2 , $10\times\text{Taq}$ Buffer, 新型植物DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号分别为N2704, N2702r, W9112); $6\times\text{DNA}$ 上样缓冲液, 琼脂

表1 宽叶缬草样品信息

Table 1 Information of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*

样品编号	采样地	纬度	经度	海拔/m
1	贵州省铜仁市四保村	27°33'58"N	108°51'30"E	825.38
2	贵州省铜仁市苗云村	27°31'49"N	108°47'48"E	526.23
3	贵州省剑河县观么乡白胆村	27°72'22"N	108°71'12"E	1 028.50
4	贵州省铜仁市苗云村	27°31'57"N	108°47'43"E	506.31
5	贵州省铜仁市岑芒村	27°47'08"N	108°49'54"E	782.26
6	贵州省铜仁市双屯村	27°38'09"N	108°37'43"E	785.89
7	贵州省铜仁市四保村野生	27°33'36"N	108°51'38"E	847.28
8	贵州省岑巩县凯本乡	27°50'41"N	108°63'30"E	612.10
9	贵州省黔南州龙里县麻芝乡	26°24'41"N	107°03'32"E	1 190.42
10	贵州省江口县凯德镇育苗基地	27°39'24"N	108°44'50"E	375.59
11	贵州省铜仁市岑芒村	27°47'12"N	108°49'59"E	782.26
12	贵州医科大学花溪校区移栽	26°22'54"N	106°37'58"E	1 118.64

糖,缓冲液 5×TBE, 10 000×SolarRed 核酸染料(索莱宝生物科技有限公司,批号分别是 20191129, 525J055, 20210105, 14G0626); 2×Taq PCR Master Mix, D2000 Plus DNA Ladder, D2000 DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder(莫纳生物科技有限公司,批号分别为 00005086-150427, 00007264-150417, 00007622-150423, 00007653-140429)。SRAP 引物选取 8 条上游引物和 11 条下游引物,均由金斯瑞生物公司合成,见表 2。

表2 SRAP 分子标记引物序列

Table 2 SRAP primers sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Me2	上游 TGAGTCCAAACCGGAGC	17
Me3	上游 TGAGTCCAAACCGGAAT	17
Me4	上游 TGAGTCCAAACCGGACC	17
Me5	上游 TGAGTCCAAACCGGAAG	17
Me6	上游 TGAGTCCAAACCGGTAG	17
Me8	上游 TGAGTCCAAACCGGTGT	17
Em1	下游 GACTGCGTACGAATTAAT	18
Em2	下游 GACTGCGTACGAATTTGC	18
Em3	下游 GACTGCGTACGAATTGAC	18
Em4	下游 GACTGCGTACGAATTTGA	18
Em5	下游 GACTGCGTACGAATTAAC	18
Em6	下游 GACTGCGTACGAATTGCA	18
Em7	下游 GACTGCGTACGAATTATG	18
Em8	下游 GACTGCGTACGAATTAGC	18
Em11	下游 GACTGCGTACGAATTTTCG	18

1.3 主要仪器 WP-UP-WF-20 型超纯水器(四川沃特水处理设备有限公司),HH-2 型数显恒温水

浴锅(金坛市富华仪器有限公司),AL204 型电子天平(梅特勒-托利仪器有限公司),L96G 型基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),DYCP-31DN 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司),DYY-12C 型电泳仪电源(北京六一生物科技有限公司),TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂),NanoPhotometer N60 型超微量分光光度计(德国 Implen 公司),ChemiDoc XRS+ 型全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 宽叶缬草基因组 DNA 提取及检测 用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 12 个宽叶缬草样本基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶检测其完整性及质量,用超微量分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。所提基因组 DNA 均稀释至 15 mg·L⁻¹,保存于 -20 °C 冰箱中备用。

2.2 宽叶缬草 SRAP-PCR 体系单因素优化试验 对 Taq Mix, Mg²⁺, 模板 DNA, Taq DNA 聚合酶 4 种因素进行单因素试验优化,每个因素设置 8 个梯度水平,见表 3。SRAP-PCR 初始反应体系设置为 Taq Mix 10 μL,模板 DNA 30 ng,上游引物与下游引物各 5 μmol·L⁻¹,用 ddH₂O 补足体系至 20 μL,选取 9 号基因组 DNA 为模板。初始反应程序参考张迎辉等^[15]建立的反应程序基础上调整为①94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 5 次。②94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次,72 °C 延伸 8 min,4 °C 保存。

表3 SRAP-PCR反应体系单因素筛选

Table 3 Single factor screening of SRAP-PCR reaction system

梯度	Mix/ μL	$\text{Mg}^{2+}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	DNA/ng	Taq DNA/U
1	4	0.012 50	15.0	1.0
2	5	0.018 75	22.5	1.5
3	6	0.025 00	30.0	2.0
4	7	0.031 25	37.5	2.5
5	8	0.037 50	45.0	3.0
6	9	0.043 75	52.5	3.5
7	10	0.050 00	60.0	4.0
8	11	0.056 25	67.5	4.5

2.3 宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系正交试验设计

根据单因素优化结果,选择 SPSS 23 软件中正交设计功能对 Taq Mix 用量, MgCl_2 加入量, 模板 DNA 用量, Taq DNA 聚合酶加入量进行四因素四水平正交设计试验, 见表 4。试验选用 9 号基因组 DNA 作为模板, 引物组合选择 Me4~Em8。

表4 宽叶缬草 SRAP-PCR $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计

Table 4 SRAP-PCR $L_{16}(4^5)$ orthogonal test of *V. officinalis* var. *latifolia*

组别	Taq Mix/ μL	$\text{Mg}^{2+}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	DNA/ng	Taq DNA/U	评分/分
1	8	0.012 50	22.5	1.5	1
2	10	0.025 00	22.5	2.5	13
3	11	0.031 25	22.5	3.0	11
4	9	0.018 75	22.5	2.0	12
5	9	0.031 25	37.5	1.5	12
6	11	0.025 00	30.0	1.5	15
7	10	0.018 75	45.0	1.5	11
8	8	0.031 25	45.0	2.5	13
9	11	0.012 50	45.0	2.0	14
10	8	0.025 00	37.5	2.0	2
11	9	0.025 00	45.0	3.0	1
12	9	0.012 50	30.0	2.5	10
13	10	0.012 50	37.5	3.0	9
14	10	0.031 25	30.0	2.0	8
15	11	0.018 75	37.5	2.5	7
16	8	0.018 75	30.0	3.0	8

结果参照直观分析法^[16], 根据条带清晰度、条带数量、条带强度、条带特异性对扩增结果进行评分, 最高得分为 15 分, 最低为 1 分。分别进行 2 次独立评分, 取平均值进行极差分析。

2.4 宽叶缬草 SRAP-PCR 退火温度考察 PCR 反应体系总体积为 20 μL , 选择优化所得反应体系对

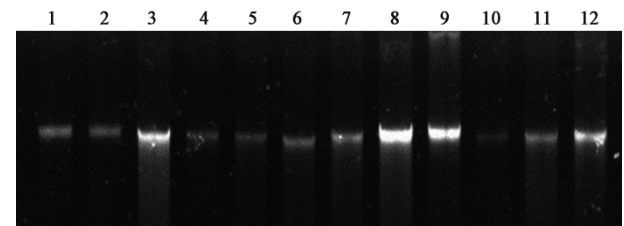
PCR 程序退火温度进行考察。采用梯度法考察最佳退火温度, 设置 12 个温度梯度, 分别为 30.0, 30.2, 31.0, 32.0, 33.2, 34.4, 35.6, 36.8, 38.0, 39.0, 39.7, 40.0 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 通过凝胶成像系统拍照, 记录保存。

2.5 宽叶缬草 SRAP-PCR 引物筛选 选取 9 号基因组 DNA 作为模板, 基于最优反应体系及反应程序, 从 8 条正向引物和 11 条反向引物随机组合成的 88 对引物中, 筛选扩增结果稳定、条带清晰度高、多态性丰富的引物组合。

2.6 宽叶缬草 SRAP-PCR 优化反应体系应用 应用最优宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系, 以 12 个宽叶缬草基因组 DNA 为模板进行 SRAP-PCR 扩增, 验证该反应体系稳定性及可靠性。

3 结果

3.1 宽叶缬草基因组 DNA 提取及纯度检验 12 个宽叶缬草基因组 DNA 条带清晰, 见图 1, 其纯度质量 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0, 说明完整性良好, 纯度高, 可用于后续 SRAP-PCR 试验。



1~12. 样本 Vo1~Vo12

图1 12个宽叶缬草样本基因组DNA提取

Fig. 1 Genomic DNA extraction of 12 *V. officinalis* var. *latifolia*

3.2 宽叶缬草 SRAP-PCR 反应体系单因素筛选

3.2.1 Taq Mix 用量考察 Taq Mix 为 PCR 预混液, 其组分为 0.1 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶, $2\times\text{PCR}$ 反应缓冲液, $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 使用时加入模板 DNA, 引物及水补足体积即可使用, 具有使用方便、简单、稳定的特点。但是固定的组分比例导致 Taq Mix 使用有一定局限性, 不同样品适用量有差异, 故有必要对 Taq Mix 用量进行考察。结果表明当 Taq Mix 用量为 4~7 μL 时条带模糊、数量较少; 用量为 8~11 μL 时, 条带清晰、数量较多, 带型基本保持一致。当用量为 11 μL 时, 扩增的结果最佳, 条带数量最丰富、清晰, 无拖尾现象。正交试验选用 8~11 μL Taq Mix 梯度水平。见图 2。

3.2.2 MgCl_2 加入量考察 Mg^{2+} 是影响 PCR 扩增的重要因素之一。实验设置 8 个 Mg^{2+} 浓度梯度, 结合 3.2.1 项下结果分析, 在 Taq Mix 已含有的 Mg^{2+} 基础

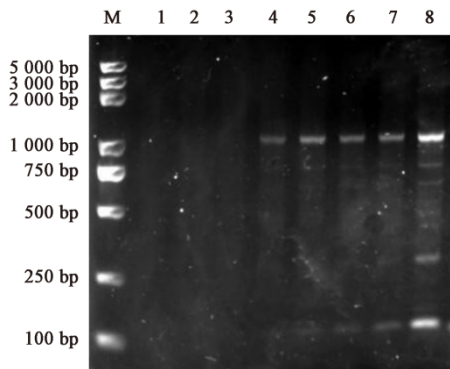


图2 *Taq* Mix用量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响
M. D2000 Plus DNA; 1. 4 μL ; 2. 5 μL ; 3. 6 μL ; 4. 7 μL ; 5. 8 μL ;
6. 9 μL ; 7. 10 μL ; 8. 11 μL

图2 *Taq* Mix用量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响

Fig. 2 Influence of *Taq* Mix content on SRAP-PCR of *V. officinalis* var. *latifolia*

上,加入0.012 5~0.031 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 可增加条带清晰度及扩增产物的亮度,当加入的 Mg^{2+} 浓度过高时,部分条带消失,见图3。适量的 Mg^{2+} 可起到优化PCR扩增结果的作用,过量则产生相反效果。因此正交实验选用0.012 5~0.031 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 梯度水平。

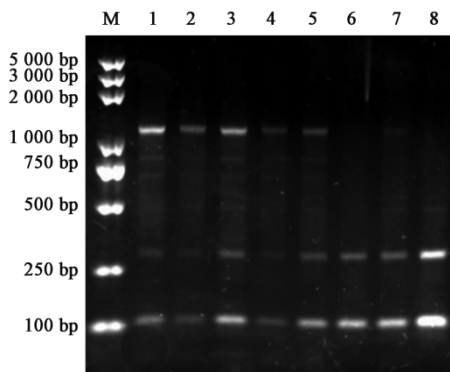


图3 MgCl_2 加入量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响
M. D2000 Plus DNA; 1. 0. 012 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2. 0. 018 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;
3. 0. 025 00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4. 0. 031 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5. 0. 037 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;
6. 0. 043 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 7. 0. 050 00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 8. 0. 056 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图3 MgCl_2 加入量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响

Fig. 3 Influence of MgCl_2 addition on SRAP-PCR of *V. officinalis* var. *latifolia*

3.2.3 模板DNA用量考察 模板DNA对扩增结果有一定影响,本研究发现22.5~45 ng模板DNA的扩增条带清晰明亮、丰富度高,较低或较高含量模板DNA的扩增条带数量较少,部分亮度过高。因此正交实验选用22.5~45 ng梯度水平。见图4。

3.2.4 *Taq* DNA聚合酶加入量考察 *Taq* DNA聚合酶在PCR反应中起到连接作用,适量的*Taq* DNA聚合酶起到特异性结合脱氧核糖核苷酸的作用。*Taq* DNA聚合酶过少将导致扩增产物数量较少或

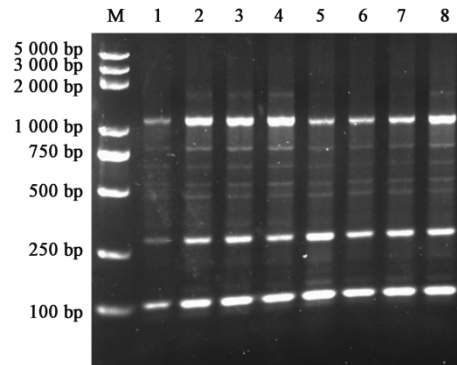


图4 模板DNA用量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响
M. D2000 Plus DNA; 1. 15. 0 ng; 2. 22. 5 ng; 3. 30. 0 ng; 4. 37. 5 ng;
5. 45. 0 ng; 6. 52. 5 ng; 7. 60. 0 ng; 8. 67. 5 ng

图4 模板DNA用量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响

Fig. 4 Influence of DNA concentration on SRAP-PCR of *V. officinalis* var. *latifolia*

无法扩增出完整条带,过多则易引起非特异性结合。结合3.2.1结果分析,在*Taq* Mix原有的基础上加入1.5~3 U的*Taq* DNA聚合酶可增加条带清晰度及丰富度,*Taq* DNA聚合酶加入量高于3 U,将导致500~1 000 bp处条带模糊、缺失,100~300 bp处条带亮度增加。故选用1.5~3 U梯度水平。见图5。

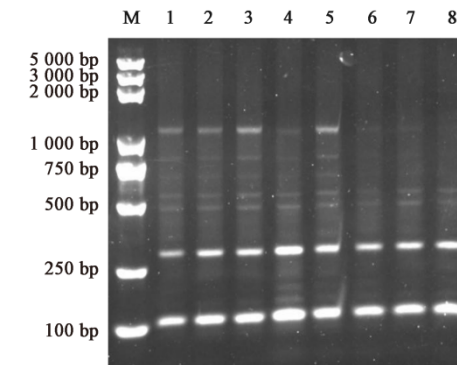


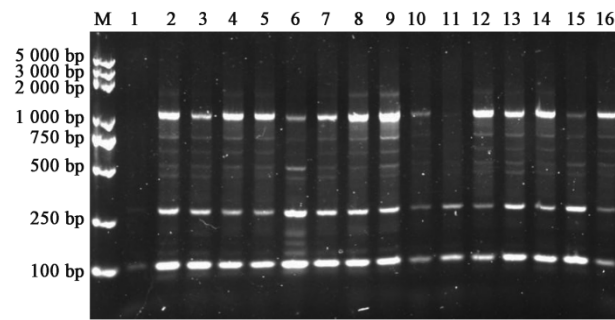
图5 *Taq* DNA聚合酶加入量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响
M. D2000 Plus DNA; 1~8. 1. 0, 1. 5, 2. 0, 2. 5, 3. 0, 3. 5, 4. 0, 4. 5 U

图5 *Taq* DNA聚合酶加入量对宽叶缙草SRAP-PCR的影响

Fig. 5 Influence of *Taq* DNA addition on SRAP-PCR of *V. officinalis* var. *latifolia*

3.3 宽叶缙草SRAP-PCR反应体系正交设计 对宽叶缙草SRAP-PCR反应体系正交试验结果进行分析。第2,6,8,9组反应体系扩增条带清晰、完整、丰富度高,1,10,11组扩增条带数量少且模糊,见图6。

采用直观分析法对正交设计试验结果进行评分,见表4。其中第6组的评分最高,为15分,扩增条带数为11。因此将第6组确立为宽叶缙草SRAP-PCR最佳反应体系,即*Taq* Mix 11 μL ,模板DNA 30 ng, Mg^{2+} 0.025 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 1.5 U,上游引物与下游引物各5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ddH₂O补足至20 μL 。



M. D2000 Plus DNA; 1~16. 分别代表正交试验组别1~16

图6 正交设计宽叶缙草SRAP-PCR反应体系扩增

Fig. 6 Amplification results of orthogonal design SRAP-PCR reaction system of *V. officinalis* var. *latifolia*

正交试验评分结果利用SPSS AU平台进行极差分析,见表5。 K_i 为各因素在4个水平中实验数据之和,其平均值 k_i 可用于说明该因素在不同水平对PCR扩增的影响程度,值越大表明其对应的因素水平扩增效果越好^[17], R 值为各因素的极差值,其值越大表明该因素对评分结果的影响越大^[18]。 Taq Mix用量, Mg^{2+} 加入量,模板DNA用量, Taq DNA聚合酶加入量的 R 值分别为5.75,3.25,2.75,3.50。表明各因素对宽叶缙草SRAP-PCR扩增结果的影响程度为 Taq Mix用量> Taq DNA聚合酶加入量> Mg^{2+} 加入量>模板DNA用量。

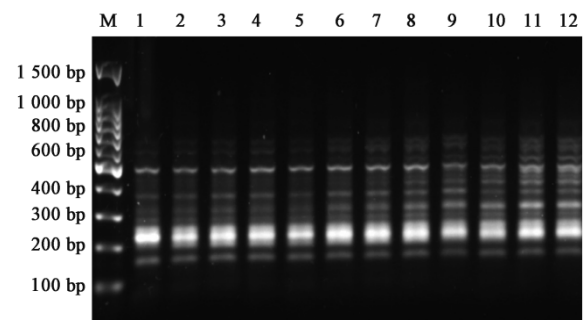
表5 正交试验设计宽叶缙草SRAP-PCR反应体系结果极差分析

Table 5 Range analysis of orthogonal design results of *V. officinalis* var. *latifolia*

组别	Taq Mix/ μ L	Mg^{2+} /mmol·L ⁻¹	DNA/ng	Taq DNA/U
K_1	24.00	34.00	37.00	39.00
K_2	35.00	38.00	41.00	36.00
K_3	41.00	31.00	30.00	43.00
K_4	47.00	44.00	39.00	29.00
k_1	6.00	8.50	9.25	9.75
k_2	8.75	9.50	10.25	9.00
k_3	10.25	7.00	7.50	10.75
k_4	11.75	11.00	9.75	7.25
R	5.75	3.25	2.75	3.50

3.4 宽叶缙草SRAP-PCR反应程序退火温度 在所设置的12个温度中,36.8℃下扩增条带清晰、亮度高、数量多,其他温度下的扩增条带数量较少且亮度较低,故选择36.8℃作为SRAP-PCR程序中最佳退火温度。见图7。

3.5 宽叶缙草SRAP-PCR引物筛选 在已建立的PCR程序下筛选引物,筛选扩增条带丰富度高,清晰明亮的引物对,共17对,分别为Me2-Em2, Me2-

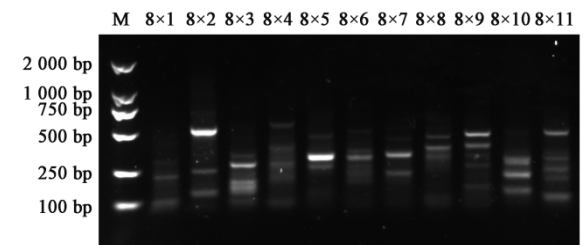


M. D2000 Plus DNA; 1~12. 温度30.0,30.2,31.0,32.0,33.2,34.4,35.6,36.8,38.0,39.0,39.7,40.0℃

图7 宽叶缙草SRAP-PCR退火温度选择

Fig. 7 Annealing temperature selection of *V. officinalis* var. *latifolia*

Em6, Me2-Em7, Me2-Em11, Me3-Em2, Me3-Em3, Me3-Em4, Me3-Em8, Me4-Em1, Me4-Em8, Me5-Em2, Me5-Em3, Me5-Em6, Me6-Em2, Me6-Em5, Me6-Em6, Me8-Em11, 见图8。



M. D2000 Plus DNA; 8x1为Me8与Em2组成的引物对,后以此类推

图8 宽叶缙草SRAP引物筛选(Me8)

Fig. 8 Amplification product of SRAP primers obtained of *V. officinalis* var. *latifolia* (Me8)

3.6 宽叶缙草SRAP-PCR优化反应体系应用 将筛选出的17对引物对与宽叶缙草基因组DNA进行扩增,对扩增出的条带进行统计,共得到168个扩增条带,其中多态性条带124条,多态性为73.8%。引物对Me4-Em1, Me6-Em5, Me6-Em6, Me8-Em11扩增条带多态性均为100%,平均每对引物扩增出9.9个条带,结果表明SRAP-PCR优化体系可用于宽叶缙草分子标记研究,扩增条带清晰度高、稳定性良好、条带丰富。见表6。

4 讨论

近年来,SRAP分子标记技术已广泛应用于中药材品种鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性分析、遗传图谱构建和分子辅助育种等领域^[19-20]。扩增开放阅读框的引物设计在SRAP分子标记中起重要作用。SRAP的正向引物由17个碱基组成,核心序列由14个碱基及3个选择性核苷酸组成,引物5'端为TGAGTCCAAACCGG,3'端为3个选择性核苷酸。

表6 基于宽叶缙草SRAP的17种引物组合的多态性

Table 6 Polymorphism based on 17 primer combinations of SRAP of *V. officinalis* var. *latifolia*

引物对	总条带数/个	多态性条带数/个	多态性百分率/%
Me2-Em2	11	6	54.6
Me2-Em6	13	9	81.8
Me2-Em7	9	6	66.7
Me2-Em11	13	8	61.5
Me3-Em2	9	7	77.8
Me3-Em3	9	5	55.6
Me3-Em4	12	10	83.3
Me3-Em8	6	3	50.0
Me4-Em1	11	11	100.0
Me4-Em8	11	4	36.4
Me5-Em2	5	2	40.1
Me5-Em3	4	1	25.0
Me5-Em6	10	9	90.0
Me6-Em2	7	5	71.4
Me6-Em5	10	10	100.0
Me6-Em6	14	14	100.0
Me8-Em11	14	14	100.0

反向引物由18个碱基组成,5'端连接了15个碱基GACTGCGTACGAATT,3'端为3个选择性碱基^[21]。其原理是基因组外显子中含有大量的GC碱基,而启动子和内含子含有大量的AT碱基,以此设置的引物可对开放阅读框进行扩增,从而使扩增结果更丰富,更稳定^[22]。

用于进行分子标记试验的模板DNA需要达到一定纯度。若模板DNA中蛋白质未除尽或酚类物质含量较高将导致扩增条带拖尾,若RNA未除尽,将导致引物错配,故在进行分子标记试验前,有必要通过 A_{260}/A_{280} 对所提取的模板DNA进行纯度评估。当 $A_{260}/A_{280} < 1.8$ 时,说明蛋白质或酚类物质存在过高,提示需要在提取基因组DNA时加入适量 β -巯基乙醇或PVP,当 $A_{260}/A_{280} > 2$ 时,提示RNA除去不完全,需增加RNase的用量。

SRAP-PCR的扩增结果容易受到模板DNA, Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA聚合酶和引物等因素影响^[23-24],大多数研究表明影响较大的因素为模板DNA, Mg^{2+} , Taq DNA聚合酶^[20]。Taq Mix操作简单、方便,结果稳定,在试验研究中使用效率高,但是其固定的组分及推荐用量不一定适用于所有植物,需要根据植物扩增情况对各因素进行调整。故本实验在考察Taq Mix用量的基础上对模板DNA,

Mg^{2+} , Taq DNA聚合酶进行优选。

试验中如果出现扩增条带模糊、拖尾、亮度低时需要进行Taq Mix用量考察,同时在其初始用量基础上增加 Mg^{2+} , Taq DNA聚合酶。 Mg^{2+} 在SRAP-PCR中起到重要作用,是Taq DNA聚合酶的激活剂,对PCR扩增结果专一性、扩增量均有影响^[25]。 Mg^{2+} 浓度过高会抑制Taq DNA聚合酶的活性及降低PCR扩增特异性,浓度过低则影响扩增产量,导致扩增条带不完整、模糊甚至不显示条带。适量的 Mg^{2+} 可提高SRAP扩增的专一性、丰富度。

Taq DNA聚合酶是一种耐高温DNA聚合酶,耐高温的特性促使该酶在程序94℃变性时仍保持活性,不需要添加新酶即可进入下一个循环的聚合反应。Taq DNA聚合酶的加入量过低,可导致PCR反应不完全;加入量过高,可导致非特异性结合,扩增条带为非目的条带,或表现出条带数量少但亮度极高^[26]。

模板DNA的用量也是影响PCR扩增结果的主要因素。模板DNA用量过高过低都易引起脱氧核糖核苷酸非特异性结合,前几轮的PCR反应,引物与模板DNA结合较多,与产物结合较少,若加入模板DNA过少,将导致引物与引物结合产生错配;若加入模板DNA过多,则导致在退火过程中,引物与

模板DNA竞争,模板DNA自身产生聚合反应,最终显示的条带只有一条,甚至扩增不出条带。加入模板DNA过多还会导致扩增条带出现拖尾的现象。

单因素考察结果显示, *Taq* Mix最佳用量为11 μL , Mg^{2+} 最佳加入量为0.025 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,模板DNA最佳用量为45 ng, *Taq* DNA最佳加入量为2.5 U,该结果与正交试验优化出的最佳反应体系有一定差异,表明不同因素之间存在相互影响。研究结果表明各因素对宽叶缬草SRAP-PCR扩增结果的影响程度大小依次为*Taq* Mix用量>*Taq* DNA聚合酶加入量> Mg^{2+} 加入量>模板DNA用量。

本实验最终确立宽叶缬草SRAP-PCR最佳反应体系为*Taq* Mix 11 μL , Mg^{2+} 0.025 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,模板DNA 30 ng, *Taq* DNA 1.5 U,上游引物与下游引物各5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,用 ddH_2O 补足体系至20 μL 。最优扩增程序为①94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,36.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,循环5次。②94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,36.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,循环35次,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。基于确定的最优反应体系及扩增程序进行引物筛选,88对引物中筛选出17对宽叶缬草有效引物,经验证均可扩增出清晰、完整、重复性好、稳定性高的条带,可为后续宽叶缬草遗传多样性及种质资源保护研究提供科学基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 覃容贵,钱志瑶,周镁,等. 宽叶缬草土壤理化性质对其总黄酮含量的影响[J]. 中药材,2016,39(8):1696-1698.

[2] CORNARA L, AMBU G, TROMBETTA D, et al. *V*comparative and functional screening of three species traditionally used as antidepressants: *Valeriana officinalis* L., *Valeriana jatamansi* Jones ex Roxb. and *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC [J]. Plants (Basel),2020,9(8):994.

[3] PARK J, LEE Y, LEE H, et al. In silico screening of GABA aminotransferase inhibitors from the constituents of *Valeriana officinalis* by molecular docking and molecular dynamics simulation study[J]. J Mol Model,2020,26(9):228.

[4] 王茹静,黄青,雍妍,等. 缬草属植物的化学成分及生物活性研究概况[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1405-1414.

[5] SARABANDI S, SATTARIFARD H, KIUMARSI M, et al. Association between genetic polymorphisms of

miR-1307, miR-1269, miR-3117 and breast cancer risk in a sample of south east Iranian women[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2021,22(1):201-208.

[6] SUEHIRO T, GIMENES F, SOUZA R, et al. High molecular prevalence of HPV and other sexually transmitted infections in a population of asymptomatic women who work or study at a Brazilian university[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo,2021,63:e1.

[7] SINGH A, MAJEED A, BHARDWAJ P. Transcriptome characterization and generation of marker resource for Himalayan vulnerable species, *Ulmus wallichiana* [J]. Mol Biol Rep,2021,48(1):721-729.

[8] KIM H, SA K, NAM-GUNG M, et al. Genetic characterization and association mapping in near-isogenic lines of waxy maize using seed characteristics and SSR markers[J]. Genes Genomics,2021,43(1):79-90.

[9] SINGH S K, KATOCH R, KAPILA R K. Genetic and biochemical diversity among *Valeriana jatamansi* populations from Himachal Pradesh [J]. Sci World J,2015,2015:863913.

[10] QUIROS G L 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.

[11] AGYENIM-BOATENG K G, LU J, SHI Y, et al. SRAP analysis of the genetic diversity of wild castor (*Ricinus communis* L.) in South China [J]. PLoS One,2019,14(7):e0219667.

[12] KUMAR J, AGRAWAL V. Analysis of genetic diversity and population genetic structure in *Simarouba glauca* DC. (an important bio-energy crop) employing ISSR and SRAP markers [J]. Ind Crop Prod,2017,100:198-207.

[13] 钱志瑶,周镁,黄秀平,等. 黔产宽叶缬草的RAPD分析[J]. 中成药,2015,37(8):1751-1756.

[14] 钱志瑶,周道堂,黄秀平,等. 黔产宽叶缬草ISSR反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通报,2015,31(7):69-75.

[15] 张迎辉,杜溶訖,凡莉莉,等. 石斛属部分植物SRAP-PCR反应体系的建立与优化[J]. 热带作物学报,2021,42(1):25-32.

[16] 戚华沙,陈加利,杨立荣,等. 海南油茶SRAP-PCR体系优化及有效引物筛选[J]. 分子植物育种,2020,18(10):3273-3281.

[17] 代培红,寇小霞,吾买尔夏提·塔汉,等. 大赖草

- SRAP-PCR反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2019, 17(17): 5735-5740.
- [18] 任小巍, 王瑜, 袁庆华. 正交设计优化草地早熟禾 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 草业科学, 2012, 29(3): 411-416.
- [19] 廖秋石, 雷刚, 陈学军, 等. 分子标记技术在茄子种质资源评价中的应用研究进展[J]. 江西农业学报, 2020, 32(8): 44-51.
- [20] 李亚兰, 潘存德, 陈虹. SRAP 标记在五十份新疆人工栽培核桃种质资源的鉴定与应用[J]. 北方园艺, 2019(16): 44-52.
- [21] CRONJE R, NONYANE D, HAJARI E. Sequence-related amplified polymorphism markers-a tool for litchi breeders in Africa[J]. S Afr J Sci, 2020, 116(7/8): 78-83.
- [22] 王延禹, 周雅卓, 郑大浩, 等. 高山红景天雌株特异性 SRAP 标记发掘及其关联基因功能分析[J]. 延边大学学报农学学报, 2016, 38(4): 283-291.
- [23] 石紫薇, 梁妍, 姜婷婷, 等. 正交设计优化青蒿 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(10): 3303-3310.
- [24] 严武平, 李娟玲, 吴淑敏, 等. 鹧鸪茶 SRAP-PCR 反应体系优化技术[J]. 分子植物育种, 2018, 16(10): 3252-3258.
- [25] 陈燕萍, 陈美霞, 徐建堂, 等. 圆果黄麻成熟叶片总 DNA 提取及 SRAP 扩增体系的建立与优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(5): 461-466.
- [26] 欧虹雅, 韩冬苗, 黄兹宝, 等. 南药益智 SRAP-PCR 体系优化及引物筛选[J]. 生物技术进展, 2018, 8(4): 338-344.

[责任编辑 顾雪竹]