

新型植物油莎豆 DNA 提取与 SRAP 体系优化

赵永国,金梦阳,危文亮*

(中国农业科学院油料作物研究所,农业部油料作物生物学重点开放实验室,湖北 武汉,430062)

摘要:以 14 个不同地理来源的油莎豆品系为实验材料,研究了油莎豆 DNA 快速提取方法;以 SRAP 反应体系中 DNA 模板量、 Mg^{2+} 浓度和引物浓度 3 个因子分别设置 3 个水平,共配制 27 个反应体系,对油莎豆 SRAP 反应体系进行优化。研究结果表明:改良 CTAB 法可获得较高质量的 DNA,参试材料的 A_{260}/A_{280} 介于 1.70 ~ 1.98;在 27 个 SRAP 反应体系(15 μ L)中,最优反应体系为 DNA 模板 25ng、 Mg^{2+} 1.5mmol/L、引物浓度 1 μ mol/L、dNTPs 0.3 mmol/L 和 Taq 酶 1U,可扩增出清晰稳定的多态性条带。

关键词:油莎豆; DNA 提取;SRAP;体系优化

中图分类号:S565.903 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2011)01-0039-05

DNA extraction and establishment of SRAP reaction system in tigernut (*Cyperus esculentus*)

ZHAO Yong-guo, JIN Meng-yang, WEI Wen-liang*

(Oil Crops Research Institute, CAAS, Key Laboratory of Oil Crops Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: In this study, fourteen tigernut lines from different geographical areas were used to investigate the effective method of DNA extraction and to construct the optimized SRAP reaction system. Twenty seven reaction systems were designed with three concentration levels of DNA template, magnesium ion and primers. The results showed that the improved method of CTAB contributed to a better extraction of genomic DNA of tigernut, and the A_{260}/A_{280} values of all samples ranged from 1.70 to 1.98. Out of the 27 reaction systems, the optimal system for SRAP analysis had 25ng DNA, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 1 μ mol/L primers, 0.3mmol/L dNTPs and 1U Taq polymerase in 15 μ L total volume. These results provided technical assistance to evaluate germplasm resource, genetic diversity and molecular breeding in tigernut.

Key words: *Cyperus esculentus*; DNA extraction; SRAP; System optimization

我国油料供需矛盾日益突出,大力提高我国油脂供给能力、保障食物消费安全,已成为研究者需要解决的一项重要的科研课题^[1~4]。油莎豆(tigernut, *Cyperus esculentus* L.)为莎草科一年生草本油料作物,原产于非洲地中海地区,我国于1960年引进,现在北自内蒙、新疆,南至广西、江苏等20多个省区种植^[5]。油莎豆具有生育期短、产油量高、综合利用价值较高等优势,其抗逆性强、适应性好,适合在滩涂地、沙质地和盐碱地等边际地种植,是极具开发潜力的新型油料作物。大力开发、种植油莎豆,不仅可以充分利用边际土地资源、增加油脂供给能力,而且

有利于促进油料种植业、加工业及饲料畜牧业等产业发展,带动农民增收和就业,综合效益明显^[6]。

国内外对油莎豆的研究较少,且大多集中于油脂营养成分、栽培技术、油脂提取工艺及多倍体育种研究等方面^[7~10]。我国油莎豆资源多从国外引进,遗传基础不详,关于油莎豆资源遗传多样性的研究未见报道。利用分子标记技术进行遗传多样性分析,已广泛应用于水稻、小麦、油菜、花生、马铃薯等主要粮油作物^[11~13],目前广泛应用的分子标记主要有RAPD、SSR、SRAP和AFLP等。其中SRAP是近年来发展起来的新型分子标记,具有引物设计简单、

收稿日期:2010-08-02

基金项目:国家自然科学基金(31000727);湖北省自然科学基金(2008CDB092);农业部油料作物生物学重点开放实验室开放基金(2010-1)

作者简介:赵永国(1978-),男,山东泰安人,博士,从事油料作物育种研究,Tel: 027-86832099;E-mail: ygzhaol019@yahoo.com.cn

* 通讯作者:危文亮,副研究员,E-mail: whwenliang@163.com

多态性好以及对 DNA 纯度要求不高等优点,已在多种作物中应用^[14~16]。本研究以油莎豆种质资源为材料,进行改良的 CTAB 方法提取 DNA 和 SRAP 体系优化研究,建立油莎豆 DNA 快速提取方法和适用的 SRAP 反应体系,为进一步开展油莎豆种质资源评价、遗传多样性分析及分子育种等后续研究提供技术基础。

表 1 参试材料、来源与块茎特征
Table 1 Origin and tuber characteristics of 14 tigernut clones

编号 Code	来源 Origin	块茎类型 Tuber type	编号 Code	来源 Origin	块茎类型 Tuber type
1	河南省 Henan Province	长椭圆形 Large – oval size	8	内蒙古自治区 Inner Mongolia Autonomous Region	长椭圆形 Large – oval size
2	河南省 Henan Province	圆形 Spherical size	9	辽宁省 Liaoning Province	长椭圆形 Large – oval size
3	湖北省 Hubei Province	圆形 Spherical size	10	浙江省 Zhejiang Province	圆形 Spherical size
4	河北省 Hebei Province	椭圆形 Average – oval size	11	江苏省 Jiangsu Province	圆形 Spherical size
5	河南省 Henan Province	圆形 Spherical size	12	内蒙古自治区 Inner Mongolia Autonomous Region	圆形 Spherical size
6	河北省 Hebei Province	圆形 Spherical size	13	河南省 Henan Province	圆形 Spherical size
7	河北省 Hebei Province	长椭圆形 Large – oval size	14	新疆维吾尔自治区 Xinjiang Uygur Autonomous Region	椭圆形 Average – oval size

1.2 基因组 DNA 提取

实验采用改良的 CTAB 法对油莎豆叶片进行 DNA 提取。具体方法如下:

1) 取 0.5~1.0g 油莎豆叶片于研钵中,加液氮研磨成粉末状后迅速装入 1.5mL 离心管中;2) 加入 65℃ 预热的 CTAB 溶液 800μL (50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris – HCl, pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 1% (v/v) β – 巯基乙醇),充分摇匀后于 65℃ 水浴 30~45min,每 10min 搅动 1 次;3) 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻摇混匀后于室温下 12 000r/min 离心 20min;4) 取上清液重复步骤 3,共两次;5) 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2) 和等体积的冷冻异丙醇,轻摇混匀后于 –20℃ 冰箱放置约 30min,12 000r/min 离心 20min;

表 2 SRAP 体系 3 个主要因子的优化设计
Table 2 Optimized design of SRAP reaction system with three major factors

编号 Code	因子 Factor			编号 Code	因子 Factor			编号 Code	因子 Factor		
	DNA Template/ng	Primers /(μmol/L)	Mg ²⁺ /(mmol/L)		DNA Template/ng	Primers /(μmol/L)	Mg ²⁺ /(mmol/L)		DNA Template/ng	Primers /(μmol/L)	Mg ²⁺ /(mmol/L)
1	25	0.5	1.2	10	50	0.5	1.2	19	75	0.5	1.2
2	25	0.5	1.5	11	50	0.5	1.5	20	75	0.5	1.5
3	25	0.5	1.8	12	50	0.5	1.8	21	75	0.5	1.8
4	25	1	1.2	13	50	1	1.2	22	75	1	1.2
5	25	1	1.5	14	50	1	1.5	23	75	1	1.5
6	25	1	1.8	15	50	1	1.8	24	75	1	1.8
7	25	1.5	1.2	16	50	1.5	1.2	25	75	1.5	1.2
8	25	1.5	1.5	17	50	1.5	1.5	26	75	1.5	1.5
9	25	1.5	1.8	18	50	1.5	1.8	27	75	1.5	1.8

1 材料与方法

1.1 参试材料

实验所用 14 份材料收集于河南省、河北省、湖北省、辽宁省、浙江省、江苏省、内蒙古自治区和新疆维吾尔自治区等 8 个省区,具体收集地、编号与块茎表型特点见表 1。

6) 弃上清液,用 76% 酒精 (10mmol/L NH₄AC) 浸泡洗涤沉淀,重复 2~3 次;7) 室温下于超净工作台上晾干,加入 200μL TE 缓冲液 (10mmol/L Tris – HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 溶解 DNA,每管加入 3μL RNase A (10mg/mL),37℃ 水浴 2h。DNA 溶液放入 –20℃ 冰箱备用。

1.3 DNA 纯度与浓度检测

取 DNA 原液 5μL 用双蒸水稀释至 100μL,用 BECKMAN DU650 紫外分光光度计测定 230nm、260nm 和 280nm 处的吸光值,计算 DNA 溶液浓度。取 DNA 原液 2μL 用双蒸水稀释至 10μL,用 1×TAE 电泳缓冲液,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,电泳设定为 4V/cm。

1.4 PCR 反应因子水平的确定与扩增体系设计

为确定 PCR 最佳反应体系,以 Me7 (TGAGTC-CAAACCGGTTG) 为正向引物、Em8 (GACTGCG-TACGAATTAGC) 为反向引物,对 PCR 反应体系中 DNA 模板量、Mg²⁺ 浓度和引物浓度 3 个因子分别设置 3 个水平,共配制 27 个反应体系(表 2),对 SRAP 反应体系进行优化。所用引物购于美国 Operon 公司,Taq 酶和 dNTP 购于上海生工公司,PCR 反应在 Bio – Rad 100 PCR 仪上进行。反应体积为 15μL,PCR 程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 1min,35℃ 1min,72℃ 1.5min,5 个循环;94℃ 1min,50℃ 1min,72℃ 1.5min,35 个循环;72℃ 延伸 10min。

1.5 电泳、检测

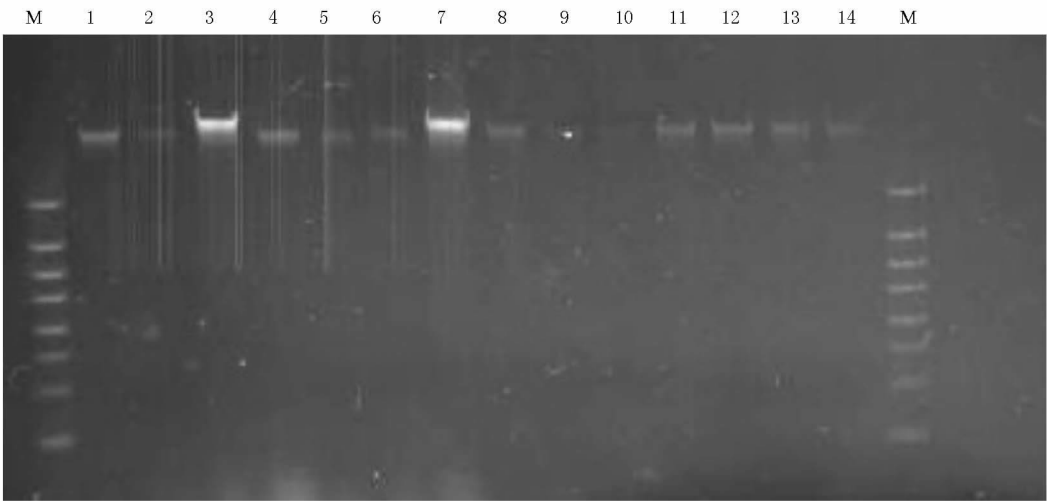
PCR 产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳缓冲液为 1 × TBE,电泳时先 2 000V 预电泳 30min,PCR 产物加 10μL 上样缓冲液(loading buffer)、沸水浴变性 5min,于冰上冷却后上样,2 000V 电

泳 1.5h,二甲苯青电泳至板约 2/3 处停止电泳,凝胶固定、银染、显影等步骤参照陆光远^[17]方法进行。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量检测

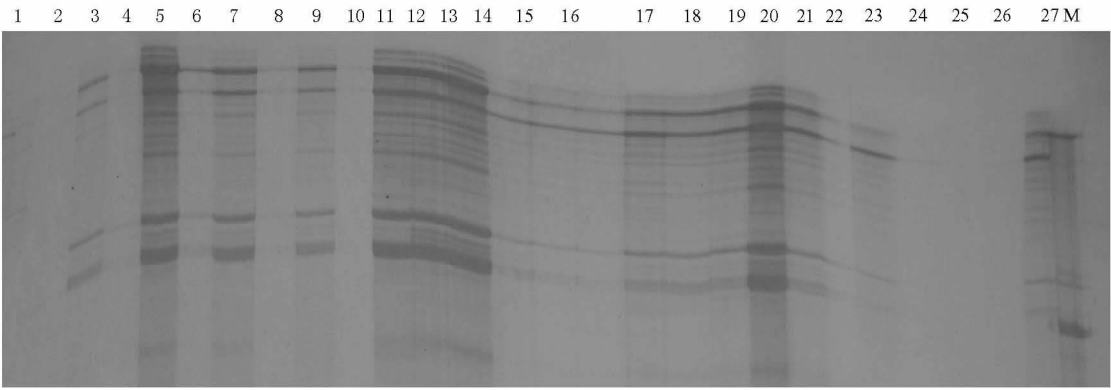
采用改良 CTAB 法提取 14 个参试材料 DNA,所提 DNA 样品 A₂₆₀/A₂₈₀ 介于 1.70 ~ 1.98,表明 DNA 质量较高;A₂₆₀/A₂₃₀ 介于 1.41 ~ 2.04,但有 3 个材料大于 1.90,占有所有材料的 21.4%,表明含有部分多肽、苯酚类等杂质。实验采用 3 次氯仿/异戊醇重复抽提样液,以彻底去除蛋白、色素等杂质,保证了 DNA 的纯度和质量。提取产物溶于 200μL TE 缓冲液,测定 DNA 浓度为 167 ~ 885ng/μL。1% 琼脂糖电泳检测结果表明(图 1),点样孔处无杂质遗留,条带较为清晰,无拖尾现象。表明改良 CTAB 法用于油莎豆叶片的 DNA 提取,可获得较高纯度和质量的 DNA。



注:1 ~ 14 指 14 个油莎豆材料编号,同表 1
Note:1 ~ 14 indicated the 14 tigernut clones listed in Table 1;M was DNA Ladder

图 1 CTAB 法提取油莎豆叶片 DNA 的电泳图

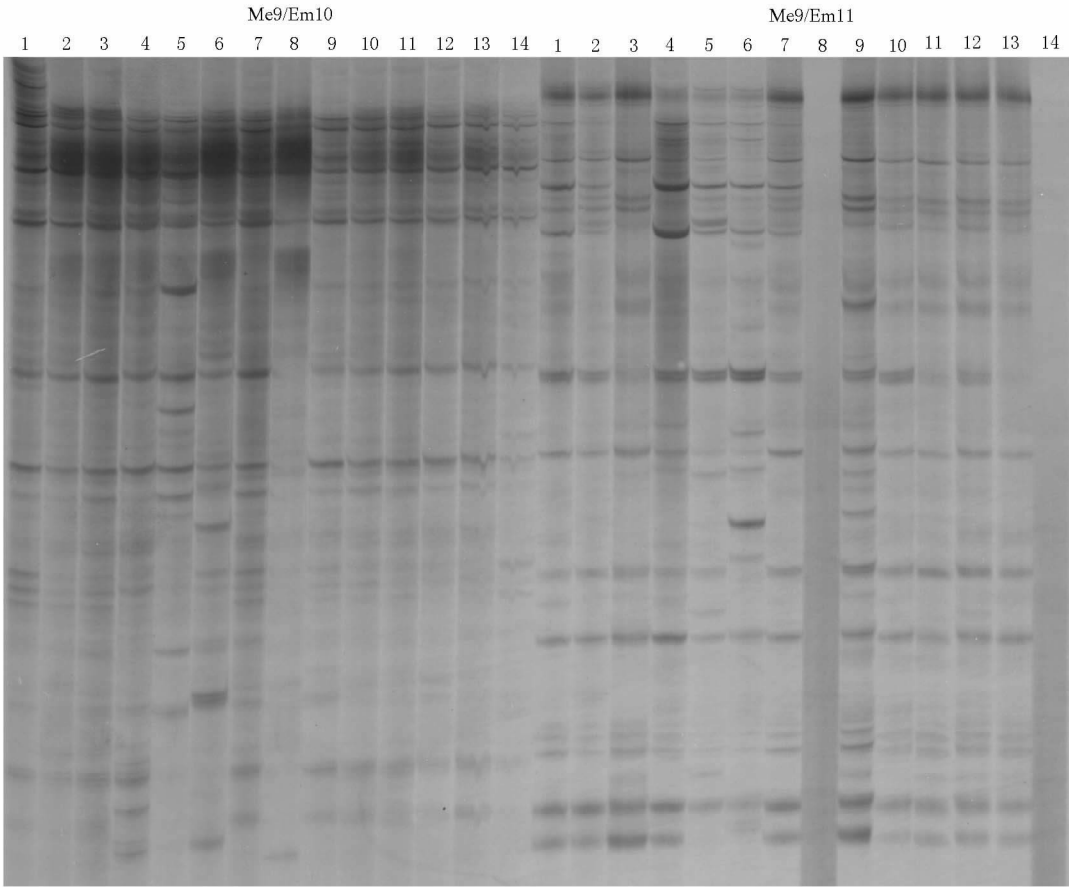
Fig.1 DNA extracted from leaves in 14 tigernut by CTAB Clonals



注:1 ~ 27 指 27 个不同 SRAP 反应体系,编号同表 2. M:1kb Ladder
Note:No. 1 ~ 27 indicated the 27 different SRAP reaction systems listed in Table 2. M was 1kb Ladder

图 2 不同 SRAP 反应体系扩增产物的电泳检测结果

Fig.2 Detection of PCR products from different SRAP reaction system



注:1~14 指 14 个油莎豆材料编号,见表 1
Note:No. 1~14 indicated the 14 tigernut clones listed in Table 1

图 3 SRAP 引物对 Me9/Em10 和 Me9/Em11 对油莎豆材料的扩增图谱

Fig. 3 Amplified profile of 14 tigernut lines by SRAP primer pairs of Me9/Em10 and Me9/Em11

2.2 SRAP 扩增与体系优化

以 13 号材料的油莎豆叶片基因组 DNA 为模板,按照表 2 设计的 SRAP 体系进行扩增。扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果见图 2。可见,27 个体系中以体系 5 (总体积 15 μ L, DNA 模板 25ng、MgCl₂ 1.5mmol/L、引物浓度 1 μ mol/L、dNTPs 0.3 mmol/L 和 Taq 酶 1U) 最为稳定,重复三次的电泳银染结果,均可以扩增出清晰的条带。

利用建立的 SRAP 反应体系进行引物筛选,图 3 为引物组合 Me9/Em10 和 Me9/Em11 对 14 个参试材料的扩增、银染结果。可见,不同材料间可扩增出清晰条带,且条带多态性丰富、清晰稳定(重复电泳、银染 3 次),能反映材料间的差异,表明该反应体系适合进行油莎豆的 SRAP 分析。

3 讨论

油莎豆具有较高的综合利用价值,其发展潜力已被越来越多的研究者所重视^[18]。因此,有必要开展油莎豆遗传基础研究,为遗传育种和品质改良等工作奠定基础。分子标记是鉴定种质资源遗传多样

性最为有效的方法之一,国外已有对油莎豆遗传多样性的研究报道,但仅限于同工酶和 RAPD 分子标记技术^[19-21]。SRAP 分子标记由于具有产率稳定、操作简单及对 DNA 要求不高等优点而广泛应用于不同作物的遗传多样性分析。本研究在前期预备试验与参考前人文献的研究基础上^[22,23],用改良 CTAB 法进行油莎豆 DNA 快速提取,并分析了 DNA 模板量、Mg²⁺ 浓度和引物浓度 3 个因子对油莎豆 SRAP 扩增结果的影响。结果表明,最优 SRAP 反应体系为 (15 μ L): DNA 模板 25ng、Mg²⁺ 1.5mmol/L、引物浓度 1 μ mol/L、dNTPs 0.3mmol/L 和 Taq 酶 1U。值得注意的是,本研究中体系 7、体系 9、体系 11-13 及体系 20 也可以扩增出清晰条带,但它们在三次重复间不稳定,所以选择体系 5 作为最佳的扩增体系。

用建立的反应体系对 14 个油莎豆材料进行扩增,能够获得图谱清晰、可稳定重现的多态性条带,表明获得的 SRAP 反应体系较好,可为油莎豆遗传多样性分析及分子育种等后续研究提供技术基础。

参考文献:

- [1] 王汉中. 我国食用油供给安全形势分析与对策建议[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 347 - 349.
- [2] 田 煜. 全球油脂油料供需形势分析. 粮食与油脂[J]. 2003, 11: 28 - 30.
- [3] 徐伟平. 当前国内外油料食用植物油市场分析与展望. 农业展望[J]. 2008, 3: 12 - 14.
- [4] 王永刚. 中国油脂油料供求、贸易、政策的现状与前景[J]. 粮食科技与经济, 2009, 6: 11 - 13.
- [5] 钱学射, 张卫明, 顾龚平, 等. 燃料油植物油莎豆的综合利用与栽培[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(3): 7 - 11.
- [6] 危文亮, 金梦阳. 发展能源油料作物的策略分析[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 260 - 264.
- [7] 陈 星, 陈 滴, 刘 蕾. 油莎豆全成分分析[J]. 食品科技, 2008, 34(3): 165 - 168.
- [8] 张小燕. 油莎豆的主要高产栽培技术[J]. 经济作物, 2009, 6: 165 - 166.
- [9] 刘 蕾. 油莎豆有效成分分析及油脂提取工艺研究[D]. 东北师范大学, 硕士论文, 2008.
- [10] 吴 琼. 油莎豆再生体系的建立及多倍体诱导[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [11] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F_2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 622 - 626.
- [12] 段艳凤, 刘 杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1 451 - 1 457.
- [13] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246 - 256.
- [14] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1 118 - 1 126.
- [15] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246 - 256.
- [16] 谭祖猛, 李云昌, 胡 琼, 等. 通过分子标记估算遗传距离预测甘蓝型油菜的杂种优势[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2): 26 - 132.
- [17] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20: 413 - 415.
- [18] Thullen R J, Keeley P E. Seed production and germination in *Cyperus esculentus* and *C. rotundus* [J]. Weed Sci. 1979, 27: 502 - 505.
- [19] Horak M J, Holt J S. Isozyme variability and breeding systems in populations of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) [J]. Weed Sci, 1986, 34: 538 - 543.
- [20] Okoli C A N, Shilling D G, Smith R L, et al. Genetic diversity in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.) [J]. Biological control, 1997, 8: 111 - 118.
- [21] Tayyar R I, Holt J S. Genetic and morphological analysis of two novel nutsedge biotypes from California [J]. Weed Sci, 2003, 51: 731 - 739.
- [22] 谭美莲, 姜兴华, 严明芳, 等. 蓖麻 DNA 的提取及 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 527 - 530.
- [23] 徐建华, 杨虹琦, 杨 程, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系优化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 257 - 259.