

杏 SSR 反应体系的优化研究

宁 宁¹, 王玉柱², 张俊怀², 杨 丽², 孙浩元², 章 镇¹

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 北京市农林科学院 林业果树研究所 北京 100093)

摘 要: 研究了杏 SSR-PCR 反应体系的主要成分对扩增结果的影响, 并进行了体系验证。优化后的反应体系为: 总体积 20 μ L, 1 \times buffer、2.0 mM/L Mg^{2+} 、0.25 mM/L dNTP、0.20 μ M/L Primer、60 ng/20 μ L 模板 DNA 和 0.05 U/ μ L Taq 酶。利用 32 个杏品种验证此反应体系, 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果显示, 扩增产物在 184~267 bp 之间, 不同品种间 DNA 谱带具有多态性, 且反应体系的稳定性和可重复性好。

关键词: 杏; SSR-PCR; 体系优化

中图分类号: S 662.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0012-04

杏(*Prunus armeniaca* L.)属蔷薇科(Rosaceae)杏属(*Armeniaca* Mill.), 原产于我国西北、华北、东北及内蒙古东部一带^[1]。中国有杏品种(类型)2 000 余个^[2], 正式发表的品种有 1 400 多个, 大量的遗传资源在为品种选育提供了丰富遗传基础的同时, 由于数量巨大, 给遗传资源的深入研究和利用带来了困难。但是, 分子标记技术的发展为果树育种和资源利用的研究提供了有力的手段, 尤其是 SSR 标记是目前最为理想的分子标记技术之一, 并已广泛应用于桃^[3]、樱桃^[4]、核桃^[5]、果梅^[6]等果树的系谱分析、性状标记、遗传图谱构建等方面。但是由于树种及品种资源的不同, SSR-PCR 反应体系和程序的选择也有较大差异^[7-10]。因此, 为了更好的利用 SSR 标记技术对我国杏种质资源进行研究, 试验对 SSR-PCR 反应体系的各因子进行筛选, 以建立并优化杏 SSR-PCR 反应体系和程序。

1 材料与方法

1.1 材料

试材取自北京市林业果树研究所杏资源圃内。取健康植株 1 a 生枝条上的嫩叶, 用蒸馏水洗净, 吸水纸吸干后置于-80℃冰箱保存备用。所用试剂 10 \times Buffer、25 mmol/L $MgCl_2$ 、10 mmol/L dNTP, 由上海生物工程有限公司提供。2 U/ μ L Taq 酶由北京鼎国生物技术有限责任公司提供。引物序列参照桃基因组^[11], 由上海生物工程有限公司合成, 序列为: 5' AAGCCATCCACTCAGCACTC 3' 和 5' CCAAAAACCAAACCAAAGG 3'。

1.2 方法

第一作者简介: 宁宁(1984), 女, 在读硕士, 主要从事中国杏核心种质构建的研究工作。E-mail: ning0428@163.com。

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6081001)。

收稿日期: 2008-11-20

1.2.1 基因组 DNA 的提取及质量检测 采用的 Doyle 等报道的 CTAB 方法^[12] 并稍加改良提取基因组 DNA, 步骤如下: 取 1.0 g 左右幼嫩叶片于研钵中, 液氮研磨后转入 50 mL 离心管中; 加入 7 mL 2% CTAB 提取液和 70 μ L β -巯基乙醇(现用现加), 剧烈振荡, 混匀, 65℃温育 45 min; 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 混匀; 8 000 r/min 离心 10~15 min; 取上清液放置于 50 mL 离心管中; 加 2 倍体积无水乙醇(预先放置于-20℃)沉淀 DNA, 1 h; 吸出上清, 保留沉淀, 将沉淀放置于 1.5 mL 离心管中; 用 70%酒精(预先放置于-20℃)洗沉淀 2 次, 10 min/次, 再用无水乙醇进行冲洗; 然后置于室温干燥 DNA 沉淀; 加入 500 μ L TE 溶解; 加入 2 μ L 的 10 mg/mL RNA 酶, 37℃消化 30~60 min; 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 混匀; 8 000 r/min 离心, 10~15 min; 取上清, 加入 5 M NH_4Ac 至终浓度 0.5 M, 混匀; 加入 1.5 倍体积无水乙醇(预先放置于-20℃)沉淀 DNA, 1 h; 弃上清, 保留沉淀; 用 70%酒精(预先放置于-20℃)洗沉淀 2 次, 再用 100%乙醇冲洗 1~2 次; 于室温干燥 DNA 沉淀; 加入 5~100 μ L 的 1 倍 TE 溶解沉淀, 放置于 4℃水合 2 d; 置于-20℃贮存 6 个月。提取的 DNA 质量和浓度采用 1%琼脂糖凝胶电泳(北京六一仪器厂, DYY-III 型)和紫外分光光度计(Q/OAGO-97, 上海天美科学仪器有限公司)测定。

1.2.2 SSR-PCR 扩增 以鲜食杏品种‘大巴达’为试材, 采用 20 μ L 反应体系 对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板 DNA 及 Taq 酶 5 因素设 4 个浓度梯度, 共 20 个处理(如表 1 所示)。SSR 扩增在 PTC-200 PCR 仪上进行。扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 45 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 进行 35 个循环, 最后 72℃延伸 8 min, 然后置于 4℃待电泳检测。

表1 杏 SSR 反应体系优化

Table 1 Optimization of SSR System in Apricot					
编号 Number	Mg ²⁺ / mM · L ⁻¹	dNTP / mM · L ⁻¹	引物 Primer/ mM · L ⁻¹	模板 DNA Template DNA / ng · (20 μ L) ⁻¹	Taq 酶 Taq polymerase / U · (20 μ L) ⁻¹
1	1.5	0.15	0.15	20	0.5
2	2.0	0.20	0.20	40	1.0
3	2.5	0.25	0.25	60	1.5
4	3.0	0.30	0.30	80	2.0

1.2.3 PCR 产物的检测 采用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 电压 1 000 V, 时间 1.5 h, 电泳结束后银染染色。染色方法为: 10%乙醇固定 5 min, 双蒸水漂洗 0.5~1 min, 0.1%硝酸氧化 5 min, 双蒸水漂洗 0.5~1 min, 0.1%硝酸银染色 30 min, 双蒸水漂洗 10~15 s 在 3%碳酸钠(加入 1.5 mL/L 甲醛和 1.5 mg/L 硫代硫酸钠)溶液中显色 5~10 min, 显色后用 10%乙酸固定, 用水洗净残余乙酸, 阴干保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果

利用改良 CTAB 法提取不同品种类群的 6 个杏品种基因组 DNA 的检测结果如表 2 所示, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.81~1.88 之间, DNA 质量浓度为 153.2~1 296.1 μ g/mL, 纯度和产量均较高。用 1%琼脂糖检测(图 1)所提 DNA 条带清晰, 无弥散拖尾现象、无杂带, RNA 去除较干净, 纯度较高, 能够满足 SSR 的扩增要求。

表2 6个不同杏品种 DNA 质量浓度与 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值

Table 2 DNA concentration and OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ of different apricot cultivars		
品种 Variety	DNA 质量浓度 DAN concentration/ μ g · mL ⁻¹	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
子荷杏	1 296.1	1.87
沙金红	807.2	1.81
绿萼山杏	1027.9	1.86
草丕杏	597.5	1.88
豫寒魁	601.7	1.82
大巴达	153.2	1.85

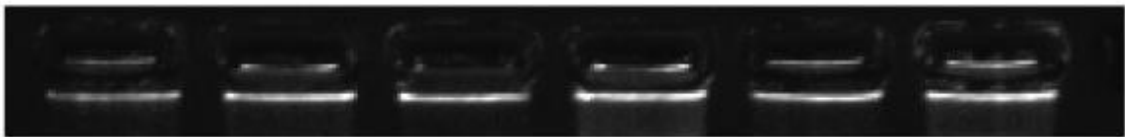


图1 所提的部分 DNA 琼脂糖电泳图谱

注: 1. 草丕杏; 2. 大巴达; 3. 豫寒魁; 4. 子荷杏; 5. 绿萼山杏; 6. 沙金红
Fig.1 Agarose gelelectrophoresis of genomic DNA extracted
Notes: 1. Caopixing; 2. Dabada; 3. Yuhankui; 4. Zihexing; 5. Lvshanxing 6. Shajinhong.

2.2 杏 SSR 优化反应体系的建立

2.2.1 Mg²⁺ 浓度对 SSR 扩增结果的影响 试验采用了 4 个浓度梯度, 如图 2 所示。Mg²⁺ 浓度为 1.5~2.5 mM/L 时均可产生稳定一致的条带, 扩增结果较好; 当浓度达到 3.0 mM/L 时, 扩增的特异性降低, 条带产生弥散现象。浓度为 2.0 mM/L 时, 条带最为清晰, 扩增效果最好。

2.2.2 dNTP 浓度对 SSR 扩增结果的影响 dNTP 浓度对 SSR 反应的影响见图 2。虽然 4 个浓度梯度中均得到相同扩增产物, 但相比之下, 当 dNTP 用量为 0.25 mM/L 时, 可以得到理想的扩增效果。因此, 确定 dNTP 适宜用量为 0.25 mM/L。

2.2.3 引物浓度对 SSR 扩增结果的影响 引物在 4 个浓度中均有扩增产物, 考虑到一般扩增反应中引物量过大可能出现引物二聚体, 因此确定引物的适宜浓度为 0.15~0.25 μ M/L。

2.2.4 DNA 浓度对 SSR 扩增结果的影响 结果如图 2 所示, 在其他影响因素相同的条件下, 模板 DNA 的用量在 20 ng 和 40 ng 时扩增产物相对较弱, 60 ng 和 80 ng

时条带较清晰, 扩增效果较好, 在 60 ng 时扩增效果最好, 条带最为清晰。

2.2.5 Taq 酶浓度对 SSR 扩增结果的影响 Taq 酶在 4 个浓度中均有扩增产物, 结果如图 2 所示, 1.0 U 和 1.5 U 时条带均较明亮、清晰, 选取最小浓度即可达到试验要求, 故确定 1.0 U/20 μ L 为 Taq 酶在 SSR 反应中的适宜浓度。

综上所述, 在 20 μ L 的反应体系中各成份最适用量分别为: Mg²⁺ 为 2.0 mM/L; dNTP 0.25 mM/L; 引物为 0.15~0.25 μ M/L; DNA 用量 60 ng; Taq DNA 酶 1 U。

2.3 SSR 反应体系的验证

利用优化后 20 μ L SSR 反应体系: Mg²⁺ 2.0 mM/L; dNTP 0.25 mM/L; 引物 0.20 μ M/L; DNA 用量 60 ng; Taq DNA 酶 1 U, 对 32 个杏品种进行 SSR 扩增, 检测结果如图 3 所示, 条带清晰, 不仅扩增强, 而且特异性高; 同时反应体系具有较好稳定性和可重复性。并对同一 SSR 引物的扩增产物分别进行 1%琼脂糖凝胶和 0.6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明, 2 种电泳检测的 DNA 片段的多态性明显不同。用琼脂糖凝胶检测的 32

个杏品种,观测不到多态性。而用非变性聚丙烯酰胺凝胶进行检测 DNA 片段的分辨率明显提高,条带清晰,多数品种具有多态性。表明利用优化后的反应体系能够

有效地对不同杏品种基因组进行 SSR 扩增,该反应体系实用性强。

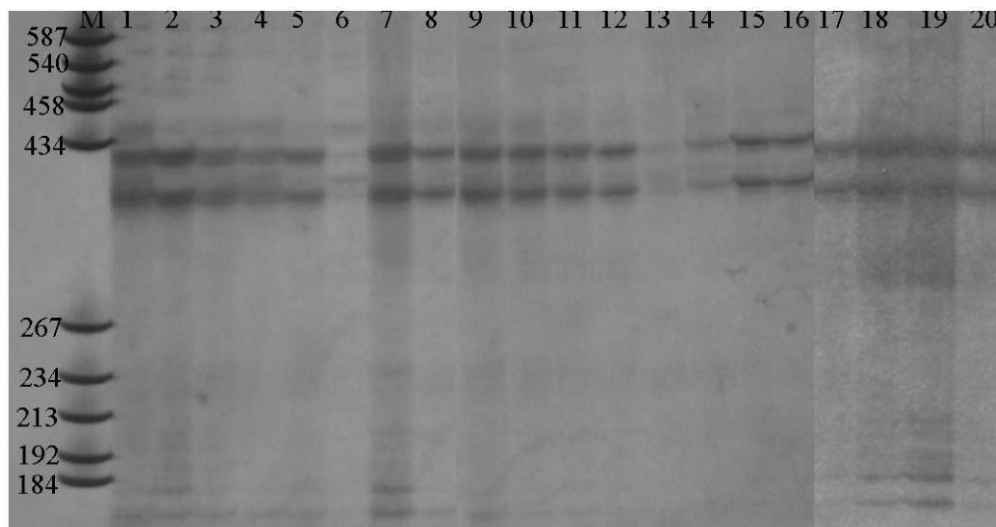


图2 杏 SSR 反应体系不同组分对扩增结果的影响

注:泳道 1~4 Mg^{2+} 1.5, 2.0, 2.5 及 3.0 mM/L; 泳道 5~8 dNTP 0.15, 0.20, 0.25 及 0.30 mM/L; 泳道 9~12 引物 0.15, 0.20, 0.25 及 0.30 μ M/L; 泳道 13~16 DNA 模板 20, 40, 60 及 80 ng; 泳道 17~20 Taq 酶 0.5, 1.0, 1.5 及 2.0 U。

Fig.2 The effects of different components on SSR amplification of apricot

Notes: lane 1~4, Mg^{2+} 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM/L; lane 5~8, dNTP 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30 mM/L; lane 9~12, primer 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30 μ M/L; lane 13~16, Template DNA 20, 40, 60 and 80 ng; lane 17~20, Taq polymerase 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 U.

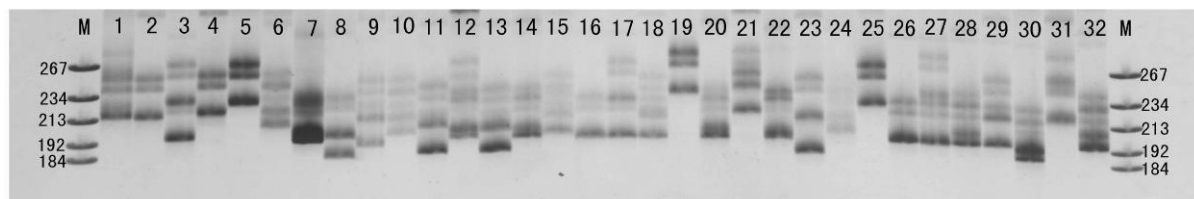


图3 聚丙烯酰胺凝胶检测不同杏品种 SSR 扩增产物

注: M 为 DNA 标准分子量; 1. 606 杏; 2. 631 杏; 3. 新疆沙杏; 4. 安加娜; 5. 巴斗杏; 6. 白胡外娜; 7. 白仁杏; 8. 白沙杏; 9. 包天一串铃; 10. 北安河大黄杏; 11. 鞭杆杏; 12. 苍家杏; 13. 草滩梅杏; 14. 昌黎白果杏; 15. 串铃; 16. 串枝红杏; 17. 大白杏; 18. 大丰杏; 19. 道孚杏; 20. 大偏头杏; 21. 大叶杏; 22. 东宁 2 号; 23. 二转子; 24. 法库核包; 25. 房陵大杏; 26. 关老爷脸杏; 27. 古渡杏; 28. 孤山大杏梅; 29. 姑咱杏; 30. 黑叶杏; 31. 红脸杏; 32. 红火梅子。

Fig.3 DNA bands of different cultivars of apricot with polyacrylamide gel in SSR analysis system

Notes: M. DNA Molecular marker; 1. 606Xing; 2. 631Xing; 3. Xinjiangshaxing; 4. Anjiana; 5. Badouxing; 6. Baihuwaina; 7. Bairenxing; 8. Baishaxing; 9. Baotianyichuanling; 10. Beianhehuangxing; 11. Bianganxing; 12. Cangjiaxing; 13. Caotanmeixing; 14. Changlibaiguoxing; 15. Chuanling; 16. Chuanzhongxing; 17. Dabaixing; 18. Dafengxing; 19. Daofuxing; 20. Dapiantouxing; 21. Dayexing; 22. Dongning 2; 23. Erzhuang; 24. Fakuheba; 25. Fanglingdaxing; 26. Guanhuoyelianxing; 27. Gulixing; 28. Gushandaxingmei; 29. Guzanxing; 30. Heyexing; 31. Honglianxing; 32. Honghuomeizi.

3 讨论

SSR 标记因同时具有多态性高、重复性好、共显性等特点,在图谱构建和分子标记辅助育种等领域中已广泛应用。但物种、材料、仪器以及反应体系对 SSR 反应结果都有较大的影响,任何一个反应因子设置不好,都会影响整个反应过程^[9]。该试验在实验室已有的基础

上,对影响 SSR 反应的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板 DNA 及 Taq DNA 酶进行了优化试验分析,筛选出了最适宜的浓度,确定了杏 SSR 反应最佳体系:即总体积 20 μ L, 1 \times buffer、2.0 mM/L Mg^{2+} 、0.25 mM/L dNTP、0.20 μ M/L Primer、60 ng/20 μ L 模板 DNA、1.0 U Taq 酶,用超纯水补足 20 μ L。经验证,所建立的体系稳定,重复性

好、分辨率高, 杏品种的扩增产物在 150~500 bp 之间, 为下一步构建我国杏核心种质的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 辛树帜. 中国果树史研究[M]. 北京: 农业出版社 1983.
- [2] 张加延. 中国李杏资源及开发利用研究[M]. 北京: 中国林业出版社 1999.
- [3] 李银霞, 李天红. 桃 SSR 反应体系的优化[J]. 中国农业大学学报 2005, 10(6): 57-61.
- [4] 艾呈祥, 辛力, 余贤美, 等. 樱桃主栽品种的遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 871-876.
- [5] 刘晓丽, 何天明, 张美勇, 等. 核桃 SSR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2007, 24(2): 140-145.
- [6] 高志红, 章镇, 韩振海. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报 2002, 25: 19-22.
- [7] 郑丽珊, 王静毅, 冀小蕊, 等. 香蕉 SSR 反应体系的优化[J]. 热带农业科学, 2007, 27: 2.
- [8] Hautea D M, Molina G C, Balatero C H, et al. Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers [M] // Jain S Mohan, Swennen Rony. Banana Improvement: Cellular Molecular Biology, and Induced Mutations. New Hampshire: Science Publishers 2004: 45-57.
- [9] Buhariwalla H K, Jarret R L, Jayashree B, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana* [J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5(2): 327-330.
- [10] Ge X J, Liu M H, Wang W K, et al. Population structure of wild bananas *Musa balbisiana* in china determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(4): 933-944.
- [11] Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, et al. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars [J]. Genome 2000, 43: 512-520.
- [12] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus 1990, 12: 13-15.

Optimization of SSR System in Apricot

NING Ning¹, WANG Yu-zhu², ZHANG Jun-huan², YANG Li², SUN Hao-yuan², ZHANG Zhen¹

(1. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 2. Institute of Pology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: The factors which affected the SSR-PCR results of Apricot were studied in the experiment. The reaction system optimized was as follows: the 20 μ L reaction system contained Mg^{2+} 2.0 mM/L, dNTP 0.25 mM/L, Primer 0.20 μ M/L, DNA template 60 ng/20 μ L, Taq DNA polymerase 0.05 U/ μ L and PCR buffer 1 \times . To evaluate this SSR system, 32 accessions of apricot were used. The 6 percent polyacrylamide gelelectrophoresis showed that the PCR products were between 184~267 bp and polymorphic in DNA among the apricot accessions, indicating that the SSR reaction system was steady and reproducible.

Key words: Apricot; SSR-PCR; System optimization

专家 建议

用植物化感技术

缓解大面积干旱威胁

目前,严重的干旱已使我国华北、西北的小麦和油菜受到严重威胁,抗旱保收已成为我国受灾地区各级政府 and 农民朋友的当务之急。目前,有部分农业专家针对目前的旱灾提出,采用国际上成功的植物化感技术增强受旱作物抗逆性能的方法,是缓解干旱威胁的有效措施之一。

植物化感调节剂已在德国、西班牙、意大利、美国等国家普遍使用,诱导植物体内细胞分裂素、维生素E、脱落酸等抗旱物质,缓解干旱威胁,成效显著。来自德国的农业专家波特先生告诉记者,不同国家应用到大豆、小麦、油菜、马铃薯、果类等作物上,均取得了良好的抗旱增产效果,减灾增收率达到20%~50%。