

中国特有种虎榛 SSR 反应体系的初步研究

王艳梅^{1,2}, 马天晓³, 翟明普²

(1. 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2. 北京林业大学 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 3. 黄河科技学院 河南 郑州 450008)

摘要: 为了探讨适于中国特有种虎榛 DNA 提取的方法和建立虎榛的 SSR 反应体系, 该试验以虎榛幼嫩叶片为材料, 通过对 CTAB 法的改良, 摸索出了适于虎榛 DNA 的提取方法, 并以核酸产量、纯度、片断分布情况等指标进行了评价, 同时应用 16 对欧榛 SSR 引物对虎榛进行了跨属转移, 获得了清晰稳定的扩增图谱; 上述结果表明获得的基因组质量较高, 同时也表明反映体系对虎榛的 SSR 分析是可行的; 并对影响虎榛基因组 DNA 的制备及扩增反应因素进行了简要的分析讨论。

关键词: 虎榛; DNA 提取; 微卫星; 扩增图谱

中图分类号: S 664.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0041-04

简单重复序列 SSR(Simple sequence repeat, SSR)也称微卫星 DNA^[1-2] 或短串联重复序列(Short tandem repeat, STR), 于 20 世纪 80 年代被发现, 并且广泛存在于真核基因组中^[3], 原核生物中也有少量的微卫星标记。SSR 属于共显性分子标记, 多态性高, 试验操作简单、稳定重复性好, 需要 DNA 量很少。微卫星分子标记在林木研究中的应用前景十分广阔, 它可用于植物基因型鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位、种质资源保存、濒危物种保护、基因流监测、群体的遗传漂变、基因突变及系统发生等领域^[4]。其优越性使其很快从多种分子标记中脱颖而出, 甚至被有关学者称为第二代分子标记。

虎榛 (*Ostryopsis davidiana* Decne) 隶属于桦木科 (Betulaceae) 虎榛属 (*Ostryopsis Deane*), 为我国特有种, 产于我国西南、西北和东北; 喜光、耐旱是优良的水土保持树种; 种子可榨油、食用或工业用; 树皮、树叶可以提制栲胶。目前有关虎榛的研究多在形态和系统分类方面, 而从分子水平研究虎榛比较少见。鉴于 SSR 可以进行位点在属内种间, 甚至在科内属间的保守性探查, 该试验利用的为榛属植物欧榛的 16 对 SSR 引物。SSR 为共显性标记、重现性好和检测多态性丰富等优点, 有助于遗传变异分析, 因此, 建立一套适于虎榛基因

组 DNA 的提取方法和 SSR 反应体系, 对于分析虎榛的遗传背景有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野外采集的虎榛叶片, 带回实验室后用蒸馏水冲洗干净, 在滤纸上吸干水分, 按 2.0 g 为标准分装进 4# 自封袋, 放入 -20℃ 箱保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取虎榛子基因组 DNA^[5]。在 50 mL 离心管中加入 10 mL 提取缓冲液 (3% 十六烷基三乙基溴化胺, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP40), 65℃ 水浴预热 10 min 以上; 取 2 g 虎榛子叶片, 在研钵中加液氮磨成粉状后立即倒入预热的离心管中, 同时加入 100 μL 0.1% β-巯基乙醇, 剧烈摇动混匀; 65℃ 水浴保温 2.5~3 h, 并不时摇动; 加入 10 mL 氯仿/异戊醇 (24:1; v:v), 轻轻颠倒混匀, 室温下静置 5~10 min, 使水相和有机相分层; 15℃ 8 000 rpm 离心 10 min, 移取上清液至另一 50 mL 离心管, 加入 7 mL 乙醇 (-20℃ 贮存) 与 580 μL 3 M 醋酸钠, -20℃ 放置 30~60 min; 虎榛子第 1 次抽提时 DNA 较少出现絮状沉淀, 需要用 6 000 rpm 离心 8 min, 此时将有褐色沉淀附着于管壁; 倒出残液, 进行清洗, 先用 900 μL 70% 乙醇 (-20℃ 贮存) 和 100 μL 4 M 醋酸钾清洗 2 次, 每次 5~10 min, 再用 100% 乙醇清洗后转入 1.5 mL 离心管, 常温风干溶于 650 μL 1× TE 缓冲液中。待 DNA 溶解后, 加入 2 μL RNase (10 mg/mL), 37℃ 放置 60 min 后, 除去 RNA; 等体积氯仿/异戊醇 (24:1; v:v) 抽提 1~2 次, 直至白色界面消失, 然后加入 1/10 体积 5 M 醋酸氨和等体积无水乙醇 (-20℃ 贮存) 进行

第一作者简介: 王艳梅 (1978-), 女, 河南信阳人, 博士, 讲师, 研究方向为树木生理生态学。Email: wangyanmei1978@yahoo.com.cn.

通讯作者: 翟明普 (1942-), 男, 山西大同人, 硕士, 教授, 主要研究方向为植被恢复建设。E-mail: zhaimingpu@126.com.

基金项目: 国家科技攻关课题资助项目 (2004BA515B12)。

收稿日期: 2009-02-16

二次沉淀, -20℃放置 30~60 min, 此时将出现充满气泡的透明胶状沉淀, 即为 DNA, 收集沉淀, 重复上述清洗步骤待 DNA 风干后溶于 50~300 μL 1×TE 缓冲液 -20℃贮藏。

1.3 DNA 纯度检测

在核酸分光光度计(Eppendorf Biophotometer 6131)上检测 DNA 的纯度及浓度, 记录 OD₂₆₀/OD₂₈₀, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值及 DNA 的浓度。0.8%琼脂糖凝胶电泳(北京六一仪器厂, DYY-II型), 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 电压为 80 V, 电泳 1~2 h; 采用灵敏度高、毒性低, 使用安全的 SYBR[®] Green I 核酸染色, 凝胶成像仪(Alphalmager)下检测, 根据条带的亮度可估测 DNA 的浓度, 判断 DNA 片断大小及完整程度。

2 SSR 分析体系的建立

2.1 扩增体系

SSR 扩增在 Biometra 公司的 T1 Thermocycler PCR 仪上进行。25 μL 反应体系含有: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM 引物, 1.0 U Taq DNA 聚合酶 50~100 ng 的模板 DNA (上述药品均来自华美生物工程公司)。扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 51~58℃复性 40 s, 72℃延伸 40 s, 共 45 个循环, 最后在 72℃延伸 8 min。

2.2 产物检测

扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。在扩增产物中加入等体积或 3/4 体积的变性载样缓冲液(98%甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.025%溴酚蓝和二甲基青兰),

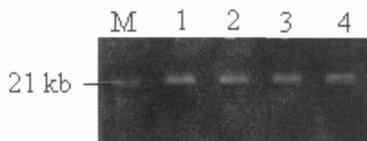


图 1 虎榛不同方法 DNA 提取电泳检测图

Fig. 1 Electrophoresis inspection for DNA samples extracted from the *Ostryopsis davidiana* Deene with different methods

3.2 SSR 扩增反应

PCR 扩增反应中, 如果较多的色素和多糖等杂质存在于 DNA 样本中, 将对 Taq DNA 聚合酶的活性将有抑制作用^[9]。试验中, 利用榛属 SSR 引物进行 PCR 扩增, 虎榛子 DNA 样本扩增出清晰的条带(图 2), 说明得到的 DNA 质量高。

3.3 欧榛微卫星在虎榛植物中的同源性

试验中, 利用 16 对欧榛 SSR 引物^[7-8]对虎榛进行 PCR 扩增。在电泳前采用 94℃变性 5 min, 1.2×TBE 电泳液预冷(5℃)或预热(60~80℃), 其产物在聚丙烯酰胺凝胶上电泳、银染。由图 3 可看出, 除位点 10、11、13

混匀, 94℃变性 5 min 后, 立即放入冰中, 上样量为 7 μL, 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 恒压 1 200 V 电泳 2.5 h, 银染染色。染色方法: 10%乙醇固定 5 min, 双蒸水漂洗 30~60 s, 1%硝酸氧化 5 min, 双蒸水漂洗 30~60 s, 0.2%硝酸银中染色 30~40 min, 双蒸水漂洗 30~60 s, 3%碳酸钠+400 μL/L 甲醛+0.2 mg/L 硫代硫酸钠溶液中显色 5~10 min, 显色后用 10%乙酸固定 1~2 min。

3 结果与分析

3.1 模板 DNA 的检测

用 Eppendorf Biophotometer 检测 DNA 结果如表 1 所示。所获得的 DNA OD_{260/280} 基本介于 1.6~1.8 之间, 说明 DNA 纯度较高^[4]。

表 1 DNA 样品紫外测定结果

Table 1 DNA content of the samples as detected by UV spectrophotometry

序号 No.	260nm	280nm	260nm/280nm	浓度 μg · μL ⁻¹
1	0.543	0.315	1.69	267.1
2	0.386	0.221	1.74	193.0
3	0.349	0.208	1.68	257.5
4	0.322	0.190	1.69	161.0

根据 Eppendorf Biophotometer 检测的浓度, 将样品浓度稀释到 10 ng/L, 用琼脂糖检测 DNA。凝胶质量检测显示如图 1: 所提 DNA 主带清晰, 与 λDNA 的位置相似, 无弥散带, 无明显的 RNA 带, 说明虎榛子的 RNA、蛋白质、多糖以及其他次生代谢物质去除的比较干净能满足 SSR 指纹图谱的构建。

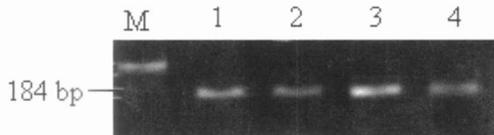


图 2 位点 14 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agrose electrophoresis inspection of the microsatellite 14 in the *Ostryopsis davidiana* Deene

外, 虎榛子 DNA 样本扩增图谱条带清晰可辨, 虎榛子 SSR 指纹图谱质量较高, 表明欧洲榛与虎榛之间具有同源性。选用一对特异性好的引物进行扩增, 测序引物为 CAC-B014, 核心序列为 (GA)₁₆。引物序列为:

5'-CTTCCAAGGATGGCTCAG-3',
5'-TTTCAGGACGAGGACTCTG-3'.

对虎榛 PCR 产物进行 DNA 测序, 测序结果表明 PCR 产物中含有为复合型微卫星, 不但含有欧榛微卫星序列, 并且有虎榛特有的微卫星(AT)_n(图 4), 进一步证明虎榛与欧洲榛的同源性及其微卫星跨属转移的有效性。

4 讨论

很多植物 DNA 提取方法已经相当成熟^[9,10],其中以 Doyle 等人于 1987 年提出的 CTAB 法的应用最为广泛^[11],但由于虎榛子含的杂质较多(糖类、酚类等),利用常规方法难提取到大量的高质量 DNA。但对于我国特有种虎榛的研究很少,目前,有关因此对虎榛 DNA 的提取仍处于探索阶段。现综合了许多实验室基因组 DNA 提取方法并进行改进,发展了虎榛基因组 DNA 的提取方法。试验针对虎榛植物体内后内含物多、成分复杂等特点,采用了经过改良的 3%CTAB 法,不同于核桃、板栗(30 min)及榛属植物(1 h)水浴裂解时间,虎榛需要裂解 2.5~3 h,其原因需进一步探讨。

尽管 SSR 多态性高、稳定重复性好,但 SSR 试验操作要求很高,影响扩增结果的因素很多^[4]: ① 模板浓度对扩增结果有一定的影响,若浓度太小,扩增条带较弱,若浓度太大,易发生拖带,带型模糊难以辨认。② 退火,温度太高,不利于引物和模板发生结合;温度太低,特异性将大大降低。

```
TTTCAGGACGAGGACTCTGAAAGAGGTTGAGGACATGACTATTAATCCGATGGATGCTGTCATAGTTTGT
GCAGCGTAGTAGTAATGAGGATGATGTCACGTCATCTTGAGGCATGTACTACTAGCTAGAAAAA TACTT
CCTCTCTCTCTCTCTATATATATATATATATATCACATGCCAGTGCA TGTGAGCCATCCTTGGAAG
```

图4 虎榛 PCR 产物的测序结果(具有长度多态性的重复序列用粗体字现实)

Fig. 4 Alignment of sequences of the *Ostryopsis davidiana* Decne(The repeat with the length polymorphism was showed in bold)

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术由于其检测灵敏度和分辨率高的特点,特别适合于像 SSR 这样的小片段扩增产物的检测^[12-13]。银染法是聚丙烯酰胺凝胶电泳常用的显影方法,原理是利用银离子与核苷酸结合,在碱性环境下甲醛能使银离子还原从而使凝胶中的 DNA 得以显现。电泳前的变性、电泳液预处理、电压及胶的质量等因素也很重要。94℃变性 3 min 的变性条件对多数植物的分析是理想的^[4],但对虎榛而言不合适。该试验采用 94℃变性 5 min 既可使样品充分变性,也可防止样品变性后复性;电泳液预处理(预冷或预热),可有效防止样品变性后复性;检测的电压太高,则会产生弥散条带且条带易跑成“弧形”或“八”字形;电压太低也不利于扩增片段的分离;而制胶的尿素质量很关键,若质量差,易拖尾现象,使条带模糊不清,而且在胶的制作过程中,需凝胶均匀,勿产生气泡,不然条带易变形,不利于读带。

16 对微卫星引物从虎榛样本中得到扩增产物,说明上述基因座在属间具有较高的保守性。从微卫星侧翼得到的引物可跨植物的种、属甚至科进行扩增已多有报道^[15-16],周涵韬等^[17]曾经利用 2 对甘蓝型油菜微卫星引

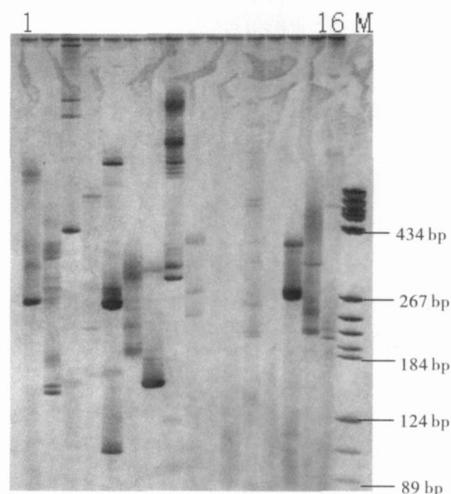


图3 16 对 SSR 引物对虎榛子进行 PCR 扩增和电泳
Fig. 3 PCR amplification and electrophoresis of 16 pairs of SSR primers in the *Ostryopsis davidiana* Decne

物对禾本科、十字花科、芸香科和锦葵科作物的 DNA 进行扩增并得到扩增产物。微卫星的这一特性也被用于构建作物种间分子遗传图,以期用较少的代价获得具有较多 SSR 位点的遗传图。然而,微卫星侧翼的保守性并不能保证扩增产物具有重复序列,对 PCR 产物的杂交或 DNA 测序成为进行种间 SSR 分析先期检验^[8]。对 PCR 产物 DNA 测序证明了欧榛 SSR 基因座位中微卫星序列在属内的保守性,以及等位基因在电泳中的大小与重复单位的增减相关。

5 结论

裂解液中加入 PVP40 及研磨时加入 β-巯基乙醇可去除多酚类物质及多糖;抽提过程中氯仿的使用有效地去除了植物色素和蔗糖,同时也减少酚污染;裂解时间为 2.5~3 h;沉淀 DNA 时,用无水乙醇代替异丙醇可减少盐类、蔗糖等与 DNA 发生共沉淀。另外,由于加入的有机剂均为冰冷状态, -20℃静置 10 min 即可大大提高了工作效率。

在虎榛 SSR 扩增反应体中,采用的模板浓度是 10 μg/μL 效果较好;不同的引物采用不同的退火温度,介于 51~58℃;该试验采用 94℃变性 5 min 既可使样品充

分变性,也可防止样品变性后复性,1.2×TBE电泳液预冷(5℃)30 min,可有效防止样品变性后复性;该试验采用800~1200V稳压,结果良好;银染时采用乙醇固定,硝酸酸化,以及在染色时不加入甲醛,在缩短银染时间的同时,减少了甲醛造成的污染,全部银染可在1h内完成。不同植物的SSR反应是不同的,该试验对虎榛属虎榛的SSR反应体系进行了摸索与建立,利用欧榛SSR引物,扩增出图谱清晰,信号较强的条带,试验结果稳定可靠、可重复性较高。虎榛SSR反应体系的建立,为该技术对我国特有虎榛植物进行SSR分析奠定了良好基础。

参考文献

[1] Amos W, Rubinstzejn D C. Microsatellite are subject to directional evolution[J]. Nat Genet, 1996, 12(1): 13-14.
 [2] Debrauwere H, Gendrel C G, Lechat S, et al. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites[J]. Biochimie, 1997, 79(9-10): 577-586.
 [3] Todt G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in Different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. Genome Research, 2000(10): 967-981.
 [4] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
 [5] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990(12): 13-15.
 [6] Galderisi U, Cipollaro M, Di Bernardo G, et al. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis[J]. Plant Cell Reports, 1999, 17(7/8): 652-655.

[7] Bassil N V, Botta R, Mehlenbacher S A. Additional Microsatellite Markers of the European Hazelnut[J]. J. AMER SOC. HORT. SCI, 2005, 130(4): 543-549.
 [8] Gökirmak T, Mehlenbacher S A, Bassil N V. Investigation of Genetic Diversity among European Hazelnut (*Corylus avellana*) Cultivars Using SSR Markers[J]. Acta Hort (ISHS) 2005, 686: 141-147.
 [9] Klimyuk V I, Carroll B J, Thomas C M, et al. Alkali treatment for preparation of plant material for reliable PCR analysis[J]. Plant J, 1993(3): 493-494.
 [10] Thomson D, Henry R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR[J]. Biotechnique, 1995, 19: 394-400.
 [11] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
 [12] Bassam B J, Caetano A G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80-83.
 [13] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921.
 [14] 李作洲, 龚俊杰, 王瑛, 等. 水杉子遗居群 AFLP 遗传变异的空间分布[J]. 生物多样性, 2003, 11(4): 265-275.
 [15] Guilford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 249-254.
 [16] Huang W G, Cipriani G, Morgante M, et al. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1269-1278.
 [17] 周涵涛, 郑文竹, 周以挺, 等. 不同作物间共用 SSR 引物的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 89-91.

DNA Extraction and Construction on the SSR Reaction System of *Ostryopsis Davidiana* Decne

WANG Yan-mei^{1,2}, MA Tian-xiao³, ZHAI Ming-pu²

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Key Laboratory for Silviculture and Conservation, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: This study presented to probe DNA extraction and to construct the SSR reaction system of *Ostryopsis davidiana* Decne. A procedure for DNA extraction from the leaves of *Ostryopsis davidiana* Decne was constructed by modifying the method CTAB. Quality of DNA was evaluated by yield and purity of genomic DNA and gel electrophoresis inspection, at the same time, the genome DNA of *Ostryopsis davidiana* Decne was amplified using 16 pairs of SSR *corylus* primers and obtained clear and stable amplification patterns, which indicated the DNA was good and the system was feasible. The factors affecting the DNA extraction and amplification of genome DNA of *Ostryopsis davidiana* Decne were discussed in the paper.

Key words: *Ostryopsis davidiana* Decne; DNA extraction; SSR; Amplification patterns