

# 仁用杏 SSR 反应体系的建立与优化

艾鹏飞, 方闪闪, 甄志军, 靳占忠

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

**摘 要:** 采用正交设计结合单因素分析, 建立并优化了仁用杏 SSR 反应体系。结果表明: 20  $\mu$ L 反应体系中,  $Mg^{2+}$ 、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和引物的浓度分别为 1.5 mmol/L、1.5 U、0.2 mmol/L、0.25  $\mu$ mol/L, 引物退火温度为 52  $^{\circ}C$ 。应用该体系对 24 份仁用杏资源进行 SSR 分析, DNA 谱带多态性丰富, 将为仁用杏资源的 SSR 分析提供技术支持。

**关键词:** 仁用杏; SSR; 建立; 优化

**中图分类号:** S 662.203.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0068-03

杏 (*Armeniaca vulgaris* Lam.) 原产我国, 蔷薇科 (Rosaceae) 杏属 (*Armeniaca*) 植物。果仁可食用的即为仁用杏 (Kernelled Apricot), 我国每年出口杏仁 0.7~0.8 万 t, 创汇居我国出口土特产之首位<sup>[1]</sup>。但是, 我国各地种植的品种混杂, 品种间遗传背景和亲缘关系不明, 以致单产低, 品质低劣, 尤其是仁用杏开花早, 花期、果期极易遭受低温危害, 常导致减产、甚至绝收, 给生产造成重大损失。采用 SSR (Simple Sequence Repeat) 技术可鉴定种质资源、筛选与特异性状连锁的分子标记, 为资源创新和育种实践提供分子依据<sup>[24]</sup>。有关仁用杏 SSR 的研究国内鲜有报道。SSR 技术是基于 PCR 的一种标记, 为此, 试验采用正交设计结合单因素分析, 建立并优化仁用杏 SSR 反应体系, 以期对仁用杏品种鉴定和遗传结构等方面的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验所用的 24 个仁用杏品种或类型: 2 号、4 号、6 号、8 号、11 号、31 号、32 号、40 号、80A03、80B05、斑龙、薄壳一号、优一、白玉扁、一窝蜂、龙丰、绿源一号、山杏、油仁、超仁、围选一号、丰仁、国仁、龙王帽, 均取自张家口市农业科学院林果所仁用杏资源圃。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取及引物合成** 采用改良 CTAB 法<sup>[9]</sup>, 提取仁用杏基因组 DNA。参照文献<sup>[9]</sup>, 选取近缘物种的

SSR 引物 UDP97-402 (F: 5'-TCCCATA ACCAA AAAAA ACACC-3'; R: 5'-CAACG AGCTCCCATGACTTT-3'), 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

**1.2.2 仁用杏 SSR-PCR 体系的建立** 以超仁为模板, 20  $\mu$ L SSR 反应体系, 4 因素 3 水平正交试验 (如表 1), 2 次重复。

表 1 SSR-PCR 反应条件正交组合设计

试验号 Code	Mg <sup>2+</sup> 浓度	dNTPs 浓度	Taq 酶用量	引物浓度 Primers
	Mg <sup>2+</sup> concentration	dNTPs concentration	Amount of	concentration
	/mmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>	Taq E/U	/ $\mu$ mol · L <sup>-1</sup>
1	0.5	0.2	0.5	0.2
2	0.5	0.3	1.0	0.25
3	0.5	0.4	1.5	0.3
4	1.0	0.2	1.0	0.3
5	1.0	0.3	1.5	0.2
6	1.0	0.4	0.5	0.25
7	1.5	0.2	1.5	0.25
8	1.5	0.3	0.5	0.3
9	1.5	0.4	1.0	0.2

**1.2.3 仁用杏 SSR-PCR 体系的优化** 基于正交试验, 对影响仁用杏 SSR-PCR 的主效因子进行单因素梯度试验。以超仁为模板, 20  $\mu$ L 反应体系中,  $Mg^{2+}$  浓度梯度为 0.5、1、1.5、2、2.5 mmol/L, dNTPs 浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L, Taq 酶用量梯度为 0.5、1、1.5、2、2.5 U, 引物退火温度梯度为 46、49、52、55、57  $^{\circ}C$ 。SSR-PCR 扩增反应在 MJ Reaserch PTC-100 型 PCR 仪上进行。反应程序为: 94  $^{\circ}C$  预变性 4 min, 然后 94  $^{\circ}C$  变性 45 s, 48~60  $^{\circ}C$  退火 45 s, 72  $^{\circ}C$  延伸 90 s, 共 33 个循环, 最后 72  $^{\circ}C$  延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统上观察、拍照和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 多因素组合对 SSR-PCR 的影响

SSR 标记得到的扩增条带是各因素相互之间综合

第一作者简介: 艾鹏飞 (1974-), 男, 湖北浠水人, 博士, 副教授, 现主要从事植物种质资源的评价与创新工作。E-mail: apf2002@ sina.com。

通讯作者: 靳占忠 (1960-), 男, 博士, 教授, 现从事植物抗逆性遗传改良方面的研究工作。

基金项目: 河北省教育厅资助项目 (ZH2007116)。

收稿日期: 2009-03-20

作用的结果。按表 1 设计的 9 个处理进行 PCR 反应后,电泳结果如图 1,在 9 个处理组合中由于 4 个因素浓度组合的不同,扩增的效果存在着明显的差异。其中,第 7、8 组合带型丰富、主带清晰,4、6、9 组合只扩增出一条带,5 组合产物模糊、带型微弱且拖尾;第 1、2、3 组合无扩增带,原因可能是  $Mg^{2+}$  浓度太低的缘故。而第 7、8 组合除了  $Mg^{2+}$  浓度相同(1.5 mmol/L)之外,其他组分浓度均不同,为更直观评价各单因素对 SSR-PCR 的影响,进一步确定 SSR-PCR 的最优体系,有必要进行了单因素浓度梯度试验。

通过对正交试验结果进行评价和数据分析得出,4 个组分中,由主到次影响 PCR 依次为:  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq 酶、引物,其中 dNTPs 和 Taq 酶的影响程度相当。

2.2 单因素对 SSR-PCR 的影响

基于正交试验结果,依次进行引物退火温度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶用量梯度试验,每一次试验所得的最优条件应用到下一次的试验中。

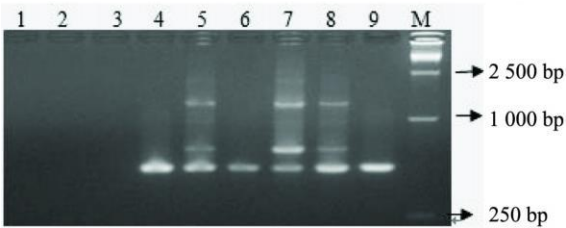


图 1 超仁 SSR-PCR 正交试验电泳图  
注: M 为 DNA Marker DL 15 000 1~9 处理代号同表 1。  
Fig. 1 Electrophoresis patterns of orthogonal SSR-PCR in Chaoren cultivar

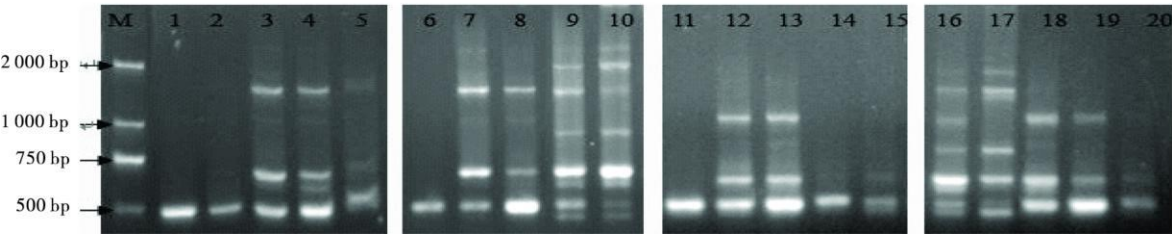


图 2 单因素浓度梯度下的超仁 SSR-PCR 电泳图  
Fig. 2 Effects of different components on SSR amplification of Chaoren cultivar

注: M 为 D 2000 DNA Marker; 1~5 为 Taq 酶: 0.5、1、1.5、2、2.5 U, 6~10 为  $Mg^{2+}$  浓度: 0.5、1、1.5、2、2.5 mmol/L, 11~15 为 dNTPs 浓度: 0、1、0.2、0.3、0.4 mmol/L, 16~20 为退火温度: 46、49、52、55、57℃。

PCR 反应中,退火温度影响引物与模板 DNA 的特异性结合,过高或过低都直接影响扩增结果:退火温度低于引物最佳温度时,非特异性扩增条带较多,结果不可靠;随着退火温度的升高,非特异性扩增条带逐渐减少,但当退火温度高于最佳温度时,引物与模板结合差,PCR 产物丰度低,电泳条带亮度小导致扩增失败。图 2 中第 16~20 泳道显示了不同退火温度下的 PCR 结果。其中,52℃时特征带清楚,背景杂带少,低于 52℃虽然特征带明显,但背景杂带较多,故可以确定该引物的最佳退火温度为 52℃。

$Mg^{2+}$  影响 DNA 聚合酶的活性,扩增的真实性及产物的特异性等 PCR 反应的诸多方面,  $Mg^{2+}$  浓度偏低,可能无扩增条带或扩增条带少;  $Mg^{2+}$  浓度过高,常出现非特异性扩增、片状拖带或涂抹带的现象。图 2 泳道 6~10 所示为 5 个不同  $Mg^{2+}$  浓度对 PCR 的影响。由图 2 可见,  $Mg^{2+}$  浓度为 0.5 mmol/L 时,扩增条带少,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0、2.5 mmol/L 时,出现非特异性扩增,背景不清晰,当  $Mg^{2+}$  浓度在 1.0、1.5 mmol/L 时特征带多且明显,其中 1.5 mmol/L 时背景更清晰,故确定为最适  $Mg^{2+}$  浓度,这与正交试验结果吻合。

Taq DNA 聚合酶活性和用量是 PCR 反应中最为重要的影响因子之一。在 20 μL 反应体系的 5 个 Taq DNA 聚合酶浓度(如图 2 的 1~5)中,5 个处理均有扩增产物,但在 0.5 U 和 1 U 时谱带数目较少;1.5 U 时谱带亮且清晰;2 U 时谱带数量多、出现非特异性扩增。2.5 U 时没有明显的条带,呈现模糊或团状。因此,确定每 20 μL 反应体系中 Taq 酶适宜用量为 1.5 U。

dNTPs 为 DNA 合成提供底物,所以 dNTPs 浓度过低时,产物减少或没有;但当 dNTPs 浓度高时会与 Taq 酶竞争性结合  $Mg^{2+}$ ,使 Taq 酶活性降低,扩增产物减少。从图 2 泳道 11~15 可以看出, dNTPs 的浓度为 0.2 mmol/L 时扩增的条带最理想。

综合正交试验和单因素分析,确定 20 μL 反应体系中最适条件为:  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、Taq 酶 1.5 U、引物 0.25 μmol/L、退火温度 52℃。

2.3 SSR 反应体系的检测

按上述试验所确定的各组条件,采用引物 UDP 97-402 对 24 份仁用杏样品进行 SSR-PCR 分析,扩增的谱带清晰,多态性丰富(图 3),表明优化的仁用杏 SSR-PCR 扩增的反应体系稳定可靠,可应用于仁用杏资源的

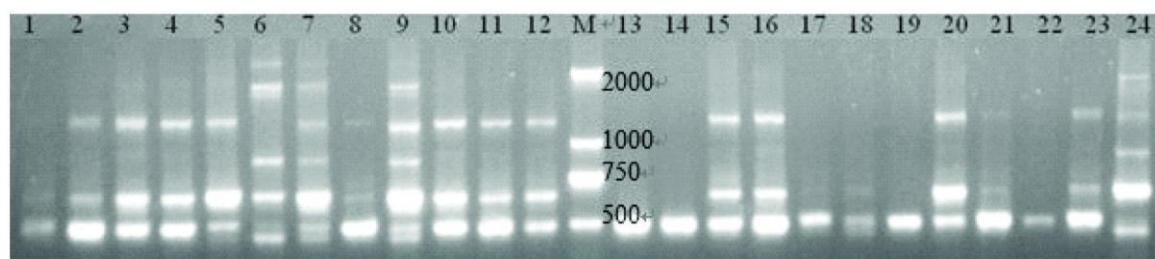


图3 不同仁用杏样品 SSR-PCR 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis patterns of SSR-PCR of different Kernelled Apricot samples

遗传多样性分析与评价。

### 3 讨论

作为一种中性的、共显性分子标记 SSR 分析几乎是可以无限制地应用到分子生态、系统发育与进化研究,在分子标记辅助育种的实践中也显示出巨大的潜力。但是 SSR 反应涉及诸多因子,每个因子对整个反应体系都有较大影响,并且不同生物适合的反应体系大不相同,因而,筛选 SSR 引物及建立稳定的反应体系是 SSR 多态性标记的前提。

该研究建立了仁用杏 SSR 反应体系,关键是调节  $Mg^{2+}$ 、Taq 酶、dNTPs 浓度以及 PCR 反应过程中的退火温度,综合各种因素,最终确立了仁用杏 SSR 反应体系。与相关文献报道的其他植物 SSR 的反应体系对比<sup>[6,8]</sup>,仁用杏 SSR 标记反应体系的主要特点引物浓度偏小 ( $0.25 \mu\text{mol/L}$ ), Taq 酶用量、 $Mg^{2+}$  浓度及 dNTPs 用量基本一致。试验过程中发现,降低琼脂糖凝胶浓度,不会影响 PCR 产物检测,1%和 2%凝胶结果显示无显著差异,从经济角度考虑,可使用 1%琼脂糖凝胶。

该研究中对 24 个仁用杏样品进行初步的 SSR 标记

分析,结果发现,不同的品种或类型中表现出较为丰富的多态性,更为详尽的仁用杏资源的遗传多样性分析待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张加延, 张有林. 李杏资源研究与利用进展 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 25-27.
- [2] 刘旭, 史娟, 张学勇, 等. 小麦耐盐种质的筛选鉴定和耐盐基因的标记 [J]. 植物学报, 2001, 43(9): 948-954.
- [3] Yoshiro M., Kazuyoshi T. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley [J]. Euphytica, 1997, 94: 263-272.
- [4] 谈移芳, 张启发. 水稻蜡质基因引导区的两个 SSR 序列与直链淀粉含量的相关性 [J]. 植物学报, 2001, 43(2): 146-150.
- [5] He T M., Chen X S., Xu Z. et al. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in Ily Valley [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 563-572.
- [6] 高志红, 章镇, 韩振海. SSR 技术及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 2002, 19(5): 281-285.
- [7] 张琪静, 张新忠, 李贺, 等. 甜樱桃 SSR 体系的建立、优化及应用 [J]. 果树学报, 2007, 24(6): 770-773.
- [8] 柳晓磊, 汤华, 李东栋, 等. 椰子 SSR 反应体系的建立和优化 [J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 676-679.

## Optimization and Establishment of SSR Analysis Method in Kernelled Apricot

AI Peng-fei, FANG Shan-shan, ZHEN Zhi-jun, JIN Zhan-zhong

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

**Abstract:** Using orthogonal design and single factor trial, four factors including  $Mg^{2+}$ , dNTPs, primers as well as Taq polymerase were screened and optimized in order to establish SSR reaction system in Kernelled Apricot (*Armeniaca vulgaris* Lam.). The results showed that  $1.5 \text{ mmol/L } Mg^{2+}$ ,  $1.5 \text{ U Taq polymerase}$ ,  $0.2 \text{ mmol/L dNTPs}$ ,  $0.25 \mu\text{mol/L}$  primers were the optimal conditions in the SSR-PCR reaction of  $20 \mu\text{L}$  volume. The optimal annealing temperature was about  $5^\circ\text{C}$  less than the least  $T_m$ . Through the optimized reaction system, SSR fragments of 24 Kernelled Apricot samples could be obtained, and the polymorphism between different samples was abundantly detected by 2% agarose gels, which showed this system was suitable and stable.

**Key words:** Kernelled Apricot; SSR; Establishment; Optimization