

南瓜 SSR-PCR 反应体系的优化

孟令君¹, 李柱刚², 韩俊岩², 王珣², 陆杰², 付玉杰¹

(1. 东北林业大学 林业生物制剂教育部工程研究中心, 东北林业大学生物资源生态利用国家地方联合工程实验室(黑龙江), 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以 3 个矮生南瓜自交系和 2 个蔓生南瓜自交系为试材, 利用 Primer 5 软件开发南瓜植物中具有特异性的 SSR 引物, 并通过正交实验和梯度 PCR 试验对影响南瓜 SSR-PCR 结果的主要条件进行优化筛选, 以期建立最佳的 SSR-PCR 反应体系。结果表明: 20 μL 反应体系含有 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 60 ng DNA, 0.20 mmol/L dNTPs, 0.25 mmol/L Primer 和 1.5 U Taq 酶, 最佳退火温度为 44.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

关键词:南瓜; SSR-PCR; 正交实验; 体系优化

中图分类号:S 642.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)10-0103-04

简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)是普遍存在于真核生物基因组中的一种重复序列。SSR 标记有很多优点, 包括多态性高、共显性、重复性好、数量丰富、对基因组覆盖范围广以及操作简单易检测^[1]。因而成为构建遗传连锁图谱、遗传多样性检测、进行分子标记辅助育种、系谱分析、品种指纹图谱绘制、品种纯度检测以及目标性状分子标记筛选等的理想工具^[2-5]。

南瓜(*Cucurbita moschata*)为 1 a 生蔓性草本植物, 广泛分布于世界各地, 在我国有悠久的栽培历史。1983 年王甲生^[6]在山西省首先发现了矮生的无蔓中国南瓜, 无蔓南瓜对比长蔓南瓜有很多明显优势: 一是无蔓南瓜植株株型紧凑, 可以密植, 种植密度可以是长蔓南瓜的 2~3 倍, 提高了光能利用率, 单株所占营养面积变小, 单位面积产量明显提高; 二是抗倒伏能力强; 三是早熟不耽误换茬; 四是不需要整枝压蔓, 管理简单, 方便机械化生产, 可以大量节约劳动力, 降低成本, 提高经济效益, 无蔓南瓜属于高产品种。该研究以南瓜矮生自交系和蔓生自交系为试验材料, 借鉴前人对其它植物分子标记的成功经验, 采用正交实验的方法对影响南瓜 SSR 反应体系的主要条件进行研究, 设计了梯度 PCR 对南瓜 SSR 反应体系进行优化^[7], 建立了一套适合研究南瓜矮生性状的高效稳定的 SSR 标记技术体系, 为南瓜控制矮生性状基因的精细定位以及对标记的矮生基因进行基因克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 3 个矮生南瓜自交系和 2 个蔓生南瓜自交系均由黑龙江省农业科学院生物技术研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 南瓜基因组 DNA 的提取及检测 南瓜基因组 DNA 的提取方法参考了 Doyle 等^[8]的 CTAB 法, 并针对试验样品的实际情况进行了适当调整。提取过程为: 取田间新鲜嫩叶片 0.8 g, 研钵内加入液氮研磨成粉末, 迅速装入 2 mL 离心管, 加入 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热好的 CTAB 溶液 600 μL (每 25 mL CTAB 溶液中加入 0.25 g PVP、1 μL 巯基乙醇), 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。室温冷却, 加入 600 μL 氯仿/异戊醇混合液(24:1), 上下轻轻颠倒 5 min, 使样品与混合液充分混匀, 10 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液 400 μL 于 1.5 mL 离心管, 加入 400 μL 在 -40 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇, 轻轻摇匀后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 60 min。弃掉上清液, 用 75% 乙醇溶液清洗提取好的 DNA 2 次, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃掉上清液, 室温风干。加入 200 μL 的 1 \times TE 溶液(内含 1 μL 的 10 mg/mL 的 RNaseA)混匀。待 DNA 溶解, 用 0.8% 琼脂糖电泳和紫外分光光度计测定所提 DNA 的纯度与浓度。

1.2.2 引物设计 利用 Primer 5 软件设计 6 对引物对 5 份试材进行扩增, 预设引物的 T_m 值区间为 38~74 $^{\circ}\text{C}$, 最佳为 46 $^{\circ}\text{C}$ 。试验中使用的 SSR 引物均由北京华大基因生物技术公司合成。引物序列见表 1。

1.2.3 PCR 反应正交实验 DNA Taq 酶、引物、dNTPs、 Mg^{2+} 浓度和模板 DNA 都能影响试验的结果, 因此对 PCR 反应进行 5 因素 4 水平正交实验设计, 试验中各组

第一作者简介:孟令君(1987-), 男, 硕士, 研究方向为植物生物技术。E-mail: menglingjun01987@163.com.

责任作者:李柱刚(1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为植物分子生物学。

基金项目:黑龙江省杰出青年科学基金资助项目(JC200704)。

收稿日期:2013-01-17

合总体积均为 20 μL , 均含有 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液。具体试验方案见表 2、3。PCR 反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 46°C 80 s(退火温度根据引物设计的 T_m 值进行适当调整), 72°C 2 min, 共 41 个循环; 72°C 延伸 7 min, 最后在 4°C 条件下保存。PCR 扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 75 W 电泳 90 min 时条带分离较好, 功率过高易使凝胶融化。EB 染色后于 Kodak Gl200 凝胶成像系统下拍照。除表 2 中的变化因素外, 每次试验设 2 次重复。

表 1 供试引物序列及 T_m Table 1 Sequences and T_m of primers used in the study

引物编号 Primers codes	$T_m/^{\circ}\text{C}$	引物序列 Primers sequences
NSO_518885_001	73.54	GGGTCTATCTCTGTGTTGACTGG
NSO_518885_002	68.25	AGGACGCATGGAGTAGCAAT
NSO_518885_003	66.20	ACTGCTCAATAAGGCAAGGA
NSO_518885_004	66.93	AAACAAGAGTGCACAAACAGG
NSO_518885_005	70.30	TGACATCACTCCGGCAACTC
NSO_518885_006	70.30	ACACCTTCGCTTCCGACATC
NSO_518885_007	66.20	AGGAGGGGAAAATACAGAGT
NSO_518885_008	66.20	GCCACTATAAATCCACCACT
NSO_518885_009	64.98	TGTCCAATTCTTCATTGCTCA
NSO_518885_010	66.93	GGATTCCACCACAATTGAGA
NSO_518885_011	62.10	TCATCAATAGGTGAATATCG
NSO_518885_012	60.14	GAATCAATAGAAAAAGAAAGAA

表 2 SSR-PCR 反应的因素与水平

Table 2 Reaction factors and levels in SSR-PCR reaction

水平 Levels	引物 Primers /mmol \cdot L $^{-1}$	dNTPs /mmol \cdot L $^{-1}$	Mg $^{2+}$ /mmol \cdot L $^{-1}$	模板 DNA Template DNA /ng \cdot (20 μL) $^{-1}$	Taq DNA /U
1	0.25	0.10	1.0	15	0.5
2	0.50	0.15	1.5	30	1.0
3	0.75	0.20	2.0	45	1.5
4	1.00	0.25	2.5	60	2.0

表 3 SSR-PCR 试验设计

Table 3 The experimental design in SSR-PCR

编号 Codes	Taq 酶 Taq enzyme /U \cdot (20 μL) $^{-1}$	Mg $^{2+}$ /mmol \cdot L $^{-1}$	模板 DNA Template DNA /U \cdot (20 μL) $^{-1}$	dNTPs /mmol \cdot L $^{-1}$	引物 Primers /mmol \cdot L $^{-1}$
1	0.5	1.0	15	0.10	0.25
2	0.5	1.5	30	0.15	0.50
3	0.5	2.0	45	0.20	0.75
4	0.5	2.5	60	0.25	1.00
5	1.0	1.0	30	0.20	1.00
6	1.0	1.5	15	0.25	0.75
7	1.0	2.0	60	0.10	0.50
8	1.0	2.5	45	0.15	0.25
9	1.5	1.0	45	0.25	0.50
10	1.5	1.5	60	0.20	0.25
11	1.5	2.0	15	0.15	1.00
12	1.5	2.5	30	0.10	0.75
13	2.0	1.0	60	0.15	0.75
14	2.0	1.5	45	0.10	1.00
15	2.0	2.0	30	0.25	0.25
16	2.0	2.5	15	0.20	0.50

1.2.4 退火温度筛选 以组合 10 的反应体系为基础, 分别使用引物来筛选反应退火温度。PCR 扩增反应在 MyCycler 梯度 PCR 仪(Bio-Rad 公司)上进行, 设置温度最小为 38°C , 最大为 48°C 。仪器自动形成 8 个反应梯度: 48.0°C 、 47.2°C 、 46.0°C 、 44.1°C 、 41.7°C 、 39.9°C 、 38.7°C 、 38.0°C 。每个梯度设 2 次重复, 其它反应程序设置都与 1.2.3 相同。

2 结果与分析

2.1 南瓜基因组 DNA 的检测

试验发现, 使用加入巯基乙醇和 PVP 的 CTAB 溶液提取南瓜 DNA, 并用 $1\times\text{TE}$ (含 10 μL 的 10 mg/mL 的 RNaseA)溶液溶解 DNA, 提取的基因组 DNA 质量较好。由表 4 可知, 使用 UV-2802 紫外分光光度计测量 DNA 纯度, 测得 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值在 1.8~2.0 区间内。

表 4 南瓜基因组 DNA 紫外分光光度测定结果

Table 4 The detection results of pumpkin genome DNA using UV spectrometer

材料名称 Materials	浓度 Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$
蔓生-1	21.38	1.953
蔓生-2	20.17	1.997
矮生-3	26.33	1.864
矮生-4	27.19	1.951
矮生-5	26.94	1.963

南瓜基因组 DNA 通过 0.8% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测, 分离条带清晰明亮, 无拖尾和降解现象, 在点样孔内仅有少量蛋白质等杂质残留(图 1)。说明改良的 CTAB 法提取的南瓜基因组 DNA 符合 SSR 标记试验标准, 从而获得了一套较好的提取南瓜基因组 DNA 的方法。

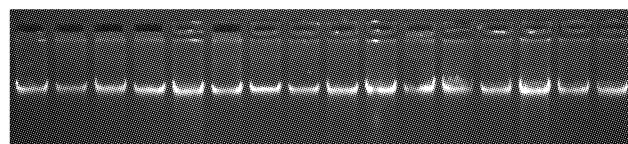


图 1 南瓜基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 The electrophoresis results of pumpkin genomic DNA

2.2 SSR-PCR 反应体系优化

按表 3 设计的 16 个组合进行 PCR 正交实验, 聚丙烯酰胺电泳检测结果见图 2。从图 2 可直观看 SSR 引物有很高的特异性, 1 对引物只扩增出 1 个条带, 但由于 DNA Taq 酶、dNTPs、Mg $^{2+}$ 浓度、Primer 和模板 DNA 等因素浓度组合不同, 扩增结果也存在差异。除第 1、13、14 组合扩增条带很弱外, 其它组合都有较清晰的扩增条带, 且没有明显的副带。其中, 第 8 组合扩增条带较亮, 第 10 组合扩增条带非常亮, 所以选取第 10 组合作为 SSR-PCR 最佳反应体系, 即 20 μL 反应体系中含有 1.5 U DNA Taq 酶、1.5 mmol/L Mg $^{2+}$ 、60 ng 模板 DNA、0.20 mmol/L dNTPs、0.25 mmol/L 引物。

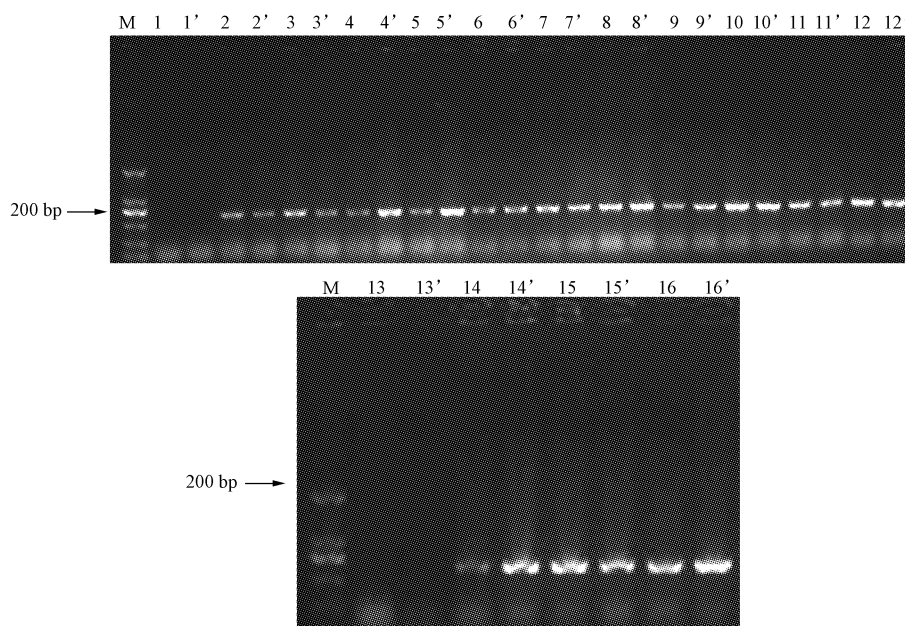


图2 SSR-PCR反应体系正交设计扩增结果

注:1~16泳道表示表3处理编号,1'~16'为相应处理的重复。

Fig. 2 SSR-PCR amplification results according to orthogonal design

Note:1~16 lines mean codes in Table 3,1'~16' are the repeats of 1~16.

2.3 退火温度的优化

SSR-PCR体系中,每一对引物都有各自最佳的退火温度,而退火温度的高低能够直接影响引物与模板DNA的结合效率。不同退火温度条件下PCR扩增结果如图

3所示。退火温度过低时产物多且扩增条带不清晰,会产生非特异性扩增条带;退火温度过高时引物与模板DNA结合效率低,PCR产物较少,扩增条带亮度低^[9]。试验中所使用引物均采用Primer 5软件设计,最佳 T_m 值

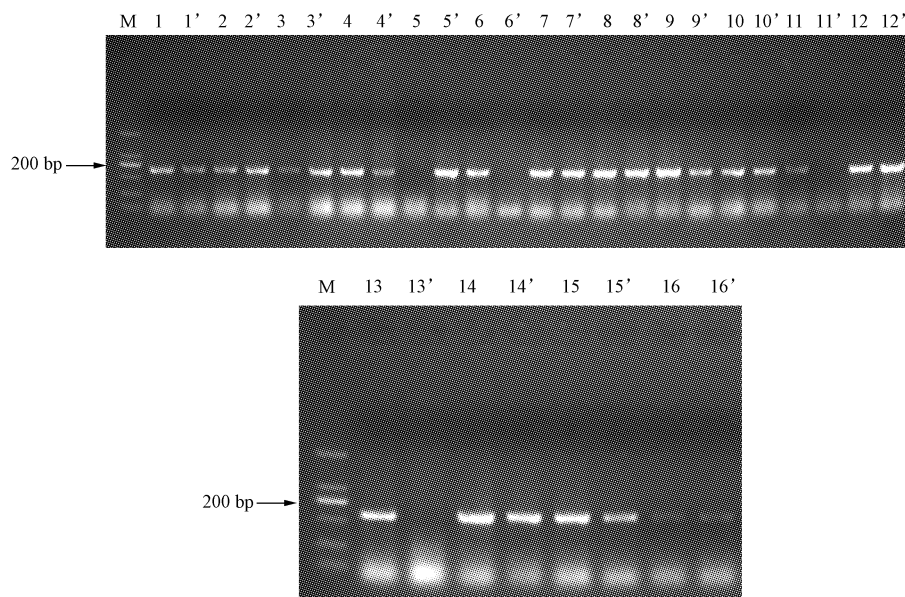


图3 不同退火温度的PCR反应结果

注:1~16泳道对应的退火温度依次为48.0,47.2,46.0,44.1,41.7,39.9,38.7,38.0,48.0,47.2,46.0,44.1,41.7,39.9,38.7,38.0℃。1'~16'泳道为相应处理的重复。1~8泳道为引物NSO_518885_001和NSO_518885_002扩增结果,9~16泳道为NSO_518885_003和NSO_518885_004扩增结果。

Fig. 3 Different annealing temperature of PCR results

Note:The annealing temperature in 1~16 lines are 48.0,47.2,46.0,44.1,41.7,39.9,38.7,38.0,48.0,47.2,46.0,44.1,41.7,39.9,38.7,38.0℃. 1'~16' lines are the repeats of 1~16. 1~8 lines are the amplification results of primers NSO_518885_001 and NSO_518885_002, 9~16 lines are the amplification results of primers NSO_518885_003 and NSO_518885_004.

设定在 46℃,根据 2 对引物的 PCR 扩增结果,在 44.1℃时退火,扩增条带清晰明亮,且引物二聚体较少,因此确定南瓜 SSR-PCR 反应体系最佳退火温度为 44.1℃。

3 讨论与结论

SSR 标记由于多态性高、共显性、重复性好、数量丰富、对基因组覆盖范围广等优点,弥补了前人利用 AFLP 标记和 RAPD 标记对南瓜研究的不足。然而,已发表的利用 SSR 标记对南瓜进行研究的报道中,关于 DNA 的提取方法、PCR 体系各组分浓度以及 PCR 反应程序上存在很大差别。该研究采用改良的 CTAB 法(每 25 mL CTAB 抽提液中加入 0.25 g PVP 和 1 μL 巯基乙醇)提取南瓜基因组 DNA,并用 1×TE 溶液(内含 1 μL 的 10 mg/mL 的 RNaseA)溶解南瓜基因组 DNA,可有效减少南瓜叶中的酚类物质、蛋白、多糖和 RNA,为后续的 PCR 反应提供高质量的基因组 DNA。

稳定的 PCR 反应体系的建立是 SSR 应用的基础,SSR 反应涉及诸多因素,每个因素对整个反应体系都有较大影响。因此,开发并筛选合适的 SSR 引物,建立并优化反应体系是进行 SSR 标记的前提。前人一般采用多次试验改变单一条件设计优化 SSR-PCR 反应体系^[10],即逐一改变 5 个条件中的一个,其它 4 个条件固定不变,由于 PCR 扩增是多因素共同作用的结果,所以仅考察单一反应条件的做法是不严谨的。

因为 SSR-PCR 反应体系中包含组分比较多,各组分都可能对扩增反应的敏感性、特异性和产量丰度造成影响。该试验对影响南瓜 SSR 标记的 *Taq* 酶、dNTPs、Mg²⁺ 浓度、引物和模板 DNA 等因素进行优化试验分析,并且进行多条件联合优化的正交实验方案,依靠设计合理的正交实验表,应用数学均衡抽样原理,得到理想的试验结果^[11]。最终获得适合南瓜 SSR-PCR 的优化体系:20 μL 反应组分中包含 1.5 mmol/L Mg²⁺,60 ng 模板 DNA,0.20 mmol/L dNTPs,0.25 mmol/L 引物和

1.5 U DNA *Taq* 酶,1×PCR 缓冲液。扩增程序为 94℃ 5 min;94℃ 30 s,44.1℃ 80 s(退火温度根据引物设计的 *Tm* 值进行适当调整),72℃ 2 min,共 41 个循环;72℃ 延伸 7 min,最后在 4℃ 条件下保存。

在对南瓜作物研究中,南瓜 SSR 引物开发起步较晚,能够利用的具有特异性的引物很少。在以后的工作中,如果能够开发出更多的 SSR 引物来分析南瓜种质资源,将有助于南瓜遗传学研究及分子标记辅助育种,促进南瓜未来生产的科学化与规范化。

参考文献

- [1] Wayne P, Gordon C M, Jim P. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 7(1): 215-222.
- [2] Hikaru T, Ken-ichiro Y, Shigenori Y, et al. Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion[J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1213-1223.
- [3] Zhang Y, Mary K S, Bouton J H. Genome mapping of white clover and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 1367-1378.
- [4] Yvonne L, Alfred D, Sam O, et al. Assessment of genetic diversity among African cassava mosaic virus disease using SSR markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53: 1441-1453.
- [5] Varshney P K, Vraner A, Sorrells M E. Genomic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48-55.
- [6] 王甲生. 矮生中国南瓜的发现与选育简报[J]. *中国蔬菜*, 1986(3): 17.
- [7] 谢文刚, 张新全, 彭燕, 等. 鸭茅 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(2): 381-386.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990(12): 13-15.
- [9] 杨传平, 王艳敏, 魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR-PCR 反应体系[J]. *东北林业大学学报*, 2006, 34(6): 1-3.
- [10] 郭大龙, 罗正荣, 柿和君迁子 SSR 分析技术的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(4): 386-389.
- [11] 臧威, 张兰兰, 张国民, 等. 稻瘟病菌 SSR 反应体系的优化[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(6): 174-178.

Optimization for SSR-PCR Technology System in *Cucurbita moschata*

MENG Ling-jun¹, LI Zhu-gang², HAN Jun-yan², WANG Xun², LU Jie², FU Yu-jie¹

(1. Engineering Research Center of Forest Bio-Preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, State Engineering Laboratory of Bio-Resources Eco-Utilization, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking 3 dwarf inbred line and 2 sprawling inbred lines of *Cucurbita moschata* as materials, the specific SSR primers in *Cucurbita moschata* were designed using software Primer 5.0. The main conditions affecting SSR-PCR were optimized using orthogonal experiment and gradient PCR experiments so as to establish the optimal SSR-PCR reaction system. The results showed that 20 μL reaction system contained 1.5 mmol/L Mg²⁺, 60 ng DNA, 0.20 mmol/L dNTPs, 0.25 mmol/L primer and 1.5 U *Taq* enzyme. The optimal annealing temperature was 44.1℃.

Key words: *Cucurbita moschata*; SSR-PCR; orthogonal experiment; system optimization