

茄子微卫星标记(SSR)反应体系的优化研究

李 烨

(哈尔滨市农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要:以茄子品种“哈农杂茄4号”DNA为试材,利用单因素试验方法,研究了茄子SSR技术中PCR体系的主要成分对SSR扩增结果的影响,并比较了聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖电泳检测扩增产物多态性的差异。结果表明:反应体系中,模板DNA的适宜浓度为20~40 ng,适宜的引物浓度为0.3 $\mu\text{mol/L}$,dNTP的适宜浓度为200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 的最适浓度范围为2.0~2.5 mmol/L,*Taq*聚合酶在20 μL 反应体系中宜加入1 U。茄子SSR的最佳反应程序为94℃预变性5 min;94℃变性1 min,52~56℃复性1 min,72℃延伸2 min,35个循环;最后72℃延伸8 min。PCR产物检测时6%的聚丙烯酰胺凝胶的分辨率显著高于1.8%的琼脂糖电泳。

关键词:茄子;微卫星标记;反应体系

中图分类号:S 641.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0070-05

简单序列重复(SSR, Simple Sequence Repeat)称为微卫星(microsatellite),是一类由几个核苷酸(一般2~4个)为重复单位,组成的长达几十个核苷酸的串连重复序列。由于其重复次数的不同而造成序列长度的多态性,因此称为简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP)。1993年SSR分析首先用于水稻基因组研究,能够很好地用于水稻遗传作图和种质鉴定,其具有多态性高、重复性好、具有共显性、操作简单以及费用低等多方面的优点。因而被广泛认为是RFLP之后的第二代分子标记^[1]。可是只有重复序列较长的微卫星多态性才较丰富。NUMOME等^[2]利用(GA)和(GT)重复序列在茄子基因文库中分别分离出3 200和820个微卫星的克隆。卢婷等^[3]利用25对SSR引物对66份茄子材料的遗传多样性进行了分析。韩洪强等^[4]应用正交实验设计对茄子的SSR体系进行了优化。NUMOME等^[5]又利用SSR引物对茄子的236个基因进行了标记,并绘制了SSR指纹图谱。何娟娟等^[6]利用SSR分子标记分别对航天诱变茄子后代变异及其多态性进行了研究。JULIO等^[7]利用SSR和EST-SSR对西班牙本地茄子的遗传多样性进行了分析。潜宗伟等^[8]利用SSR标记筛选出对“京茄218”茄子种子纯度快速鉴定。

在一定范围内,双亲亲缘关系、生态类型和生理特性差异越大,并且双亲间优缺点彼此能互补,则其杂种优势就越强。因此,准确判断种质资源之间的亲缘关系

至关重要。SSR标记可以用于判断亲本的纯度、提高育种效率。该研究通过单因子方法优化出SSR的PCR反应体系条件,以期提高条带扩增效率及分辨率,降低成本,为亲缘关系鉴定和遗传育种提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茄子品种为“哈农杂茄4号”,SSR引物由上海生工生物工程技术公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 以“哈农杂茄4号”的幼嫩叶片为材料,提取基因组DNA。提取方法为改良CTAB法,DNA检测用0.8%的琼脂糖胶, λ DNA作为Marker,以检查DNA浓度。并用分光光度计测定浓度和质量。然后用 ddH_2O 将其稀释至50 ng/ μL 。

1.2.2 SSR反应体系及扩增程序的优化 初始PCR反应条件设定为:20 μL 体系中模板浓度40 ng、引物浓度0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTP浓度0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 浓度2.5 mmol/L、*Taq* DNA聚合酶1.5 U、退火温度根据引物合成报告单进行调整,在此基础上分别对模板、引物、dNTP、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA聚合酶的浓度及退火温度进行优化,通过电泳检测其扩增多态性。引物为SSR7(5'-AAGACAGAAAGTGCACGTCAGA、3'-TGGAT-GAGAAGAGGGAATCCT)和SSR391(5'-AAAC-CCTCAACACCATCACC、3'-CATCATTTCTTTTCAT-GGCTCC)。

1.2.3 单因素试验 模板浓度对SSR扩增结果的影响:模板浓度在20 μL 体系中设置5、10、20、40、60 ng

作者简介:李烨(1972-),女,硕士,研究员,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:eggplant_2010@163.com.

收稿日期:2015-05-25

5个浓度梯度,采用引物 SSR7 和 SSR391 对模板浓度进行优化。引物浓度对 SSR 扩增结果的影响:引物浓度设置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 6个同浓度梯度, DNA 浓度为优化出的浓度,其它 PCR 反应条件不变,采用引物 SSR7 和 SSR391 对引物浓度进行优化。dNTP 浓度对 SSR 扩增结果的影响:dNTP 浓度设置 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$ 6个浓度梯度, DNA、引物为优化出的浓度,其它 PCR 反应条件不变,采用引物 SSR7 和 SSR391 对 dNTP 浓度进行优化。Mg²⁺ 浓度对 SSR 扩增结果的影响:MgCl₂ 浓度设置 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L 6个浓度梯度, DNA、引物、dNTP 为优化出的浓度,其它 PCR 反应条件不变,采用引物 SSR7 和 SSR391 对 Mg²⁺ 浓度进行优化。Taq DNA 聚合酶浓度对 SSR 扩增结果的影响:Taq DNA 聚合酶浓度设置 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 U 6个浓度梯度, DNA、引物、dNTP、Mg²⁺ 为优化出的浓度,其它 PCR 反应条件不变,采用引物 SSR7 和 SSR391 对 Taq DNA 聚合酶浓度进行优化。退火温度对 SSR 扩增结果的影响:退火温度梯度设置 49、50、51、52、53、54、55、56、57、58℃ 10个温度, PCR 反应条件中 DNA、引物、dNTP、Mg²⁺、Taq DNA 聚合酶为优化出的浓度,其它 PCR 扩增程序不变,采用引物 SSR7 和 SSR391 对退火温度进行优化。

1.2.4 PCR 扩增程序 PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min, T_m 退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 35 个循环,最后 72℃延伸 8 min。

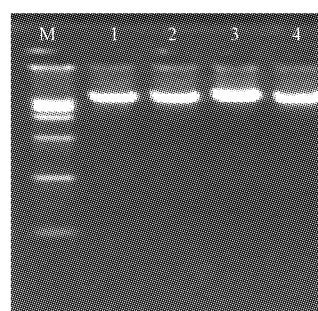
1.2.5 PCR 产物检测 琼脂糖检测:扩增产物在 1.8% 的琼脂糖凝胶(EB 染色)上电泳分离,在 1×TAE 缓冲液中电泳,在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。聚丙烯酰胺凝胶电泳:PCR 产物在 6%变性聚丙烯酰胺胶上分离,预电泳 20 min 后上样,采用恒功率 100 W,电泳 1 h。银染显色:固定液为 10% 的冰乙酸溶液,摇

床上轻摇 20~30 min;水洗 10 min;染色液为 0.15% 硝酸银溶液,时间为 20~30 min;水洗 5~6 s;显影液为 3% 的碳酸钠、0.15% 的甲醛溶液;用 10% 冰乙酸定影。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量和浓度的检测结果

采用改良 CTAB 法提取的茄子基因组 DNA 沉淀呈半透明纯白色。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,提取的基因组 DNA 条带清晰,无拖尾、降解现象,带型集中(图 1),说明所提 DNA 结构完整,完全能够满足 SSR 扩增的需要。



注:M 为 Marker, 1~4 为茄子基因组 DNA。

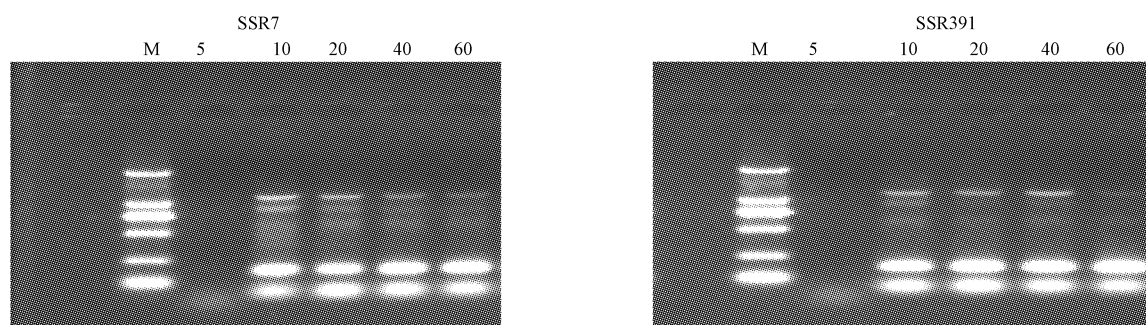
Note: M, Marker, 1-4, genome DNA of eggplant.

图 1 基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis result of genome DNA

2.2 SSR 反应体系优化

2.2.1 模板浓度对 SSR 扩增的影响 由图 2 可知,在 20 μL 体系中,当模板取量在 5 ng 时,没有扩增出条带,其余几个梯度都有较好的结果。说明 SSR 对 DNA 浓度要求不十分严格。考虑不同引物的差异,为体系稳定和节约模板,以 20 μL 体系采用 20~40 ng DNA 为宜。



注:M 为 Marker, 5、10、20、40、60 为模板浓度(ng)。

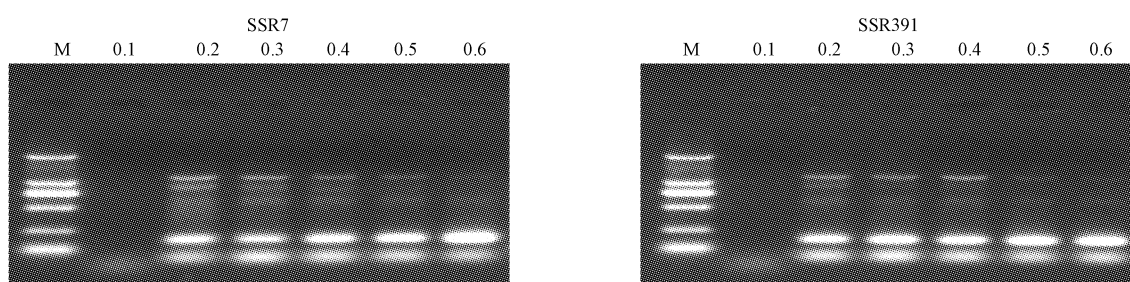
Note: M represents Marker, 5, 10, 20, 40, 60 represent template DNA concentration(ng).

图 2 模板浓度对 SSR 扩增的影响

Fig. 2 Effect of template DNA concentration on the SSR reaction

2.2.2 引物浓度对 SSR 扩增的影响 由图 3 可知, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 没有扩增出条带,其余的均扩增出明亮的条

带,考虑引物的差异,为体系稳定和降低成本,以选择 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 为宜。



注:M为Marker,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6为引物浓度($\mu\text{mol/L}$)。

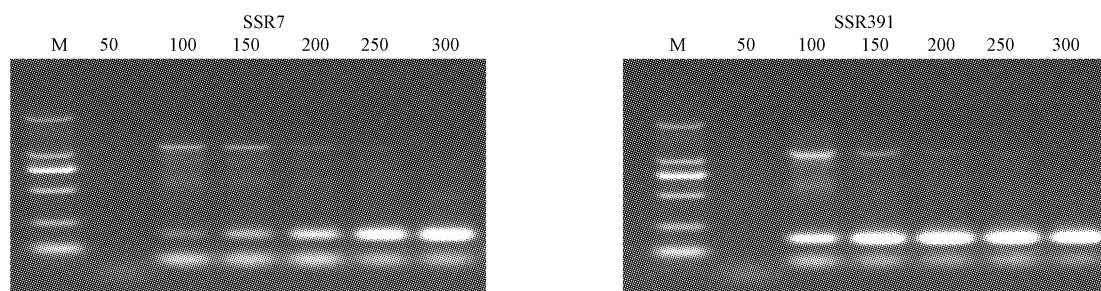
Note:M represents Marker,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 represent primer DNA concentration($\mu\text{mol/L}$).

图3 不同引物浓度对 SSR 扩增的影响

Fig.3 Effect of different primer concentration on SSR amplification

2.2.3 dNTP 浓度 SSR 扩增的影响 图 4 表明, dNTP 浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,没有扩增出产物,100~300 $\mu\text{mol/L}$ 时都能扩增出产物,不同引物扩增有差

异,200 $\mu\text{mol/L}$ 时即可扩增出清晰的条带,达到 250 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增产物显著增加,为降低成本, dNTP 浓度选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 为宜。



注:M为Marker,50、100、150、200、250、300为dNTP浓度($\mu\text{mol/L}$)。

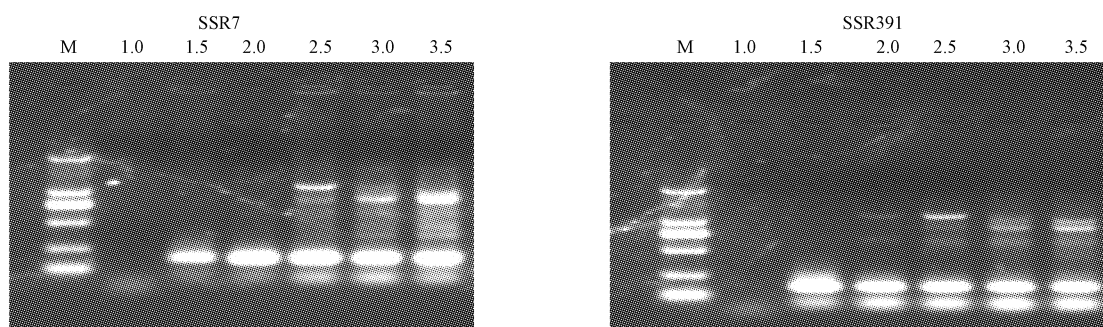
Note:M represents Marker,50,100,150,200,250,300 represent dNTP concentration($\mu\text{mol/L}$).

图4 dNTPs 浓度对 SSR 扩增的影响

Fig.4 Effect of different dNTPs concentration on SSR amplification

2.2.4 Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增的影响 由图 5 可知, 2 个引物在 Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时没有扩增出产物, Mg^{2+} 浓度在 1.5~3.5 mmol/L 时均有扩增产物,达到

3.0 mmol/L 以上出现弥散和非特异扩增增加。 Mg^{2+} 浓度在 2.0~2.5 mmol/L 时,可得到理想的扩增产物。



注:M为Marker,1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5为 Mg^{2+} 浓度(mm mol/L)。

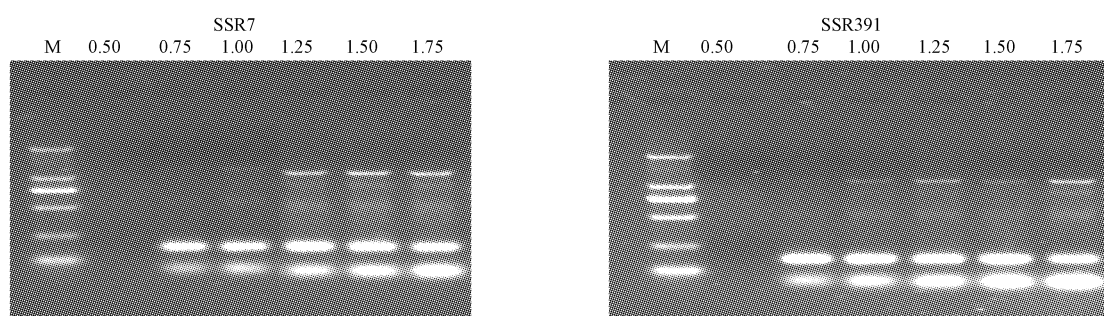
Note:M represents Marker,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 represent Mg^{2+} concentration(mm mol/L).

图5 Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增的影响

Fig.5 Effect of different Mg^{2+} concentration on SSR amplification

2.2.5 Taq DNA 聚合酶浓度对 SSR 扩增的影响 在 20 μL 反应体系设定 6 个 Taq DNA 聚合酶浓度优化,通过对 2 个引物的试验,由图 6 可知,除 0.5 U 时没有扩增

出条带外,其它均扩增出较亮的条带。从体系稳定和降低成本考虑,以选用 1.0 U 为宜。



注:M为Marker,0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75为 *Taq* DNA聚合酶浓度(U)。

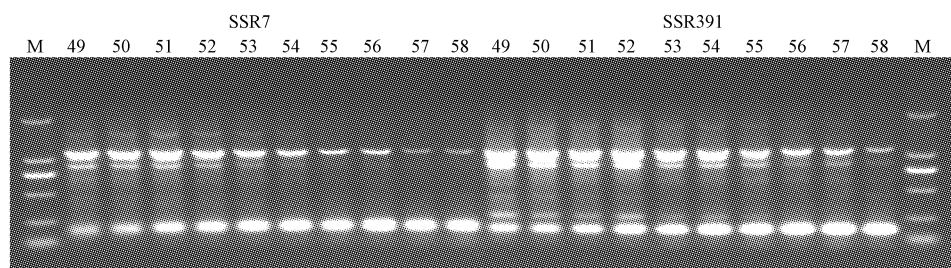
Notet;M represents Marker,0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 represent *Taq* polymerase concentration(U).

图6 *Taq* 聚合酶浓度对 SSR 扩增的影响

Fig.6 Effect of different *Taq* polymerase concentration on SSR amplification

2.2.6 退火温度 SSR 扩增的影响 退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素,退火温度过低,降低引物和模板的浓度容易出现非特异扩增。退火温度过高,影响引物与模板的结合,从而降低 PCR 扩增效率。在 T_m 值允许范围内,选择较高的退火温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合,提高 PCR 反应的特异性。该试验通过对 10 个温度梯度的对比试验,经琼脂糖和聚丙烯

酰胺凝胶电泳检测都可看出(图 7、8),每个梯度都扩增出目标产物,SSR7 退火温度低于 51℃,特异条带较弱,同时非特异扩增增多,应选择 51~57℃,SSR391 退火温度低于 52℃,非特异扩增增多,高于 56℃,则特异扩增也减少,应选择 52~56℃,从 2 种引物可以看出,根据每组引物的 T_m ,选择其引物上限 T_m 值作为体系的退火温度。



注:M为Marker,49~58为退火温度(℃)。

Note;M represents Marker,49-58 represent annealing temperature(℃).

图7 采用琼脂糖凝胶电泳法检测退火温度对 SSR 扩增的影响

Fig.7 Effect of annealing temperature on the SSR reaction by AGE

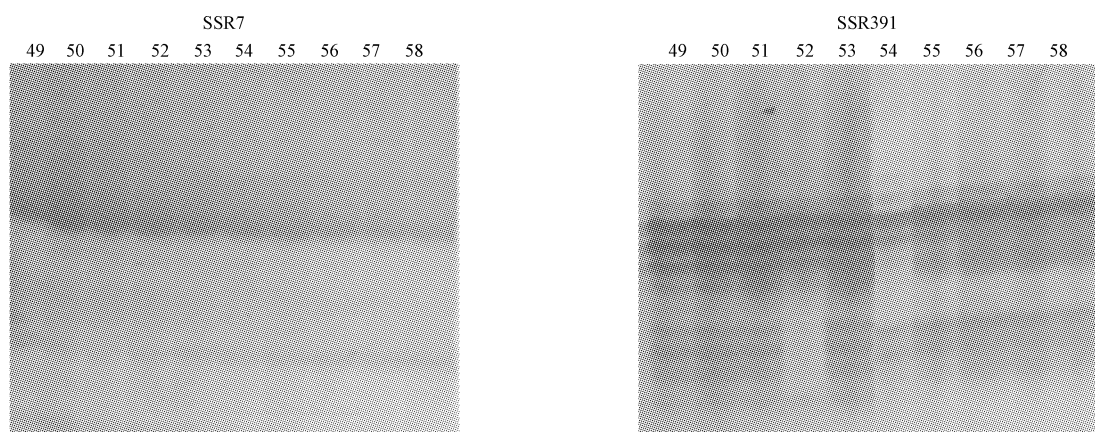


图8 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测退火温度对 SSR 扩增的影响

Fig.8 Effect of annealing temperature on the SSR reaction by SDS-PAGE

3 讨论

3.1 茄子的 SSR 标记引物

SSR 标记具有多态性高、重复性好、具有共显性、操作简单的特点,所以应用越来越广泛。但是 SSR 标记是特异引物标记,引物开发费用相当高。主要在水稻、小麦、番茄等植物上开发。茄子引物获得较困难,目前对基因组未测序的物种利用近缘物种 SSR 引物进行跨物种扩增是一种简便方法。有学者^[9]利用番茄引物扩增茄子,其多态性明显减少,仅为番茄多态性引物数的 11.49%。而汪国平等^[10]在 1 046 对番茄 SSR 引物中有 887 对能在茄子基因组 DNA 上扩增出产物,标记的通用率为 40.6%,马铃薯 SSR 引物在茄子上的通用率达到 30%。说明 SSR 引物具有一定的种属特异性,并在番茄与茄子间相似程度高。

3.2 茄子的 SSR 反应体系

SSR 分子标记技术已经在许多植物上应用,但是其 PCR 反应每个因素对扩增效果都有较大影响,因而建立稳定的 SSR 反应体系是多态性标记应用的基础。韩洪强等^[11]对 5 个因素进行正交设计对茄子 SSR 反应体系进行了优化。该试验首先通过 6 个单因素优化构建了茄子 20 μ L 体系 PCR 反应体系和反应程序,而后用丙烯酰胺凝胶电泳检测得到了良好的效果。优化出的模板浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度均比前者低,从而降低了试验成本。

参考文献

- [1] 徐云碧,朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,1994.
- [2] NUNOME T,ISHIGURO K,YOSHIDA T. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers[J]. Breeding Science,2001,51(1):19-26.
- [3] 卢婷,汪国平,林明宝,等. 应用 SSR 标记分析茄子种质资源的遗传多样性[J]. 中国蔬菜,2008(增刊):5-9.
- [4] 韩洪强,李怀志,刘杨,等. 正交设计优化茄子 SSR 反应体系[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2008,26(4):313-315.
- [5] NUNOME T,NEGRO S,KONO I,et al. Development of SSR markers-derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics,2009,119(6):1143-1153.
- [6] 何娟娟,刘富中,陈钰辉,等. 茄子航天诱变后代变异及其 SSR 标记多态性研究[J]. 核农学报,2010,24(3):460-465.
- [7] JULIO E,MUNOZ-FALCON,SANTIAGO V,et al. Diversity,relationships,and genetic fingerprinting of the Listada de Gandía eggplant land-race using genomic SSRs and EST-SSRs[J]. Scientia Horticulturae,2011,129(2):238-246.
- [8] 潜宗伟,陈海丽,崔彦玲. 茄子种子纯度 SSR 标记快速鉴定[J]. 北方园艺,2014(23):75-78.
- [9] LIU Y,CHEN H Y,WEI Y T,et al. Construction of a genetic map and localization of QTLs for yield traits in tomato by SSR markers[J]. Progress in Natural Science,2005,15(9):793-797.
- [10] 汪国平,牛玉,汪文毅,等. 番茄 SSR 标记在茄子及其它茄科作物上的通用性分析[J]. 华南农业大学学报,2014,35(4):56-60.
- [11] 韩洪强,李志怀,刘杨,等. 正交设计优化茄子 SSR 反应体系[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2008,26(4):313-315.

Optimization of SSR Analysis System in Eggplant

LI Ye

(Harbin Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: Taking eggplant DNA of 'Hanongzaqie No. 4' as the test material, using single factor test method, the SSR amplified results of eggplant and comparative analysis of polymorphism of SSR detected on two gel electrophoresis systems were studied. A standard SSR system fitting for eggplant was established. The results showed that the optimized amplification conditions were 20—40 ng DNA, 0.3 μ mol/L of each primer, 200 μ mol/L of dNTP, 2.0—2.5 mmol/L Mg^{2+} and 1 unit *Taq* DNA polymerase in 20 μ L volume. The optimized PCR cycles started at 94°C (5 min), followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 52—56°C and 2 min at 72°C, and then extended 8 min at 72°C. 6% Polyacrylamide gel had higher ability than 1.8% agarose gel in discriminating polymorphism.

Keywords: eggplant; SSR; analysis system