

DOI:10.11937/bfyy.201712026

天山樱桃 EST-SSR 引物开发及 PCR 反应体系优化

秦 雪¹, 陈淑英², 田 嘉¹, 李 鹏¹, 盛 芳¹, 李 疆¹

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆伊犁州林业科学研究院, 新疆 伊宁 835000)

摘 要:以新疆天山樱桃叶片为试材,从 NCBI 数据库中搜索天山樱桃 EST 序列,利用 SS-RHunter 1.3 软件查找 SSR 位点,结合 Primer 6.0 设计引物,通过正交实验和单因素试验优化天山樱桃 SSR-PCR 反应体系,并用最佳体系对所开发的引物进行验证,以期研究天山樱桃遗传多样性、构建遗传连锁图谱奠定基础。结果表明:从 58 对备选引物中随机挑选 30 对引物进行试验,有 21 对引物能够扩增出特异性条带,有效扩增率为 70%。20 μL 天山樱桃 SSR-PCR 最佳反应体系为 dNTP 0.2 mmol \cdot L⁻¹、引物 0.4 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹、Taq 酶 0.75 U、模板 DNA 60 ng。

关键词:天山樱桃;引物开发;EST-SSR;体系优化

中图分类号:S 662.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0108-07

天山樱桃(*Cerasus tianschanica* Pojark.)属蔷薇科(Rosaceae)樱桃属(*Cerasus*)矮生樱亚属植物,又称野樱桃。天山樱桃在我国目前仅分布在新疆伊犁地区,花色绚丽,果实鲜艳,营养价值高,既可供观赏,又可鲜食,被誉为“雪域圣果”^[1],自古就被当地少数民族所喜食,也是我国重要的野生珍奇稀有果品资源之一^[2]。但近年来由于旅游开发及过度放牧等人为因素,天山樱桃保护区遭到了严重破坏,致使新疆天山樱桃成为我国濒临灭绝的野生树种之一,因此开发和保护野生天山樱桃种质资源刻不容缓。

前人对天山樱桃的研究保护主要集中在生态地理环境和生物学特性等方面,周龙等^[1]对天山樱桃的生境、物候期和生态适应性进行了初步调查;彭妮等^[3]、王超等^[4]分别对天山樱桃种子萌发特性和花芽形态分化进行了研究,但有关天山樱桃分子标记方面的研究尚鲜见报道。

SSR 分子标记具有多态信息含量高、特异性强、

重复性好等特点,已广泛应用于物种亲缘关系分析、新品种选育与鉴定、遗传图谱构建和分子标记辅助育种等方面。随着表达序列标签(EST)数据库的不断扩充,EST 作为新的 SSR 标记来源,已经成功应用于葡萄^[5]、梨^[6]、苹果^[7]、核桃^[8]、黄瓜^[9]、辣椒^[10]、菊花^[11]等植物的遗传多样性研究中。由于 SSR 技术易受模板 DNA 用量、dNTP 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶用量以及引物退火温度的影响,因此筛选出合适的 PCR 体系至关重要。该研究利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库中天山樱桃的 EST 序列成功设计了 58 对引物,通过正交实验与单因素试验,优化了天山樱桃 SSR-PCR 体系,旨在为研究天山樱桃遗传多样性、品种鉴定、构建遗传连锁图谱等奠定基础,也为今后使用分子标记技术研究保护野生天山樱桃提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试天山樱桃叶片采集于新疆伊犁霍城县大西沟,从山脚开始采集,海拔每升高 50 m 采集 1 份天山樱桃叶片(每份 30 个叶片),至海拔 600 m 处共采集 12 份样品。采集的样品立即装入存有干燥硅胶的封口袋中,带回实验室后每 2 d 更换一次干燥的硅胶至样品完全干燥,然后将装有样品和硅胶的封口袋保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 提取及检测 采用改良的 CTAB^[12]

第一作者简介:秦雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向为果树种质资源。E-mail:331254336@qq.com.

责任作者:李疆(1958-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事果树栽培生理与种质资源等研究工作。E-mail:lijiangxj@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201304701-1);新疆维吾尔自治区园艺学重点学科基金资助项目(2016-10758-3)。

收稿日期:2017-02-07

法提取新疆野生天山樱桃叶片的总 DNA,用琼脂糖凝胶电泳检测法和紫外分光光度计法分别检测 DNA 质量及浓度,检测后将 DNA 的浓度稀释至 $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存备用。

1.2.2 EST 序列搜索及 SSR 位点查找 从 NCBI 公共数据库中以 Fasta 格式下载天山樱桃 EST 序列共计 111 850 条(截至 2016 年 4 月)。用 BioEdit 软件对 EST 序列进行编辑,用 SSR Hunter 1.3 软件对经过编辑的序列进行 SSR 位点查找,查找的标准为:二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复序列次数分别大于或等于 10、7、5、4、3^[13-14]。

1.2.3 EST-SSR 引物设计 筛选出含有 SSR 位点的 EST 序列后,用 Primer 6.0 软件进行引物设计。参数如下:GC 含量 40%~60%,引物长度 18~26 bp,引物 T_m 值在 $48\sim 60^\circ\text{C}$,PCR 扩增产物长度控制在 100~300 bp,应尽量避免引物二聚体、错配和发夹结构的出现^[15]。所设计的引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.4 SSR-PCR 引物筛选及检测 为便于后续 PCR 扩增,选 4 个样本 DNA 进行等量混合,构建混合 DNA 池,用混样 DNA 作为模板 DNA 进行 PCR 扩增。20 μL PCR 反应体系中,10 \times Buffer (Mg^{2+} plus)2 μL ,2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 1.6 μL ,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.6 μL ,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL ,模板 DNA 60 ng。PCR 反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,56 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^\circ\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,核酸染料染色,紫外凝胶成像系统成像观察,剩余产物置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2.5 退火温度梯度筛选 将退火温度区间设为 $48\sim 66^\circ\text{C}$,PCR 仪会自动生成 12 个温度梯度,48.0、48.5、49.7、51.6、53.7、55.9、58.1、60.3、62.4、64.3、65.5、66.0 $^\circ\text{C}$,其它反应程序不变,筛选出引物最佳退火温度。

1.2.6 SSR-PCR 反应体系正交优化实验 以天山樱桃 5 号 DNA 为模板,选取初筛时表现良好的 30 号引物进行分析。采用正交法设计 4 因素 4 水平正交实验,建立 20 μL SSR-PCR 反应体系,试验设计按照表 1 和表 2 所示,试验设 3 次重复,反应程序与 1.2.4 相同。

1.2.7 单因素优化试验 在其它因素固定不变的情况下,依次改变 4 个因素的用量,以便确定各因素的最佳用量。各因素变化梯度设计如下:dNTP

(0.10、0.15、0.20、0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$);引物 (0.10、0.20、0.30、0.40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);DNA (30、60、90、120 ng);*Taq* DNA 聚合酶 (0.25、0.50、0.75、1.00 U);每次试验设 3 组重复,以上 PCR 反应均在 Biometra TProfessional PCR 仪上进行。

表 1 正交优化因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平 Level	因素 Factor			
	dNTPs 浓度 (含 Mg^{2+})	引物浓度 Concentration of primers	<i>Taq</i> 酶用量 Amount of <i>Taq</i>	模板 DNA 用量 Concentration of DNA
	dNTPs concentration /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	/U	/ng
1	0.10	0.1	0.25	30
2	0.15	0.2	0.50	60
3	0.20	0.3	0.75	90
4	0.25	0.4	1.00	120

表 2 SSR-PCR 正交优化实验设计

Table 2 Orthogonal design for SSR-PCR optimization

编号 Code	因素 Factor			
	dNTPs 浓度 (含 Mg^{2+})	引物浓度 Concentration of primers	<i>Taq</i> 酶用量 Amount of <i>Taq</i>	模板 DNA 用量 Concentration of DNA
	dNTPs concentration /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	/U	/ng
1	0.10	0.1	0.25	30
2	0.10	0.2	0.50	60
3	0.10	0.3	0.75	90
4	0.10	0.4	1.00	120
5	0.15	0.1	0.50	90
6	0.15	0.2	0.25	120
7	0.15	0.3	1.00	30
8	0.15	0.4	0.75	60
9	0.20	0.1	0.75	120
10	0.20	0.2	0.25	90
11	0.20	0.3	1.00	60
12	0.20	0.4	0.50	30
13	0.25	0.1	1.00	60
14	0.25	0.2	0.75	30
15	0.25	0.3	0.50	120
16	0.25	0.4	0.25	90

1.2.8 优化体系验证 采用最佳反应体系对所有 DNA 进行扩增,对体系的可靠性和稳定性进行验证,对引物的适用性进行检测,对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 天山樱桃 EST-SSR 序列分析

对来自 NCBI 数据库中 111 850 条天山樱桃 EST 序列进行 SSR 搜索,含 SSR 的 EST 序列共 8 288 条,占 EST 序列总数的 7.41%。随机挑选了 595 条 EST 序列进行 SSR 引物设计,共设计出 58 对备选引物。对这 595 条 EST-SSR 的重复基元类型进行统计分析(表 3),发现仅存在 3 种类型的重复基

元;二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸,类型并不是很丰富。分析其分布规律发现二核苷酸最多,占主导地位,其次是三核苷酸,四核苷酸最少,这与人研究结果一致^[16]。

表 3 天山樱桃 EST-SSR 重复基元类型

Table 3 Repeat motifs in EST-SSR of *Cerasus tianshanica*

重复基元 Repeat type	SSR 数量 Number of SSR/个	百分率 Frequency%
二核苷酸 Dinucleotides	426	71.60
三核苷酸 Trinucleotides	161	27.06
四核苷酸 Tetranucleotides	8	1.34

2.2 天山樱桃微卫星碱基分布频率与特点

由表 4 可知,在二核苷酸重复中,有 11 种类型,其中 CT 重复次数最多,共 124 次,占总数的 20.84%;TC 重复次数位居第二,共 115 次,占总数的 19.33%;AG 和 GA 重复次数分别为 79、44 次。CT 和 TC 重复类型占核苷酸总数的 40.17%,是天山樱桃碱基重复的主要类型。三碱基重复类型共 34 种,类型在重复基元中最为丰富,其中 GCT 重复次数最多,共 23 次,占三碱基重复类型的 14.29%,占总数的 3.87%。四碱基重复类型 5 种,CCTC 重复次数最多,共 3 次,占四碱基重复类型的 37.5%,占总数的 0.5%。

表 4 微卫星中各重复基元含量比例

Table 4 Repeat motifs percentage in simple sequence repeat

重复基元 Repeat type	重复次数 Repeat times/次	所占比例 Frequency / %	重复基元 Repeat type	重复次数 Repeat times/次	所占比例 Frequency / %
AC	7	1.18	CTT	8	1.34
AG	79	13.28	GAA	6	1.01
AT	25	4.20	GAC	1	0.17
CA	3	0.50	GAG	3	0.50
CT	124	20.84	GAT	3	0.50
GA	44	7.39	GCA	4	0.67
GC	1	0.17	GCG	1	0.17
GT	1	0.17	GCT	23	3.87
TA	23	3.87	GGC	2	0.34
TC	115	19.33	GGT	2	0.34
TG	4	0.67	GTG	1	0.17
AAC	2	0.34	TCA	2	0.34
AAG	7	1.18	TCC	1	0.17
ACG	1	0.17	TCG	3	0.50
AGA	4	0.67	TCT	9	1.51
AGC	10	1.68	TGA	3	0.50
AGG	2	0.34	TGC	3	0.50
ATG	2	0.34	TGG	2	0.34
CAA	3	0.50	TTC	19	3.19
CAC	4	0.67	TTG	1	0.17
CAG	3	0.50	CCTC	3	0.50
CCT	7	1.18	CTGT	1	0.17
CGG	1	0.17	CTTT	2	0.34
CTC	7	1.18	TGTC	1	0.17
CTG	11	1.85	TTCT	1	0.17

2.3 天山樱桃引物设计与筛选

根据筛选出的 595 条天山樱桃 EST 序列,运用 Primer 6.0 软件设计天山樱桃 EST-SSR 引物,共得到 58 对备选引物。随机从中挑选 30 对引物,以 12 份天山樱桃的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,初步筛选后有 16 对引物能扩增出条带,有效扩增率为 53.3%;由于部分引物扩增出的条带不清晰,经过调整退火温度,二次筛选后扩增出有效条带的引物达到 21 对(表 5),有效扩增率为 70.0%。表明利用天山樱桃 EST 序列开发引物是高效可行的。

表 5 天山樱桃 EST-SSR 引物信息

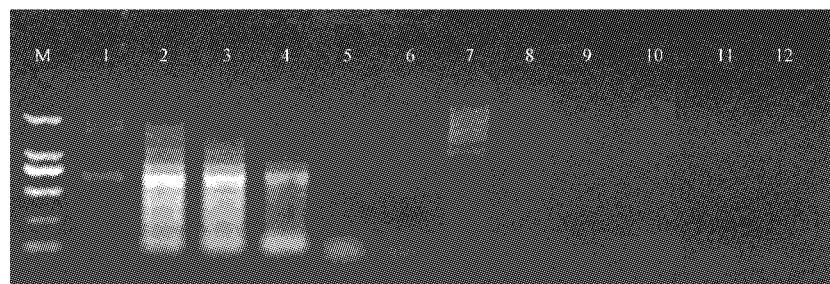
Table 5 EST-SSR sequence of *Cerasus tianshanica*

序号 Number	引物编号 Primer code	退火温度 Tm/℃	引物序列(5'-3') Primer sequence
1	XNDTSYT1	58.1	F:CGCCAGGTGTCCAGTTAA R:TGCTGCTGTTGGTTCATAG
2	XNDTSYT 3	58.1	F:TTCAACCAACACCTCTCTC R:GTGTGAGTGTCTTCTCTGT
3	XNDTSYT 6	48.5	F:AAGCAGCAAGGAATGTCG R:TGTGGTCTGTCTGTGATGA
4	XNDTSYT 7	62.4	F:TTGGTGAACGAAGAAGGC R:CGGATAGGTTAGATGCTCAA
5	XNDTSYT 8	55.9	F:ATCTCGACGGACTCTTC R:TCAGGTGAGATGGTGACTAT
6	XNDTSYT 10	62.4	F:CCCTTTGTCTTTGCTTTTG R:AAGTGGTGAAGAAGAGTGTT
7	XNDTSYT 11	49.7	F:AACACCACTCCACTCTC R:AACACCACTCCACTCTC
8	XNDTSYT 12	60.3	F:GCATCATCCACCTTCA R:TGTTATGAACTTGGCTTGG
9	XNDTSYT 13	48.5	F:GCCATCACCTCCATCATC R:CTGTGCTGTTGTTGTTGT
10	XNDTSYT 14	60.3	F:GCCACAACGTGTCTCATCT R:AACGCCAATCTTCTATCC
11	XNDTSYT 15	49.7	F:CCACCAATCCATCATCAT R:TAGAAGAAGAACGACGAGAG
12	XNDTSYT 16	60.3	F:TTGCCACATTTGCTTCC R:ACACCAGTAACTGGATTAAAG
13	XNDTSYT 17	49.7	F:TTCTTCCGAGCAGCCTAG R:GAGGTATCTTCTCCATCTTG
14	XNDTSYT 18	53.7	F:TCTCTTCTTCTATAGCAGTAGC R:CTGGGCTCATAGAGTCATAG
15	XNDTSYT 19	49.7	F:CCTCTCTCAGTTTCAAGATC R:GAAGAAGGCTGGAAGTGTT
16	XNDTSYT 20	55.9	F:GCGTCTGAACAATTATACA R:TTGAGCCTTGCGAACTTC
17	XNDTSYT 21	58.1	F:CCACACTCTCAGCTTCTC R:AACTTCAATCCACCAACATG
18	XNDTSYT 23	58.1	F:AGCAGACAGTTTCGTTA R:AAGGATGGGACTTAAGAAGAG
19	XNDTSYT 25	55.9	F:CTCTTCTTCTATAGCAGTAGC R:GGGACCTGTTCATTTGAAA
20	XNDTSYT 26	58.1	F:GAGACAGGCAGTCAGAGA R:GGAACGAAGAGCAGAGATG
21	XNDTSYT 30	55.9	F:ACACATGACACATCTTCAGA R:TGATTTCCGCCCAACAT

2.4 退火温度对 PCR 反应程序的影响

退火温度对 PCR 反应程序有较大影响,温度过高不利于引物与模板结合,温度过低容易发生错配。由图 1 可知,退火温度低于 60.3 °C 能扩增出条带,高于 60.3 °C 后无扩增产物。在能扩增出条带的温

度区间内,53.7~60.3 °C 时扩增产物条带模糊,数量较少。48.0~51.6 °C 时扩增谱带比较清晰,无明显拖尾现象,其中 48.5 °C 时主带最亮,有效条带数目最多,最清晰,因此引物 XNDTSYT13 的最适退火温度为 48.5 °C。其它引物最佳退火温度见表 5。



注: M, DL 2 000 DNA Marker, 下同; 1~12 表示退火温度分别为 48.0、48.5、49.7、51.6、53.7、55.9、58.1、60.3、62.4、64.3、65.5、66.0 °C。

Note: M, DL 2 000 DNA Marker, the same below; 1~12 represent annealing temperature 48.0, 48.5, 49.7, 51.6, 53.7, 55.9, 58.1, 60.3, 62.4, 64.3, 65.5, 66.0 °C, respectively.

图 1 引物 XNDTSYT13 退火温度的筛选

Fig. 1 Screening of annealing temperature for primer XNDTSYT13

2.5 SSR-PCR 反应体系正交实验优化结果

各因素之间的优化组合对 SSR 标记能否获得扩增条带至关重要,按照表 2 设计的 16 个处理,用引物 XNDTSYT30 对天山樱桃 5 号 DNA 样品进行 PCR 扩增,由图 2 可知,16 个处理(样品序号同表 2)的扩增效果存在明显差异。第 13、14 泳道没有扩增出特异性条带;第 1、5、9 泳道虽扩增出条带,但带型微弱,不易分辨;第 2、6、8、10 泳道能扩增出条带,但

条带相对较暗,第 7、11、12、15、16 泳道也能扩增出条带,但较第 3、4 泳道重复性差。第 3 和第 4 泳道结果基本一致,但第 4 泳道中引物、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 的用量均大于第 3 泳道,因此第 3 组处理为各因素最佳组合。即在 20 μ L 的反应体系中,各因素的用量依次为 dNTP 0.1 mmol \cdot L⁻¹、引物 0.3 μ mol \cdot L⁻¹、*Taq* 酶 0.75 U、模板 DNA 90 ng。



图 2 正交实验优化结果

Fig. 2 Results of orthogonal design optimization

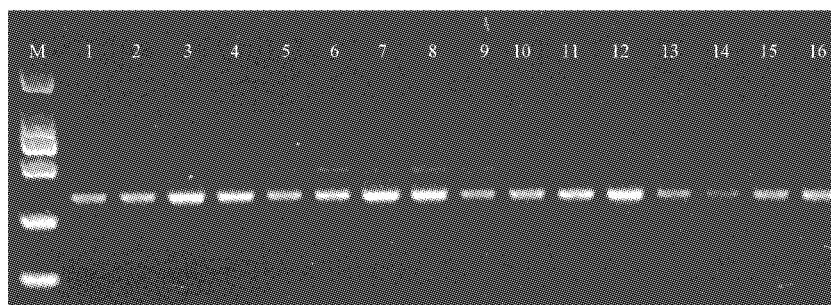
2.6 SSR-PCR 反应体系单因素试验结果

从正交实验中得出 PCR 的最佳反应体系为第 3 组处理,在各因素最佳水平附近设计单因素浓度梯度试验,进一步优化 SSR-PCR 反应体系,明确最终反应中各成分的最适用量。试验设 3 次重复。DNA 浓度过低会影响扩增产物的稳定性,过高则会增加非特异性产物的扩增。由图 3 可知,当 DNA 用量为

30 ng 时,扩增产物条带较微弱,60~120 ng 时,扩增产物较为清晰,该试验选取 60 ng 作为模板 DNA 最适用量。dNTP 是 PCR 反应的原料,浓度过低时影响 PCR 产率,dNTP 浓度为 0.10~0.25 mmol \cdot L⁻¹ 时,均能扩增出条带,当浓度为 0.2 mmol \cdot L⁻¹ 时,扩增产物条带最亮,最清晰,因此该试验选择最适 dNTP 浓度为 0.2 mmol \cdot L⁻¹。引物浓度对 PCR 反应也十

分重要,当浓度过高时容易引起碱基错配,浓度过低时又会导致扩增产率下降。图3中引物的浓度为 $0.1\sim 0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,均可以扩增出清晰条带,但 $0.1\sim 0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时条带较 $0.3\sim 0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的条带暗,引物浓度在 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最亮,

因此该试验选择 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最适浓度。由图3还可知,随着Taq酶用量的增加,目的条带逐渐变粗变亮,当Taq酶用量达到 $0.75\sim 1.00\ \text{U}$ 时,目的条带最亮,该试验认为Taq DNA聚合酶最适用量为 $0.75\ \text{U}$ 。



注:1~4号处理为模板DNA用量梯度试验;5~8号处理为dNTP浓度梯度试验;9~12号处理为引物浓度梯度试验;13~16号处理为Taq DNA聚合酶用量梯度试验。

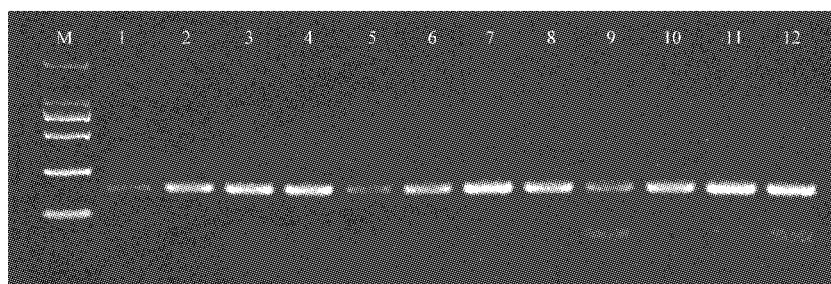
Note:1~4 represent the concentration gradient of template DNA;5~8 represent the concentration gradient of dNTP;9~12 represent the concentration gradient of primer;13~16 represent the concentration gradient of Taq polymerase.

图3 单因素试验结果

Fig. 3 Results of single factor experiment

天山樱桃 SSR-PCR 最适反应体系为 $20\ \mu\text{L}$ 体系,dNTP $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Taq酶 $0.75\ \text{U}$ 、模板 DNA $60\ \text{ng}$ 。用筛选的最佳体系对

12份天山樱桃DNA进行验证,如图4所示,12份DNA均能扩增到明显谱带,表明所选体系适合天山樱桃叶片DNA的PCR反应。



注:1~12表示12份DNA样品。

Note:1~12 represent 12 different DNA.

图4 XNDTSYT17号引物对12份天山樱桃的SSR-PCR检测

Fig. 4 SSR-PCR detection for 12 *Cerasus tianschanica* samples by using primer XNDTSYT17

3 讨论与结论

随着EST数据库的不断丰富,利用EST开发SSR引物已经成为一项高效、低成本的选择。目前,EST-SSR标记已作为分子工具被广泛应用于遗传多样性、亲缘关系、连锁图谱构建、比较基因组学及关联分析等领域^[17-19]。该研究搜集了111 850条天山樱桃EST序列(截至2016年4月),对其进行特征分析发现,含有SSR的EST序列共有8 828条,占总EST总数的7.41%,该比例与梨的7.1%较为接近^[6],高于香蕉的5.3%^[20],但又低于苹果的

14.78%^[7]和柑橘的21.56%^[21]。存在这种差异一方面可能与搜索SSR时所设定的参数不同有关,另一方面也可能与植物本身SSR信息存在差异有关。

该研究利用EST序列共设计了58对引物,从中随机选取30对引物分别对12份天山樱桃叶片的DNA进行扩增,初步筛选中有16对引物扩增出条带,有效扩增率为53.3%,经过调整退火温度,二次筛选后有21对引物扩增出清晰条带,有效扩增率为70%。经对比发现,天山樱桃EST-SSR引物有效扩增率稍高于梨的64.6%^[6]和苹果的63.9%^[7],但低

于核桃的 90.9%^[8]和茶树的 81.3%^[22],处于中间地位。NICOT 等^[23]研究发现,鉴定过的 EST 序列只有 74%能够设计成引物,引物的 70%可以扩增出多态性产物,其中 68%的扩增质量较好。这一结论与该研究结果基本一致。

开展 EST-SSR 分子标记研究,建立稳定可靠的 PCR 扩增体系是天山樱桃遗传多样性、构建遗传连锁图谱等研究的基础。纵观前人研究发现 SSR-PCR 反应体系的优化一般采用单因素试验、完全随机试验或正交实验,这些试验各有其优缺点。完全随机试验虽然结果更加客观,但是试验工作量大,试验成本高,正交实验虽节约了成本,具有一定的代表性,但组合中每种因素的浓度是否达到最优的水平还有待深入验证。为了增加试验的准确性同时又避免试验组合数多,工作量大的缺点,该试验首先利用正交实验确定好 PCR 反应体系的最佳浓度范围,再进一步开展单因素试验,从而快速、准确地筛选出最佳反应体系。这与李亚利等^[24]研究黄瓜 SSR-PCR 反应体系和李亚慧等^[25]对菊花 SSR-PCR 体系的优化思路一致。

综上所述,经过筛查对比发现天山樱桃 EST 序列中 SSR 含量较为丰富,因此可以利用天山樱桃 EST 序列设计引物。该研究利用天山樱桃 EST 序列共设计了 58 对引物,从中随机选取 30 对引物分别对 12 份天山樱桃的 DNA 进行扩增,有效扩增率为 70.0%,经过体系优化后,最终得到天山樱桃 SSR-PCR 最适反应体系为 20 μL ,dNTP 0.2 mmol \cdot L⁻¹、引物 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq* 酶 0.75 U、模板 DNA 60 ng。利用该试验开发的 21 对 EST-SSR 引物对 12 份天山樱桃的 DNA 进行扩增,发现均成功扩增出清晰稳定的条带,说明筛选的体系稳定可靠,为今后利用天山樱桃 EST 序列开发更多的引物提供了有力保障,为天山樱桃遗传多样性、构建遗传连锁图谱的研究奠定了基础,对实现天山樱桃种质资源的准确评价及保护提供技术支撑。

参考文献

[1] 周龙,秦伟,苏向辉,等.天山樱桃种质资源的调查研究[J].现代农业科技,2010(21):157-158.
[2] 廖康.新疆野生果树资源研究[M].乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2013:457.
[3] 彭妮,周龙,王超,等.天山樱桃种子萌发特性研究[J].经济林研究,2015,33(3):145-149.
[4] 王超,周龙,彭妮,等.天山樱桃花芽形态分化研究[J].西北农业学报,2015,24(5):97-101

[5] 王娟,陶永焕,宋尚伟,等.葡萄 EST-SSR 引物的开发及部分种质聚类分析[J].华北农学报,2014,29(2):121-126.
[6] 王西成,姜淑苓.梨 EST-SSR 标记的开发及其在梨品种遗传多样性分析中的应用评价[J].中国农业科学,2010,43(24):5079-5087.
[7] YAO L H, ZHENG X Y, CAI D Y, et al. Exploitation of *Malus* EST-SSRs and the utility in evaluation of genetic diversity in *Malus* and *Pyrus*[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2010, 57(6): 841-851.
[8] 朱艳,郝艳宾,王克建,等.核桃 EST-SSR 信息分析与标记的初步建立[J].果树学报,2009,26(3):394-398.
[9] 关媛,李效尊,潘俊松,等.黄瓜果实 EST-SSR 标记的开发[J].分子植物育种,2007,5(5):725-728.
[10] 支莉,王述彬,刁卫平,等.辣椒 EST-SSRs 分布特征及其应用[J].江苏农业学报,2010,26(6):1323-1328.
[11] 万志兵,陈燕,闫莹莹,等.菊花 EST-SSR 分析及标记开发[J].西南林业大学学报,2013,33(1):39-44.
[12] ARANZANAMJ, GARCIA-MAS J, CARBO J, et al. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach[J]. Plant Breed, 2002, 121: 87-92.
[13] JUNG S, ABBOTT A, JESUDURAI C, et al. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs[J]. Functional & Integrative Genomics, 2005, 5(3): 136-143.
[14] PONCET V, RONDEAU M, TRANCHANT C, et al. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 276(5): 436-449.
[15] 邓传良,高俊.菠菜性别相关 EST-SSR 标记的开发及应用[J].基因组学与应用生物学,2012,31(5):467-472.
[16] 杨素丽,明军,刘春,等.基于 EST 信息的百合 SSR 标记的建立[J].园艺学报,2008,35(7):1069-1074.
[17] Mc COUCH S R, CHEN X, PANAUD O, et al. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 89-99.
[18] CARDLE L, RAMSAY L, MILBOURNE D, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants[J]. Genetics, 2000, 156: 847-854.
[19] MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes[J]. Nature Genetics, 2002(30):194-200.
[20] 王静毅,陈业渊,刘伟良,等.香蕉 EST-SSRs 标记的开发与应用[J].遗传,2008,30(7):933-940.
[21] 江东,钟广炎,洪棋斌.柑橘 EST-SSR 分子标记分析[J].遗传学报,2006,33(4):345-353.
[22] 金基强,李素芳,龚晓春,等.茶树 EST 资源中 SSR 的信息分析[J].科技通报,2006,22(4):471-476.
[23] NICOT N, CHIQUET V, GANDON B, et al. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 800-805.
[24] 李亚利,陈书霞,孟焕文,等.利用正交设计优化黄瓜的 SSR-PCR 反应体系[J].西北农业学报,2008,17(3):280-284.
[25] 李亚慧,黄丛林,董然.菊花 SSR-PCR 反应体系的建立和优化[J].北方园艺,2012(13):127-131.

DOI:10.11937/bfyy.201712027

CRISPR-Cas9 系统敲除甜瓜 ACC 合成酶 基因表达载体的构建

王 雪, 李 冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要:以甜瓜品种“老汉瓜”为试材,采用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术,研究了构建 CRISPR-Cas9 系统敲除甜瓜 ACC 合成酶基因表达载体的方法,以期获得高效的敲除甜瓜基因的基因组编辑技术。结果表明:以甜瓜 ACC 合成酶的基因设计出引物后,将其构建到 pPIC4 载体上,用热激法将连接产物转化到大肠杆菌中,筛选的阳性克隆测序验证为最终载体。

关键词:CRISPR-Cas9;基因敲除;ACC 合成酶

中图分类号:S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0114-05

随着转基因技术的发展,出现了多种对基因组进行定点编辑的新技术,特别是最近发现的 CRISPR/Cas 系统因其简易和有效性被广泛应用于包括植物在内的多种生物的基因组编辑中。

第一作者简介:王雪(1992-),女,硕士研究生,研究方向为植物学。E-mail:870432310@qq.com

责任作者:李冠(1949-),男,教授,博士生导师,现主要从事植物生理生化与分子生物学教学等工作。E-mail:guanli@xju.edu.cn

收稿日期:2017-02-15

CRISPR/Cas 系统仅需要短 RNA 和核酸酶就可以对特定的靶标基因进行突变。CRISPR-Cas 系统是细菌和古细菌在进化过程中逐渐形成的一种适应性免疫系统,通过小片段的 RNA 介导对入侵的核酸进行靶向定位并通过 Cas 酶对核酸进行酶切、降解可以降解入侵的病毒或质粒 DNA^[1-2]。利用此技术能够对目的基因进行靶向的敲除或敲入。

2007 年,BARRANGOU 等^[3]首次利用试验证明了嗜热链球菌的 CRISPR 系统直接参与细菌对噬菌体的适应性免疫反应。CRISPR 介导的获得性免

Development of EST-SSR Markers and Optimization of SSR System in *Cerasus tianschanica*

QIN Xue¹, CHEN Shuying², TIAN Jia¹, LI Peng¹, SHENG Fang¹, LI Jiang¹

(1. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Academy of Forestry in Ili of Xinjiang, Yining, Xinjiang 835000)

Abstract: Leaves of *Cerasus tianschanica* were used as materials. The EST sequences of *Cerasus tianschanica* were obtained from NCBI, SSR motifs were screened by using SSRHunter 1.3 software from these sequences, and specific primers were designed with the software Primer 6.0. Besides, the SSR-PCR reaction system of *Cerasus tianschanica* was optimized by orthogonal test and single factor experiment to verify the developed primers in order to lay the foundation for genetic diversity and construction of genetic map. The results showed that 21 pairs of primers could amplify specific bands, and the effective amplification rate was 70%. Moreover, the 20 μ L reaction system contained 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 0.75 U *Taq* polymerase and 60 ng template DNA.

Keywords: *Cerasus tianschanica*; primer development; EST-SSR; system optimization