

doi:10.11937/bfy.20173431

苹果愈伤组织 SSR-PCR 反应体系优化

高 兵^{1,2}, 安文杰¹, 孙 俊^{2,3}

(1. 山西林业职业技术学院 园艺系, 山西 太原 030009; 2. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095;
3. 安徽农业大学 园艺学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要:以“嘎啦”苹果组培苗叶片诱导的愈伤组织作为 DNA 模板提取材料, 采用正交设计, 摸索了 SSR 反应体系中 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA、dNTP 的最适浓度, 可为苹果愈伤组织的遗传变异研究奠定基础。结果表明: 各因素不同水平变化对反应体系的影响为 *Taq* DNA 聚合酶 > dNTP 用量 > Mg^{2+} 用量 > 引物用量 = 模板 DNA 浓度。确立了苹果愈伤组织 SSR-PCR 最佳反应体系总体积 25 μ L, 其中 4 μ L 25 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} , 0.25 μ L 5 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶, 3 μ L 0.01 mmol \cdot L⁻¹ SSR 引物, 1 μ L 30 ng \cdot μ L⁻¹ 模板 DNA, 4 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 10.25 μ L 超纯水。

关键词:苹果; 愈伤组织; SSR-PCR; 体系优化

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2018)10-0053-04

蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)种质资源丰富、种类多、分布广^[1]。全球苹果属植物大约 35 个种, 原产我国的 27 个种, 其中野生种有 21 个, 栽培种 6 个。前人在苹果的砧木选育^[2]、品质性状^[3]及遗传方面^[4]进行了大量研究, 研究方法除了外观形态方面的调查整理外, 主要选用 DNA 分子技术, 随着分子技术的进一步发展完善以及在苹果中的不断应用, 将为苹果资源的研究范围和体系提供更加准确可靠的手段。

愈伤组织是植物离体培养与生物技术研究的良好试验材料。离体培养中若培养条件特别或对植物材料进行特殊处理, 都有可能诱发体细胞无性系产生变异^[5-6], 对这些遗传变异情况进行检测和研究是非常必要的。分子标记能在 DNA 水平上检测生物个体间的差异, 是 DNA 分子水平遗传变异的直接反应。SSR (simple sequence

repeat, 简单重复序列)又称微卫星, 是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术。它具有数量丰富、分布广泛、多态性高、稳定性好以及呈共显性遗传等优点^[7]。因此, SSR 标记在苹果的品种鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱建立和基因标记等方面的研究中广泛应用。该试验采用 PCR 扩增程序和正交实验设计, 对苹果愈伤组织 SSR-PCR 反应中影响试验结果的主要因子进行优化, 获得最佳反应体系, 以期为后续在分子水平上进行苹果愈伤组织的遗传变异检测与鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“嘎啦”苹果单芽系组培苗叶片诱导的不同处理和不同继代周期的愈伤组织, 由南京农业大学园艺学院提供。供试 *Taq* DNA 聚合酶购自上海生工, 引物序列由上海生工合成, dNTP、 $MgCl_2$ 、10 \times PCR Buffer 购自大连宝生物工程公司。供试 PCR 仪 (PTC-100TM, 美国); 琼脂糖凝胶电泳 (FR-200, 上海复日科技); 高速冷冻离心机 (ependorf 518R, 德国)。

第一作者简介:高兵(1979-), 女, 山西太原人, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺教学等工作。E-mail: 754025816@qq.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200190); 港澳台科技合作专项资助项目(2015DFT30090)。

收稿日期:2018-03-12

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织基因组 DNA 的提取及检测

参考陈大明等^[8]的 DNA 提取方法提取基因组 DNA,稍作改进,将裂解缓冲液的盐离子浓度由 0.5 mol · L⁻¹提高到 1.4 mol · L⁻¹。提取的 DNA 用 100 μL TE 溶液溶解,待测。1)测定 DNA 浓度。吸取已提纯的 DNA 样品每份 2 μL,用 TE 溶液稀释至 50 μL。先以 TE 作空白对照校零点,再在核酸蛋白质分析仪上测定 OD₂₆₀ 值。DNA 浓度(μg · mL⁻¹)=OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数。2)检测 DNA 纯度。采用紫外分光比色法,依据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值估计 DNA 的纯度。取模板 DNA 原液 4 μL,与 5 μL 超纯水和 1 μL 溴酚蓝混合,1.5%琼脂糖凝胶,在 1 × TAE 缓冲液中(电压 5 V · cm⁻¹)电泳检测 DNA 的降解情况,并用紫

外成相系统进行观察与拍照。

1.2.2 SSR-PCR 反应体系正交实验

根据表 1“嘎啦”苹果愈伤组织的 PCR 反应体系中 Mg²⁺、Taq DNA 聚合酶、引物、dNTP、模板 DNA 因素及水平,设计 5 因素 4 水平正交实验(表 2)。反应体系总体积 25 μL,10 × PCR Buffer(2.5 μL),其余体积用超纯水补充。

反应程序:94 ℃,预变性 2 min;94 ℃变性 1 min,52~60 ℃(依据引物的退火温度)退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,35 个循环;72 ℃后延伸 10 min。扩增产物在 1 × TAE 电泳缓冲液下,用 1.5%琼脂糖凝胶以 5 V · cm⁻¹电压进行分离,电泳后的凝胶用 0.5 μg · mL⁻¹溴化乙锭溶液染色,并在紫外成相系统上拍照进行扩增条带分析。

表 1 SSR-PCR 反应体系的因素及水平
Table 1 Factors and levels of SSR-PCR reaction system

水平 Level	因素 Factor				
	Mg ²⁺	Taq DNA 聚合酶	引物 Primer	模板 DNA	dNTP
	(25 mmol · L ⁻¹)/μL	Taq DNA polymerase(5 U · μL ⁻¹)/μL	(0.01 mmol · L ⁻¹)/μL	Template DNA/ng	(2.5 mmol · L ⁻¹)/μL
1	3	0.10	1	10	0.8
2	4	0.15	2	20	1.6
3	5	0.20	3	30	3.2
4	7	0.25	4	50	4.0

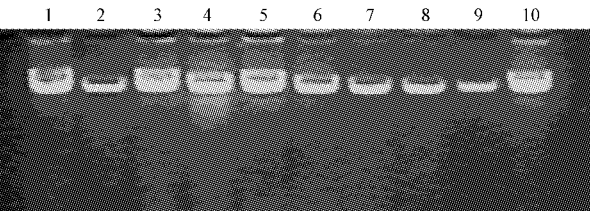
表 2 SSR-PCR L₁₆(4)⁵ 正交实验设计
Table 2 Orthogonal design for SSR-PCR L₁₆(4)⁵

处理 Treatments	Mg ²⁺	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase	引物 Primer	模板 DNA Template DNA	dNTP
1	1	1	4	3	2
2	2	1	1	1	3
3	3	1	3	4	1
4	4	1	2	2	4
5	1	2	3	2	3
6	2	2	2	4	2
7	3	2	4	1	4
8	4	2	1	3	1
9	1	3	1	4	4
10	2	3	4	2	1
11	3	3	2	3	3
12	4	3	3	1	2
13	1	4	2	1	1
14	2	4	3	3	4
15	3	4	1	2	2
16	4	4	4	4	3

2 结果与分析

2.1 愈伤组织 DNA 提取及检测结果

由图 1 电泳结果可知,DNA 条带整齐、明亮,



注:泳道 1~10 表示不同处理的愈伤组织 DNA 电泳检测条带。

Note:Lanes 1—10 represent DNA electrophoresis detection bands of different treatment callus.

图 1 苹果愈伤组织基因组 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 Detection results of apple callus DNA electrophoresis

呈一条带,无弥散现象,加样孔及其附近的杂质含量也很少,表明所提取的 DNA 质量较高。

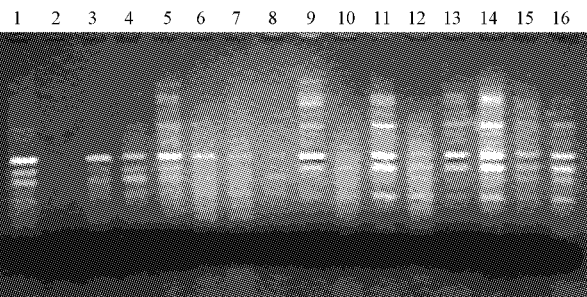
一般 DNA OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0,若蛋白质污染,则比值明显降低;若 DNA 有降解,则比值明显上升。由表 3 可以看出,所提取 DNA 的浓度范围在 $500\sim1\,200\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 范围均在 1.86~2.00,说明该试验中 DNA 的纯度较高,能够满足 PCR 反应的需要。

表 3 苹果愈伤组织 DNA OD 值测定结果
Table 3 Determination results of OD value of apple callus DNA

样号 Sample number	OD_{260}	OD_{260}/OD_{280}	样品浓度 Sample concentration /($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
1	0.954	1.942	1 193.0
2	0.549	1.984	686.3
3	0.673	2.000	841.3
4	0.405	2.000	506.3
5	0.554	2.000	692.5
6	0.694	1.886	867.5
7	0.864	1.970	1 080.0
8	0.904	1.890	1 130.0
9	0.654	1.903	817.5
10	0.804	1.863	1 005.0

2.2 SSR-PCR 反应体系的获得

正交实验 PCR 产物电泳结果如图 2,反应条件 9、11、14 下扩增出的条带主带明亮清晰,数量多,分别为 5、5、6 条,其中反应 14 经重复试验所扩增的条带亮度相当,能稳定存在,而反应 9 和 11 扩增的条带亮度相差大,不能稳定存在,由此初步得到 SSR 合适的 PCR 反应体系(表 4)。



注:1~16 泳道与表 2 样号一致。
Note: Lane 1—16 were the same as sample number in Table 2.
图 2 苹果 SSR-PCR 反应体系正交实验电泳检测结果
Fig. 2 Detection results of apple SSR-PCR reaction system by orthogonal test electrophoresis

表 4 SSR-PCR 反应体系
Table 4 SSR-PCR reaction system

PCR 反应成分 Components in PCR reaction	用量 Dosage/ μL
DNA 模板 Template DNA($30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	1
引物 Primer($0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	3
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	0.25
10× PCR Buffer	2.5
Mg^{2+} ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4
dNTP($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4
超纯水 Ultra-pure water	10.25

为进一步证明初步结论的准确性,对正交实验的各因素及水平进行分析(表 5),其中, K 值代表某因素同一水平下所产生扩增条带的总和; k 值代表某因素同水平下所产生扩增条带的平均值; R 表示某因素的极差,即相同因素不同水平间的均值之差。 R 值的大小反映了某因素对正交实验结果影响的大小, R 值越大,影响越显著。 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA、dNTP 这 5 个因素在 4 个水平内对结果的影响从大到小依次为 *Taq* DNA 聚合酶>dNTP 用量> Mg^{2+} 用量>引物用量=模板 DNA 浓度。 K 值和 k 值反映了因素不同水平对反应体系的影响情况,其值越大,反应水平越好。

表 5 SSR-PCR 正交实验结果
Table 5 Result of SSR-PCR by orthogonal design

项目 Item	Mg^{2+}	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase	引物 Primer	模板 DNA Template DNA	dNTP
K_1	17	8	10	10	8
K_2	9	12	14	13	11
K_3	15	13	15	15	15
K_4	11	19	13	14	18
k_1	4.3	2.0	2.5	2.5	2.0
k_2	2.3	3.0	3.5	3.3	2.8
k_3	3.8	3.3	3.8	3.8	3.8
k_4	2.8	4.8	3.3	3.5	4.5
R	2.0	2.8	1.5	1.5	2.5

Mg^{2+} 用量水平 1 最好,*Taq* DNA 聚合酶水平 4 最好,引物用量水平 3 最好,模板 DNA 水平 3 最好,dNTP 用量水平 4 最好。经验证试验,并综合其它因素的影响,确定这 5 因素的最佳反应体系为 $4\text{ }\mu\text{L}\text{ }25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }\text{Mg}^{2+}$, $0.25\text{ }\mu\text{L}\text{ }5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}\text{ Taq DNA 聚合酶}$, $3\text{ }\mu\text{L}\text{ }0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ SSR 引物}$, $1\text{ }\mu\text{L}\text{ }30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}\text{ 模板 DNA}$, $4\text{ }\mu\text{L}\text{ }2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTP}$,与观察值相一致。

3 结论

SSR 是基于特异引物 PCR 的分子标记技术,凡是影响 PCR 扩增效果的因素,如 Mg^{2+} 、DNA 聚合酶、引物、模板 DNA、dNTP 等的浓度,均能影响 SSR-PCR 体系的建立和优化。正交实验设计优化 PCR 反应条件,克服了单因素试验规模巨大、顾此失彼的缺点^[9],效率更高,稳定性较好^[10],能够全面的找出各因素间的规律,快速获得最优水平组合。

对于 SSR-PCR 扩增反应,DNA 聚合酶是主要影响因素,它的用量直接关系扩增的成功与否;dNTP 浓度的变化主要影响 SSR 条带的亮度; Mg^{2+} 浓度过高,会降低 PCR 扩增的特异性,浓度过低,则影响 PCR 扩增产物产量;引物浓度偏高,易引起错配和产生非特异性扩增,也可增加形成引物二聚体的机会。引物浓度偏低,则与模板的结合位点少,扩增产物产量低;模板 DNA 浓度过高引起扩增条带拖尾甚至无扩增条带,浓度过低影响扩增产物产量。

该试验最终确定苹果愈伤组织 SSR-PCR 体系的最优组合为 25 μ L 反应体系中,25 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} 4 μ L,5 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L,0.01 mmol \cdot L⁻¹ SSR 引物 3 μ L,30 ng \cdot μ L⁻¹ 模板 DNA 1 μ L,2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4 μ L,10 \times

PCR Buffer 2.5 μ L,超纯水 10.25 μ L。可用于后续苹果愈伤组织遗传变异的鉴定研究。

参考文献

- [1] 王爱德,李天忠,许雪峰,等. 苹果品种的 SSR 分析[J]. 园艺学报,2005,32(5):875-877.
- [2] 金万梅,毛海亮,张强,等. 苹果矮化砧木 SH 系的 SSR 标记鉴定[J]. 园艺学报,2010,37(2):303-306.
- [3] 王刚刚,王飞,赵政阳,等. 苹果果实酸/低酸性状的 SSR 标记[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(6):133-137.
- [4] 董研,张军,任亚超,等. 中国新疆野苹果天然群体遗传多样性 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学,2013,14(5):1-7.
- [5] ASHMORE S E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for conservation and use of plant genetic resources[J]. International Plant Genetic Resources Institute Rome,1997,90:307-313.
- [6] ENGELMANN F. *In vitro* conservation methods[M]// CALLOW J A, FORD-LLOYD, B V NEWBURY H J. Biotechnology and plant Genetic Resources. Oxon: CABI,1997:119-161.
- [7] KALIA R K, RAI M K, KALIA S, et al. Microsatellite markers: An over-view of the recent progress in plants[J]. Euphytica,2011,177(3):309-334.
- [8] 陈大明,张上隆,金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报,1997,23(6):621-624.
- [9] 续九如,黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京:中国林业出版社,1998:65-79.
- [10] 杨水云,李续娥,吴明宇,等. 正交实验在 PCR 反应条件优化中的应用[J]. 生物数学学报,2005,20(2):202-206.

Optimization of SSR-PCR Reaction System for Apple Callus

GAO Bing^{1,2}, AN Wenjie¹, SUN Jun^{2,3}

(1. Department of Horticulture, Shanxi Forestry Vocational and Technical College, Taiyuan, Shanxi 030009; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095; 3. College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract: In order to establish the basis of genetic variation research of apple callus, the ‘Gala’ induction of callus was DNA template extraction materials. the Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, primer dosage, template DNA concentration and dNTP which were suitable for concentration or dosage were explored. The results showed that the effect of different levels on reaction system was *Taq* DNA polymerase > dNTP dosage > Mg^{2+} dosage > primer dosage = template DNA concentration. The optimal reaction system of apple callus was established, the optimal reaction system of apple callus was that 25 μ L for total volume, which were 4 μ L 25 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} , 0.25 μ L 5 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA polymerase, 3 μ L 0.01 mmol \cdot L⁻¹ SSR, 1 μ L 30 ng \cdot μ L⁻¹ template DNA, 4 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 10.25 μ L ultra-pure water.

Keywords: apple; callus; SSR-PCR; system optimization