

于晓岳, 杨 华, 邹芳刚, 等. 退火温度、DNA 聚合酶和扩增仪对水稻品种真实性 SSR 分子检测质量的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 57–60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.016

退火温度、DNA 聚合酶和扩增仪对水稻品种真实性 SSR 分子检测质量的影响

于晓岳¹, 杨 华², 邹芳刚², 毛从亚², 许如根¹

(1. 扬州大学, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省种子管理站, 江苏南京 210036)

摘要: SSR 标记法已经被广泛应用到水稻品种真实性的鉴定中, 此方法具有快速、稳定等特点。本研究对比了不同退火温度、DNA 聚合酶以及 PCR 扩增仪等因素对水稻品种真实性 SSR 分子检测方法的影响, 旨在探讨如何根据实验室自身情况选择适合的反应体系和反应条件来顺利地开展检测工作。结果表明, 55 ℃退火温度的 PCR 产物较有利于水稻品种真实性 SSR 标记的检测; 2 种 PCR 仪性能比较一致, 均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测; TaKaRa 及生工 Taq DNA 聚合酶均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测, 天根 Taq DNA 聚合酶不适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测。不同实验室, 应选择以上 3 个适合实验条件进行组合, 以提高水稻品种真实性和纯度分子检测的准确性。

关键词: 水稻; SSR; 品种真实性检测; 退火温度; PCR 扩增仪; DNA 聚合酶

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0057-03

SSR 称为简单重复序列 (simple sequence repeat), 也可以称为微卫星 DNA (microsatellite DNA)。SSR 是由 1~6 个核苷酸为重复序列组成的串联重复序列, 这些简单重复序列随机、均匀, 并且广泛存在于真核生物的基因组上^[1]。分子标记 (molecular markers) 是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映。以这种简单重复序列为基础的标记技术被称为分子标记技术, SSR 分子标记由 Moore 等于 1991 年创立^[2]。由于 SSR 分子标记具有非组织和发育阶段特异性、不易受外界环境影响、多态性高、在基因组中分布广泛、呈共显性遗传等优点, 目前已经被广泛应用在农作物品种的真实性鉴定和纯度鉴定中^[3-6]。2014 年我国农业部修订了 2007 年版本的水稻品种鉴定标准, 发布了行业推荐标准 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程: SSR 标记法》, 因分子标记检测具有快速、稳定等特点, 该技术规程在全国广泛应用; 但是分子检测结果的可靠性和准确性, 与实验条件和实验操作人员的实验技能有一定的关系, 为提高江苏水稻品种真实性和纯度鉴定结果的准确性, 本研究对江苏省种子管理站种子质量检验室现有的实验条件进行了组合比较, 拟筛选较适合江苏水稻品种真实性和纯度鉴定的实验条件, 在江苏范围内推广应用。

1 材料与方法

1.1 材料

以水稻品种淮稻 5 号和连粳 7 号为试验材料。

收稿日期: 2015-06-06

基金项目: 2015 年江苏省农作物种子安全监管项目; 江苏省扬州市农业前瞻性研究项目 (编号: YZ2014168)。

作者简介: 于晓岳 (1990—), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向为种子科学与技术。E-mail: xiaoyueyu1990@163.com。

通信作者: 许如根, 教授, 博士生导师, 主要从事大麦遗传育种及种子科学与技术研究。E-mail: rgxu@yzu.edu.cn。

1.2 引物

选取 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程: SSR 标记法》(2014 年 6 月 1 日实施) 中 12 对 SSR 引物, 引物名称及序列详见表 1, 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.3 试剂

(1) DNA 提取: 选用 OMEGA 公司生产的植物基因组 DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A. TM Plant DNA Kit D3485-01) 提取 2 个品种的 DNA。

(2) Taq DNA 聚合酶: 选用 TaKaRa 公司、天根生物科技 (北京) 有限公司及生工生物工程 (上海) 股份有限公司的 Taq DNA 聚合酶。

1.4 主要仪器

使用赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 的 NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 检测提取的 DNA 模板的浓度和质量; 分别用 BIO-RAD 公司生产的 My cycler 和 Agilent Technologies 公司生产的 Sure Cycler 8800 扩增仪进行 PCR 扩增; 采用美国 Bio-rad 伯乐 GelDoc XR System 凝胶成像系统对银染后的聚丙烯酰胺凝胶拍照。

1.5 DNA 模板准备

用试剂盒提取完 DNA 后, 用超微量分光光度计检测 2 个品种的 DNA 模板浓度, 将其分别稀释到相同浓度使用。

1.6 实验条件设计

本实验采用 50 ℃、55 ℃及 60 ℃3 个退火温度和 3 种不同来源的 Taq DNA 聚合酶在 2 种 PCR 扩增仪上对 2 个品种的 DNA 模板 PCR 扩增, 为便于标记图片和分析结果, 分别对实验条件进行编号 (表 2), 并按照表 3 的实验条件组合进行。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板质量检测与稀释

用 DNA 提取试剂盒提取的 DNA 模板, 微量分光光度计检测后结果见表 4。 $D_{280\text{ nm}}$ 是蛋白和酚类物质最高吸收峰的

表 1 12 对 SSR 引物名称与序列

序号	引物名称	引物序列(5'→3')
1	RM274	正向:CCTCGCTTATGAGAGCTTCG;反向:CTTCTCCATCACTCCCATGG
2	RM336	正向:CTTACAGAGAACGGCATCG;反向:GCTGCTTGTGTTTCAGGTTCC
3	RM219	正向:CGTCGGATGATGTAAAGCCT;反向:CATATCGGCATTCGGCTCG
4	RM208	正向:TCTGCAGCCTTGTCTGATG;反向:TAAGTCGATCATTTGTGTGGACC
5	RM232	正向:CCGGTATCCTTCGATATTGC;反向:CCGACTTTTCCTCCTGACG
6	RM278	正向:GTACTGAGCCTAACAATAATC;反向:TCAACTCAGCATCTCTGTCC
7	RM493	正向:TAGCTCCAACAGGATCGACC;反向:GTACGTAAACGCGGAAGGTG
8	RM551	正向:AGCCCAGACTAGCATGATTG;反向:GAAGCGGAGAAGGATCACAG
9	OSR28	正向:AGCAGCTATAGCTTAGCTGG;反向:ACTGCACATGAGCAGAGACA
10	RM567	正向:ATCAGGGAATCCTGAAGGG;反向:GGAAGGAGCAATCACCCTG
11	RM289	正向:TTCCATGGCACACAAGCC;反向:CTGTGCACGAACCTCCAAG
12	RM267	正向:TGCAGACATAAGAGAAGGAAGTG;反向:AGCAACAGCACAACTTGATG

表 2 实验条件及编号

序号	实验条件	编号
1	50 ℃	I
2	55 ℃	II
3	60 ℃	III
4	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(TaKaRa)	a
5	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(天根)	b
6	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(生工)	c
7	PCR 扩增仪 1(My cycler)	A
8	PCR 扩增仪 2(Sure Cycler 8800)	B

表 3 实验条件组合类型及代号

组合 编号	实验条件								组合 代号
	I	II	III	a	b	c	A	B	
1	+			+			+		I aA
2	+			+				+	I aB
3	+				+		+		I bA
4	+				+			+	I bB
5	+					+	+		I cA
6	+					+		+	I cB
7		+		+			+		II aA
8		+		+				+	II aB
9		+			+		+		II bA
10		+			+			+	II bB
11		+				+	+		II cA
12		+				+		+	II cB
13			+	+			+		III aA
14			+	+				+	III aB
15			+		+		+		III bA
16			+		+			+	III bB
17			+			+	+		III cA
18			+			+		+	III cB

注: + 代表组合采用此处理方法。

吸收波长, $D_{260\text{ nm}}$ 是核酸最高吸收峰的吸收波长, $D_{230\text{ nm}}$ 是碳水化合物最高吸收峰的吸收波长。纯 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.8,纯 DNA 和 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 比值为 2.5。检测结果表明,所提取 DNA 模版质量较高,蛋白质、RNA、多糖和酚类等杂质基本去除,能够满足进行 SSR 分子标记分析的质量要求(表 4)。根据每个样品的原始 DNA 浓度,稀释至 50 ng/ μL 备用。

2.2 退火温度对品种真实性 SSR 标记扩增产物质量的影响

18 个实验条件组合中有 6 组组合可比较 3 种不同温度下品种真实性 SSR 标记 PCR 产物的质量。分别为 I aA、II aA、III aA, I aB、II aB、III aB, I bA、II bA、III bA, I bB、II bB、

表 4 DNA 模板检测结果

品种名称	浓度 (ng/ μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$
淮稻 5 号	80.4	1.82	2.48
连梗 7 号	81.5	1.84	2.51

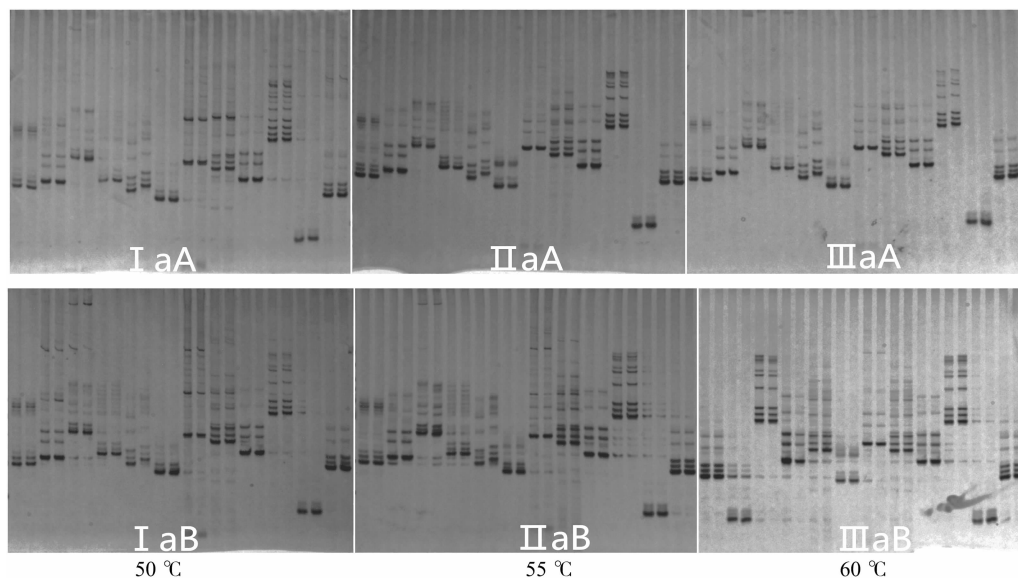
III bB, I cA、II cA、III cA, I cB、II cB、III cB。以 I aA、II aA、III aA, I aB、II aB、III aB 等 2 组组合电泳图谱(图 1)为例,对 PCR 产物电泳谱带的清晰度比较可知,50 ℃退火温度非特异性产物较多,电泳谱带弥散背景较多;55 ℃退火温度,扩增特异性目标条带清晰,电泳谱带背景干净,便于后续的比较分析;60 ℃退火温度扩增特异性目标条带不及 55 ℃退火温度扩增特异性目标条带清晰,且其他 5 组组合中也是如此,因此,以 55 ℃退火温度的 PCR 产物较有利于水稻品种真实性 SSR 标记的检测。

2.2 不同扩增仪对品种真实性 SSR 标记 PCR 产物质量的影响

18 个实验条件组合中有 9 组组合可比较 2 种不同品牌扩增仪的 PCR 产物的质量,分别为 I aA、I aB, I bA、I bB, I cA、I cB, II aA、II aB, II bA、II bB, II cA、II cB, III aA、III aB, III bA、III bB, III cA、III cB。以其中 2 组组合 III bA、III bB 和 III cA、III cB 电泳图谱(图 2)为例,结果表明无论是条带特性高低与否、背景清晰与否,仪器对结果的影响并不明显,其他几个组合的结果亦如此,本实验表明 2 种 PCR 仪性能比较一致,均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测。

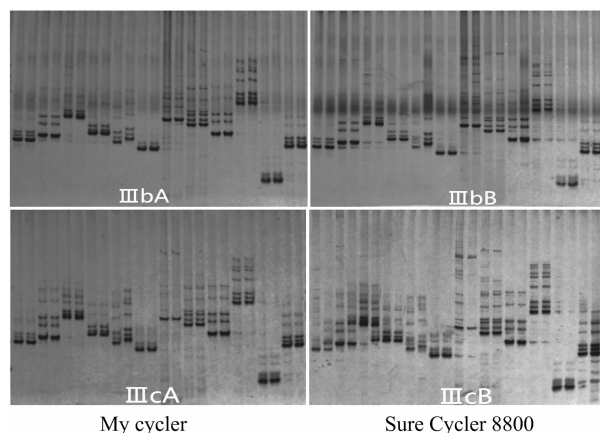
2.3 不同品牌的 *Taq* DNA 聚合酶对品种真实性 SSR 标记方法检测结果的影响

18 个实验条件组合中有 6 组组合可比较 3 种不同品牌的聚合酶扩增后的结果,分别为 I aA、I bA、I cA, II aA、II bA、II cA, III aA、III bA、III cA, I aB、I bB、I cB, II aB、II bB、II cB, III aB、III bB、III cB。以 I aA、I bA、I cA 和 I aB、I bB、I cB 电泳图谱(图 3)为例,TaKaRa 及生工 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 产物电泳谱带特异性高,目标条带清楚、杂带少、背景清晰,便于后期的成像分析;天根 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 产物电泳谱带特异性尚可、目标条带较清楚,但杂带多、背景不清晰。其他几个组合的结果亦如此,本实验结果表明 TaKaRa 及生工 *Taq* DNA 聚合酶均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测,天根 *Taq* DNA 聚合酶不适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测。



24 个泳道依次为 12 对 NY/T 1433—2014 水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记对准稻 5 号和连梗 7 号的扩增产物

图1 温度对 PCR 产物质量的影响



My cyclor

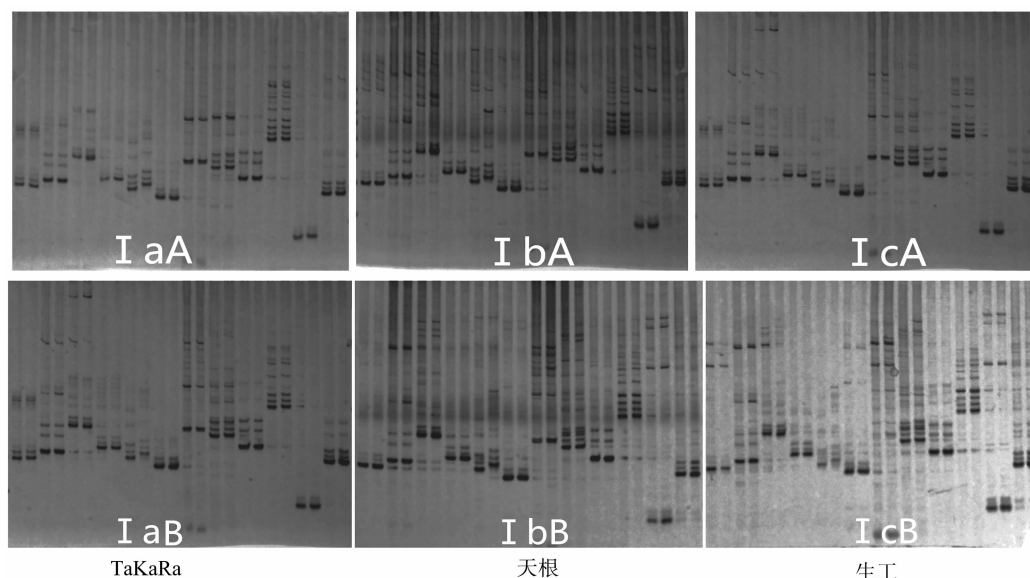
Sure Cyclor 8800

图2 不同 PCR 扩增仪对电泳结果的影响

3 小结与讨论

在利用分子标记法鉴定品种真实性的方法中,一个重要环节是 PCR 的扩增,只有扩增出特异性高、杂质少的扩增产物,才能在后续聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色后得到条带清晰、背景干净的指纹图谱,方便后续的读图、分析和鉴定。而影响 PCR 反映的条件主要分为 2 个方面:一是 PCR 体系和反应环境。本研究中主要对这 2 种影响因素中的 *Taq* DNA 聚合酶、退火温度以及不同公司的仪器进行了比较分析,结果表明,55 °C 退火温度的 PCR 产物较有利于水稻品种真实性 SSR 标记的检测;2 种 PCR 仪性能比较一致,均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测;TaKaRa 及生工 *Taq* DNA 聚合酶均适合水稻品种真实性 SSR 标记的检测。

综上所述,如果准备开展 SSR 标记法对水稻品种真实性



TaKaRa

天根

生工

图3 不同品牌 *Taq* DNA 聚合酶的电泳图谱

肖林霞,卢其能,李润根. 光质、光强和外植体对虎杖愈伤组织增殖及白藜芦醇积累的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):60-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.017

光质、光强和外植体对虎杖愈伤组织增殖及白藜芦醇积累的影响

肖林霞,卢其能,李润根

(宜春学院生命科学与资源环境学院,江西宜春 336000)

摘要:研究了光质、光强、外植体来源对虎杖愈伤组织增殖及其白藜芦醇积累的影响。结果表明,绿光和黄光有利于虎杖愈伤组织增殖,蓝光最适合于愈伤组织中白藜芦醇的积累;长期培养条件下,弱光和中强光比强光更利于白藜芦醇的积累;以茎段作为外植体,虎杖愈伤组织的增殖速度和白藜芦醇含量都明显高于叶片和叶柄。

关键词:虎杖;愈伤组织;白藜芦醇;光质;光强;外植体

中图分类号: S567.23⁺9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0060-04

白藜芦醇(resveratrol)是一种具有多种生物活性的非黄酮类多酚化合物,是植物受到外界刺激而产生的一种植物抗毒素,主要存在于虎杖、葡萄、花生等植物中,且在虎杖根茎中含量最高。白藜芦醇不仅能提高植物的抗病性,还具有多种有益于人类健康的药理作用,主要包括抗氧化、抗肿瘤、抗炎抗菌、抗衰老、预防心血管疾病、雌激素作用、保护肝脏等^[1-2]。因此,白藜芦醇不仅能用于医药和保健品市场,还能用于化妆品市场,需求量大。目前,白藜芦醇的主要来源依然是从天然植物中提取,为了防止植物资源被过度采挖,已有较

多的利用生物技术(如组织培养、生物转化和转基因等技术)来生产白藜芦醇的研究。但光质、光强、外植体对虎杖愈伤组织生长及其白藜芦醇含量的影响还鲜有报道。因此,本试验研究了LED光质、光强、外植体来源对虎杖愈伤组织增殖及其白藜芦醇含量的影响,旨在获得适合虎杖愈伤组织白藜芦醇积累的光照条件和外植体来源,为将来利用组织培养技术大规模生产白藜芦醇提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

虎杖采自江西省吉安市新干县。

1.2 方法

1.2.1 虎杖愈伤组织的诱导 取虎杖的幼嫩茎段,消毒后接至快繁培养基中,获得无菌小苗后将其接至生根培养基中,获得虎杖幼苗。按曹庸等诱导虎杖愈伤组织的方法^[3],略作改动进行愈伤组织诱导。将无菌幼苗的叶片剪成适当大小,叶柄和

收稿日期:2015-09-30

基金项目:江西省天然药物活性成分研究重点实验室开放基金(编号:JXKLF20102016)。

作者简介:肖林霞(1990—),女,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事生物制药研究。E-mail: xiaolinxia@126.com。

通信作者:卢其能,博士,教授,主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: lqn216@tom.com。

进行鉴定,应根据所在实验室的具体情况对PCR的反应体系和反应环境等进行相应的预实验和对比,根据实验室的仪器设备和资金预算等多个方面,选择适合的条件以满足真实性室内分子检测工作开展的需要,保证鉴定结果的准确性。当然,SSR标记法也有着一些局限性,随着生物技术的飞速发展,新技术、新方法也将运用到品种真实性检测中,例如毛细管电泳法、荧光标记法、SNP分子标记法、芯片技术乃至二代、三代测序技术等^[7-8]。但无论哪种新型技术,由于分子方法的结果有不可预见性,在检验室开展和应用一项技术前,都应该根据实验室的具体情况开展一系列的摸索和对比试验,只有这样才能保证实验室检测结果的稳定性、重复性、准确性,真正为农业主管部门、执法部门提供最快速、最有利的技术支撑,在种子市场净化乃至整个种业发展中发挥巨大的作用。

参考文献:

[1] 罗兵,孙海燕,徐港明,等. SSR分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学,2013,41(12):5210-5212,5246.

[2] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. Genomics, 1991, 10(3): 654-660.

[3] 周会,苏秀,毛双林,等. 杂交水稻品种真实性和纯度的SSR分子标记鉴定[J]. 种子世界,2014(3):34-35.

[4] 张冰清,陆徐忠,吴新杰,等. 利用SSR标记进行杂交油菜品种鉴定[J]. 中国油料作物学报,2014,36(6):728-734.

[5] 王飞. SSR分子标记在棉种真实性和纯度中的应用研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

[6] 郭奕生,何德银. SSR分子标记在玉米品种真实性鉴定上的应用[J]. 广东农业科学,2014,41(12):12-15.

[7] 许鲲,李锋,吴金锋,等. SSR荧光标记毛细管电泳法与国家冬油菜区试指纹鉴定平台的构建[J]. 中国油料作物学报,2014,36(2):150-159.

[8] 李雪,田红丽,王风格,等. SSR和SNP两种标记技术在玉米品种真实性鉴定中的比较分析[J]. 分子植物育种,2014,12(5):1000-1004.