

熊 健, 屈 燕, 冷秋思, 等. 绿绒蒿 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 60-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.013

绿绒蒿 SSR-PCR 反应体系的建立与优化

熊 健, 屈 燕, 冷秋思, 赵琬玥

(西南林业大学园林植物与观赏园艺省高校重点实验室/西南林业大学园林学院, 云南昆明 650224)

摘要:为建立适合绿绒蒿属 (*Meconopsis* Vig.) 的 SSR 反应体系, 以多刺绿绒蒿 (*M. horridula*) 为试材, 应用 $L_{25}(5^6)$ 进行正交试验, 对影响 SSR-PCR 的主要因素进行优化。结果发现, Mg^{2+} 对 PCR 反应效果影响最大, 而 dNTPs 的影响最小。5 个因素水平的变化对绿绒蒿属 SSR-PCR 反应体系的影响从大到小依次为 $Mg^{2+} > Taq$ 酶含量 $>$ 引物浓度 $>$ DNA 模板量 $>$ dNTPs 浓度。适宜绿绒蒿属的 SSR 反应体系: 总体积 25 μ L, Mg^{2+} 浓度 2 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L, 引物浓度 0.5 μ mol/L, DNA 模板量 60 ng, *Taq* 聚合酶量 1.6 U, 其余用 ddH₂O 补充。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 1.5 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 最适退火温度 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。利用优化后的反应体系对同属另外 8 种绿绒蒿 (*M. wallichii*, *M. racemosa*, *M. lingholm*, *M. prattii*, *M. rudis*, *M. napaulensis* Pinky, *M. paniculata*, *M. superba*) 进行 PCR 扩增, 均获得优良的扩增产物。因此, 该试验建立的反应体系适用于绿绒蒿属植物的 SSR-PCR 反应。

关键词:绿绒蒿; SSR; PCR 体系优化

中图分类号: Q949.95 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0060-04

绿绒蒿是罂粟科 (Papaveraceae) 绿绒蒿属 (*Meconopsis*) 植物的总称, 有“高山牡丹”之称。绿绒蒿是一年或多年生草本, 花大而美丽, 颜色丰富, 有蓝色、紫色、红色、黄色、稀白色。全世界共有 49 种, 1 种产自西欧, 其余 48 种均分布于东亚的喜马拉雅地区, 但最原始种恰在华中^[1]。我国有 38 种, 集中分布于西南部。绿绒蒿不仅花色艳丽, 具有很高的观赏价值, 是著名的观赏植物, 同时还是传统藏医药用植物, 有清热解毒、利尿、消炎、止痛等功效^[2]。作为潜力巨大的药用观赏植物, 目前绿绒蒿属大多数物种已处于濒危状态。

简单重复序列 (simple sequence repeats, 简称 SSR) 又称

微卫星 DNA, 是以 1~6 个碱基为基本单元的串联重复序列。SSR 分子标记具有多态性丰富、高信息量、共显性、检测方便等优点。SSR 分子标记是目前最为常用的微卫星标记之一^[3]。目前, 在国内尚未有关于绿绒蒿属植物 SSR-PCR 反应体系的研究成果。本研究以多刺绿绒蒿为试材, 通过正交设计试验对 SSR-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、DNA 模板量、*Taq* 聚合酶量等 5 个主要因素进行探索优化, 筛选出各因素的最适量, 建立和优化绿绒蒿 SSR-PCR 的反应体系, 为绿绒蒿属的遗传多样性研究提供技术支持和参考^[4]。

1 材料与方法

所有试验均于 2017 年 12 月 20 日至 25 日在西南林业大学园林学院实验室完成。

1.1 材料

试验以多刺绿绒蒿 (*M. horridula*) 为试材及 SSR 引物 P23 进行反应体系的正交设计试验, 建立和优化反应体系, 并选取 *M. wallichii*, *M. racemosa*, *M. lingholm*, *M. prattii*, *M. rudis*, *M. napaulensis* Pinky, *M. paniculata*, *M. superba* 等 8 种

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460218); 云南省高校重点建设学科 (风景园林学) 建设项目; 云南省农业基础研究联合专项 [编号: 2017FG001(-68)]; 国家级质量工程园林专业综合改革试点项目 (编号: 50126002)。

作者简介: 熊 健 (1993—), 男, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事风景园林植物应用方向的研究。E-mail: xiongjian205@163.com。

通信作者: 屈 燕, 博士, 副教授, 主要从事园林植物及中草药植物资源保护与开发利用研究。E-mail: flyersw@163.com。

[12] Wang Z I, Li P H, Fredricksen M, et al. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance[J]. Plant Science, 2004, 166(3): 609-616.

[13] Takanashi K, Shitan N, Sugiyama A, et al. Galactinol synthase gene of *Coptis japonica* is involved in berberin tolerance[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(2): 398-405.

[14] 汤正辉, 陈维伦, 石 雷, 等. 刺齿报春苔苔苔的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 211.

[15] Bariola P A, Howard C J, Taylor C B, et al. The *Arabidopsis thaliana* ribonuclease gene *RNAI* is tightly controlled in response to phosphate limitation[J]. The Plant Journal, 1994, 6(5): 673-685.

[16] 杜玉杰. 构建分子系统树的简易方法[J]. 生物学通报, 2013, 48(4): 4-6.

[17] Wang Z, Zhu Y, Wang L L, et al. A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* binding to the W-box elements of the galactinol synthase (*BhGolSI*) promoter[J]. Planta, 2009, 230(6): 1155-1166.

[18] Panikulangara T J, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, et al. Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2004, 136(2): 3148-3158.

绿绒蒿 DNA 以及 SSR 引物 P2、P10、P29 进行反应体系的验证。试验中所用到的 SSR 引物由笔者所在课题组通过转录组数据开发,并由昆明硕擎生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物序列

引物名称	序列(5'→3')
P2 - R	GGGCATCATCATATGAGGTCTAA
P2 - F	TGTAACACGACGGCCAGTATGTATCCACCTCCTCTTCTCTAA
P10 - R	CAAATAAGGAATCAAAGACCACG
P10 - F	GTAAACGACGGCCAGTACCAAAGAAGAATGGG
P23 - R	CCGACAATGAAATGTAAACCAT
P23 - F	TGTAACACGACGGCCAGTATGTCTCTGGAGTAATGGGTGTG
P29 - R	CACAACCCAACTAGAAAAGACCAC
P29 - F	TGTAACACGACGGCCAGTGGTTTCTGCCTCTTTGCTTCAGTA

1.2 生物试剂

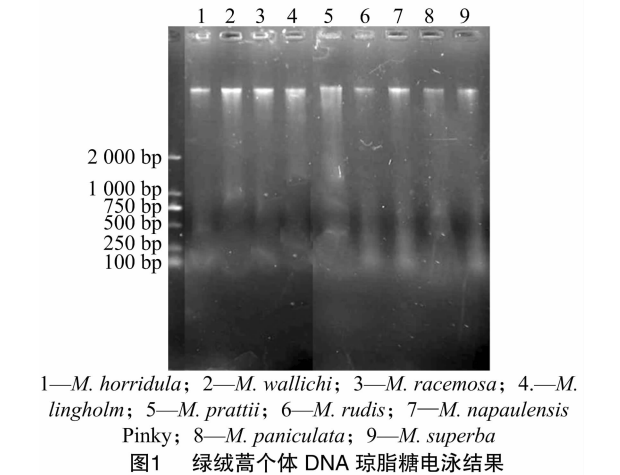
SSR - PCR 反应体系中的 10 × PCR Buffer(含 Mg^{2+})、dNTPs、*Taq* 聚合酶、DNA maker、Loading Buffer 购自绿诚生物技术有限公司。

1.3 基因组 DNA 的提取与检测

利用试剂盒法提取 9 种样品(表 2)试验所需绿绒蒿 DNA,通过微量分光光度计测定 DNA 的纯度和纯度,筛选出 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8 ~ 2.0 之间的优质 DNA,然后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 质量进行检测,选出各样品中质量最佳的 DNA 各 1 份,稀释至 20 ng/μL,置于 - 70 °C 保存备用(图 1)。

表 2 试验样品来源

编号	拉丁名	来源	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
1	<i>M. horridula</i>	西藏错那	1.98
2	<i>M. pratti</i>	实验室培育的实生苗	1.88
3	<i>M. napaulensis</i> Pinky	实验室培育的实生苗	1.97
4	<i>M. pegia</i>	实验室培育的实生苗	1.91
5	<i>M. rudis</i>	实验室培育的实生苗	1.85
6	<i>M. paniculata</i>	实验室培育的实生苗	1.95
7	<i>M. lingholm</i>	实验室培育的实生苗	1.90
8	<i>M. racemosa</i>	实验室培育的实生苗	1.86
9	<i>M. superba</i>	实验室培育的实生苗	1.88



1.4 SSR - PCR 反应体系的正交试验设计

以 *M. horridula* 为试材,利用引物 P23 进行正交试验。

优化 SSR - PCR 的正交试验以 $L_{25}(5^6)$ 正交表进行设计,以 5 因素(Mg^{2+} 、dNTPs、引物浓度、DNA 模板量、*Taq* 聚合酶量)的 5 个水平进行正交试验,共 25 个组合(表 3)。PCR 扩增体系为 25 μL 体系,除了添加表 3 内的各种反应液外,需添加 ddH₂O 进行补充。试验进行 2 次重复。

表 3 绿绒蒿 SSR - PCR 反应体系的正交试验设计 $L_{25}(5^6)$

编号	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	引物浓度 (μmol/L)	DNA 模板 (ng)	<i>Taq</i> 酶含量(U)
1	0.5	0.1	0.1	20	0.4
2	0.5	0.2	0.2	40	0.8
3	0.5	0.3	0.3	60	1.2
4	0.5	0.4	0.4	80	1.6
5	0.5	0.5	0.5	100	2.0
6	1.0	0.2	0.1	100	1.6
7	1.0	0.3	0.2	80	2.0
8	1.0	0.4	0.3	60	0.4
9	1.0	0.5	0.4	40	0.8
10	1.0	0.1	0.5	20	1.2
11	1.5	0.3	0.1	80	0.8
12	1.5	0.4	0.2	100	1.2
13	1.5	0.5	0.3	20	1.6
14	1.5	0.1	0.4	40	2.0
15	1.5	0.2	0.5	60	0.4
16	2.0	0.4	0.1	60	2.0
17	2.0	0.5	0.2	80	0.4
18	2.0	0.1	0.3	100	1.6
19	2.0	0.2	0.4	20	0.8
20	2.0	0.3	0.5	40	1.2
21	2.5	0.5	0.1	40	0.8
22	2.5	0.1	0.2	60	1.2
23	2.5	0.2	0.3	80	1.6
24	2.5	0.3	0.4	100	2.0
25	2.5	0.4	0.5	20	0.4

1.5 PCR 扩增与检测

PCR 反应在 BIOMETRA TProfessional standard 梯度 PCR 仪上进行。反应体系为 25 μL 体系。反应组合共 25 个,在退火温度设置为 60 °C 下进行 1 次 PCR 扩增并进行琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 反应程序见表 4。

表 4 PCR 反应程序

反应循环数(个)	反应温度(°C)	时间
35	94	1.5 min
35	94	20 s
35	60	20 s
35	72	1 min
35	72	5 min
35	4	

扩增产物取 2 μL 加入 4 μL Loading Buffer,通过 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶通过 BioSpectrum AC Chemi HR 410 凝胶成像仪进行成像观察并保存胶图。

1.6 统计与数据分析

参照何正文等的方法^[5],根据扩增条带的清晰度、弥散程度以及特异性对每个条带进行独立评分,最高记 10 分(条带清晰,弥散程度弱,特异性高),最低记 1 分。利用 SPSS 17.0 软件对 2 次重复试验的评分值总数进行方差分析。

1.7 最佳 SSR-PCR 反应体系的验证

通过优化的绿绒蒿 SSR-PCR 反应体系利用 3 对引物 (P2、P10、P29) 对 8 种绿绒蒿 DNA 进行 PCR 扩增,产物通过 1% 琼脂糖电泳进行检测,验证该反应体系的稳定性和通用性。

2 结果与分析

2.1 正交试验整体分析

根据直观观察法对琼脂糖电泳胶图进行评分,25 组试验 2 个重复共 50 次评分结果分别是 2、1、3、4、7、6、3、5、4、5、3、6、7、2、8、4、3、7、6、9、2、3、5、2、2、2、2、4、4、6、5、2、6、4、5、3、5、7、2、9、5、3、7、5、9、1、4、5、1、2 分。利用 SPSS 17.0 软件对评分结果进行方差分析,分析结果表明, Mg^{2+} 对 PCR 反应效果影响最大,而 dNTPs 的影响最小。5 个因素水平的变化对绿绒蒿属 SSR-PCR 反应体系的影响从大到小依次是 Mg^{2+} 浓度 > *Taq* 酶含量 > 引物浓度 > DNA 模板量 > dNTPs 浓度 (表 5)。

表 5 绿绒蒿属 SSR-PCR 反应体系方差分析

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F 值
校正模型	412.943 ^a	20	20.647	2.039
Mg^{2+} 浓度	129.477	4	32.369	3.197
dNTPs 浓度	9.205	4	2.301	0.227
引物浓度	59.269	4	14.817	1.464
DNA 模板量	40.930	4	10.232	1.011
<i>Taq</i> 含量	66.925	4	16.731	1.653
误差	40.497	4	10.124	
总计	2 337.000	25		

注: $R^2=0.911$ (调整 $R^2=0.464$)。

2.2 各因素正交试验分析

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响 研究发现, Mg^{2+} 浓度在 0.5~2.0 mmol/L 的区间中随着浓度的升高,扩

增效果变化呈现缓慢增长的趋势;在 2.0 mmol/L 处达到 1 个最高点;从 2.0 mmol/L 到 2.5 mmol/L 反应效果出现骤降 (图 2)。

2.2.2 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响 研究发现,当 dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L 时所得反应产物质量相对最高。dNTPs 在整个过程中可以与 Mg^{2+} 结合,当 dNTPs 的浓度较大时,dNTPs 大量与 Mg^{2+} 结合,降低了 Mg^{2+} 的浓度,降低了 *Taq* 酶的活性^[6] (图 3)。

2.2.3 引物浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响 研究发现,引物浓度对 PCR 扩增的影响呈折线状,但整体为上升趋势。引物的浓度决定了 PCR 反应产物产量的上限,但如果引物浓度过高又会降低产物特异性^[7]。从整体正交试验的评分和胶图上可以看出,引物浓度为 0.3、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时反应效果都在相当高的水平上,而 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 效果最好 (图 4)。

2.2.4 DNA 模板量对 SSR-PCR 反应体系的影响 研究发现,DNA 模板量作为目的基因的来源,其总量影响 PCR 反应的效率^[8]。60 ng 与 100 ng 模板量最后的试验结果差距较小 (图 5)。

2.2.5 *Taq* 聚合酶对 SSR-PCR 反应体系的影响 *Taq* 聚合酶在整个反应中起到催化作用。其用量过少会直接影响产量,但如果用量过多又会降低产物的特异性^[9]。本研究发现,*Taq* 聚合酶对 PCR 反应产物的效果先降后增再降,从 0.4 U 到 0.8 U 时反应效果下降,从 0.8 U 到 1.6 U 时整体效果呈上升趋势,而从 1.6 U 增加到 2.0 U 时,整体反应效果则开始呈现下降趋势 (图 6)。

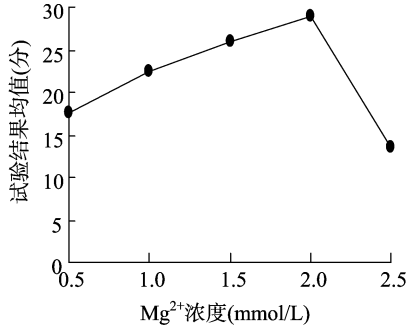


图2 Mg^{2+} 浓度与试验结果均值的关系

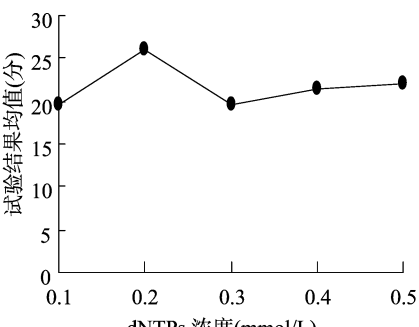


图3 dNTPs 浓度与试验结果均值的关系

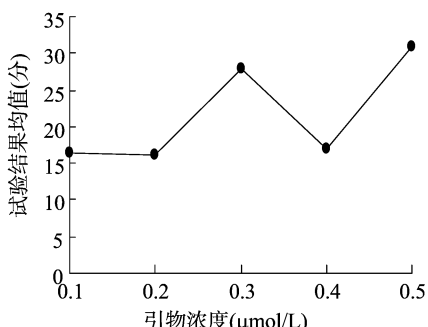


图4 引物浓度与试验结果均值的关系

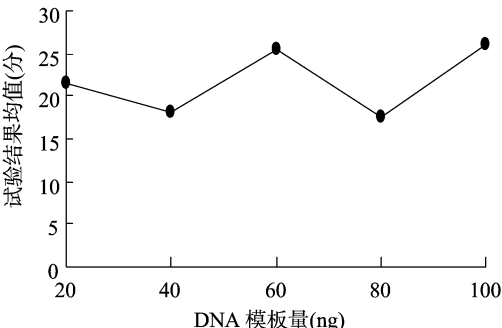


图5 DNA 模板量与试验结果均值的关系

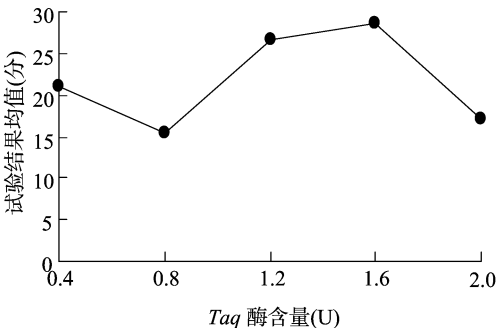
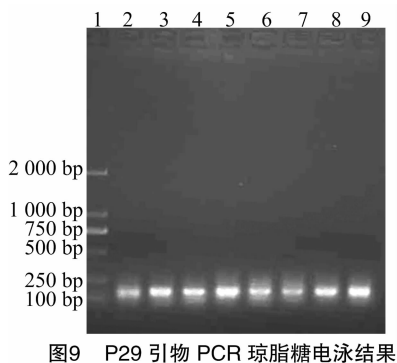
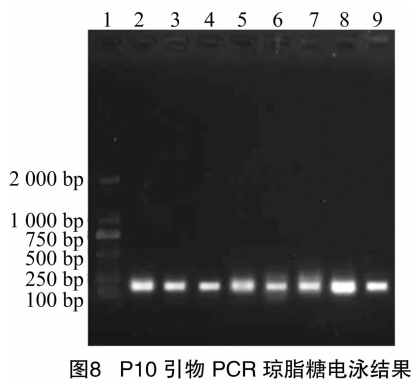
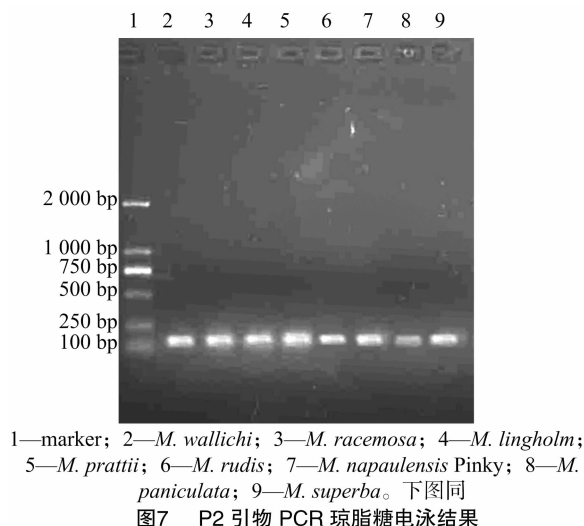


图6 *Taq* 酶含量与试验结果均值的关系

2.3 SSR 反应体系的验证

采用优化后的 25 μL SSR 反应体系: Mg^{2+} 浓度 2 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L, 引物浓度 0.5 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板量 60 ng, *Taq* 聚合酶量 1.6 U, 其余用 ddH_2O 进行补充。利用 3 对不同的 SSR 引物, 对 8 个绿绒蒿属不同种植物进行 PCR 扩增, 并用 1% 琼脂糖电泳进行验证, 结果发现, 扩增产物条带均较为清晰, 主带比较明显, 表明此反应体系及扩增程序稳定性较高, 适合用于绿绒蒿属植物的 SSR 扩增反应(图 7 至图 9)。



3 讨论与总结

聚合酶链式反应是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术。敏感度高、特异性强、产率高、重复性好

以及快速简便等优点让其被广泛应用于多个领域, 它的出现大大简化了传统分子克隆技术^[10]。对绿绒蒿属植物的 PCR 反应体系进行建立和优化, 有利于绿绒蒿植物分子层面的研究, 可为其遗传多样性研究提供技术支持和参考。

SSR 检测过程中的一个重要环节就是 PCR 反应, 建立稳定的 PCR 反应体系和扩增程序是 SSR 分析的必要前提^[11]。而 SSR 的反应受到多个因素的影响^[12], 每个因素的不同水平都可能对扩增的敏感性、特异性和产量造成不同的影响^[13-14]。

本试验通过正交设计试验对绿绒蒿属的 SSR-PCR 反应体系进行优化和探索, 结果发现 Mg^{2+} 对 PCR 反应效果影响最大, 而 dNTPs 的影响最小。5 个因素水平的变化对绿绒蒿属 SSR-PCR 反应体系的影响从大到小依次是 Mg^{2+} > *Taq* 酶含量 > 引物浓度 > DNA 模板量 > dNTPs 浓度。最终建立的适合绿绒蒿属植物的 SSR-PCR 反应体系: 总体积 25 μL , Mg^{2+} 浓度 2 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L, 引物浓度 0.5 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板量 60 ng, *Taq* 聚合酶量 1.6 U, 其余用 ddH_2O 进行补充。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 最适退火温度 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 7.
- [2] 屈燕, 区智. 绿绒蒿属植物国内外研究进展[J]. 北方园艺, 2012(2): 191-194.
- [3] 徐阳, 陈金慧, 王颖, 等. 杉木 SSR-PCR 体系优化[J]. 林业科技开发, 2014, 28(1): 15-20.
- [4] 李银霞, 李天红. 桃 SSR 反应体系的优化[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(6): 57-61.
- [5] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 76-77.
- [6] 吴爱军, 王红, 俞守义. 在多基因 PCR 中对 dNTP 与 Mg^{2+} 的浓度关系的研究[J]. 中国公共卫生, 2001(2): 17-18.
- [7] 周静, 陈书霞, 程智慧, 等. 大蒜 SSR 体系的建立与优化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 117-122.
- [8] 徐阳, 陈金慧, 王颖, 等. 杉木 SSR-PCR 体系优化[J]. 林业科技开发, 2014, 28(1): 15-20.
- [9] 李雪, 韩熹, 梁琼麟, 等. *Taq* 酶对 PCR 定量检测结果的影响[J]. 生命科学仪器, 2006(5): 34-36.
- [10] 丁海麦, 白羽, 石松利. 濒危植物蒙古扁桃 ISSR 反应体系优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 32-34.
- [11] 周静, 陈书霞, 程智慧, 等. 大蒜 SSR 体系的建立与优化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 117-122.
- [12] 唐健民, 陈宗游, 韦霄, 等. 东兴金花茶 SSR-PCR 反应体系的优化及引物筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 398-404.
- [13] 赵雅楠, 王颖, 张东杰, 等. 小豆 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 33-37.
- [14] 贾新平, 孙晓波, 梁丽建, 等. 绣球 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 华北农学报, 2016, 31(4): 68-73.