

王 萍,母洪娜,耿兴敏,等. 利用正交试验设计优化桂花的 SSR-PCR 体系[J]. 江苏农业科学,2017,45(2):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.011

利用正交试验设计优化桂花的 SSR-PCR 体系

王 萍,母洪娜,耿兴敏,杨秀莲,王良桂
(南京林业大学风景园林学院,江苏南京 210037)

摘要:以潢川金桂 DNA 为 SSR-PCR 扩增模板,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计对 *Taq* 酶用量、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度以及引物浓度在 4 个水平上进行了优化,建立了桂花 SSR-PCR 反应的最佳体系,即在 10 μ L 反应体系中,不同成分的最佳含量为 *Taq* 酶 0.2 U、 Mg^{2+} 3.0 mmol/L、模板 DNA 40 ng、dNTPs 0.60 mmol/L、引物 0.8 μ mol/L。应用最佳体系对引物 Ofp50 进行退火温度的优化,得到最适退火温度范围为 60~62 $^{\circ}$ C。

关键词:桂花;SSR-PCR;体系优化;正交设计

中图分类号: S685.130.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0044-03

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 是一类由 1~6 个碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列^[1],其长度在 100 bp 以内,广泛分布于各类真核生物基因组中。SSR 标记由于具有高度的重复性、丰富的多态性、共显性等优点,成为构建遗传图谱^[2-3],研究遗传多样性,分析亲缘关系^[4-5],种质鉴定^[6-8],进行分子辅助标记^[9-10]、基因定位与克隆^[11-12]等的理想工具。

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 为木犀科木犀属常绿小乔木或灌木,是城市优良的绿化树种,也是我国十大传统名花之一。近年来,对桂花分子方面的研究主要是利用 SRAP^[13-14]、RAPD^[15]、ISSR^[16-18]、AFLP^[19-20] 这几种分子标记技术,以 SSR 分子标记对桂花开展的相关研究较少。本试验采用正交试验设计的方法对桂花 SSR-PCR 反应体系进行优化,以期建立一个稳定可靠的反应体系,为今后利用 SSR 标记技术对桂花开展进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验桂花采自南京林业大学校园内的潢川金桂,提取其 DNA 作为 SSR-PCR 反应的模板 DNA。快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (非离心柱型) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司;dNTPs、 Mg^{2+} 、10 \times Buffer (Mg^{2+} Free)、*Taq* DNA 聚合酶、SSR 引物、Marker (DL50) 均购自上海捷瑞生物工程有限公司。根据笔者前期试验,引物 Ofp50 (5'-TTACCACCAAGATGACAGCGG-3'/5'-CCGCCCTTTCTCTCTCTA-3') 对于桂花具有良好的条带可读性与多态性,故选其为此次正交试验及退火温度的固定引物。

收稿日期:2016-01-12

基金项目:国家科技支撑计划 (编号:2013BA001B06);江苏省高校优势学科建设工程 (编号:PAPD)。

作者简介:王 萍 (1989—),女,江苏常熟人,硕士,研究方向为园林植物育种。E-mail:alvawang@yeah.net。

通信作者:王良桂,男,教授,博士生导师,研究方向为园林植物应用。E-mail:wlg@nifu.com.cn。

1.2 基因组 DNA 的提取

取生长良好的潢川金桂嫩叶,采用试剂盒的方法提取 DNA。DNA 的纯度和浓度测定使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计,选用 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.7~1.9 且浓度大于 20 ng/ μ L 的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增前将 DNA 稀释至 20 ng/ μ L。

1.3 PCR 反应体系正交设计

选用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计表,对 PCR 反应中 5 个因素 (*Taq* 酶含量、dNTPs 含量、 Mg^{2+} 含量、模板 DNA 含量、引物含量) 在 4 个水平上进行试验,因素水平的选取参考徐沂春等的方法^[21-22]并加以综合。PCR 反应因素水平见表 1, $L_{16}(4^5)$ 设计方案见表 2,本试验采用 10 μ L 体系,不足体积用 ddH₂O 补齐,试验设 2 次重复。

表 1 优化桂花 PCR 反应体系的因素水平

水平	因素				
	A: <i>Taq</i> 酶含量 (U)	B: Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	C: 模板 DNA 含量 (ng)	D: dNTPs 浓度 (mmol/L)	E: 引物浓度 (μ mol/L)
1	0.2	1.5	10	0.15	0.2
2	0.3	2.0	20	0.30	0.4
3	0.4	2.5	30	0.45	0.6
4	0.5	3.0	40	0.60	0.8

1.4 SSR-PCR 扩增

PCR 扩增反应在 Biometrac TPprofessional Standard PCR 仪上进行。PCR 反应程序:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 反应产物的电泳与检测

在 PCR 产物中加入 5 μ L 0.25% 溴酚蓝,然后加样,样孔中每样品点样 1 μ L, D50Marker 为对照,用 12% 聚丙烯酰胺凝胶于恒压 240 V 电压下电泳 1 h 左右,再进行银染和显影,凝胶在灯光下用数码相机照相以供分析。

1.6 退火温度的筛选

采用试验确定的最佳反应体系对本次试验所用引物 Ofp50 的退火温度进行筛选。利用 ABI Veriti 梯度 PCR 仪进

表 2 优化桂花 SSR-PCR 反应体系 L₁₆(4⁵) 正交试验设计

编号	A: <i>Taq</i> 酶 含量 (U)	B: Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	C: 模板 DNA 含量 (ng)	D: dNTPs 浓度 (mmol/L)	E: 引物 浓度 (μmol/L)
1	0.2	1.5	10	0.15	0.2
2	0.2	2.0	20	0.30	0.4
3	0.2	2.5	30	0.45	0.6
4	0.2	3.0	40	0.60	0.8
5	0.3	1.5	20	0.45	0.8
6	0.3	2.0	10	0.60	0.6
7	0.3	2.5	40	0.15	0.4
8	0.3	3.0	30	0.30	0.2
9	0.4	1.5	30	0.60	0.4
10	0.4	2.0	40	0.45	0.2
11	0.4	2.5	10	0.30	0.8
12	0.4	3.0	20	0.15	0.6
13	0.5	1.5	40	0.30	0.6
14	0.5	2.0	30	0.15	0.8
15	0.5	2.5	20	0.60	0.2
16	0.5	3.0	10	0.45	0.4

行 PCR 反应程序中退火温度梯度试验。设置退火温度为 48 ~ 65 ℃, 共 18 个梯度, 对所得 PCR 产物进行电泳检测。

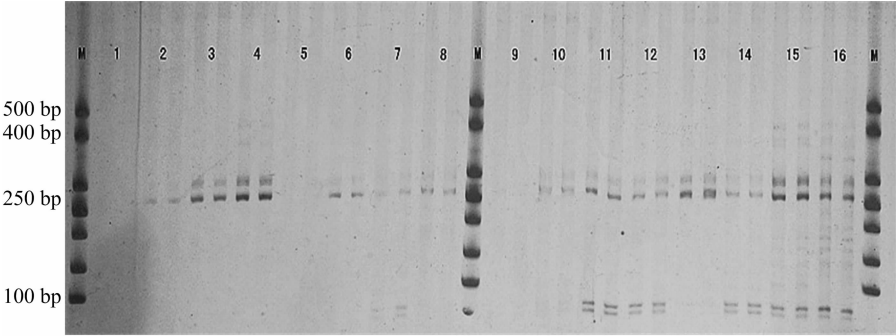
1.7 最佳反应体系的检测

随机选择引物 OIP16(5'-TGCATTTCTGACGCCTGGAT-3', 5'-ACCGTTGTCAAGCCCCCTTT-3') 对 21 份采集于南京林业大学校园同一植株的潢川金桂实生苗 DNA 进行 SSR 扩增, 对优化确定的桂花 SSR-PCR 体系的稳定性进行检测。

2 结果与分析

2.1 正交试验

从图 1 可以看出, 5 个因素的浓度组合不同, 扩增出来的效果存在明显差异。处理 1、处理 5、处理 9 没有条带; 处理 7、处理 11、处理 12、处理 14、处理 15、处理 16 扩增出了分子量小于 50 bp 的引物二聚体, 处理 15、处理 16 存在不同程度的杂带; 处理 2、处理 6、处理 8、处理 10 条带比较模糊; 处理 3、处理 4、处理 13 扩增出了比较好的条带。综合考虑经济因素以及清晰度, 选择处理 4 为最佳体系, 即在 10 μL 反应体系中, *Taq* 酶含量为 0.2 U, Mg²⁺ 浓度为 3.0 mmol/L, 模板 DNA 含量为 40 ng, dNTPs 浓度为 0.60 mmol/L、引物浓度为 0.8 μmol/L。



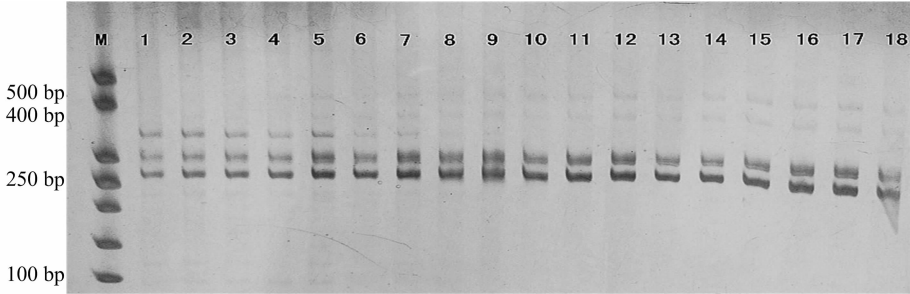
M—DL 50 DNA marker(图2、图3同), 处理编号同表2

图1 不同处理 PCR 产物电泳结果

2.2 退火温度筛选

退火温度对扩增结果有较大的影响, 引物在最适宜的退火温度下扩增出来的条带清晰, 反之条带会模糊、拖尾。试验对引物 OIP50 设置了 18 个不同的退火温度进行 PCR 扩增,

不同温度条件下产物的电泳结果见图 2, 退火温度过低, 非特异性条带增多, 结果不可靠; 退火温度过高时, 引物与模板结合差, 清晰度下降。综合考虑条带数与清晰度, 引物 OIP50 适宜的退火温度范围为 60 ~ 62 ℃。



1~18温度依次为48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65 ℃

图2 不同退火温度 PCR 产物电泳结果

2.3 最佳反应体系稳定性检测

应用该最佳反应体系, 随机选择引物 OIP16 对 21 份取自同植株的潢川金桂实生苗 DNA 进行扩增, 从图 3 可以看出, 21 份 DNA 模板都扩增出了清晰目的条带, 说明该体系较稳

定, 适用于桂花 SSR-PCR 反应。

3 讨论

PCR 的体积对扩增效果有一定影响, 体积过小, 容易出

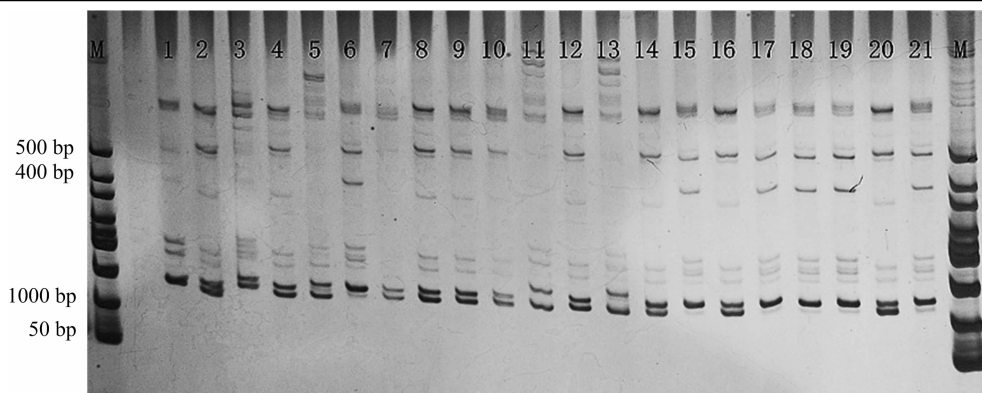


图3 应用最佳反应体系对 21 份潢川金桂实生苗 DNA 的扩增结果

现操作上的误差, 体积过大, 增加试验成本。本试验采用 10 μ L 反应体系, 得到了清晰的条带, 相较王静对桂花采用的 20 μ L 反应体系^[22], 节省了试验材料, 并节约了成本。

引物的退火温度对扩增效果有较大的影响, 因此, 采用不同的引物进行扩增反应时, 须对引物进行退火温度筛选, 以确定最适宜的退火温度。

正交设计的优越性就在于能均衡各个试验因素并考虑到各因素间的交互效应, 在减少试验次数的同时又不使信息损失过多, 可以在最短的时间内找到最优的组合^[23]。很多学者在优化体系时也经常使用多次单因素设计^[24-26], 这种方法虽然简便易行, 但忽略了试验因素间的交互效应, 因此不能完全保证各个因素的最佳浓度组合到一起就是最佳反应体系, 但是结果可以作为正交设计结果的参考。

桂花 SSR-PCR 优化体系的建立, 可为今后桂花及其他木犀科植物的群体遗传及基因型鉴定提供参考。

参考文献:

- [1] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Gulsen O, Uzun A, Canan I, et al. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers[J]. Euphytica, 2010, 173(2): 265-277.
- [3] 陈庆全, 张玉山. 籼型水稻 SSR 标记遗传连锁图谱的构建及偏离分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 685-689.
- [4] 孙希平, 杨庆文. 中国与东南亚三国(越、老、柬)普通野生稻遗传多样性的比较研究[J]. 作物学报, 2009, 35(4): 679-684.
- [5] 王利锋, 李会勇, 唐保军, 等. 利用表型和 SSR 标记分析河南省玉米地方品种的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1136-1144.
- [6] 张红莲, 李火根, 胥 猛, 等. 鹅掌楸属种及杂种的 SSR 分子鉴定[J]. 林业科学, 2010, 46(1): 36-39.
- [7] 张 杰, 刘晓杰, 孙君灵, 等. 棉花种间杂交渐渗系 SSR 及农艺性状分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 60-67.
- [8] 刘 峰, 冯雪梅, 钟 文, 等. 适合棉花品种鉴定的 SSR 核心引物的筛选[J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1160-1168.
- [9] Zhang G L, Chen L Y, Xiao G Y, et al. Bulk segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(4): 482-

487.

- [10] 滕卫丽, 李文滨, 韩英鹏, 等. 大豆种质对 SMV 抗性鉴定的 SSR 辅助选择[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 224-228.
- [11] Liu C, Wang J, Huang T, et al. A missense mutation in the VHYNP motif of a DELLA protein causes a semi-dwarf mutant phenotype in *Brassica napus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(2): 249-258.
- [12] 陈立君, 郭 强, 刘迎雪, 等. 大豆灰斑病 1 号生理小种抗性基因的 SSR 标记[J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 43-46.
- [13] 胡春芳, 袁录霞, 张 凡, 等. 咸宁部分桂花品种亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(9): 1907-1911.
- [14] 李 梅, 侯喜林, 郝日明. 基于 SRAP 分子标记的桂花品种亲缘关系研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1667-1675.
- [15] 赵小兰, 姚崇怀. 桂花部分品种的 RAPD 分析[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(5): 484-487.
- [16] 范付华, 夏 辉, 王振启, 等. 咸宁地区部分桂花品种的 ISSR 分析[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2014, 36(3): 272-276.
- [17] 段一凡, 王贤荣, 梁丽丽, 等. 古桂遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 福建林学院学报, 2011, 31(4): 335-339.
- [18] 李 梅, 侯喜林, 单晓政, 等. 部分桂花品种亲缘关系及特有标记的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 674-682.
- [19] 徐沂春, 胡绍庆, 赵宏波. 基于 AFLP 分子标记的不同类型野生桂花种群遗传结构分析[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(2): 217-223.
- [20] 韩远记, 董美芳, 袁王俊, 等. 部分桂花栽培品种的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 137-142.
- [21] 徐沂春. 桂花遗传多样性及不同性别花的花芽特性[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [22] 王 静. 桂花野生居群遗传多样性分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.
- [23] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [24] 胡凤荣, 王 斐, 王志强, 等. 风信子 ISSR-PCR 体系的优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2013, 12(1): 139-144.
- [25] 谢文刚, 张新全, 彭 燕, 等. 鸭茅 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2008, 6(2): 381-386.
- [26] 高志红, 章 镇, 韩振海, 等. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(4): 19-22.