

王丽丽,孙昌法,胡尚连. 梁山慈竹 SSR-PCR 体系的优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):61-64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.012

梁山慈竹 SSR-PCR 体系的优化

王丽丽,孙昌法,胡尚连

(西南科技大学生命科学与工程学院,四川绵阳 621010)

摘要:以梁山慈竹为材料,提取叶片 DNA 并将其作为模板,采用正交设计试验优化影响梁山慈竹简单重复序列-聚合酶链式反应(SSR-PCR)体系的 3 个主要因素,并对 21 个梁山慈竹不同品系进行稳定性验证,结果表明,优化的 20 μL SSR-PCR 反应体系为 $2 \times \text{Taql}$ PCRMix 8 μL 、模板 DNA (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2.5 μL 、SSR 引物 (1.0×10^{-4} mmol/L) 1 μL 、无菌蒸馏水补足至 20 μL ;使用 SSR 引物 BMK.38757 对 21 个梁山慈竹不同品系进行扩增,扩增产物大小在 140 bp 左右,共有 4 个多态性位点;使用 SSR 引物 L6、R83 对梁山慈竹进行扩增,均获得 3 个多态性位点,且条带清晰。

关键词:梁山慈竹;简单重复序列(SSR);聚合酶链式反应(PCR);正交试验;优化

中图分类号:S795.501 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)05-0061-04

简单重复序列(simple sequence repeats,SSR)别称微卫星 DNA(microsatellite DNA)^[1],由 1~6 个碱基重复串联组成,其不同等位基因间的重复数具有丰富的差异,而其两侧的序列高度保守,可以在重复串联序列的两端设计引物,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增片段的长度检测等位基因的多态性。SSR 是 Skinner 等于 1974 年在研究寄居蟹时首次发

现的^[2],此后人们相继发现,SSR 广泛存在于真核生物中,由于其具有多态性高、容易检测、共显性等特点,SSR 标记技术很快在动植物遗传检测分析中得到广泛应用^[3-4]。

SSR 标记根据开发方法可分为基因组 SSR(gSSR)、表达序列标签 SSR(EST-SSR)标记,随着高通量测序技术的发展,转录组测序相对价格越来越低,一些无参照基因组物种的 EST-SSR 开发也越来越容易。西南科技大学生命科学与工程学院实验室在梁山慈竹分子层面研究上取得一定进展^[5],并获得多个品系梁山慈竹的转录组数据^[6-7],这为梁山慈竹 EST-SSR 分子标记的开发提供了坚实的基础。在 EST-SSR 标记开发过程中,PCR 过

收稿日期:2019-02-12

基金项目:四川省“十三五”重点攻关项目(编号:2016NYZ0038)。

作者简介:王丽丽(1992—),女,山东临沂人,硕士,从事植物遗传与品种改良。E-mail:1298901076@qq.com。

通信作者:胡尚连,博士,教授,从事植物生理与生物技术研究。E-mail:hashanglian@126.com。

[16] 廖祥儒,朱新产. 种子引发提高小麦抗渗透胁迫能力的效应[J]. 植物学通报,1997,14(2):37-41.

[17] Henry Y, De Buyser J. Float culture of wheat anthers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981,60(2):77-79.

[18] 李建民,李喜文. 皮燕麦胚性愈伤组织的形成及植株再生[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),1999(3):40-43,45.

[19] 张丽君,刘龙龙,马名川,等. 燕麦成熟胚组织培养体系的优化及其影响因素[J]. 山西农业科学,2015,43(3):269-272.

[20] 王迅娉,修 谨,倪秀珍. 燕麦组织培养体系的建立与优化[J]. 湖北农业科学,2014,53(16):3936-3938.

[21] 罗志娜,赵桂琴,刘 欢. 燕麦成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 甘肃农业大学学报,2012,47(5):60-68.

[22] 贾利敏,傅晓峰,刘俊清. 不同燕麦种成熟胚诱导条件的优化[J]. 杂粮作物,2009,29(2):95-98.

[23] 胡晓旭. 燕麦成熟胚组织培养植株再生体系的建立与优化[D]. 福州:福建农林大学,2017:11-12.

[24] Bhaskaran S R. Regeneration in cereal tissue culture; a review[J]. Crop Science,1990,30:1328-1336.

[25] Saalbach G H. Attempts to initiate callus formation from barley leaves[J]. Plant Science Letters,1978,13(2):165-169.

[26] Hassan G, Zipf A, Sharma G C, et al. Plant regeneration from mature *Avena* tissue explants [J]. Cereal Research Communications,1999,27(1):25-32.

[27] Kim K H, Lee B M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos in oat[J]. Indian Journal of Ophthalmology,2002,60(2):87-93.

[28] Artunduaga I R, Taliaferro C M, Johnson B L. Effects of auxin concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of old world bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermud (*Cynodon* spp.) grasses[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture,1988,12(1):13-19.

程对后续电泳条带的读取具有直接的影响^[8],为保证 PCR 结果的可靠性,本研究对影响梁山慈竹 SSR-PCR 结果的主要因子进行优化,以获得较好的反应体系,为后续梁山慈竹的遗传多样性、性状关联分析及分子辅助育种等研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

移液枪、PCR 扩增仪、琼脂糖凝胶电泳仪、垂直板电泳仪、凝胶成像仪、通风橱、离心机、数码相机等。

1.2 试验材料

野生型梁山慈竹及梁山慈竹 20 个栽培品系叶片,由西南科技大学生命科学与工程学院实验室提供。

1.3 DNA 提取及检测

21 个梁山慈竹品系的叶片基因 DNA 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium

bromide,CTAB)法进行提取^[9],并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度法分别检测提取的 DNA 质量、浓度;分别取各品系 DNA 溶液 10 μL,用蒸馏水稀释至 20 ng/μL 后,在 -20 ℃ 冰箱中保存,备用。

1.4 SSR-PCR 体系优化

以野生型梁山慈竹叶片 DNA 为模板,使用 SSR 引物 BMK.38757(表 1),对影响 SSR-PCR 效果的 Taq PCRMix 用量、引物浓度、DNA 模板用量采用 3 因素 4 水平正交试验进行优化,具体设计见表 2,反应总体积为 20 μL,不足的加双蒸水补齐。反应程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 下退火 30 s,72 ℃ 延伸 25 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;4 ℃ 保存。采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2.5~3.0 h,电泳恒定电压为 600 V;使用 ACS 染液(2% 硝酸银,10% 乙醇,0.5% 冰醋酸)染色 15~20 min,蒸馏水冲洗后,浸没于由 3% 氢氧化钠(NaOH)、0.1% 甲醛配制成的显影液中显影约 15 min,至条带清洗;采用数码相机拍照记录。

表 1 SSR 引物序列

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
BMK.38757	GCAATAATACAAGGGGAGTG	ACGTCGTCTACGAGAAGATT
L6	CAAGATTCCAGAGTGGGAGA	CTTCGAATAGCCCCAAAC
R83	GAACAGGGTAGATTGGAAGA	CACAACAATGGCAGATACC

表 2 SSR-PCR 体系 L₁₆(4)³ 正交试验设计

处理编号	2×Taq PCRMix 用量(μL)	引物浓度 (×10 ⁻⁴ mmol/L)	模板 DNA 用量 (ng)
1	6	0.5	10
2	6	1.0	20
3	6	1.5	30
4	6	2.0	50
5	8	1.0	10
6	8	0.5	20
7	8	2.0	30
8	8	1.5	50
9	10	1.5	10
10	10	2.0	20
11	10	0.5	30
12	10	1.0	50
13	12	2.0	10
14	12	1.5	20
15	12	1.0	30
16	12	0.5	50

1.5 SSR-PCR 反应体系验证

以野生型梁山慈竹叶片 DNA 为对照(CK),以

20 个梁山慈竹品系叶片 DNA 为试验材料,以 BMK.38757、L6、R83 为引物,分别在退化温度为 56、55、57 ℃,其他反应程序同“1.4”节条件下对优化的 SSR-PCR 反应体系稳定性及引物扩增的多态性进行验证。

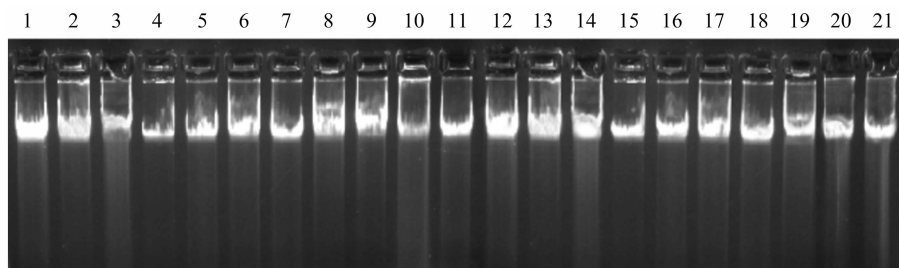
2 结果与分析

2.1 梁山慈竹叶片 DNA 的提取与检测

由图 1 可见,21 个梁山慈竹品系的叶片 DNA 电泳后均具有明亮的条带,且条带没有明显的拖尾。紫外分光光度计检测结果显示,各品系 DNA 在波长分别为 260、280 nm 处的吸光度比值均在 1.7~1.9 之间,DNA 浓度均在 200 ng/μL 以上,说明 DNA 降解较少,蛋白杂质污染相对较轻,提取质量较高,可满足后续试验要求。

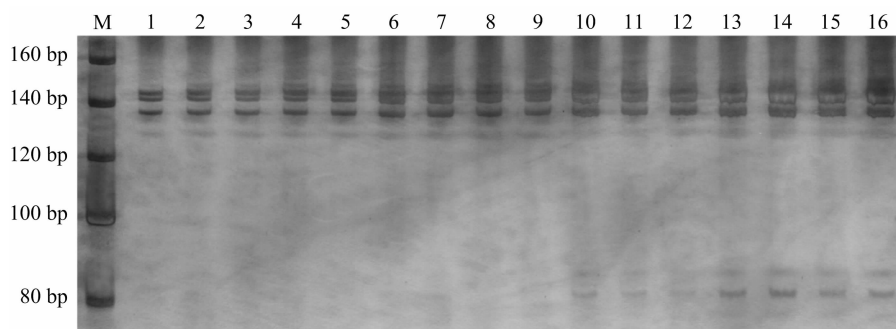
2.2 梁山慈竹 SSR-PCR 体系的优化

由图 2 可知,采用引物 BMK.38757 共扩增出 4 条条带;Taq PCRMix 用量为 10~12 μL(泳道 9~泳道 16)时,条带染色过深,且容易出现引物二聚体;在 Taq PCRMix 用量相同条件(泳道 1~泳道 4)下,



泳道1~泳道21分别代表野生型梁山慈竹及20个不同品系梁山慈竹DNA电泳结果。图3同

图1 梁山慈竹基因组DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果



M为marker; 1~16泳道分别对应表1中的处理编号

图2 梁山慈竹SSR-PCR正交试验电泳检测结果

引物浓度或模板DNA用量的增加可以提升PCR的扩增效果;泳道5~泳道8的条带则进一步表明,模板DNA用量的增加会使扩增条带逐渐清晰,而引物浓度对扩增结果影响相对较小。因此,优化的梁山慈竹SSR-PCR体系为 $2 \times \text{Taql}$ PCRMix $8 \mu\text{L}$,模板DNA用量($20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $2.5 \mu\text{L}$, SSR引物($1.0 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$) $1 \mu\text{L}$,无菌蒸馏水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。

2.3 梁山慈竹SSR-PCR优化反应体系的验证

使用SSR引物BMK. 38757,对野生型梁山慈竹及20个梁山慈竹栽培品系采用优化反应体系进行PCR扩增,结果(图3)显示,共获得4个多态性位点,产物大小均在140 bp左右,条带清晰,容易分辨,且均未见引物二聚体的产生。

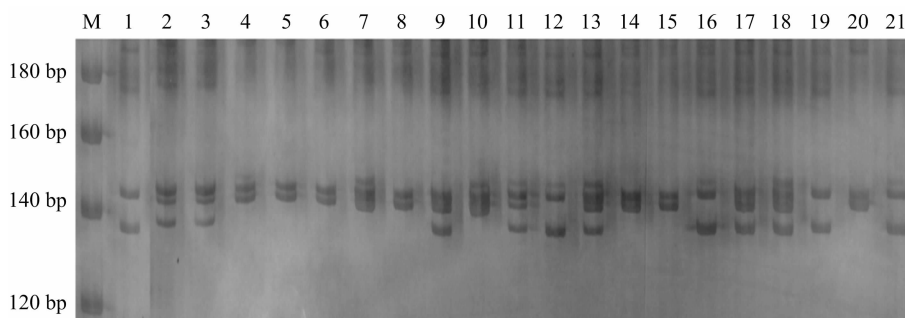


图3 优化反应体系对梁山慈竹SSR-PCR的检测结果

图4-(1)、图4-(2)分别为采用引物L6、引物R83在优化体系下对部分梁山慈竹品系的PCR扩增结果,结果表明,2个引物均可获得3个等位多态性位点,说明优化体系能够适用于多对引物,能够得到清晰、无拖尾、易于读取的条带。

3 结论与讨论

简单重复序列标记由于具有共显性、数量丰

富、多态性高、开发容易且开发时间短等特点^[10],自该技术诞生以来,得到广大科研工作者的青睐,目前该技术已经被广泛应用于动植物的遗传多样性分析、遗传图谱构建、目标基因定位、品种鉴定及辅助育种等研究^[11-16]中。由于竹类植物以无性繁殖为主,其遗传多样性分析、分类等分子水平上的研究难度较大^[17],因此,将SSR分子标记手段应用在竹类植物研究上具有重要的意义。

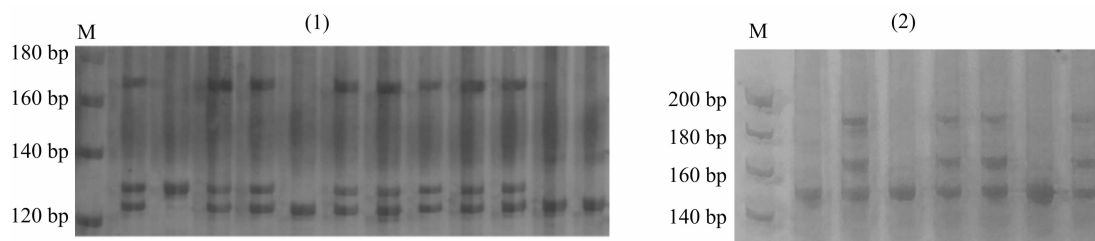


图4 最优 SSR-PCR 体系在不同引物间的稳定性验证

SSR 分子标记的技术基础是 PCR 扩增,影响 PCR 扩增的因素将直接影响 SSR 分子标记的结果。本研究对梁山慈竹 SSR-PCR 的引物浓度、模板 DNA 浓度、*Taq* PCRMix 等设计 3 因素 4 水平正交试验,获得的最佳反应体系为 *Taq* PCRMix 8 μL ,模板 DNA (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2.5 μL ,SSR 引物 (1.0×10^{-4} mmol/L) 1 μL ,无菌蒸馏水补足至 20 μL 。

采用优化的反应体系对野生型梁山慈竹及 20 个梁山慈竹栽培品系进行 PCR 扩增,部分引物获得较好的多态性位点,其中,引物 BMK. 38757 获得 4 个多态性位点,引物 L6、R83 均可获得 3 个多态性位点。表达序列标签 SSR (EST-SSR) 标记可用于梁山慈竹不同栽培品种间的遗传分析,结合性状关联分析^[18-19]能够应用于优良竹种选育与鉴别,有利于加快育种速度。

参考文献:

- [1] 郭小平,赵元明,刘毓侠. SSR 技术及其在植物遗传育种中的应用[J]. 华北农学报,1998,13(3):73-76.
- [2] Skinner D M, Beattie W G, Blattner F R, et al. The repeat sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (- T - A - G - G -)_n - (- A - T - C - C -)_n [J]. Biochemistry, 1974, 13(19): 3930-3937.
- [3] Ali S, Müller C R, Epplen J T. DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats [J]. Human Genetics, 1986, 74(3): 239-243.
- [4] 吴妙丹. 毛竹 EST-SSR 标记的开发和利用[D]. 杭州:浙江农林大学,2010.
- [5] 李晓瑞,胡尚连,曹颖,等. 农杆菌介导慈竹 4CL 基因遗传转化梁山慈竹[J]. 林业科学,2012,48(3):38-44.
- [6] 周振华. 梁山慈竹体细胞突变体 No. 29 特性及其转录组分析[D]. 绵阳:西南科技大学,2015.

- [7] 王身昌. 梁山慈竹体细胞突变体 No. 30 的研究[D]. 绵阳:西南科技大学,2016.
- [8] 杨传平,王艳敏,魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR-PCR 反应体系[J]. 东北林业大学学报,2006,34(6):1-3.
- [9] 闫庆祥,黄东益,李开绵,等. 利用改良 CTAB 法提取木薯基因组 DNA[J]. 中国农学通报,2010,26(4):30-32.
- [10] 董文娟. 毛竹多拷贝 SSR 及其遗传多样性研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2011.
- [11] Lokko Y, Dixon A, Offei S, et al. Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihot esculenta* Grantz accessions resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers[J]. Genetic Resources & Crop Evolution, 2006, 53(7):1441-1453.
- [12] 荣浩,黄彬,周琦,等. 61 个观赏海棠品种的 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2018,42(3):045-050.
- [13] Tsukazaki H, Yamashita K I, Yaguchi S, et al. Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2008, 117(8): 1213-1223.
- [14] Riday H, Brummer E C, Campbell T A, et al. Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata* [J]. Euphytica, 2003, 131(1):37-45.
- [15] Hir Y P. 基于 SSR 和 AFLP 标记的东方百合群体遗传图谱构建及 QTL 定位[D]. 北京:中国农业科学院,2016.
- [16] Grandon N G, Alarcon Y, Moreno M V, et al. Genetic diversity among alfalfa genotypes (*Medicago sativa* L.) of non-dormant cultivars using SSR markers and agronomic traits[J]. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, 2013, 45(2):181-195.
- [17] 吴妙丹. 毛竹 EST-SSR 标记的开发和利用[D]. 杭州:浙江农林大学,2010.
- [18] 李昌荣. 大花序桉生长和材性遗传变异及 SSR 关联分析[D]. 北京:中国林业科学研究院,2017.
- [19] 谭文丽. 木薯 SSR 标记与表型的关联分析[D]. 郑州:河南农业大学,2014.