

# 仁用杏远缘杂交后代 SSR-PCR 反应体系的优化

蔡胜文<sup>1</sup>, 孙浩元<sup>2</sup>, 杨丽<sup>2</sup>, 王玉柱<sup>2</sup>, 路丙社<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 河北农业大学, 河北保定 071001; <sup>2</sup> 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

**摘要:** 为了有效的利用 SSR-PCR 对仁用杏远缘杂交后代进行早期鉴定, 采用正交设计, 对仁用杏杂交苗 SSR-PCR 反应的 5 因素 4 水平进行试验, 通过极差分析法对结果进行分析, 建立了仁用杏杂交苗 SSR-PCR 反应的最佳体系: 即在 20 $\mu$ l 反应体系中, 1 $\times$ buffer、2.0 mM/L Mg<sup>2+</sup>、0.25 mM/L dNTPs、0.25 $\mu$ M/L Primer、60ng/20 $\mu$ l 模板 DNA 和 0.05 U/ $\mu$ l Taq 酶。

**关键词:** 仁用杏; SSR-PCR; 远缘杂交后代; 正交设计

**中图分类号:** S661 **文献标识码:** A

## Optimization of SSR-PCR Reaction System of Apricot Distant Hybrids

Cai Shengwen<sup>1</sup>, Sun Haoyuan<sup>2</sup>, Yang Li<sup>2</sup>, Wang Yuzhu<sup>2</sup>, Lu Bingshe<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

<sup>2</sup>Institute of Pology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093)

**Abstract:** In order to make good use of SSR-PCR to identify the distant hybridization descendant of apricot, the orthogonal design was used to optimize SSR amplification system of apricot hybrids in five factors at four levels respectively. A suitable SSR reaction system was established by range method, namely 20 $\mu$ l reaction system containing 1 $\times$ buffer, 2.0mM/L Mg<sup>2+</sup>, 0.25mM/L dNTPs, 0.25 $\mu$ M/L Primer, 60ng/20 $\mu$ l DNA templet and 0.05 U/ $\mu$ l Taq polymerase.

**Key words:** apricot, SSR-PCR, distant hybrids, orthogonal design

仁用杏是中国特产树种之一, 随着国内加工业的发展和出口量不断增加, 杏仁产品供不应求, 市场发展前景广阔。“龙王帽”、“一窝蜂”和“柏峪扁”是目前国内发展面积最大的仁用杏良种, 但是与国际上同为仁用的扁桃相比, 单仁重较低。对现有优良品种进行品种改良, 提高单果仁重以及果实品质势在必行。为此, 北京市农林科学院林业果树研究所自 20 世纪 90 年代以来, 开展了仁用杏和扁桃的远缘杂交研究, 成功获得了后代植株。SSR 简单序列重复标记 (simple sequence repeat, SSR 标记) 是近年发展起来的建立在 PCR 基础之上的新型遗传标记, 因其使用程序简便、快速, 多态性高, 重复性好, 遗传信息量大, 共显性遗传等特点, 现已广泛应用于许多植物的系谱分析、性状标记、遗传图

谱构建等方面, 如杏<sup>[1]</sup>、葡萄<sup>[2]</sup>、花生<sup>[3]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>等均有相关的报道。由于影响 SSR 反应体系的因素较多, 所建立的体系必须根据物种进行相应的调整。为了有效的利用 SSR 对仁用杏和扁桃的远缘杂交后代进行早期鉴定, 笔者于 2007—2008 年以扁桃和龙王帽的杂交后代为试材, 采用正交实验设计, 对鉴定其后代的 SSR-PCR 反应体系进行了优化, 以期筛选出最佳的反应体系, 为进一步研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验材料为扁桃和龙王帽的杂交后代的杂交苗幼叶(见表 1)。采自北京市农林科学院林业果树研究所杏育种圃, 地点位于北京市平谷区马坊镇。提取其基因组

**基金项目:** 国家科技支撑计划林业项目子专题“高产优质仁用杏新品种选育”(2006BAD01A17)。

**第一作者简介:** 蔡胜文, 男, 1981 年出生, 硕士, 主要从事经济林与园林植物育种研究。通信地址: 071001 河北省保定市河北农业大学林学院。Tel: 0312-7528772, E-mail: caishengwen@163.com。

**通讯作者:** 王玉柱, 男, 1960 年出生, 研究员, 所长。博士, 主要从事杏、李遗传育种研究。通信地址: 100093 北京市农林科学院林业果树研究所。Tel: 010-82595857, E-mail: chinabjwyzhu@sohu.com; 路丙社, 男, 1964 年生, 教授, 博士, 主要从事经济林与园林植物育种研究。通信地址: 071001 河北省保定市河北农业大学园林与旅游学院。Tel: 0312-7528772, E-mail: lubingshe@126.com。

**收稿日期:** 2008-04-01, **修回日期:** 2008-05-07。

表 1 杂交苗编号表

编号	品种名称	编号	品种名称
1	P6-N-54	16	P8-N-7
2	P6-N-55	17	P8-N-8
3	P6-N-56	18	P8-N-9
4	P6-N-57	19	P8-N-10
5	P6-N-58	20	P25-N-1
6	P6-N-59	21	P25-N-2
7	P6-N-60	22	P25-N-3
8	P6-N-61	23	P25-N-4
9	P6-N-62	24	P25-N-5
10	P8-N-1	25	P25-N-6
11	P8-N-2	26	P25-N-7
12	P8-N-3	27	P25-N-8
13	P8-N-4	28	P25-N-9
14	P8-N-5	29	P25-N-10
15	P8-N-6		

DNA 作为 PCR 扩增的模板。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 所用基因组 DNA 采用的 Doyle 等报道的 CTAB 方法<sup>[5]</sup>并稍加改良,提取后置于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 SSR-PCR 扩增 针对 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup>、模板 DNA、dNTPs 及引物 5 个因素设置 4 个水平,见表 2。选用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交表(见表 3),共设 16 个处理,即 16 种反应体系。用远缘杂交后代单株 P6-N-62 的 DNA 作模板。

SSR 所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,选用 12 号引物(碱基序列 F:GCTGATGGGTTT-TATGGTTTTTC; R:CGGACTCTTATCCTCTATCAACA,引物来源 Testolin<sup>[6]</sup>)进行实验。10×Buffer、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 由上海生工生物工程技术有限公司提供, Taq 酶由北京泽星生物科技有限公司提供。各处理反应总体积均为 20μl,每处理均加入 2.0μl 不含 Mg<sup>2+</sup> 的 10×Buffer(终浓度为 1×Buffer),然后按照各组分母液浓度计算其用量,不足体积用超纯水补足。

表 2 正交设计中的各因素及其水平

处理水平	Mg <sup>2+</sup> /(mM·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mM·L <sup>-1</sup> )	引物/(mM·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/(mM·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶/(U·μl <sup>-1</sup> )
1	1.5	0.15	0.15	20	0.025
2	2.0	0.2	0.2	40	0.05
3	2.5	0.25	0.25	60	0.1
4	3.0	0.3	0.3	80	0.15

表 3 正交实验设计表 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)

组合	Mg <sup>2+</sup> /(mM·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mM·L <sup>-1</sup> )	引物/(mM·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/(ng·20 μl <sup>-1</sup> )	Taq 酶/(U·μl <sup>-1</sup> )	等级
1	1(1.5)	1(0.15)	1(0.15)	1(20)	1(0.025)	2
2	1	2(0.2)	2(0.2)	2(40)	2(0.05)	5
3	1	3(0.25)	3(0.25)	3(60)	3(0.1)	6
4	1	4(0.3)	4(0.3)	4(80)	4(0.15)	1
5	2(2.0)	1	2	3	4	5
6	2	2	3	4	1	3
7	2	3	4	1	2	7
8	2	4	1	2	3	5
9	3(2.5)	1	2	3	4	3

(续表 1)

组合	Mg <sup>2+</sup> /(mM·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mM·L <sup>-1</sup> )	引物/(mM·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/(ng·20 μl <sup>-1</sup> )	Taq 酶/(U·μl <sup>-1</sup> )	等级
10	3	2	3	4	1	3
11	3	3	4	1	2	1
12	3	4	1	2	3	2
13	4(3.0)	1	2	3	4	3
14	4	2	3	4	1	6
15	4	3	4	1	2	4
16	4	4	1	2	3	3
K1	14	13	12	14	14	
K2	20	17	16	15	17	
K3	9	18	18	17	16	
K4	16	11	13	13	12	
k1=K1/4	3.50	3.25	3.00	3.50	3.50	Σ degree=59
k2=K2/4	5.00	4.25	4.00	3.75	4.25	
k3=K3/4	2.25	4.50	4.50	4.25	4.00	
k4=K4/4	4.00	2.75	3.25	3.25	3.00	
R	2.75	1.75	1.50	1.00	1.25	

注: 括号中数字表示各水平的取值。

SSR 扩增在 PTC-200 PCR 仪上进行。扩增程序为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8min, 然后置于 4℃ 贮存, 然后电泳检测。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物 在 PCR 扩增的产物中加入等体积的变性载样缓冲液 (98% 甲酰胺, 10mmol/L EDTA, 0.025% 溴酚蓝, 0.025% 二甲苯青), 混匀后于 94℃ 变性 5min, 立即放入冰中, 上样量为 2μl, 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 恒压 (北京六一仪器厂, DYY-10C 型电泳仪, DYCZ-20C 型电泳槽) 1000V, 时间 1h, 银染染色。染色方法为: 10% 乙醇固定 5min, 双蒸水漂洗 0.5~1min, 0.1% 硝酸氧化 5min, 双蒸水漂洗

0.5~1min, 0.1% 硝酸银染色 30min, 双蒸水漂洗 10~15s, 在 3% 碳酸钠 (加入 1.5ml/L 甲醛和 300μl 的 0.2mg/L 硫代硫酸钠) 溶液中显色 5~10min, 显色后用 10% 乙酸固定, 用水洗净残余乙酸, 阴干保存。

1.2.4 退火温度的筛选 用正交试验设计筛选出来的最佳体系进行退火温度的筛选, 根据引物的最低和最高的 Tm 值在 PCR 仪上输入最低和最高温度值, 仪器自动生成 12 个温度梯度, 所设最低温度为 47℃, 最高温度为 59℃, 中间温度为 47.3℃、48.1℃、49.0℃、50.4℃、52.1℃、54.2℃、55.9℃、57.2℃、58.1℃、58.8℃。以杂交单株 P6-N-62、P25-N-4 的 DNA 作模板, 12 号为引物进行 PCR 扩增。

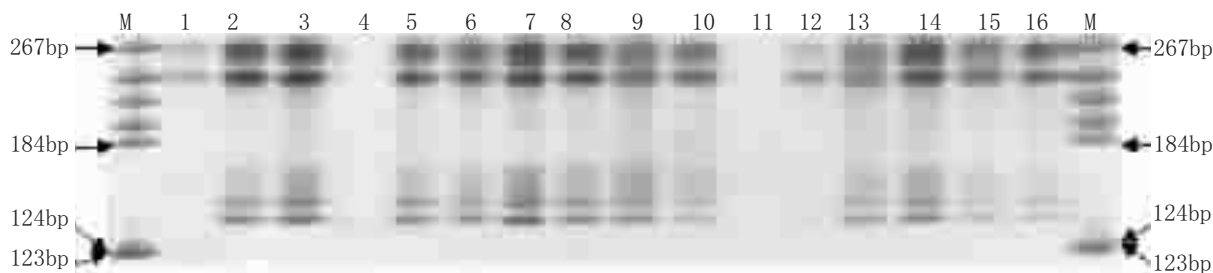


图 1 SSR-PCR 正交试验结果

注: 1-16, 处理代号, 参见表 1; M 为 DNA marker。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交设计的优化结果

图 1 为正交设计优化 SSR 体系的聚丙烯酰胺电泳图谱。由图 1 可见, 组合 4、11 无任何条带, 未扩增成功; 组合 1 与 12 的多态性低, 扩增效果较差; 组合 6、

9、10、13、15、16 多态性较高, 虽然扩增成功, 但其背景弥散, 条带不清晰; 组合 2、5、8 多态性好, 条带较清晰, 扩增较好; 组合 3、14 扩增效果好, 条带清晰, 多态性高; 组合 7 扩增效果最好, 条带清晰, 无弥散现象, 多态性最高。最佳体系应选择条带稳定、清晰、多态性高的

体系。

### 2.2 正交试验结果的极差分析

电泳结果属于非数量指标,参照何正文等<sup>[7]</sup>的方法,用评分法将其转换为数量指标进行统计分析。依照电泳图谱的结果优劣,将16个处理结果划分成7个等级。分别是:处理4、11为第1等级;处理1、12为第2等级;处理6、9、10、13、16为第3等级;处理15为第4等级;处理2、5、8为第5等级;处理3、14第6等级;处理7为第7等级。

由表2中的R值可知,各影响因素作用的显著性顺序为: $Mg^{2+}$ (2.75) > dNTPs(1.75) > 引物(1.50) > Taq酶(1.25) > 模板DNA(1.00),即 $Mg^{2+}$ 对反应体系的影响最大,依次为dNTPs、引物、Taq酶,最后为模板DNA。由ki值的大小可知,最佳的SSR-PCR反应体系(20 $\mu$ l)应设置为:1 $\times$ buffer、2.0 mM/L  $Mg^{2+}$ 、0.25 mM/L

dNTPs、0.25 $\mu$ M/L Primer、60ng/20 $\mu$ l 模板DNA、0.05 U/ $\mu$ l Taq酶,不足用超纯水补足20 $\mu$ l。

### 2.3 退火温度筛选的结果与分析

退火温度是指引物与模板特异结合的最佳温度,是PCR反应最重要的参数<sup>[8]</sup>。笔者对扩增程序的退火温度进行了处理,设置了12个梯度,以优化扩增程序。图2为12号引物对退火温度筛选的电泳结果,可以看出,在给定的退火温度范围内两品种均能扩增成功,且呈现的多态性较一致,但有些退火温度下条带有缺失。在退火温度为59.0 $^{\circ}$ C时对后代单株P25-N-4的扩增成功,而后代单株P6-N-62的扩增效果不佳,可能是退火温度过高,引物与模板未能最大限度的配对甚至配对失败造成的。试验结果表明,在47.0~58.8 $^{\circ}$ C之间12号引物均有扩增产物,这与邹喻苹等<sup>[9]</sup>报道的结论一致。

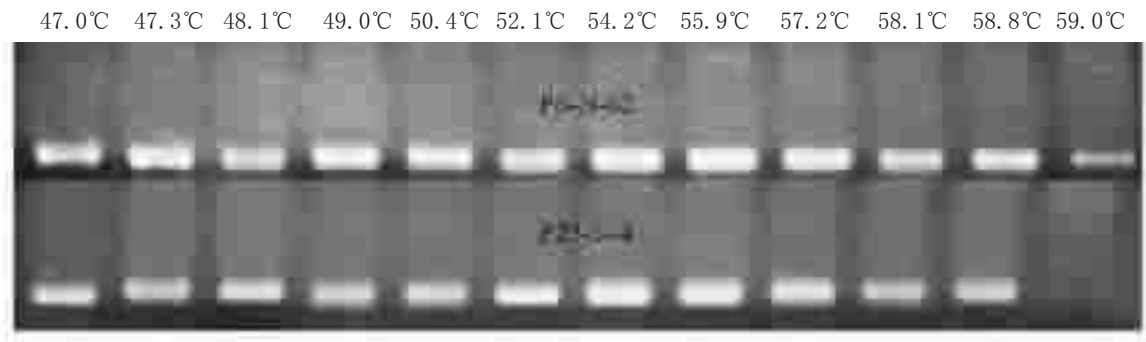


图2 12号引物退火温度的电泳试验结果

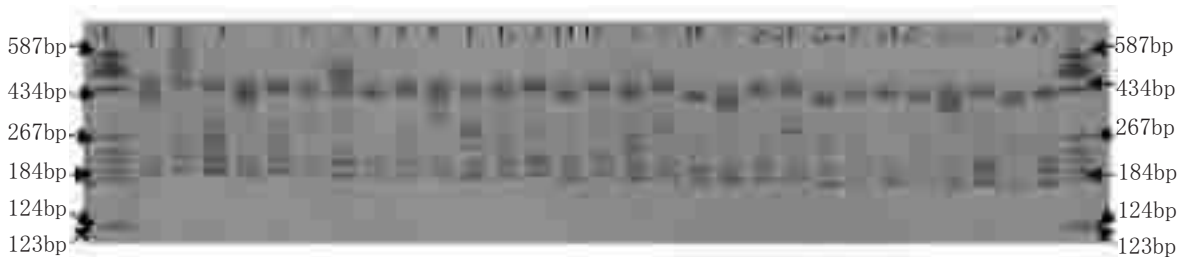


图3 13号引物对29个杂交苗扩增所得SSR带型

### 2.4 最佳体系的验证

为了验证新体系的稳定性,以13号(碱基序列F:AAGCCATCCACTCAGCACTC;R:CCAAAAC-CAAAACCAAAGG,引物来源Testolin<sup>[6]</sup>。)为引物,体系中含有1 $\times$ buffer、2.0 mM/L  $Mg^{2+}$ 、0.25 mM/L dNTPs、0.25 $\mu$ M/L Primer、60ng/20 $\mu$ l 模板DNA和0.05 U/ $\mu$ l Taq酶,不足用超纯水补足20 $\mu$ l。在退火温度为55 $^{\circ}$ C下,对29株杂交苗进行了SSR-PCR扩增。如图3所示,扩增成功,得到了清晰、多态性高的SSR谱带,并具有较好的重复性。证明新体系稳定重复性好、分辨率高。

### 3 讨论

虽然SSR标记具有多态性百分率高、重复性好、

共显性等特点,但是PCR反应结果受多方面因素的影响。在PCR反应中需要耐高温Taq酶进行催化,而Taq酶的活性受 $Mg^{2+}$ 浓度高低的直接影响; $Mg^{2+}$ 浓度过高或过低都会降低Taq酶的活性,只有浓度适宜才能使Taq酶发挥最大的催化作用,提高PCR的产率;dNTPs是影响PCR反应的另一重要因素,作为PCR反应的重要底物,其含量的多少直接影响PCR反应的进行,dNTPs能与 $Mg^{2+}$ 结合,其含量高时会与Taq酶竞争 $Mg^{2+}$ ,这样就大大降低了酶的活性,使PCR扩增受到影响,扩增产物也会大大降低,导致PCR产率下降;引物浓度高低同样会影响PCR扩增效果,过高浓度的引物容易形成引物二聚体,影响扩增效率,并导致非特异性扩增的发生;高纯度、高质量的模板DNA也

是 PCR 反应中必不可少的, DNA 中的杂质也会影响 PCR 扩增的效率, 而模板量过多则会增加非特异性 PCR 产物; 退火温度是 PCR 反应程序中另一重要因素, 在允许的范围内, 较高的退火温度会减少引物与模板的非特性结合, 提高 PCR 反应的特异性<sup>[10]</sup>。因此, 对 SSR 体系进行优化试验可以提高 SSR 结果的有效性和准确性。

有报道对甘草、西瓜、核桃和山楂等不同物种进行了 ISSR-PCR 或 SSR-PCR 的体系优化试验<sup>[11-14]</sup>, 但是大部分是采取单因素的梯度试验, 即对每个因素进行单独的梯度试验从而摸索最佳水平, 过程较繁琐且不能兼顾各因素间的交互作用。笔者以仁用杏杂交苗 P6-N-62 的 DNA 为模板, 采用正交实验方法对  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、Taq 酶、模板 DNA 等因素进行了优化, 建立了重复性好、分辨率高的 SSR-PCR 反应体系, 得到 20 $\mu$ l 的最佳反应体系, 即 1 $\times$ buffer、2.0mM/L  $Mg^{2+}$ 、0.25mM/L dNTPs、0.25 $\mu$ M/L Primer、60ng/20 $\mu$ l 模板 DNA、0.05 U/ $\mu$ l Taq 酶, 用超纯水补足 20 $\mu$ l。经验证, 所建立的体系稳定, 重复性好、分辨率高, 为进一步研究奠定了实验基础。

#### 参考文献

- [1] 何天明, 陈学森, 高疆生, 等. 新疆栽培杏群体遗传结构的 SSR 分析. 园艺学报, 2006, 33(4): 809-812.
- [2] Sefc K M, Regner F, Glors J, et al. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 1998, 37: 15-20.
- [3] 陈本银, 姜慧芳, 廖伯寿, 等. 利用 SSR 技术研究花生属种间亲缘关系. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 140-144.
- [4] 王效宁, 韩东飞, 云勇, 等. 利用 SSR 标记分析海南普通野生稻的遗传多样性. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 184-188.
- [5] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [6] Testolin R., Marrazzo T., Cipriani G., Quarta R., Verde I., Dettori M. T., Pancaldi M. and Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43: 512-520.
- [7] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [8] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法. 分子植物育种, 2003, 1(3): 381-394.
- [9] 邹喻苹, 蔡美琳, 王晓东, 等. 古代“太子莲”及现代红花中国莲钟质资源的 RAPD 分析. 植物学报, 1998, 40(2): 163-168.
- [10] Lu S D. *Current Protocols for Molecular Biology*. Second Edition[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 458-463.
- [11] 佟汉文, 孙群, 吴波, 等. 乌拉尔甘草 ISSR-PCR 反应体系优化研究. 中国农学通报, 2005, 21(4): 70-74.
- [12] 刘海河, 侯喜林, 张彦萍. 西瓜 ISSR-PCR 体系的正交优化研究. 果树学报, 2004, 21(6): 615-617.
- [13] 刘晓丽, 何天明, 张美勇, 等. 核桃 SSR 反应体系的优化. 果树学报, 2007, 24(2): 140-145.
- [14] 代红艳, 张志宏, 周传生, 等. 山楂 ISSR 分析体系的建立和优化. 果树学报, 2007, 24(3): 313-318.