

正交设计优化稻瘟病菌 SSR-PCR 反应体系

张崎峰, 靳学慧*, 张亚玲, 蔡鑫鑫, 王士磊 (黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163319)

摘要 [目的] 筛选最佳的稻瘟病菌 SSR-PCR 反应体系。[方法] 利用正交设计对稻瘟病菌 SSR-PCR 反应体系中的 5 个因素(Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、模板 DNA、dNTP、引物)在 4 个水平上进行优化试验, 筛选出各反应因素的最佳水平并进行退火温度梯度试验筛选最佳的退火温度。[结果] 稻瘟病菌 SSR-PCR 反应的最佳体系为: 反应总体积为 20 μl, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, DNA 100 ng, dNTP 50 μmol/L, 引物(ms355~356) 0.4 μmol/L, 最佳退火温度为 58.5 °C。在此体系下可从稻瘟病菌材料基因组 DNA 中扩增出 300 bp 左右清晰的目的条带, 说明该体系稳定, 适用于稻瘟病菌基因组 DNA 的 SSR 标记。[结论] 该研究为稻瘟病菌的分子标记、遗传多样性研究和分子育种奠定了基础。

关键词 稻瘟病菌; SSR-PCR; 体系优化

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)22-10426-03

SSR-PCR Reaction System for *Magnaporthe oryzae* Optimized by Orthogonal Design

ZHANG Qi-feng et al (Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective] The aim was to screen the optimum SSR-PCR reaction system for *M. oryzae* in terms of 5 factors (Taq DNA polymerase, Mg²⁺, DNA template, dNTP and primer) from 4 levels and the optimum level of each reaction factor were screened. The optimum annealing temperature was screened by annealing temperature gradient experiment. [Result] The optimum SSR-PCR reaction system for *M. oryzae* was as follows: the total volume was 20 μl, including 1.0 U Taq DNA polymerase, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 100 ng DNA, 50 μmol/L dNTP, 0.4 μmol/L primer (ms355-356), and the optimum annealing temperature was 58.5 °C. Under the system, a clear target band about 300 bp was amplified from *M. oryzae* genome DNA, which showed that the system was stable and was suitable for the SSR marker of *M. oryzae* genome DNA. [Conclusion] The research laid the foundation for the molecular marker and genetic diversity of *M. oryzae* and molecular breeding.

Key words *Magnaporthe oryzae*; SSR-PCR; System optimization

稻瘟病是水稻产区危害较严重的病害之一, 每年都造成很大的损失。我国南北稻区每年都有该病发生, 其为害程度因品种、栽培技术以及气候条件不同而有差别, 病害流行年份一般减产 10%~20%, 严重的达 40%~50%^[1]。微卫星(SSR)是新一代的分子标记^[2-5], 它不仅数量丰富、多态性高, 而且只需用常规的方法进行检测, 操作简便, 结果可靠^[6]。目前, SSR 标记在大麦、水稻、玉米、拟南芥等植物中有较多应用, 但在病原真菌中的应用报道较少。由于 SSR 分子标记技术主要是 PCR 技术, 同样易受多种因素的影响。在其他物种的相关研究中, 采用正交法优化^[7] SSR-PCR 条件, 能够迅速获得满意的试验结果^[8]。该试验用 Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、模板 DNA、dNTP、引物 5 种因素 4 种不同浓度, 对稻瘟病菌 SSR 反应体系及退火温度进行研究, 为稻瘟病菌的分子标记、遗传多样性研究和分子育种奠定基础。

1 材料与方

1.1 供试材料 供试稻瘟病菌为黑龙江八一农垦大学植物病理研究室保存菌株; Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 Marker 均购自大连宝生物工程有限公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物编号 ms355~356(5'-AACCTCCGTGCAC-CITAG-3', 5'-GCTTCTCTCGCTTGCTGT-3'), 该标记与稻瘟病菌无毒基因 *Avr-pit* 紧密连锁, 片段长度 292 bp, *T_m* 值 55。

1.2 DNA 的提取 采用 SDS-CTAB 提取法^[6]。取 25 mg 研磨好的菌丝样品加入 500 μl 提取液, 再加入 50 μl 10% SDS(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L ED-

TA), 振荡混匀, 然后将离心管置于电热恒温水浴锅内 37 °C 水浴 1 h, 每管加入 5 mol/L NaCl 溶液 75 μl, 再加入 65 μl CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB、0.7 mol/L NaCl), 缓慢混匀, 65 °C 水浴 20 min, 然后冷却至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 剧烈摇动 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液移入新管中, 加入等体积的异丙醇, -20 °C 放置 3~5 h, 12 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 用 70% 无水乙醇洗沉淀, 去除其中的金属离子, 室温干燥, 溶于 70 μl TE Buffer 中, 用紫外分光光度计检测样品 DNA 浓度, 通过计算, 稀释到终浓度为 50 ng/μl, 备用。

1.3 SSR-PCR 反应因素水平的确定与正交表的设计 为了确定 PCR 反应中 5 个因素(Taq DNA 酶、dNTP、Mg²⁺、模板 DNA、引物)的最佳水平, 采用正交设计 L₁₆(4⁵) 在 4 个水平上进行试验。参加 PCR 反应的因素水平见表 1, L₁₆(4⁵) 设计方案见表 2。试验设 2 次重复^[9]。

表 1 SSR-PCR 体系的因素水平
Table 1 Factors levels of SSR-PCR system

水平 Levels	Taq DNA 聚合酶//U Taq DNA enzyme	Mg ²⁺ mmol/L	模板 DNA//ng Template DNA	dNTP μmol/L	Primer μmol/L
1	0.5	1.0	25	50	0.2
2	1.0	1.5	50	75	0.4
3	1.5	2.0	75	100	0.6
4	2.0	2.5	100	125	0.8

1.4 SSR-PCR 扩增反应体系 PCR 扩增采用 20 μl 的反应体系, 按表 2 分别加入各样品, 无菌超纯水补足体积至 20 μl, 15 μl 矿物油覆盖。

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 45~60 °C (按特定引物特定温度) 退火 50 s; 72 °C 延伸 1 min; 共循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。取扩增产物 5 μl 加

基金项目 黑龙江省科技攻关项目 (GB06B105-2); 黑龙江省农垦总局科技攻关项目 (HNKXIV-01-04-02)。

作者简介 张崎峰(1983-), 男, 黑龙江鹤岗人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。* 通讯作者, 教授, E-mail: jxhbyndzky@yahoo.com.cn。

收稿日期 2009-04-10

Lording Buffer 进行上样,采用 DYY-6c 型电泳仪,2% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶中加入 5 μl 的 EB 替代物(GoldViewTM),电泳时电压 120 V,时间 30 min,然后用紫外凝胶成像系统(BIO-PRO 200E)观察、拍照。

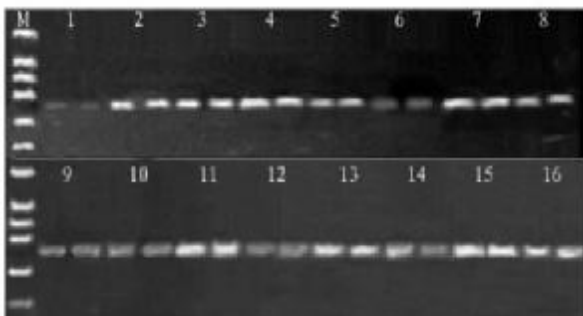
表 2 SSR-PCR 反应的 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计

Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for SSR-PCR response

序号 Serial NO.	Taq DNA 聚合酶//U Taq DNA enzyme	Mg ²⁺ mmol/L	模板 DNA//ng Template DNA	dNTP $\mu\text{mol/L}$	Primer $\mu\text{mol/L}$
1	0.5	1.0	25	50	0.2
2	0.5	1.5	50	75	0.4
3	0.5	2.0	75	100	0.6
4	0.5	2.5	100	125	0.8
5	1.0	1.0	50	100	0.8
6	1.0	1.5	25	125	0.6
7	1.0	2.0	100	50	0.4
8	1.0	2.5	75	75	0.2
9	1.5	1.0	75	125	0.4
10	1.5	1.5	100	100	0.2
11	1.5	2.0	25	75	0.8
12	1.5	2.5	50	50	0.6
13	2.0	1.0	100	75	0.6
14	2.0	1.5	75	50	0.8
15	2.0	2.0	50	125	0.2
16	2.0	2.5	25	100	0.4

2 结果与分析

2.1 稻瘟菌 SSR-PCR 反应的优化体系 按表 1 设计的 16 个处理进行 PCR 反应后,将得到的产物进行电泳,结果见图 1。从图 1 可以看出,在 16 个处理组合中由于 Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、模板 DNA、dNTP 和引物 5 个因素浓度组合的不同,扩增的效果存在明显的差异。其中第 1、6、9、10、12、14 组合均扩增产物模糊、带微弱,不易观察;其他组合均扩增出较为清晰的条带,但相对而言 4、7、11、13、15 组合扩增的条带更加清晰。为了扩增出清晰度高、稳定性强的条带,从经济角度看,试验选用第 7 组合用于稻瘟病菌的 SSR-PCR 反应,即在 20 μl 反应体系中各成分的最佳浓度为模板 DNA 100 ng, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, dNTP 50 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。



注:1~16 为处理组合编号;M 为标准分子量 DL2000。

Note:1~16 are the treatment combination number respectively.

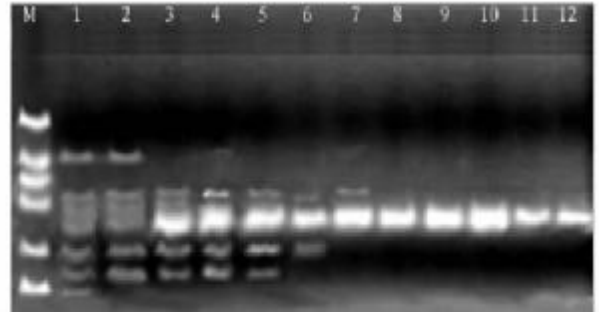
M. DL2000 is standard molecular weight.

图 1 SSR-PCR 正交设计试验电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of SSR-PCR orthogonal design

2.2 PCR 退火温度的选择 在 PCR 反应中,每对引物都有其最适宜的退火温度,退火温度的高低直接影响引物与模板 DNA 的特异性结合。应用上述最佳因素水平,利用 BIO-RAD PTC-200 扩增仪进行 PCR 反应程序中退火温度梯度试

验。设置退火温度为 45.0~60.0 $^{\circ}\text{C}$,扩增仪自动生成 12 个梯度,对所得 PCR 产物进行电泳检测,结果见图 2。结果表明,在不同的退火温度下均可扩增出条带,退火温度低时,非特异性扩增条带较多;退火温度过高时,条带较暗。从图 2 可明显看出第 10 泳道扩增条带比较亮,因此,该引物的最适退火温度确定为 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 。



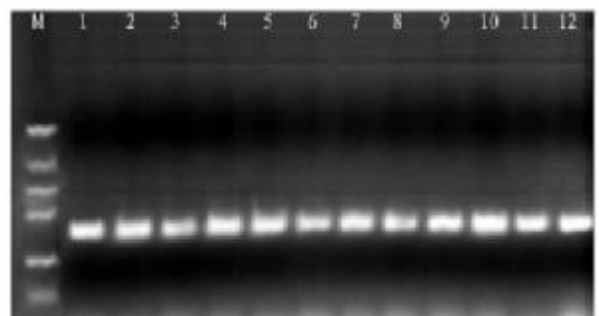
注:1~12 依次表示退火温度为:45.0、45.8、46.8、48.2、50.2、52.1、53.6、55.4、57.3、58.5、59.4、60.0 $^{\circ}\text{C}$;M 为标准分子量 DL2000。

Note:1~12 represent the annealing temperature of 45.0,45.8,46.8,48.2,50.2,52.1,53.6,55.4,57.3,58.5,59.4,60.0 $^{\circ}\text{C}$; respectively; M. standard molecular weight DL2000.

图 2 SSR-PCR 反应体系在梯度退火温度下的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of annealing temperature on SSR-PCR reaction system

2.3 SSR-PCR 最佳反应体系的稳定性检验 应用上述最佳反应体系,用引物 ms355~356 对 12 份来自不同地区并且已知含有无毒基因 *Avr-pit* 的稻瘟菌 DNA 进行 SSR-PCR 扩增,结果见图 3。引物对稻瘟菌材料基因组 DNA 样品均在 300 bp 左右扩增出清晰的目的条带,说明该体系稳定,适用



注:M 为标准分子量(DL2000);1. TLJQ-1 铁力市;2. TJQJ-4 同江县;3. JMSA-2 佳木斯市;4. NCKZ-2 密山市;5. TJQE-3 同江县;6. HGDH-6 鹤岗市;7. FJJQ-1 富锦市;8. HLSZ-3 呼兰县;9. LB-JB-2 萝北县;10. MLLH-3 木兰县;11. SBNL-1 绥滨县;12. YLSY-3 依兰县。

Note: M. standard molecular weight (DL2000); 1 TLJQ-1 Tieli City; 2. TJQJ-4 Tongjiang Country; 3. JMSA-2 Jiamusi City; 4. NCKZ-2 Mishan City; 5. TJQE-3 Tongjiang Country; 6. HGDH-6 Hegang City; 7. FJJQ-1 Fujin City; 8. HLSZ-3 Hulan Country; 9. LB-JB-2 Luobei Country; 10. MLLH-3 Mulan Country; 11. SBNL-1 Suibin Country; 12. YLSY-3 Yilan Country.

图 3 应用最佳反应体系对稻瘟菌不同菌株基因组 DNA 的 SSR-PCR 扩增结果

Fig. 3 SSR-PCR amplification results of different *Magnaporthe oryzae* DNA by the optimal reaction system

于稻瘟菌基因组 DNA 的 SSR 标记。

3 讨论

PCR 反应的扩增效率是反应体系中各因素综合作用的结果。*Taq* DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 浓度对反应的影响较大。*Taq* DNA 聚合酶的用量太低时 PCR 反应不能进行,浓度太高又会产生非特异性扩增,高浓度的游离 Mg^{2+} 可以提高 *Taq* DNA 聚合酶的活性,同时也会降低扩增的忠实性,使非特异性条带增多。dNTP 浓度过低影响扩增效率,浓度过高将与 *Taq* DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} ,影响游离 Mg^{2+} 浓度,降低酶活性。引物的质量和特异性也直接影响 PCR 扩增反应,引物浓度过高会促进非特异性扩增,还会增加引物二聚体的形成。与郑丽珊等所优化其他物种的 SSR 反应体系^[10-12]相比较,该试验所获得的稻瘟病菌的 SSR 体系中,*Taq* DNA 聚合酶的用量稍高; Mg^{2+} 的用量浮动不大;dNTP 和引物的用量较少;相对而言,模板 DNA 适宜范围较宽。退火温度高低对扩增效果也有较大影响,温度太低时,扩增量小,电泳检测条带没有或不清晰;温度过高则扩增量减少,甚至有可能导致无扩增产物;适宜的温度能够提高 PCR 反应的特异性。因此,退火温度的梯度试验是有必要的。

PCR 反应是 SSR 检测过程中的一个重要环节,其扩增效果是反应体系中各因素综合作用的结果^[13]。单因素设计法^[14]是变化其中 1 个因素的用量而固定其他各因素,逐一变化各因素,然后得到各因素的最佳浓度,最后组合成最佳反应体系。然而 SSR 反应体系所含组分比较多,各组分均可能对扩增的敏感性、特异性和产量产生影响,所以这种方法忽略了各因素的交互作用。完全组合设计法虽然能够考虑到

各因素的相互作用,但是试验量相当大^[15],人力和物力消耗也较大;相比较而言,多因素联合优化的正交试验设计法效率高,进展快,节省了人力和物力。

参考文献

- [1] 靳学慧,马汇泉. 农业植物病理学[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1999.
- [2] 曾莉娟,郑成木. SSR 技术及其应用[J]. 热带农业科学,2001(3):56-59.
- [3] 万平,刘大钧. SSR 标记与植物遗传育种研究[J]. 安徽农业大学学报,1998,25(1):92-95.
- [4] 李汝玉. 简单重复序列(SSR)及其在农作物研究中的应用[J]. 山东农业科学,1999(4):45-49.
- [5] AIL S, MULLER S R, EPPLER R W. DNA fingerprinting by oilgo nucleotide probes specific for simple sequence repeat[J]. Human Genet, 1986, 74:239-243.
- [6] HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation[J]. Mycosystema, 2000, 19(3):434.
- [7] 张春华,周永志,阎隐,等. 数理统计方法[M]. 济南:山东大学出版社,1992:151.
- [8] 王彦华,侯喜林,徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 899-902.
- [9] 杨水云,李续娥,吴明宇,等. 正交试验法在 PCR 反应条件优化中的应用[J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 202-206.
- [10] 郑丽珊,王静毅,冀小蕊,等. 香蕉 SSR 反应体系的优化[J]. 热带农业科学, 2007, 27(2): 14-17.
- [11] 李亚利,陈书霞,孟焕文,等. 利用正交设计优化黄瓜的 SSR-PCR 反应体系[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 280-284.
- [12] 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(2): 23-26.
- [13] 姜同川. 正交试验设计[M]. 济南:山东科学技术出版社,1985:71.
- [14] 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.
- [15] 孙伟. 正交设计微卫星 PCR 扩增条件的探讨[J]. 草食家畜, 2001(2): 4-5.

(上接第 10425 页)

2.6 优化的 ISSR-PCR 反应体系 综合上述试验结果,得到优化的反应体系:总体积 20 μ l 中含有 DNA 模板 60 ng、PCR 缓冲液 10 \times buffer 为 2.0 μ l,底物 dNTP 终浓度为 0.25

mmol/L,引物终浓度为 0.3 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。经过优化的大叶栎扩增的体系能够扩增出清晰、多态性高的条带(图 6),能够满足大叶栎种群 ISSR 多样性分析的要求。

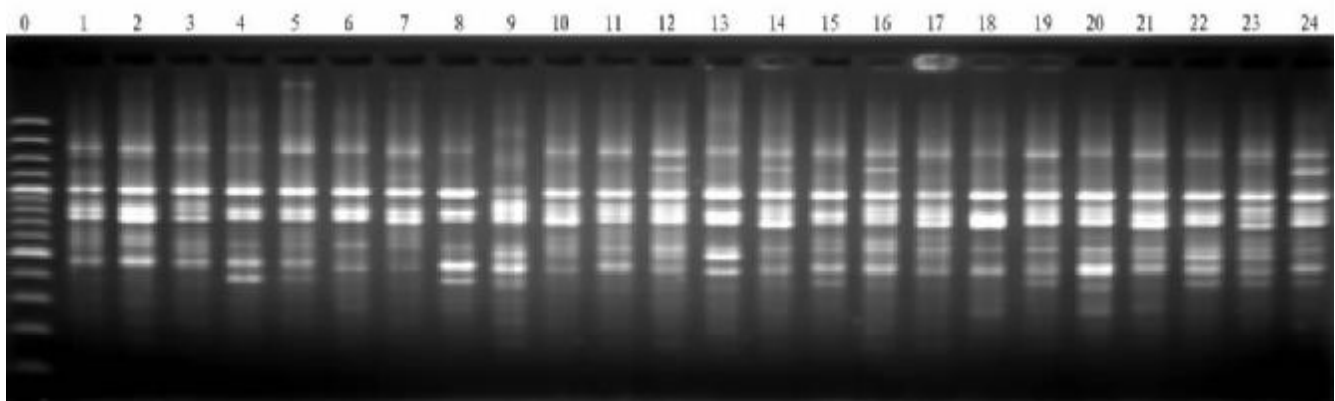


图 6 引物 UBC-857 扩增图谱

Fig. 6 Primer UBC-857 ISSR-PCR pattern

参考文献

- [1] 苏小青. 不同演替阶段中黎蒴栲种群的大小结构与分布格局[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 499-504.
- [2] 广西林业勘测设计院, 苍梧县林业局. 苍梧县短轮伐期工业原料林成熟龄调查研究报告[Z]. 2000.
- [3] 詹怀宇,岳保珍,张旭坊,等. 黎蒴栲纤维形态及制浆漂白性能的研究

- [J]. 广东造纸, 1998(2): 1-4.
- [4] 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.
- [5] 丁晓东,吕新新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 142-145.