

桃 SSR 反应体系的优化

李银霞 李天红

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 以‘新大久保’桃为试材,利用正交设计直观分析法和 2 因素完全随机试验优化了桃 SSR 技术中 PCR 反应体系。试验结果表明,适宜桃遗传分析的 SSR 技术体系为:在 25 μ L 反应体系中 Taq DNA 聚合酶和 DNA 最适用量分别为 1 U 和 50~100 ng; Mg^{2+} 、dNTP 和引物最适浓度分别为 1.5~2.0 mmol/L、0.20~0.28 mmol/L 和 0.2~0.6 μ mol/L。利用 30 个桃品种验证此反应体系,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果显示,扩增产物在 100~300 bp,多态性高,且反应体系的稳定性和可重复性好。

关键词 桃; SSR; 体系优化; 正交直观分析法; 完全随机试验

中图分类号 S 662.1; S 603.6

文章编号 1007-4333(2005)06-0057-05

文献标识码 A

Optimization of SSR reaction system of peach

Li Yinxia, Li Tianhong

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract ‘Shinokubo’ peach (*Prunus persica* (L.) Batsch.) was used to set up a SSR-PCR amplification system for peach. The results showed that the optimal SSR-PCR reaction system for peach was 1.5—2.0 mmol/L Mg^{2+} concentration, 0.20—0.28 mmol/L dNTP, 0.2—0.6 μ mol/L primer, 50—100 ng DNA and 1 U in 25 μ L Taq DNA polymerase. To retest the above SSR system, 30 cultivars of peach were used. SSR fragments between 100—300 bp were detected by polyacrylamide gel (8%), indicating that the SSR reaction system was steady and reproducible.

Key words peach; simple sequence repeats; system optimization; orthogonal design; direct analysis; completely randomized design

SSR (simple sequence repeats) 即简单序列重复, 又称微卫星 DNA (microsatellite DNA), 是由少数几个核苷酸(一般为 1~6 个)为单元多次串联重复的 DNA 序列^[1], 其长度大多在 300 bp 以内。微卫星 DNA 广泛分布在真核生物的基因组中, 并在两侧都有物种特异性的侧翼序列, 鉴于基序的重复次数变化很大, 因此, SSR 与其他 DNA 标记相比具有更高的多态性^[2]。根据两侧的保守序列设计引物, 通过 PCR 扩增和对扩增产物的有效检测, 可获得丰富的等位基因多态性, 从而可以在 DNA 水平上检测物种的遗传多样性^[3]。近年来, SSR 迅速应用于人类、哺乳动物和植物基因组研究中, 在多种果树上如苹果、葡萄、柑橘、桃和果梅上均有利用 SSR 进行种

质资源研究的报告^[4-8]。在众多果树当中, 桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch.) 基因组最小, 结构简单 ($2n = 16$), 自交亲合性高, 单基因控制的质量性状多, 现有品种中基因的非加性效应小, 已成为鉴定和分离核果类果树重要农艺性状基因的模式植物^[9]。因其遗传基础比较狭窄, 是该属植物中遗传多样性最低的一种果树, 而 SSR 以其多态性高, 稳定性、重复性好, 能较好地反映物种的遗传结构和遗传多样性等优点, 成为评价像桃这样遗传多样性较低物种的一种有效工具^[10]。

利用 SSR 技术对植物基因组研究时都应对该物种的 SSR 反应体系进行优化, 以建立一套适宜该物种的 SSR 技术体系。目前 SSR 技术虽然已用于

收稿日期: 2005-09-14

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2004035080)

作者简介: 李银霞, 硕士研究生; 李天红, 副教授, 通讯作者, 主要从事果树种质资源利用研究, E-mail: lth123430@sohu.com

桃遗传多样性分析、品种鉴别和亲缘关系鉴定的研究^[11-13],但有关标准化的、高效的桃 SSR 反应体系及其优化方法的研究尚未见报道。本研究利用正交设计直观分析法^[14]结合较少因素的完全随机试验,旨在优化并建立适宜桃遗传分析的高效稳定的 SSR 技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的 30 个桃品种 (*Prunus persica* (L.) Batsch.) 均取自北京市农林科学院林业果树研究所国家桃种质资源圃。取健康植株一年生枝条上刚展开的嫩叶,液氮处理后置于 -80℃ 待用。

1.2 研究方法

1) DNA 提取。取 0.5 g 叶片在液氮中研磨成粉末,桃叶片基因组 DNA 提取参照 CTAB 法,稍加改进。利用紫外分光光度计 (Q/OAGO-97,上海天美科学仪器有限公司) 及 1 g/100 mL 的琼脂糖凝胶电泳法检测所提取的 DNA 浓度和质量。

2) SSR-PCR 扩增体系优化。以‘新大久保’桃 (*P. persica* (L.) Batsch. cv. Shinokubo) 为试材,采用 Cipriani 等^[15]设计的 UDP97-402 引物:

PI 5 TCCCA TAACCAAAAAAAAAACACC 3 和

P2 5 TGGAGAA GGGTGGTACTTG 3 ,

北京三博远志生物技术有限公司合成。

优化 SSR-PCR 扩增体系首先选用 $L_9(3^4)$ 正交表,进行 4 因素 (Taq DNA 聚合酶, dNTP, 引物, Mg^{2+}) 3 水平的正交试验^[16]共 9 个组合 (表 1)。依

表 1 PCR 正交试验设计表 [$L_9(3^4)$]

组合号	PCR 反应组			
	Taq DNA 聚合酶用量/ U	dNTP 浓度/ (mmol/L)	引物浓度/ (μ mol/L)	Mg^{2+} 浓度/ (mmol/L)
1	0.5	0.16	0.2	1.0
2	0.5	0.20	0.4	1.5
3	0.5	0.24	0.6	2.0
4	1.0	0.16	0.4	2.0
5	1.0	0.20	0.6	1.0
6	1.0	0.24	0.2	1.5
7	1.5	0.16	0.6	1.5
8	1.5	0.20	0.2	2.0
9	1.5	0.24	0.4	1.0

照扩增条带的敏感性与特异性即条带强弱及杂带多少做 1~9 计分,分数越高,表示敏感性、特异性越好。参照张春华等^[14]方法进行数据处理以识别反应体系中关键影响因素;再设计二组 2 因素 4 水平完全随机试验 (表 3、4),逐个优化其他反应成分终浓度水平,以确定相对较优的因素组合。PCR 扩增所用试剂均购自北京天为时代科技有限公司。

3) SSR-PCR 扩增及检测。PCR 反应采用 PTC-100 基因扩增仪 (MJ Research, Inc. USA)。反应程序:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,48.2℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共 35 个循环;72℃ 延伸 8 min。扩增产物用测序胶 (8.0 g/100 mL 变性聚丙烯酰胺) 分离,快速银染检测。

4) SSR 反应体系的验证。利用 30 个桃品种对构建的 SSR-PCR 反应体系进行验证,方法同前。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果

利用优化 CTAB 法提取不同品种类群的 6 个桃品种基因组 DNA 的检测结果如表 2 所示, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.82~1.89 之间, DNA 质量浓度为 227.27~460.92 μ g/mL,纯度和产量均较高。琼脂糖检测 DNA 条带清晰且没有降解 (图 1),说明提取的 DNA 质量高,完整性好,可用于 SSR 分析。

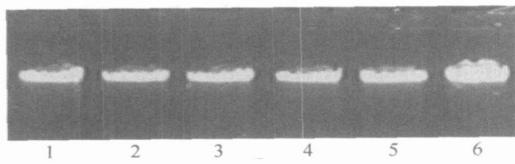
表 2 6 个不同桃品种 DNA 质量浓度与 OD_{260}/OD_{280} 值

Table 2 DNA concentration and OD_{260}/OD_{280} of different peach cultivars

品 种	DNA 质量浓度/ (μ g/mL)	OD_{260}/OD_{280}
西伯利亚 C	297.52	1.82
深州红蜜	261.41	1.89
瑞蟠 2 号	246.54	1.89
扬州早甜桃	227.27	1.89
维纳斯	305.02	1.87
内克特罗斯	460.92	1.88

2.2 利用正交设计和完全随机试验优化桃 SSR 反应体系

1) 正交直观分析确定关键影响因素。‘新大久保’桃正交试验各组合 (表 2) 及 SSR 扩增效果如图 2 所示,依照条带强弱及杂带多少为 1~9 泳道评分为 1、3、7、9、8、4、5、6 和 2。参照张春华等^[14]方法简



1. 西伯利亚 C; 2. 深州红蜜桃; 3. 瑞蟠 2 号; 4. 扬州早甜桃; 5. 维纳斯; 6. 内克特罗斯
图 1 6 个桃品种 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 DNA electrophoresis of different peach cultivars

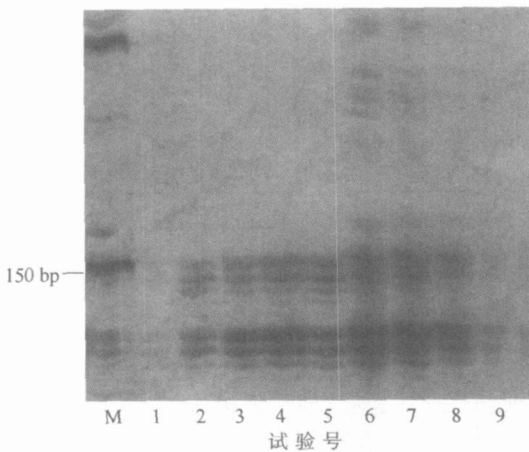


图 2 ‘新大久保’桃 PCR 反应组分正交试验设计 [L₉(3⁴)] 及电泳检测结果

Fig. 2 Orthogonal design of PCR reaction components [L₉(3⁴)] and electrophoresis results of ‘Shinokubo’ peach

易计算,组合 4 为此正交试验所获得的最佳反应条件,其次为组合 5。在 4、5 组合中 Taq DNA 聚合酶用量均为 1 U,而 Mg²⁺、dNTP 和引物浓度均处于不同水平。在‘燕红’、‘仓方早生’等品种上利用此正交试验也获得相似结果(结果未列出)。表明 Taq DNA 聚合酶为影响桃 SSR-PCR 反应的关键因素,当其用量为 1 U 时 SSR 的扩增效果较好,而其他反应成分的终浓度水平尚需进一步研究。

2) 完全随机试验筛选最适 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度。利用 2 因素 4 水平完全随机试验设计优化 PCR 反应体系中 Mg²⁺ 和 dNTP 终浓度,因素水平设计见表 3,扩增结果如图 3 所示,在 Taq DNA 聚合酶为 1.0 U 反应体系中,Mg²⁺ 浓度对 SSR 反应影响较大,随着 Mg²⁺ 浓度的增大扩增逐渐增强,Mg²⁺ 浓度为 1.0 mmol/L 时几乎无扩增产物;浓度为 1.5 ~ 2.0 mmol/L 时条带比较清晰,扩增效果较好;当浓度达到 2.5 mmol/L 时扩增的特异性降低,条带产生弥散现象。表明 Mg²⁺ 终浓度应以 1.5 ~ 2.0 mmol/L 为宜。dNTP 浓度为 0.16 mmol/L 时扩增较弱,浓度在 0.20 ~ 0.28 mmol/L 扩增效果较好。

表 3 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度 2 因素 4 水平完全随机设计(‘新大久保’桃)

Table 3 Completely randomized design of two factors and four levels on concentrations of Mg²⁺ and dNTP (*P. persica* (L.) Batsch. cv. Shinokubo)

组合号	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol/L)	dNTR 浓度/ (mmol/L)	试验号	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol/L)	dNTR 浓度/ (mmol/L)
1	1.0	0.16	9	2.0	0.16
2	1.0	0.20	10	2.0	0.20
3	1.0	0.24	11	2.0	0.24
4	1.0	0.28	12	2.0	0.28
5	1.5	0.16	13	2.5	0.16
6	1.5	0.20	14	2.5	0.20
7	1.5	0.24	15	2.5	0.24
8	1.5	0.28	16	2.5	0.28

3) 完全随机试验筛选最适引物浓度和 DNA 用量。进一步利用 2 因素 4 水平完全随机试验设计优化引物终浓度和 DNA 用量(表 4)。在 25 μL 的反应体系中,引物终浓度在 0.8 μmol/L 时扩增条带弥

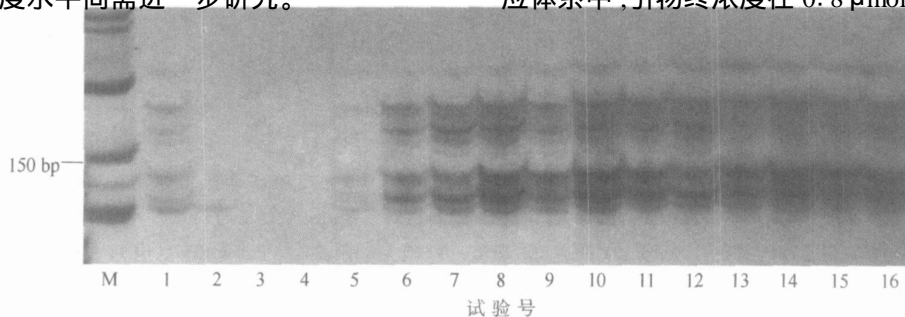


图 3 ‘新大久保’桃 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度试验的 SSR 反应

Fig. 3 Effects of different concentrations of Mg²⁺ and dNTP on SSR of ‘Shinokubo’ peach

散、模糊不清,而在 0.2~0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增条带清晰,特异性好,为适宜的引物浓度(图 4)。在相同引物浓度下,模板 DNA 的用量少于 20 ng 时扩增产物相对较弱,而在 50~100 ng 时扩增较强,特异性好,均适合 SSR 扩增反应。

2.3 SSR 反应体系的验证

利用优化后的 25 μL SSR 反应体系: Taq DNA 聚合酶 1 U; DNA 用量 50 ng; 其他成分终浓度为 Mg^{2+} 1.5 mmol/L; dNTP 0.20 mmol/L; 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 对 30 个桃品种进行 SSR 扩增,检测结果如图 5 所示: 条带清晰,不仅扩增强,而且特异性高; 同时反应体系具有较好稳定性和可重复性。表明利用优化后的反应体系能够有效地对不同桃品种基因组进行 SSR 扩增,该反应体系实用性强。

表 4 引物浓度和 DNA 2 因素 4 水平完全随机设计 ('新大久保' 桃)

Table 4 Completely randomized design of two factors and four levels on primer and DNA (*P. persica* (L.) Batsch. cv. Shinokubo)

组合号	引物浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	DNA 用 量/ng	组合号	引物浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	DNA 用 量/ng
1	0.2	20	9	0.6	20
2	0.2	50	10	0.6	50
3	0.2	80	11	0.6	80
4	0.2	100	12	0.6	100
5	0.4	20	13	0.8	20
6	0.4	50	14	0.8	50
7	0.4	80	15	0.8	80
8	0.4	100	16	0.8	100

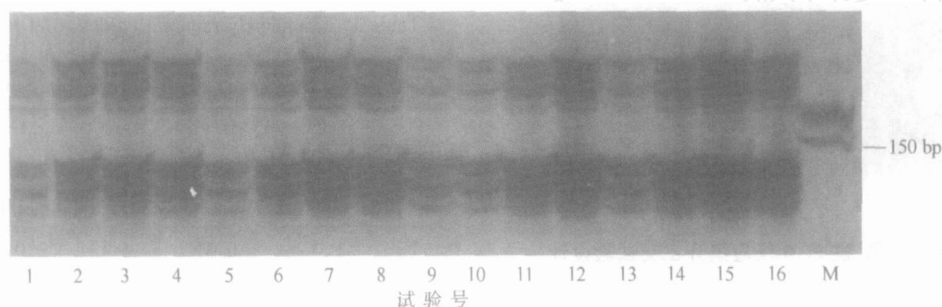
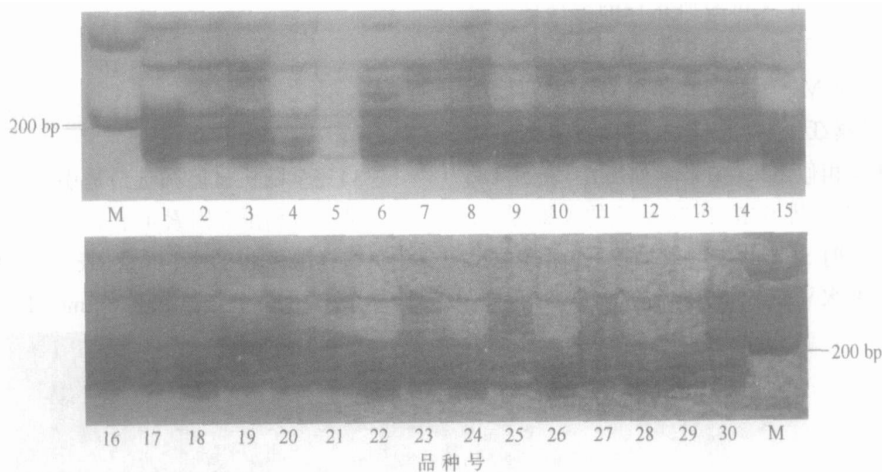


图 4 '新大久保' 桃引物和 DNA 用量试验的 SSR 反应

Fig. 4 Effects of different concentrations of primer and dosage of DNA on SSR of 'Shinokubo' peach



桃品种为: 1. 秋蜜; 2. 寒露蜜; 3. 连黄; 4. 金皇后; 5. 兴津油桃; 6. 曙光; 7. 砂子早生; 8. 朝霞; 9. 春时; 10. 白凤; 11. 大久保; 12. 都白凤; 13. 爱保太; 14. 陈圃蟠桃; 15. 京春; 16. 瑞蟠 2 号; 17. 内克特罗斯; 18. NJ257; 19. 扬州早甜桃; 20. 京玉; 21. 顶香; 22. 瑞光 7 号; 23. 晖雨露; 24. 早生水蜜; 25. 冈山 11 号; 26. 六月白; 27. 深州水蜜; 28. 肥城 17 号; 29. 五月火; 30. 北农 2 号

图 5 30 个桃品种 SSR 扩增产物

Fig. 5 DNA bands of 30 cultivars of peach in SSR analysis system

3 讨论

由于 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。因此,实行多因素联合优化的正交试验设计,借助合适的正交表,利用正交表的均衡分散性和整齐可比性,可有效地解决理论上需要进行的试验次数与实际可行的试验次数的矛盾以及实际所做的有限量试验与要求全面掌握事物内在规律之间的矛盾^[17]。孙伟^[18]利用正交设计研究 SSR-PCR 扩增条件时提出,由于试验的影响因素多,在一次正交试验中不可能研究全部因素,可先找出主次、先后矛盾,分批进行。因此,本试验首先利用正交设计识别了 SSR 反应体系中的关键影响因素并确定其最适用量,再结合较少因素的完全随机试验逐步筛选其他成分的最佳终浓度水平。若利用完全随机试验一次性优化 PCR 反应中 5 个主要成分,使用较少的水平数如 3 个水平,需要处理数为 $3^5 = 243$ 个,而本试验利用 4 因素 3 水平正交设计有 9 个处理,加上 2 组 2 因素 4 水平的完全随机试验 32 个处理,共计 41 个处理,即达到了应用较少的试验因素及水平逐步优化各个条件的目的,大大降低了试验工作量。30 个桃品种的验证试验也表明,该 SSR 反应体系敏感度高,特异性强,稳定和可重复性好(图 5)。

4 结论

1) 利用正交设计结合两因素的完全随机试验设计优化桃 SSR 反应体系是一种有效、适用而且简便的方法,能较好地识别 SSR 反应体系中的关键影响因素,并优化反应条件。

2) 本研究构建的适宜桃遗传分析的 SSR 技术体系为:在 25 μ L 反应体系中 Taq DNA 聚合酶和 DNA 最适用量分别为 1 U 和 50 ~ 100 ng; Mg^{2+} 、dNTP 和引物最适终浓度分别为 1.5 ~ 2.0 mmol/L、0.20 ~ 0.28 mmol/L 和 0.2 ~ 0.6 μ mol/L。

北京市农林科学院林业果树研究所国家桃种质资源圃提供试验所需材料,谨致谢意!

参 考 文 献

[1] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20: 42~47
 [2] Cho Y G, Ishii T, Temnykh S, et al. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and Genbank

sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 713~722
 [3] 宋国华,刘田福,张建红,等. 微卫星 DNA 分子标记及其在实验动物遗传分析中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35: 381~383
 [4] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for genetic analysis of apple [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1069~1076
 [5] Sefc K M, Regner F, Glors J, et al. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers [J]. Vitis, 1998, 37: 15~20
 [6] Carlos R, Breto M P, Asins M J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus programs using SSR markers [J]. Euphytica, 2000, 112: 89~94
 [7] Aranzana M J, Vicente de M C, Arus P, et al. Comparison of fruit and leaf DNA extracts for AFLP and SSR analysis in peach [J]. Acta Hort, 2001, 546: 297~300
 [8] 高志红,章镇,韩振海. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25: 19~22
 [9] Baid W V, Ballard R E, Rajapakse S, et al. Progress in *Prunus* mapping and application of molecular markers to germplasm improvement [J]. HortScience, 1996, 31: 1099~1106
 [10] Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, et al. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 127~138
 [11] Aranzana M J, Carbo J, Arus P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1341~1352
 [12] Foulongne M, Minier J, Pascal T, et al. Genetic relationship between peach (*Prunus persica* (L.) Batsch.) and closely related wild species using SSR markers [J]. Acta Hort, 2004, 663: 629~633
 [13] 俞明亮,马瑞娟,许建兰,等. 桃种间亲缘关系的 SSR 鉴定[J]. 果树学报, 2004, 21: 106~112
 [14] 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
 [15] Cipriani G, Lot G, Huang W G, et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus* [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 65~72
 [16] 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: 403~404
 [17] 姜同川. 正交试验设计[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1985. 1~71
 [18] 孙伟. 正交设计微卫星 PCR 扩增条件的探讨[J]. 草食家畜, 2001, 21: 4~5