

中国李简单重复序列 (SSR) 反应体系的建立

乔玉山¹ 章 镇^{1,*} 沈志军¹ 房经贵¹ 郭 洪²

¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014

Establishment of Simple Sequence Repeat Reaction System in *Prunus salicina*

QIAO Yu-Shan¹, ZHANG Zhen^{1,*}, SHEN Zhi-Jun¹, FANG Jing-Gui¹, GUO Hong²

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Research Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014

摘要 探讨中国李品种美丽李 (*Prunus salicina* ‘Beauty’) 简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 反应体系中5种主要成分浓度对反应产物的影响。结果表明, 引物对中国李有通用性, 25 μL SSR反应体系中, *Taq* DNA酶、Mg²⁺、每个引物、模板DNA和dNTPs等5种成分的适宜浓度分别是: 1.5 U、2.0 mmol·L⁻¹、0.8 μmol·L⁻¹、30~40 ng和0.16~0.24 mmol·L⁻¹。

关键词 中国李; SSR; 反应体系

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 又称为微卫星DNA, 是一类由1~6个碱基组成的基序 (motif) 串联重复而成的DNA序列。如: (GA)_n、(CT)_n、(GAC)_n、(GATA)_n等重复, 其中n代表重复次数, n值大小在10~60之间^[1~3]。根据微卫星DNA两端序列多是相对保守序列原理设计一对特异性引物, 采用PCR技术扩增每个位点微卫星DNA序列, 再通过电泳分析核心序列长度的多态性, 即为SSR多态性标记。SSR标记多态性百分率高, 重复性好。一般检测到的是一个单一的复等位基因位点, 且呈共显性, 因此作为一种遗传标记在植物遗传育种领域有广阔的应用前景。

SSR分子标记在遗传育种中应用的基础是引物的开发, 但开发SSR引物需要建立基因组DNA文库, 从中克隆测序^[1~3], 这需要一定的时间和经费。迄今利用相近物种中已开发的引物应用到另一物种的报道已很多^[4~11], 这说明植物近缘种能共享部分引物。核果类果树均属李属 (*Prunus*) 植物, 已有关于桃 (*P. persica*) SSR引物用于其他李属果树的报道^[5~11], 如杏 (*P. armeniaca*)^[5,8,10]、甜樱桃 (*P. avium*)^[7,10]、酸樱桃 (*P. cerasus*)^[7,8~10]、*P. serotina*^[9]、中国李 (*P. salicina*)^[10]、欧洲李 (*P. domestica*)^[7,10]、扁桃 (*P. dulcis*)^[7,10]和梅 (*P. mume*)^[11]等的报道。基于上述, 本文用桃的一对SSR引物, 试图建立中国李SSR反应体系, 以促进中国李SSR

信息资源开发和应用研究。

材料与方法

1 试材

试材为中国李品种美丽李 (*Prunus salicina* ‘Beauty’)。取春季刚萌发的幼芽, 用清水冲洗凉干后置于-70℃冰柜中贮藏。PCR扩增和电泳所用的主要试剂dNTPs、琼脂糖 (Spanish分装)、GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder Marker由南京生兴生物技术有限公司生产或提供; Promega *Taq* DNA酶、10×反应缓冲液和MgCl₂由南京冷泉港生物技术有限公司提供。引物参照桃基因组DNA微卫星位点UDP98~407设计^[10], 由上海生物工程公司合成, 序列为: P₁: 5' AGCGGCAGG-CTAAATATCAA3' 和 P₂: 5' AATCG-CCGATCA AAGCAAC3'。

2 方法

基因组DNA提取同文献12。在进行单、双引物实验中, 25 μL反应体系的组成是: 单引物实验引物浓度为1.6 μmol·L⁻¹, 双引物实验每个引物浓度均为0.8 μmol·L⁻¹, 其他成分为: 1×反应缓冲液、*Taq* DNA酶1.5 U、Mg²⁺ 2.0 mmol·L⁻¹、模板DNA 40 ng、dNTPs 0.2 mmol·L⁻¹。选

收稿 2003-04-21 修定 2003-11-21

* 通讯作者 (E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com, Tel: 025-4395266)。

SSR 反应体系中 4 种主要成分——*Taq* DNA 酶和 Mg^{2+} 、模板 DNA 和引物, 分别进行两因素 4~5 个浓度或用量水平完全组合实验, 即 25 μ L 反应体系中, *Taq* DNA 酶设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U 5 个梯度, Mg^{2+} 设置 2.0、2.5、3.0、3.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 4 个梯度, 共计 20 个处理 (其他成分为: 1 \times 反应缓冲液、模板 DNA 40 ng、双引物各为 0.8 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 、dNTPs 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$); 双引物均设置为 0.4、0.8、1.0、1.2、1.6 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 等 5 个浓度梯度, 模板 DNA 设置 20、30、40、50 ng 4 个含量梯度, 共计 20 个处理 (其他成分为: 1 \times 反应缓冲液、*Taq* DNA 酶 1.5 U、 Mg^{2+} 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 、dNTPs 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$)。在上述实验的基础上对 dNTPs 用量进行单因素实验, 设置 0.08、0.12、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32、0.36、0.40 $mmol \cdot L^{-1}$ 等 9 个处理 (其他成分为: 1 \times 反应缓冲液、*Taq* DNA 酶 1.5 U、 Mg^{2+} 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 、模板 DNA 40 ng、每个引物 0.8 $\mu mol \cdot L^{-1}$)。用 MJ Research Inc. 生产的 PTC-100™ 型 PCR 仪进行 DNA 扩增。反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 50 s、58 $^{\circ}C$ 1 min、72 $^{\circ}C$ 1 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$ 再延伸 6 min。1 \times TAE 电极缓冲液、5 $V \cdot cm^{-1}$ 、1.8% 琼脂糖凝胶电泳 60~90 min, 0.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 溴化乙锭染色, 用上海复日 FR-200 型紫外与可见光分析系统进行图象扫描。

实验结果

1 单双引物扩增产物的差异

采用近缘物种 SSR 引物扩增另一物种的微卫星 DNA 前提是扩增片段是否为简单重复序列, 这正是不同物种之间能否共享 SSR 引物关键之所

在。为确定扩增片段是否为简单重复序列, 需对扩增片段进行 Southern 杂交或克隆测序, 这样又会延长实验周期和增加实验费用。因此我们通过单双引物实验, 试图判断该引物在中国李上的通用性。从图 1 可以看出, 单个引物间以及单引物与双引物间扩增的结果差异明显, 其中一个引物无任何扩增产物, 另一个引物扩增出的片段大小约为 700 和 400 bp。这与 Cipriani 等^[10]报道的桃该微卫星位点扩增片段大小相差甚远 (该引物在桃上的扩增片段在 188~212 bp), 而用双引物可扩增出两个 150~250 bp 之间的片段, 与桃的该位点极为相近, 可能也是中国李的微卫星位点。据此, 初步判断该 SSR 引物可在中国李上通用。这一实验也提示可通过单、双引物 PCR 技术, 并参考原始物种简单重复序列的长短, 初步判断共享近缘物种的 SSR 引物时, 扩增片段是否为微卫星位点。

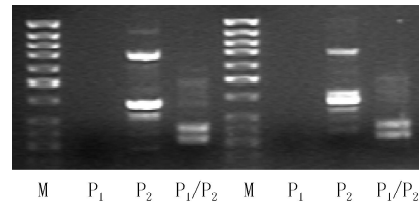


图1 单、双引物扩增片段的差异显示

P_1 、 P_2 : 单引物, P_1/P_2 : 双引物, M: 分子量标记 (从上到下分别为 1 031、900、800、700、600、500、400、300、200、150 bp)。

2 *Taq* DNA 酶与 Mg^{2+} 对 SSR 反应的影响

从图 2 中 *Taq* DNA 酶与 Mg^{2+} 浓度之间完全组合实验的结果可以看出, SSR 反应体系对 *Taq* DNA 酶用量和 Mg^{2+} 浓度对扩增反应的影响均较

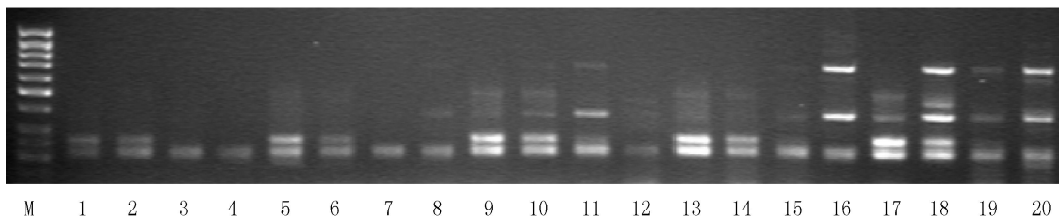


图2 *Taq* DNA 酶与 Mg^{2+} 浓度对 SSR 反应的影响

泳道 1~4、5~8、9~12、13~16、17~20: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U *Taq* DNA 酶; 泳道 1、5、9、13、17: 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$; 泳道 2、6、10、14、18: 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$; 泳道 3、7、11、15、19: 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$; 泳道 4、8、12、16、20: 3.5 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$; M: 分子量标记 (从上到下分别为 1 031、900、800、700、600、500、400、300、200、150 bp)。

大。*Taq* DNA 酶用量在 0.5 U 时扩增产物较弱, 随着用量的增加, 扩增产物渐强且非特异性扩增增多。不论 *Taq* DNA 酶的用量如何, 实验设置的 4 个 Mg^{2+} 浓度的微卫星位点扩增结果一致, 即 Mg^{2+} 浓度在 2.0 和 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 150~250 bp 大小的扩增片段均为 2 条, Mg^{2+} 在 3.0 和 3.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 150~250 bp 大小的片段仅有 1 条。因此可以说浓度为 2.0 和 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 Mg^{2+} 对微卫星位点的扩增更为全面, 其中又以 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 的

Mg^{2+} 扩增的产物更为清晰。因此可以认为适宜的 Mg^{2+} 浓度为 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 。

3 引物和模板 DNA 浓度对 SSR 反应的影响

从图 3 可以看出, 在 25 μL 反应体系中, 引物在实验的浓度范围内对 SSR 反应的影响较大。双引物各为 0.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时扩增产物较弱, 0.8~1.2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时微卫星位点的扩增产物较好, 但随着引物浓度的增加非微卫星位点的扩增产物渐强, 从而干扰实验结果。故进行微卫星位点分析时,

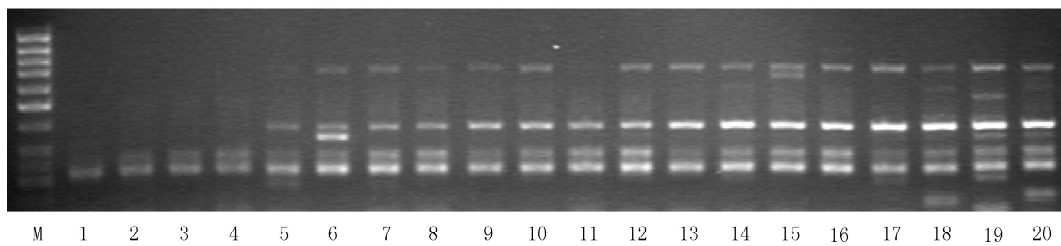


图3 引物浓度与模板 DNA 对 SSR 反应的影响

泳道 1~4、5~8、9~12、13~16、17~20: 0.4、0.8、1.0、1.2、1.6 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 引物; 泳道 1、5、9、13、17: 20 ng 模板 DNA; 泳道 2、6、10、14、18: 30 ng 模板 DNA; 泳道 3、7、11、15、19: 40 ng 模板 DNA; 泳道 4、8、12、16、20: 50 ng 模板 DNA; M: 分子量标记(从上到下分别为 1 031、900、800、700、600、500、400、300、200、150 bp)。

每个引物的浓度均以 0.8 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 为宜。在同一引物浓度下, 模板 DNA 用量为 20 ng 时, 微卫星等位点中有 1 个扩增产物极弱; 30~50 ng 之间时, 2 个微卫星位点均有较强的扩增产物, 且模板量的增加对反应影响不大。

4 dNTPs 对 SSR 反应的影响

从图 4 可以看出, dNTPs 浓度在 0.08 和 0.12 $mmol \cdot L^{-1}$ 时扩增量不足, 0.08 $mmol \cdot L^{-1}$ 水平时仅扩增出 1 个微卫星位点; dNTPs 浓度为 0.16~0.40 $mmol \cdot L^{-1}$ 时扩增产物均较清晰, 且 2 个微卫星位点均表现出来。因此从经济角度来说, dNTPs 浓度

以 0.16~0.24 $mmol \cdot L^{-1}$ 为宜。

讨 论

本文根据桃基因组 DNA 微卫星位点 UDP98~407 设计引物扩增中国李基因组 DNA, 初步证实该引物对中国李通用, 而该引物在同为李属植物杏上却无扩增产物^[6]。说明即使是近缘物种间, 引物也存在不能共享的情况, 应通过实验筛选可利用的引物。近缘物种共享微卫星引物已有很多成功报道^[4~11], 其中大多是依据片段大小判断是否为微卫星位点扩增^[5~10]。目前李属植物上已报道的微卫星位点扩增片段大小为 80~300 bp, 且等位点多态性片段之间差异很小^[5~10], 有的仅有 2 个碱基的差异^[10]。本文也是据此来判断微卫星位点扩增的, 即超出这个大小范围时即视为非特异性扩增。图 1~4 中都有不同程度地出现片段大于 400 bp 的非特异性扩增。这些产物很可能是由于单个引物 DNA 上有 2 个结合位点, 即在 DNA 相距不远处存在与引物互补的反向重复序列而导致扩增的结果, 这从单引物实验结果中可得到验证(图 1)。但也不能排除双引物分别结

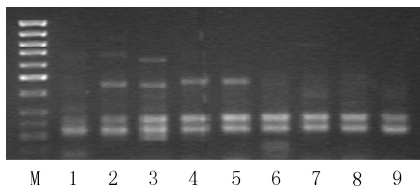


图4 dNTPs 浓度对 SSR 反应的影响

泳道 1~9: 0.08、0.12、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32、0.36、0.40 $mmol \cdot L^{-1}$ dNTPs; M: 分子量标记(从上到下分别为 1 031、900、800、700、600、500、400、300、200、150 bp)。

合在2个等位位点的上游和下游,导致相距不远的2个等位位点之间的序列与位点同时获得扩增。解决这一问题的策略是优化PCR反应参数,特别是适当缩短延伸时间,尽量使扩增产物控制在目的片段大小范围内,这是今后需探讨的问题。

SSR多态性标记因同时具多态性百分率高、重复性好且呈共显性等特点,是一种较为理想的分子标记技术,在果树种质资源遗传多样性和基因分子标记等遗传育种领域中已较广泛应用^[4~11, 13~16]。筛选SSR引物及建立稳定的反应体系是SSR多态性标记应用的基础。本文建立的中国李SSR反应体系,即25 μL反应体系中,1×反应缓冲液、Taq DNA酶1.5 U、Mg²⁺浓度2.0 mmol·L⁻¹、模板DNA用量30~40 ng、每个引物浓度0.8 μmol·L⁻¹、dNTPs浓度0.16~0.24 mmol·L⁻¹,可供研究中国李种质资源和遗传育种时参考。实验过程中还观察到不同引物所需的优化反应体系略有差异,因此欲获得更全面的微卫星位点信息,在上述优化体系下,微调某些反应物的用量,是非常必要的。

SSR标记虽然多态性百分率高,但每对引物只扩增几个等位基因^[2]。Hormaza^[6]用桃的SSR引物扩增杏时,每对引物产生的等位基因数平均为4.1也说明这一点。因此,要想获得尽量多的SSR多态信息,开发大量的SSR引物是基础。很多实验已证明,近缘物种间甚至同科不同属间的SSR引物可部分共享,这为SSR的广泛应用提供了强有力的支撑。本文结果提示我们,通过单、双引物的PCR技术并结合已知信息,可能是不同物种间SSR引物互用时分辨扩增产物是否为SSR位点的一个较简便途径,但这还需要通过克隆测序来进一步验证。需要指出的是,虽然不同物种之间可共享部分SSR引物,但从长远来看,发展SSR分子标记,基础还是构建本物种基因组DNA文库,这样才可从中筛选出足量的微卫星位点,以设计出更多的SSR引物用于植物种质资源多样性和基因分子标记的研究。

参考文献

- 1 陈佩度. 作物育种生物技术. 北京: 中国农业出版社, 2001. 134~138
- 2 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 68~107
- 3 高志红, 章 镇, 韩振海. SSR技术及其在果树上的应用. 果树学报, 2002, 19 (5): 281~285
- 4 Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor Appl Genet, 2001, 102: 865~870
- 5 Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Gorina VM et al. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. Theor Appl Genet, 2003, 106: 435~444
- 6 Hormaza JI. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. Theor Appl Genet, 2002, 104: 321~328
- 7 Dirlwanger 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.). Theor Appl Genet, 2002, 105: 127~138
- 8 Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD et al. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 421~428
- 9 Downey SL, Iezzoni AF. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. J Am Soc Hortic Sci, 2000, 125: 76~80
- 10 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*. Theor Appl Genet, 1999, 99: 65~72
- 11 高志红, 章 镇, 韩振海等. 果梅SSR反应体系的优化. 南京农业大学学报, 2002, 25 (4): 19~22
- 12 乔玉山, 章 镇, 房经贵等. 李种质资源ISSR反应体系的建立. 果树学报, 2003, 20 (4): 270~274
- 13 Lopes MS, Sefer KM, Eiras Dias E et al. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. Theor Appl Genet, 1999, 99: 733~739
- 14 Lamboy WF, Alpha CG. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species. J Am Soc Hortic Sci, 1998, 123: 182~188
- 15 Aranzana MJ, Carbó J, Arús P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1341~1352
- 16 Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P et al. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. Theor Appl Genet, 2003, 106: 819~825