

叶子花 SSR-PCR 体系的优化

鲁亚静^{1,2,3},陈庭³,李建友³,胡章立¹,晷启杰^{1,2},陈涛^{1,3*}

(1. 深圳大学生命科学学院,广东深圳 518060;2. 深圳市野生动物救护中心,广东深圳 518040;3. 深圳市中国科学院仙湖植物园,广东深圳 518004)

摘要 [目的]优化叶子花 SSR-PCR 体系。[方法]以乔木叶子花为材料,通过 Touchdown PCR 扩增程序和正交试验,对影响叶子花 SSR-PCR 体系的引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度进行优化。[结果]叶子花 20 μ l SSR-PCR 体系的最优条件为引物浓度 0.4 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶用量 1.5 U、 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L、4 种 dNTPs 浓度均为 0.15 mmol/L,模板 100 ng 左右。[结论]该反应体系的扩增条带清晰、稳定、重复性好,可用于后续叶子花遗传多样性分析和种质资源鉴定等研究。

关键词 叶子花;正交试验;SSR;PCR 体系优化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)17-047-03

Optimization of SSR-PCR System for *Bougainvillea arborea*

LU Ya-jing^{1,2,3}, CHEN Ting³, LI Jian-You³, CHEN Tao^{1,3*} (1. School of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060;2. Center for Wildlife Animal Rescue and Protection, Shenzhen, Guangdong 518040;3. Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen, Guangdong 518004)

Abstract [Objective] The aim was to optimize SSR-PCR system for *Bougainvillea arborea* by orthogonal design. [Method] Based on orthogonal design, four levels of four factors (primer, *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTPs) have been tested to optimize SSR-PCR reaction system using *Bougainvillea arborea* genomic DNA as template. The amplification was performed with a touchdown program. [Result] The optimized SSR-PCR reaction condition for *Bougainvillea arborea* was obtained in a 20 μ l system containing 0.4 mmol/L SSR primer, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.15 mmol/L dNTPs and around 100 ng DNA template. [Conclusion] With clear, stable and repeatable amplification bands, the reaction system can be used for the further studies on genetic diversity and germplasm identification.

Key words *Bougainvillea arborea*; Orthogonal design; SSR; PCR system optimization

叶子花又名三角梅、簕杜鹃、宝巾、九重葛等,为紫茉莉科(Nyctaginaceae)叶子花属(*Bougainvillea Comm. ex Juss.*)植物。叶子花原产南美洲,其栽培品种苞片、花、叶色彩艳丽,已在热带亚热带地区广泛栽种^[1]。叶子花栽培品种有300多个,但名种多达500个以上。其形态特征随各地环境因子的差异变化很大,经典的园艺分类往往难于对栽培品种进行准确鉴定。随着分子生物学的快速发展,RAPD、ISSR、SRAP等分子标记技术被陆续用于叶子花的遗传多样性和亲缘关系研究,为栽培品种的鉴定提供了更准确可靠的手段^[2-5]。

简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)也称微卫星DNA,是由1~6个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列。SSR分子标记具有双亲共显性、单位点高多态性、试验结果重复性好等优点,已广泛应用于植物遗传多样性分析、种质资源评价和分子鉴定^[6-9]。笔者采用Touchdown PCR扩增程序和正交试验设计^[10-11],对影响叶子花SSR-PCR的引物浓度、*Taq* DNA聚合酶浓度、 Mg^{2+} 浓度和dNTPs浓度进行优化,为后续叶子花SSR分子标记引物开发和遗传多样性分析与种质资源鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理 供试乔木叶子花(*B. arborea*)采自广东

基金项目 深圳市科技研发资金项目(JCYJ20120615172425764);深圳市城管局科研项目(200901)。

作者简介 鲁亚静(1989-),女,安徽合肥人,硕士研究生,研究方向:资源植物品质鉴别与安全应用。*通讯作者,研究员,博士,从事资源植物研究与开发。

收稿日期 2015-04-22

省深圳市仙湖植物园叶子花保育与研发基地。采集幼嫩叶片用硅胶进行干燥处理,取适量样品用磁珠在Fastprep-24组织破碎仪上打磨。采用经典的CTAB法提取总DNA^[12],用1%琼脂糖凝胶检测DNA质量,用NanoDrop 2000超微量分光光度计检测DNA浓度。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:DL500 DNA Maker、PCR扩增所用的*Taq* DNA聚合酶、 Mg^{2+} 以及dNTPs均购自宝生物工程(大连)有限公司,SSR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

主要仪器:SSR扩增反应在BIO-RAD T100™ Thermal Cycler上进行;DYY-8C型垂直电泳仪购自北京六一仪器厂, Gene Genius Bio-imaging system凝胶成像仪购于美国。

1.3 叶子花 SSR-PCR 体系的优化

1.3.1 正交试验设计。正交试验所用引物为Bp3,体系验证引物为Bp1和Bp2,各引物序列见表1。选用 $L_{16}(4^4)$ 正交表,对叶子花SSR-PCR条件进行引物浓度、*Taq* DNA聚合酶浓度、 Mg^{2+} 浓度和dNTPs浓度4因素4水平优化试验(表2)。

表1 不同的叶子花 SSR 引物

引物	引物序列(5'-3')	退火温度//℃	重复单元
Bp1	F:AGACAATGGTGGCTTTGTACAGT R:GAAGATGGAGCTCTAGGAAGAGG	57	(AGCTCC) ₄
Bp2	F:CACAAATCAATTTTAGCACCAAAG R:TCACGACACAACCTTGATTATTGG	53	(AT) ₉
Bp3	F:ATTGCACTTTGTCTATTGGAGTT R:TGCAAAGCTAACTCTCGAAATCT	53	(CTGGAA) ₄

表2 叶子花 SSR-PCR 体系正交设计

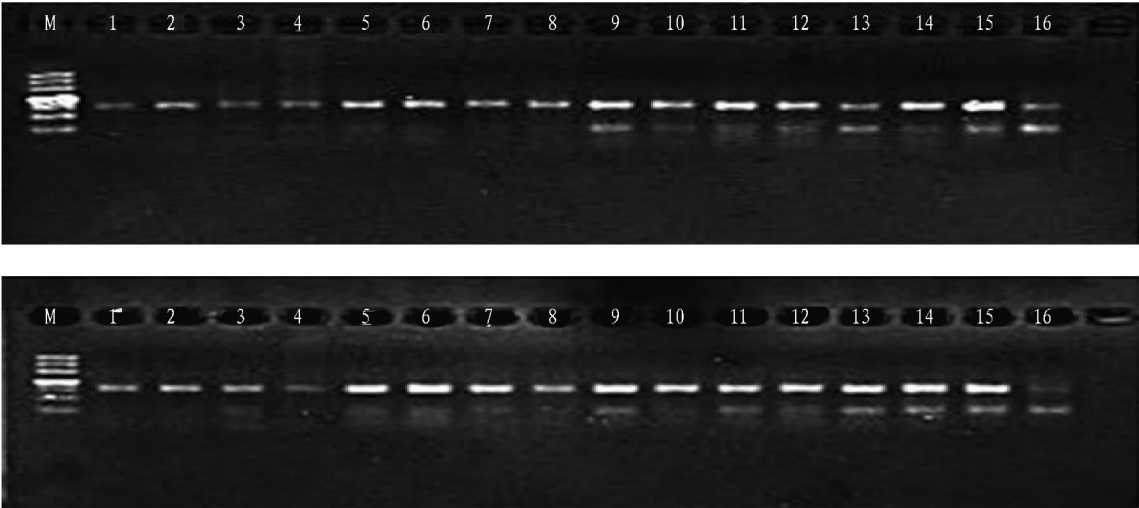
试验 序号	引物浓度 μmol/L	TaqDNA 酶浓度 U/20 μl	Mg ²⁺ 浓度 mmol/L	dNTPs 浓度 mmol/L
1	0.30	1.00	1.50	0.15
2	0.30	1.50	2.00	0.20
3	0.30	2.00	2.50	0.25
4	0.30	2.50	3.00	0.30
5	0.40	1.00	2.00	0.25
6	0.40	1.50	1.50	0.30
7	0.40	2.00	3.00	0.15
8	0.40	2.50	2.50	0.20
9	0.50	1.00	2.50	0.30
10	0.50	1.50	3.00	0.25
11	0.50	2.00	1.50	0.20
12	0.50	2.50	2.00	0.15
13	0.60	1.00	3.00	0.20
14	0.60	1.50	2.50	0.15
15	0.60	2.00	2.00	0.30
16	0.60	2.50	1.50	0.25

1.3.2 单因素试验设计。利用正交试验中 16 组试验优化的结果,选出一组结果最佳的浓度组合,以此为基准进行 PCR 体系单因素试验。每个因素依照表 2 进行优化,从而得到叶子花 SSR-PCR 最优的反应体系。

1.3.3 Touchdown PCR 扩增程序。94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,10 个循环且每个循环降低 0.5 ℃;之后 94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,24 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 叶子花 SSR-PCR 体系的正交试验优化 以乔木叶子花 DNA 为模板和所参试的引物进行 PCR 扩增,实现对影响 PCR 扩增的引物浓度、TaqDNA 聚合酶量、Mg²⁺ 浓度和 dNTPs 浓度的 4 水平正交优化。2 次重复试验的 PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。



注:M 为 DL500 DNA Maker;编号 1~16 为表 1 中正交试验序号。

图1 叶子花 SSR-PCR 体系正交试验扩增结果

结果显示,所参试的引物能成功扩增出预期长度范围的目标片段。泳道 9 所扩增出的 2 条带亮度相差大;泳道 13 和泳道 15 所扩增出的 2 条带清晰可见,稳定存在;经多次重复试验发现泳道 13 所扩增出的 2 条带亮度相当,清晰可见,稳定存在,而泳道 15 所扩增出的 2 条带亮度相差大,会出现 1 条带模糊甚至是消失,不能稳定存在。因此,正交试验的第 13 组为最佳的浓度组合,由表 1 可知,该组的引物浓度为 0.60 μmol/L,TaqDNA 聚合酶浓度为 1.00 U/20 μl,Mg²⁺ 浓度为 3.00 μmol/L 以及 dNTPs 浓度为 0.20 μmol/L。

2.2 叶子花 SSR-PCR 体系的单因素试验优化 以正交试验的第 13 组浓度组合为基准,对影响 PCR 扩增的引物浓度、TaqDNA 聚合酶量、Mg²⁺ 浓度和 dNTPs 浓度进行单因素试验。图 2 为 1 次试验 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果。

2.2.1 引物浓度。由图 2 可知,随着正反引物浓度的升高,PCR 扩增条带的亮度呈先上升后下降的趋势。当正反引物

浓度为 0.30 μmol/L 时,目标条带不被特异性扩增;当正反引物浓度为 0.40 μmol/L 时,扩增效果最好;此后,随着正反引物浓度的升高,形成的二聚体增多,故引物浓度选用 0.40 μmol/L。

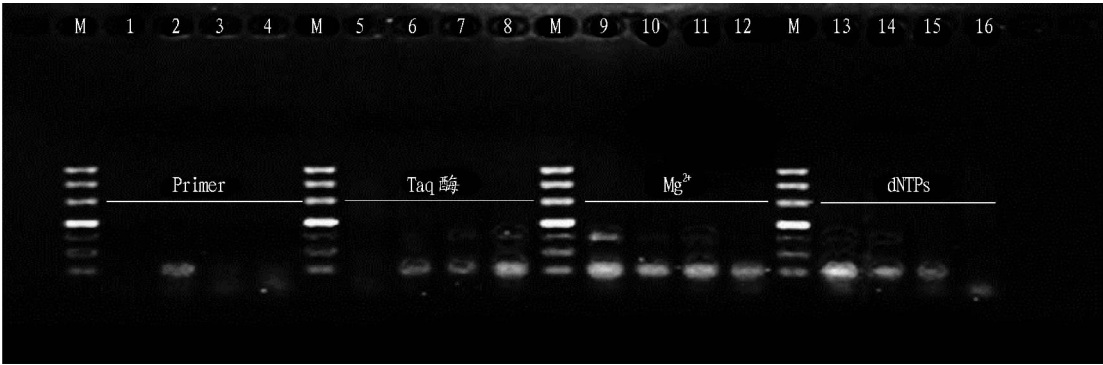
2.2.2 TaqDNA 聚合酶量。由图 2 可知,随着 TaqDNA 聚合酶量的增加,PCR 扩增条带的亮度呈上升趋势。当 TaqDNA 聚合酶量为 1.00 U 时,目标条带未被特异性扩增;当 TaqDNA 聚合酶量为 2.00 U 时,扩增效果最好,之后再增加酶量,扩增效果无太明显的变化。但从节约试剂和整体的扩增效果考虑,TaqDNA 聚合酶量为 1.50 U 时也能达到预期的效果,因此,理想的 TaqDNA 聚合酶量为 1.50 U。

2.2.3 Mg²⁺ 浓度。Mg²⁺ 为 TaqDNA 聚合酶发挥活性所必须的,Mg²⁺ 浓度过低或过高都会影响 PCR 扩增效率。由图 2 可知,随着 Mg²⁺ 浓度的增加,PCR 扩增条带的亮度呈下降趋势,故选用 1.50 μmol/L Mg²⁺ 作为理想的 Mg²⁺ 浓度。

2.2.4 dNTPs 浓度。dNTPs 浓度过高时,dNTPs 会与 Mg²⁺

结合,降低体系中 Mg^{2+} 浓度,影响 *Taq*DNA 聚合酶活性。另外,dNTPs 浓度过高也会提升错误扩增几率,出现非特异性产物和拖尾现象。由图 2 可知,随着 dNTPs 浓度的升高,

PCR 扩增条带的亮度呈下降趋势,故 dNTPs 浓度选用 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 。



注:M 为 DL500 DNA Maker;编号 1~16 为单因素试验序号,其中 1~4 代表引物浓度,分别为 0.30、0.40、0.50、0.60 $\mu\text{mol/L}$;5~8 代表 *Taq*DNA 聚合酶量,分别为 1.00、1.50、2.00、2.50 U;9~12 代表 Mg^{2+} 浓度,分别为 1.50、2.00、2.50、3.00 $\mu\text{mol/L}$;13~16 代表 dNTPs 浓度,分别为 0.15、0.20、0.25、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 。

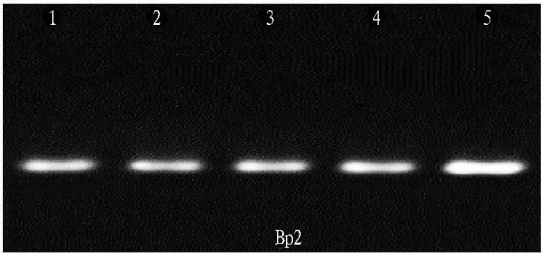
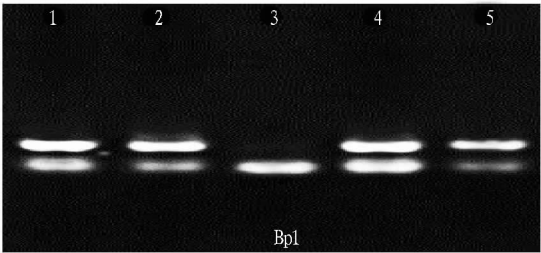
图 2 叶子花 SSR-PCR 体系单因素扩增结果

2.3 体系验证 应用上述所得体系,选用不同叶子花(表 3)对所设计的 SSR 引物(表 1)进行扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物,结果显示扩增条带清晰,重复性好(图 3)。

综上所述,叶子花 20 μl SSR-PCR 体系的最优条件:引物浓度 0.4 mmol/L,*Taq*DNA 聚合酶用量 1.5 U, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L,4 种 dNTPs 浓度均为 0.15 mmol/L,可用于后续 SSR 引物筛选及分析。

表 3 用于 SSR-PCR 反应体系验证的叶子花材料

材料编号	品种名称	凭证标本
1	<i>B. arborea</i>	Chen & Lu 2014111002
2	<i>B. ‘Pixie Yellow’</i>	Chen & Lu 2014121001
3	<i>B. peruviana</i>	Chen 2014052606
4	<i>B. ‘Mona Risa Yellow’</i>	Chen 2013011911
5	<i>B. ‘Los Banos Beauty Variegata’</i>	Chen 2013013002



注:Bp1 和 Bp2 代表表 1 中不同的叶子花 SSR 引物;1~5 分别代表表 3 中不同的叶子花。

图 3 不同叶子花不同 SSR 引物扩增结果

3 结论与讨论

SSR 分子标记技术基于特异引物 PCR,任何影响 PCR 扩增效果的因子,如引模板 DNA、引物浓度、*Taq*DNA 聚合酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度等,都将影响 SSR-PCR 体系的建立和优化。正交试验设计优化 PCR 反应条件比单因素逐个调整法的效率更高,试验设计更科学,得出的试验体系有效范围宽,稳定性好^[11]。Touchdown PCR 是一种简单快速的优化方法,能够增加扩增反应的特异性、敏感性和产物产量,避免了非特异性产物的出现以及对温度等长时间的优化或对引物的重新设计^[10]。

引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。*Taq*DNA 聚合酶为 Mg^{2+} 依赖性酶, Mg^{2+} 与 dNTPs 具有拮抗作用, Mg^{2+} 浓度过高会降低 PCR 扩增的特异性,浓度过低影响 PCR 扩增产量甚至导致 PCR 扩增失败。朱世杨等^[13]在对水稻 SSR-PCR 体系进行优化时

发现,随着引物浓度增加,PCR 扩增中产生的引物二聚体量也呈增加趋势,尤其是高浓度下产生最多; Mg^{2+} 浓度过高反而抑制了 *Taq* 酶的活性,导致扩增产物降低,该研究也发现了类似的趋势。模板 DNA 浓度过低影响扩增产量,浓度过高导致扩增条带拖尾甚至无扩增条带,黄芳丽等^[14]在对芒果 SSR-PCR 反应体系的优化中发现 20 μl 体系中模板 DNA 浓度为 60~100 ng 时对扩增结果无显著影响,Yang 等^[15]在对人参 SSR-PCR 反应体系的优化中发现,模板 DNA 浓度为 30~120 ng 时对扩增结果无显著影响^[15]。因此,该研究将模板 DNA 浓度控制在 100 ng 左右,在得到理想结果的合理范围内。

该研究最终确定叶子花 20 μl SSR-PCR 体系的最优条件为引物浓度 0.4 mmol/L,*Taq*DNA 聚合酶用量 1.5 U, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L,4 种 dNTPs 浓度均为 0.15 mmol/L,模板

(下转第 53 页)

2.5 科学施肥 制种前先对制种田块进行土壤养分检测,再根据测土结果进行配方施肥,采取“前促、中控、后看苗施肥”的原则,氮、磷、钾肥结合施用,严格控制氮肥的用量,适当增加磷、钾肥用量。由于规模化制种,考虑到控制成本的原因,无法大量施用有机肥,整地时施用过磷酸钙 750 kg/hm²、氯化钾 150 kg/hm² 作底肥。在父本移栽后 5 d 施返青肥,施用尿素 45 kg/hm²,促进父本早返青分蘖,增加单位面积上的有效穗数,保证父本有充足的花粉量。同时母本的追肥要早施,宜于母本栽后 3~4 d 施尿素 75 kg/hm² 返青肥,母本移栽后 13~15 d,施尿素 105 kg/hm²,中化复合肥 300 kg/hm² 作壮蘖肥,穗肥施用复合肥 75 kg/hm²,钾肥 120 kg/hm²,后期看苗施肥^[2]。

水分管理做到“薄水插秧、寸水返青、浅水分蘖、够苗晒田”,之后节水湿润灌溉,干湿交替,以养根护叶,以增强根系活力,防倒伏,收割前 5 d 才可断水晒田。

2.6 做好花期预测与调节工作 由于母本博 IIA 为弱感光不育系,在乐东基地,春制种从始穗到开花结束 8~9 d,花期短且抽穗集中整齐,而父本中种恢 767 花粉量大且足,因此,博 II 优 767 制种理想花期相遇标准是父本比母本早 1 d 抽穗。为此必须在母本播种后开始,每隔 5 d 记载 1 次父母本的叶龄,从倒 4 叶开始对父母本进行幼穗分化的显微剥检,确定亲本余叶、总叶,从而预测父母本幼穗分化进度,以便及时采取措施对父母本花期相遇出现偏差的田块进行调节。花期调节以促为主,以控为辅,对发育偏慢的亲本偏施钾肥和微量元素促其加快生长,对发育偏快的亲本,偏施氮肥进行调控^[3]。

2.7 准确喷施“920”,提高异交结实率 博 IIA 开花集中,午前花约占 56%,对“920”敏感,“920”总用量控制在 375 g/hm² 以内,施用时应根据气温高低、禾苗长势、见穗指标等

情况灵活处理。采用“前轻、中重、后补”的方法进行喷施,当母本抽穗 30%~35% 时喷施第 1 次,用“920”120 g/hm² 同时喷施父母本,次日再喷 180 g/hm²,第 3 天视情况用 45~75 g/hm² “920”单喷父本 1 次,使父本抽穗高度保持比母本高 20 cm 左右,同时也使母本解除包颈,保持良好的授粉状态。在喷“920”的同时,也要喷好破口和齐穗药,以防治病虫害。

打完“920”父母本抽穗扬花后,必须及时进行人工赶粉,于每天上午 10:00~12:00,在父本散粉高峰期,用塑料绳子赶粉 3~4 次,以提高异交结实率。

2.8 及时防治病虫害 海南乐东制种基地是全国南繁基地的主要育种基地,病虫螺鼠害发生比较严重,应及时喷药防治。首先是整前要先铲除水田四周的杂草,消灭越冬虫源,其次做好防鼠防螺的工作,第三是秧苗期要注意防治稻秆蝇、稻瘿蚊和稻飞虱等虫害,防止稻苗带病,最后是本田期做好二化螟、三化螟、稻飞虱、细条病、稻瘟病、纹枯病等病虫害的防治工作。

2.9 抓好全程除杂工作 为确保种子质量安全无忧,必须抓好全程除杂工作。一是要抓好隔离区安全工作,确保隔离区不出现“串粉”现象;二是抓好除杂工作,可从苗期开始,清除所有父母本行中,与亲本不同株叶形态的异型株,特别是在喷“920”前后 3 d,还要根据株型、叶型、叶色、粒型等及时清除所有杂株,抽穗后重点是除去各种落田谷、变异株、保持系等,保证制种田杂株率始终控制在 0.1% 以下。

参考文献

- [1] 黄广平,杨毅,王新,等. 杂交水稻博优 691 海南春制种技术[J]. 广东农业科学,2010(3):32-33.
- [2] 黄宏江,吴淑潮,陈德清,等. 杂交水稻新品种博 II 优 629 海南规模化高产制种技术[J]. 农业科技通讯,2011(6):152-153.
- [3] 黄宏江,吴淑潮,陈德清,等. 杂交水稻新品种博 II 优 767 规模化高产制种关键技术[J]. 种子世界,2014(2):46-47.
- [4] apple cultivars with microsatellite markers[J]. Hort Science,2005,40:1974-1977.
- [8] ROUBOS K,MOUSTAKAS M,ARAVANOPOULOS F A. Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci[J]. Genet Mol Res,2010,9(3):1865-1876.
- [9] 张红莲,李火根,胥猛,等. 鹅掌楸属种及杂种的 SSR 分子鉴定[J]. 林业科学,2010,46(1):36-39.
- [10] KORBIE D J,MATTICK J S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification[J]. Nature Protocols,2008,3(9):1452-1456.
- [11] 杨水云,李续娥,吴明宇,等. 正交实验在 PCR 反应条件优化中的应用[J]. 生物数学学报,2005,20(2):202-206.
- [12] DOYLE J J,DOYLE L L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bull,1987,19:11-15.
- [13] 朱世杨,罗天宽,张小玲,等. 水稻 SSR-PCR 体系的优化[J]. 安徽农业科学,2009,37(8):3441-3443,3447.
- [14] 黄丽芳,雷新涛,姚金胜,等. 芒果 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 热带作物学报,2010,31(3):410-415.
- [15] YANG T,MU L,WANG J. Optimizing SSR-PCR system of *Panax ginseng* by orthogonal design[J]. Journal of Forestry Research,2007,18(1):31-34.
- [1] 陈涛. 叶子花[M]. 北京:中国农业出版社,2008.
- [2] CHATTERJEE J,MANDAL A K A,CHAKRABARTY D,et al. Use of RAPD analysis to determine genetic diversity and relationship among *Bougainvillea* cultivars at intra- and inter-specific levels[J]. Horticulture, Environment and Biotechnology,2007,48(1):43-51.
- [3] SRIVASTAVA R,SHUKLA S,SONI A,et al. RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars[J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology,2009,9:154-163.
- [4] 李房英,黄彦晶,吴少华. 三角梅种质资源的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报,2011,32(9):1692-1696.
- [5] 唐源江,武晓燕,曹雯静. 基于 SRAP 的叶子花种质资源遗传多样性及遗传关系分析[J]. 热带亚热带植物学报,2014,22(2):147-154.
- [6] FREEMAN S,WEST J,JAMES C,et al. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite in tea (*Camellia sinensis*) [J]. Molecular Ecology Notes,2004,4:324-326.
- [7] GALLI Z,HALASZ G,KISS E,et al. Molecular identification of commercial