

# 影响紫花苜蓿 SSR 分析因素的研究

张阿英, 胡宝忠, 姜述君, 胡国富

(东北农业大学基础部, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 以我国紫花苜蓿地方品种为研究材料, 利用 1 对微卫星引物进行 SSR 扩增反应体系探讨, 确立了最佳 SSR 反应体系。

**关键词:** 紫花苜蓿; SSR; 影响因素

中图分类号: S 551.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2002)01-0015-03

## Establishment of Reaction System for the Assay and Usage of SSR in Alfalfa

ZHANG A-ying, HU Bao-zhong, JIANG Shu-jun, HU Guo-fu

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract:** Local samples in *Medicago sativa* were studied using SSR technique. Based on the genomic DNA extracted from alfalfa, essential factors affecting the result of SSR assay were tested and compared. An optimal reaction system suitable for the assay and usage of SSR in alfalfa was established.

**Key words:** alfalfa; simple sequence repeat; affecting factors

\* 收稿日期: 2001-10-03

作者简介: 张阿英(1976-), 女, 黑龙江省呼兰县人, 在读硕士, 从事分子生物学研究。

黑农 37、日本绿大豆、哈 90-1011、哈 90-102、东 71434、哈 920-9、黑农 32、黑农 33、哈 3527、东 72163、哈 96-9、青瓢黑豆。从总体来看, 绿子叶大豆总糖含量普遍较高, 表现出葡萄糖、果糖、蔗糖含量相对较高, 低聚糖含量较低。

### 2.6 大豆异黄酮种质的筛选

对黑龙江省 50 份不同类型品种的异黄酮含量进行测定和分析, 发现品种间有很大差异, 它表明了品种间遗传差异的存在。中国大豆种质资源中异黄酮含量变异极其丰富, 这些参试的品种中, 哈 96-9、哈 SN-1 这两个品种的异黄酮含量高达 3 000  $\mu\text{g/g}$  以上; 哈 96-9 异黄酮含量在 3 324.2  $\mu\text{g/g}$ , 其中以含 5.7.4<sup>1</sup>-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷的量较高为 476.2  $\mu\text{g/g}$ , 该类异黄酮对乳腺癌、黑素瘤、骨髓癌、白血病、肝癌、胃癌有明显的抑制增生作用, 哈 SN-1 的异黄酮为 3 838  $\mu\text{g/g}$ , 其中 7.4<sup>1</sup>-二羟基异黄酮-7-葡萄糖糖苷和 5.7.4<sup>1</sup>-三羟基异黄酮

-8-葡萄糖苷含量均比普通品种高。异黄酮含量低于 1 000  $\mu\text{g/g}$  的品种有: 哈 90-614(807.7  $\mu\text{g/g}$ )、合丰 33(950.5  $\mu\text{g/g}$ )、黑农 35(504.9  $\mu\text{g/g}$ )。大豆异黄酮类物质是大豆生长过程中形成的一类代谢产物, 它对植物的生命活动起着十分重要的作用, 大豆异黄酮类化合物是大豆食品苦涩味的重要因素, 同时它又具有生物活性, 表现明显的抗肿瘤作用。因此, 具有重要的利用价值, 应从加工利用和药用两个领域进行遗传和种质改良研究。

### 参考文献:

- [1] 唐相如, 官春云. 几种酶活性与油菜油分和蛋白质及产量的关系[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(1): 37-40
- [2] 丁安林, 王雁, 常汝镇. 大豆的抗营养因子及其改良[J]. 大豆科学, 1994, 13(1): 12-13
- [3] Wilson, C. Meta. The extraction and separation of barley slutelins and their relationship to other endosperm proteins[J]. J. Exp. Bot. 1981, 32(131): 1287-1292

微卫星(Simple sequence repeat)是指由少数几个核苷酸为单位,呈串联重复分布于整个基因组的DNA序列<sup>[3]</sup>。由于微卫星标记在基因组中具有数量大、分布均匀、多态含量丰富、显性遗传及检测方便等优点,已成为遗传图谱构建、功能基因定位、标记-QTL连锁分析、分子标记辅助选择和检测种群内遗传变异等多领域应用研究中的重要标记。它广泛存在于真核生物中,在人类和小鼠中应用较多,在植物中相对较晚。其中在大麦<sup>[2]</sup>、大豆<sup>[1]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>中应用较多,但在紫花苜蓿上国内未见报道,本研究拟探讨影响紫花苜蓿SSR扩增反应的因素,并确立最佳反应体系,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为10个我国紫花苜蓿地方品种(见表1)。

表1 紫花苜蓿地方品种

1	美国皇后苜蓿	6	敖汉1号苜蓿
2	准格尔苜蓿	7	公农1号苜蓿
3	和平苜蓿	8	敖汉2号苜蓿
4	草原2号苜蓿	9	百绿苜蓿
5	松北苜蓿	10	肇东苜蓿

1.2 试验方法

1.2.1 紫花苜蓿总DNA的提取 每个品种取1粒种子,采用酚/氯仿/异戊醇法提取紫花苜蓿总DNA。

表2 SSR引物序列

引物名称	核心序列	碱基组成
Afct45	(CT) <sub>8</sub> AT(CT) <sub>3</sub>	5 taa aaa acg gaa aga gtt ggt tag 3 gcc atc ttt tct ttt gct tc

1.2.2 引物筛选 依据引物退火温度的经验公式,计算不同引物的经验退火温度,

$$T_m=4(A+T)+2(G+C)$$
$$T_p=22+1.46(2G+2C+A+T)$$

上式中A、T、G、C代表四种不同碱基的数目,T<sub>m</sub>、T<sub>p</sub>为经验退火温度,实际应用时,上下浮动范围在5~10℃之间。

在标准PCR反应体系(100 μL体系内含有1 μg基因组DNA、50 mM KCl、10 mM Tris、Cl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 μM引物、每种200 μM dNTP及2~4 U Taq DNA聚合酶)条件下,以等比例方法将反应体系调至25 μL。根据微卫星DNA在基因组内多次重复等特点,将模板浓度降低至30 ng/25 μL。用低严谨反应程序(低退

火温度45℃,长循环时间45个循环)扩增所有引物。  
1.2.3 SSR扩增体系及反应条件的优化 对初步筛选到的引物,根据模板DNA浓度、dNTP浓度、TagDNA聚合酶用量、Mg<sup>2+</sup>浓度(以10×buffer缓冲液的用量代替)等反应参数进行优化。模板DNA浓度设为30 ng、50 ng、80 ng、100 ng、200 ng; dNTP浓度梯度为50, 100, 200, 400, 600 μM; TagDNA聚合酶的浓度设为0.5U, 1U, 2U, 3U, 4U五个水平; 10×buffer缓冲液设为两个水平2.5 μL、3.5 μL,反应总体积为25 μL。

将退火温度设为51℃、52℃、53℃、54℃、56℃、59℃,变性温度及延伸温度分别以经验设为94℃和72℃。

扩增产物经4%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 模板浓度

由图1可以看出模板浓度在30~200 ng之间均能产生扩增产物,从带的亮度强弱上,不同模板浓度有较大的差异,模板浓度为30 ng、50 ng、80 ng时带较弱,而模板浓度为100 ng、200 ng时所扩增带的亮度明显增强;说明模板浓度为100 ng、200 ng时扩增产物较多。因此,确定最终模板浓度为100 ng。

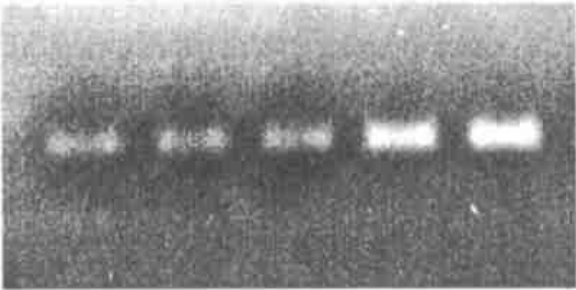


图1 模板浓度的五个水平电泳结果

由左至右模板浓度依次为30 ng、50 ng、80 ng、100 ng、200 ng

2.2 dNTP浓度

图2显示了600、400、200、100、50 μM的dNTP对扩增结果的影响。结果表明:100、50 μM扩增带弱,200 μM稍强于前者,400 μM扩增带效果较好,600 μM扩增带较400 μM的弱。这一现象的可能解释是dNTP能与Mg<sup>2+</sup>结合,而Taq酶活性依赖于Mg<sup>2+</sup>,当dNTP含量高时与Taq酶竞争Mg<sup>2+</sup>,使Taq酶活性降低,扩增产物减少。因此,确立最终dNTP浓度为400 μM。

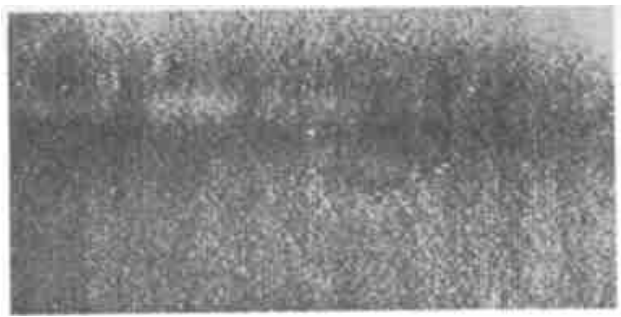


图 2 dNTP 五个浓度梯度电泳结果

由左至右 dNTP 浓度梯度依次为 600、400、200、100、50 $\mu$ M

2.3 TagDNA 聚合酶的浓度

图 3 所示结果表明: Taq 酶在 0.5~4U 之间均能产生扩增带。在 1~4 U 之间, 扩增带清晰且稳定, 无显著差异, 但在 0.5 U 时, 扩增带不清晰。从结果的稳定性及经济节约角度考虑, Taq 酶宜采用 1U/25 $\mu$ L 反应体系较为适宜。

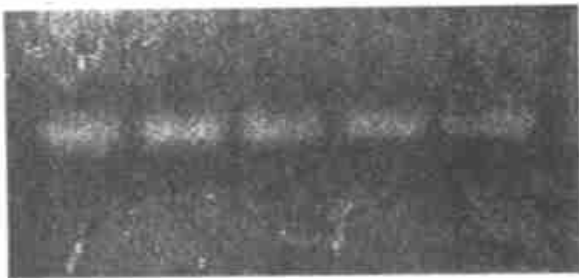


图 3 Taq 酶五个浓度梯度电泳结果

由左至右 Taq 酶浓度依次为 4U、3U、2U、1U、0.5U

2.4 缓冲液

图 4 显示了不同  $Mg^{2+}$  浓度对 SSR 扩增产物的影响, 图中结果表明: 10 $\times$  buffer 缓冲液为 2.5  $\mu$ L 带较弱, 3.5  $\mu$ L 扩增产物较清晰,  $Mg^{2+}$  是 Taq 酶的激活剂,  $Mg^{2+}$  不足时, Taq 酶作用效率低,  $Mg^{2+}$  浓度过高时, 会出现背景加深, 甚至出现非特异性扩增。因此, 确立最终 10 $\times$  buffer 缓冲液为 3.5  $\mu$ L。

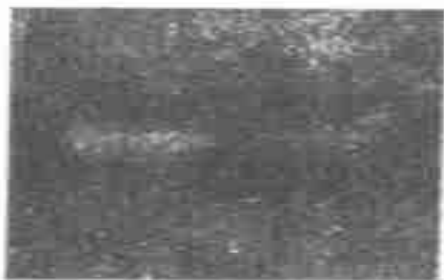


图 4 10 $\times$  buffer 缓冲液两个水平的电泳结果

由左至右 10 $\times$  buffer 缓冲液依次为 3.5 $\mu$ L、2.5 $\mu$ L

2.5 退火温度

从设计的退火温度来看, 退火温度为 53 $^{\circ}$ C 时的条带较好, 54 $^{\circ}$ C 虽能扩增出带但不明显, 并且背景深, 在其余退火温度下则没有条带的出现。

3 结论

SSR 反应涉及诸多因子, 每个因子的反应参数对整个体系有很大影响, 确定合适的反应参数是 SSR 分析的前提。影响 SSR 反应的主要因子为模板浓度、dNTP、Taq 酶、 $Mg^{2+}$  浓度等。关于模板浓度对反应的影响, 不同研究者所得结果差异较大。本研究结果表明, 模板浓度在 100 ng 以上扩增结果较好。而 Devos 和 Gale<sup>[3]</sup> 认为模板量只有在 0.2~0.4 ng/20 $\mu$ L 时才能获得一致的扩增产物, 戴思兰等<sup>[6]</sup> 在菊属植物上只有 2~10 ng/20 $\mu$ L 才获得较好扩增。作者认为产生这些分歧原因可能与所用材料有关, 更有可能与所提 DNA 的质量有关。Taq 酶的活性在不同厂家或同一厂家不同批次之间有差异, Taq 酶的用量宜据具体情况适当调节。dNTP 是 PCR 扩增反应的原料, 必须达到一定浓度才能满足要求, 但过高也会与 Taq 酶竞争  $Mg^{2+}$ , 对扩增不利。本试验表明紫花苜蓿 SSR 扩增最佳体系为:

10 $\times$  buffer; 3.5  $\mu$ L, dNTP: 400  $\mu$ M, 模板 DNA: 100 ng, TagDNA 聚合酶: 1U, 引物 1: 5 pmol, 引物 2: 5 pmol, H<sub>2</sub>O: 8.8  $\mu$ L, 总体积 25  $\mu$ L。

94 $^{\circ}$ C 5min $\rightarrow$  94 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$  53 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 10min, 35 个循环。

参考文献:

[1] Akkaya M S, Bhagwat A. A, Cregan P. B Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean[ J] . Genetics, 1992, 132: 1131-1139

[2] Liu Z W, Biyashev R. M, Saghai MAROOF M. A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map[ J] . Theor Appl Genet, 1996, 93: 869-876.

[3] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[ J] . Nucleic Acid Research, 1989, 17: 6463-6471

[4] Wu kun—sheng, Steven D, Tanksley. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[ J] . Mol Gen Genet, 1993, 241: 225-235.

[5] Devos KM, Gale MD. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[ J] . Theor Appl Genet, 1992, 84: 567-572

[6] 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊属植物 RAPD 反应体系的建立[ J] . 北京林业大学学报, 1996, 18(1): 46-51.