

紫薇 SSR-PCR 反应体系优化和引物筛选

王 鹏,张振宇,马玲玲,马育珠,杨如同,李 亚

(江苏省中国科学院 植物研究所/南京中山植物园,江苏 南京 210014)

摘要:为加强紫薇分子遗传学研究,以紫薇叶片 DNA 为模板,采用 4 因素(模板浓度、dNTP、引物浓度、酶浓度)3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交设计,优化紫薇的 SSR-PCR 反应体系,并对 24 对紫薇 SSR 引物进行了筛选。结果表明:紫薇 10 μ L SSR-PCR 的最优反应体系为: *Taq* 酶 0.2 U、 Mg^{2+} 2.5 mmol·L⁻¹、dNTP 0.15 mmol·L⁻¹、F-primer 0.25 mmol·L⁻¹、R-primer 0.25 mmol·L⁻¹、DNA 60 ng, ddH₂O 补至 10 μ L; 24 对 EST-SSR 引物筛选出可扩增出条带的引物 23 对,其中 16 对具有多态性,共扩增出清晰条带 68 条,差异条带 39 条。

关键词:紫薇; SSR-PCR; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: S685.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)09-0017-05

紫薇(*Lagerstroemia indica* L.),又名满堂红、百日红、痒痒树等,是千屈菜科紫薇属植物,在炎热的夏季,正当缺花时节,其花开烂漫如火,自夏至秋,经久不衰,是我国乃至世界上有名的夏季观花小乔木,与百合、石榴、荷花并誉为夏季四大名花,堪称“夏日花魁”,具有很高的观赏价值。紫薇是耐修剪、易攀扎造型的盆景良材,与腊梅、虎刺、杜鹃等并称为盆景中的“十八学士”;紫薇根和枝叶可入药,有抗过敏和止痒作用,花和叶有清热、消肿、解毒、利尿之功效;紫薇对多种有毒气体均有较强的抗性,并能吸收一定量的有毒气体,吸附空气中的烟尘,是一种很好的抗污染树种。因此紫薇作为一种观赏、药用兼环保的优良花木,在现代城市园林绿化中有着广泛的应用前景^[1-6]。

据王献^[7]对我国紫薇种质资源的调查发现,我国现有紫薇 18 种,从东南亚引入 3 种,共计 21 种,紫薇作为我国夏季重要的观花植物,在我国占有重要的地位。随着分子遗传学的发展,利用分子标记开展紫薇遗传多样性、遗传图谱构建、指纹图谱等方面的研究正在成为紫薇研究中的热点和重点。SSR 分子标记作为第二代分子标记具有许多优点,因此利用 SSR 分子标记开展紫薇的研

究势在必行。

目前应用于紫薇的分子标记主要有 AFLP^[8-10]、RAPD^[11-12]、ISSR^[13],国外已有部分学者开始了紫薇 SSR 标记的开发^[14-15],而国内未见到有关紫薇 SSR 的研究。SSR 标记具有多态性好,可重复性高,呈现共显性,在基因组内分布较广且均匀等优点,现已广泛应用于群落遗传结构的研究^[16-18]。SSR 引物一般分为基因组 SSR 引物和 EST-SSR 引物两类,以 EST 序列为基础进行引物的开发不必考虑非编码区域,易于筛选出合适的引物,而且不用进行大规模的基因组测序,十分经济简便^[19]。SSR-PCR 体系中的各种因素对反应结果均有一定的影响,对其体系的优化是十分必要的。

该研究利用正交设计对紫薇 SSR-PCR 体系中模板浓度、dNTP 浓度、引物浓度、酶浓度等 4 因素进行优化,筛选出了最优的反应体系,并利用最优的 SSR-PCR 反应体系对紫薇 EST-SSR 引物进行了筛选,为紫薇分子遗传学的研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

紫薇品种:紫霞、毛叶粉薇、矮生平枝紫、矮生平枝红、粉蕊出墙、白密香、白蝶飞舞,所有植株均定植于江苏省中国科学院植物研究所苗圃地中,常规大田管理。选取紫薇新生叶片,在苗圃取下后,放入冰盒中, -80℃ 保存待用。

该文中所用的 EST-SSR 引物序列来源于文献报道^[11,15],由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成,序列信息见表 1,其中 LID001 用于体系的优化, LID004 用于最优体系的验证,其余 24 对用

收稿日期:2013-06-24

基金项目:江苏省农业自主创新资金资助项目[CX(11)1039];江苏省科技公共服务平台资助项目(BM2012058);江苏省农业三新工程资助项目[SXGC(2012)412];南京市现代农业生产技术推广项目(201201021);江苏省自然科学基金资助项目(BK2012377)

第一作者简介:王鹏(1981-),男,山东省邹平县人,博士,助理研究员,从事观赏植物分子遗传学研究。E-mail: zzy_199101@139.com。

通讯作者:李亚(1969-),男,安徽省颍上县人,博士,研究员,从事观赏植物研究。E-mail: yalicnbg@yahoo.com.cn。

表 1 紫薇 SSR 引物序列
Table 1 Primer sequences of SSR for *Lagerstroemia indica*

编号 No.	引物序列 5'~3' Primer sequence	退火温度/℃ T _m	重复单元 Repeat motif	预期片段大小/bp Production length
LID001	F-AGAGAAAGAGAGGAGCGGGAGT R-ACCTTCTTCCCAATTCAATCC	55	(GT) ₆ GC(GT) ₆	213
LID004	F-ACGTTTAGCACACCGGTACTGT R-GGAAGCACATCACTATGGCAAG	55	(GT) ₇	181
LID009	F-GGTGGAGATGCTAACAAGCAAG R-GGATTTTTGCTGTAGGGTGATT	55	(TG) ₁₆	161
LID019	F-GGGGAGATAAACGATTTTGCAG R-GTAAGTACGGACCACCGTAGGC	55	(TG) ₈	183
LID020	F-GTGGAGGAGATTTGGACGATTT R-ATACGCCGAGGCATGATTAAC	55	(TG) ₉	219
LID024	F-CCCTCATACCTTCTTTATCAAGTCA R-ATCCCACAAAATCTCTCCTTC	55	(AC) ₁₃	215
LID031	F-CATGGGAACTATTTTCGGAGTGA R-CCACACAAACAAGAGGCAAAAG	55	(GT) ₁₉	221
LID032	F-TAAACCTACCTTTGGGCTGCTT R-CCCACATAGGAGATCGAAGAGG	55	(TA) ₆	193
LID036	F-TGGGATCGATGCTATTAATGTTG R-TACACCAATTCACACCTCCACTC	55	(GT) ₈	207
LID038	F-ACATGGCTCCCATCACACAG R-CAGGGGATTCTTGTTTTGCTTT	55	(AC) ₆	160
LID039	F-GTCTACTCCTCTCGATTCGTCTGA R-GGTGTGTTTCGTGGTAGGTCTG	55	(GT) ₉	188
LID042	F-GCTTAGTTTTGCTTCTGCTTTTGC R-GGACATGCCTTGCAATTAATCC	55	(GCACAC) ₆	185
11G	F-GTCACAGGTTACCGAATC R-ATGTAAATGGTGAGGAGG	50	(AATC) ₅	221
12B	F-TTCTTGTCTTGGGTATCGC R-GAGCCAGTATTGTCTTCACG	50	(CCTT) ₇	224
12G	F-TTCTTCCACTTCCTCCTT R-CAGCCCACATTAACCTTT	50	(AG) ₁₂	190
12H	F-AAAGACGCAGAAGGATGG R-CGATTAGTTTCAGCTCGT	50	(AG) ₂₀	392
13G	F-ATGTGGTGAATGGGAAC R-TTGGGCTAAAGATATGGA	50	(GAT) ₄	153
19H	F-GGACCAGATTGTAAATGC R-CTGCTCCTAATATCAGTGTC	50	(CT) ₁₅	281
110H	F-ATTCGATCTGCCCTCTTG R-ACTCGGGTTTACGTGGTG	50	(ACTG) ₄	228
112G	F-TAGTCCATTTCATGTCAAG R-GGATTCACCAAACACTT	50	(AG) ₁₄	124
112H	F-TCCCTTTAACGAGGAATG R-AAGTTTCTCGACGGCTTT	52	(CTT) ₅ (CCT) ₄ (CTT) ₈	133

续表 1

Continuing Table 1

编号 No.	引物序列 5'~3' Primer sequence	退火温度/℃ T _m	重复单元 Repeat motif	预期片段大小/bp Production length
II1C	F-GTGCTGGAGGAAGTCTA R-CACGCTATTCTAAGACAAGG	50	(AGAT) ₆	147
II2B	F-ACTGAAAAGTGACTAAACGGT R-CCATAGCCTGGAGTGAAA	50	(CTTT) ₆	297
II2C	F-TTTGGTGGTAGTGGGAGT R-GTGTCTGCATGGCTGTAA	50	(CTGT) ₆	134
II3A	F-CCTAACAAGAAAGGAACAG R-TTTCAGGACATCAGCACC	50	(AG) ₁₁	191
II3H	F-CCTCCTCCTGCCACTCCTCT R-CCCGTCGTCTCTCAGTTCTC	50	(AAG) ₄ ATG(AAG) ₂	163

于引物筛选;Buffer、dNTP、Mg²⁺、*Taq* 酶均购自 Takala 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及引物合成 利用 CTAB 法提取紫薇叶片 DNA,提取方法因样本不同而进行一定的改进^[20]。称取 0.3 g 叶片,用液氮磨碎,放入 2 mL 离心管中,加入 600 μLCTAB 裂解液,用牙签混匀;65℃水浴 30 min,每 5 min 颠倒混匀 1 次;在离心管中加入 600 μL 氯仿:异戊醇(24:1),上下颠倒 50 次后静置 1 min;将离心管以 11 000 r·min⁻¹ 以上的速度离心 20 min,转移上清至新离心管中;加入 300 μL 预冷的异戊醇,上下颠倒 30 次,−20℃保存 1~2 h;将离心管以 11 000 r·min⁻¹ 以上的速度离心 15 min,弃上清,沉淀用 300 μL70%乙醇洗涤 2 次;在通风厨中风干后,加入 100 μL 无菌去离子水,4℃条件下过夜溶解待用。DNA 样品用紫外可见分光光度计检测其浓度(A₂₆₀/A₂₈₀),−20℃保存。

1.2.2 SSR-PCR 反应 在参照 Wang 等^[15] 的紫薇 SSR 反应体系的基础上,采用 4 因素 3 水平

L₉(3⁴) 正交设计,即 DNA 模板浓度(20、40、60 ng)、dNTP 浓度(0.08、0.10、0.15 mmol·L⁻¹)、引物浓度(0.25、0.50、1.00 μmol·L⁻¹)、*Taq* 酶活性(0.1、0.2、0.4 U)(见表 2),每个体系中加入 10× Buffer 1.0 μL,25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 1 μL,ddH₂O 补至 10 μL。−20℃保存。扩增程序为 95℃预变性 3 min,95℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 30 s(35 个循环),72℃延伸 4 min,4℃保存。每个处理重复 3 次。

1.2.3 PCR 产物的检测 将 10 μL PCR 产物中加入 2 μL 3×Loading-buffer,利用 8%浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳,缓冲液为 1×TBE,上样量为 2 μL,进行恒压电泳,电压 185 V,电泳至溴酚蓝带跑出胶最低端为止。胶片用银染方法染色,染后用 250 mL 固定液(去离子水、10%乙醇、1%乙酸)固定 10 min,250 mL 1.5%硝酸银浸泡 10 min,250 mL 去离子水洗涤 2 遍,250 mL 显色液(去离子水、1.5%氢氧化钠、1%甲醛)显色 10 min,用去离子水冲洗终止反应,胶片用单反相机拍照,并利用 Photoshop 软件进行处理。

表 2 SSR 正交试验设计

Table 2 Design of orthogonal test of SSR

处理 Treatment	dNTP/ mmol·L ⁻¹	引物浓度/μmol·L ⁻¹ Primer concentration	DNA 聚合酶/U <i>Taq</i> DNA polymerase	模板 DNA/ng Template DNA
1	0.08	0.25	0.1	20
2	0.08	0.50	0.2	40
3	0.08	1.00	0.4	60
4	0.10	0.25	0.4	40
5	0.10	0.50	0.1	60
6	0.10	1.00	0.2	20
7	0.15	0.25	0.2	60
8	0.15	0.50	0.4	20
9	0.15	1.00	0.1	40

1.2.4 引物筛选 利用筛选得到的紫薇 SSR-PCR 最优反应体系对 24 对紫薇 SSR 引物进行扩增,筛选出带型清晰,有多态性的 EST-SSR 引物。

2 结果与分析

2.1 紫薇 SSR-PCR 反应体系的优化及验证

从图 1 可以看出,处理 2 和处理 9 仅第 3 次重复扩增出大小为 252 bp 的条带,处理 1 和处理 5 第 3 次重复扩增出大小为 252 和 255 bp 两条

带,处理 8 的 2 次重复扩增出大小为 252 和 255 bp 两条带,处理 3、处理 4、处理 6 和处理 7 的 3 次重复都能扩增出大小为 252 和 255 bp 的两条带,处理 7 扩增出的条带最清晰且最稳定,利于结果统计,因此选择处理 7 为最优化的 SSR 反应体系即 10 μ L 体系中含 *Taq* 酶 0.2 U、镁离子 2.5 mmol \cdot L⁻¹、dNTP 0.15 mmol \cdot L⁻¹、引物 0.25 mmol \cdot L⁻¹、模板 DNA 60 ng,去离子水补至 10 μ L。

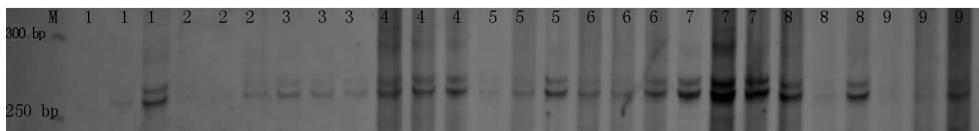


图 1 SSR-PCR 正交试验的电泳图谱
M:50 bp DNA Maker;1~9:正交组合 9 个处理的扩增产物

Fig. 1 Electrophoretogram of orthogonal test of SSR-PCR

M:50 bp DNA Maker,1~9:PCR products of 9 treatments in orthogonal test

2.2 最优 SSR-PCR 体系的验证

利用 7 个不同品种的紫薇 DNA 分别对最优的处理 7 体系和随机选择的非最优对照处理 2 进行 SSR-PCR 结果验证。从图 2 可以看出,反应体系 7 对不同品种的紫薇 DNA 均能扩增得到

250 bp 的条带,体系 2 的仅有 3 个品种的紫薇 DNA 扩增出 250 bp 的条带。验证结果表明 7 号反应体系作为最优反应体系对于不同的紫薇单株均能得到稳定的 SSR-PCR 扩增产物。



图 2 最优 SSR-PCR 反应体系的验证

M:50 bp DNA Maker;2~8 泳道:处理 7 扩增产物;9~15 泳道:处理 2 扩增产物

Fig. 2 Validation of optimal SSR-PCR reaction system

M:50 bp DNA Maker;2~8 lanes:PCR productions of treatment 7;9~15 lanes:PCR productions of treatment 2

2.3 引物的筛选

利用紫薇和毛叶粉薇 2 个紫薇品种的 DNA

及 SSR-PCR 最优反应体系对 24 对紫薇 EST-SSR 引物进行多态性筛选(见图 3) 结果表明,

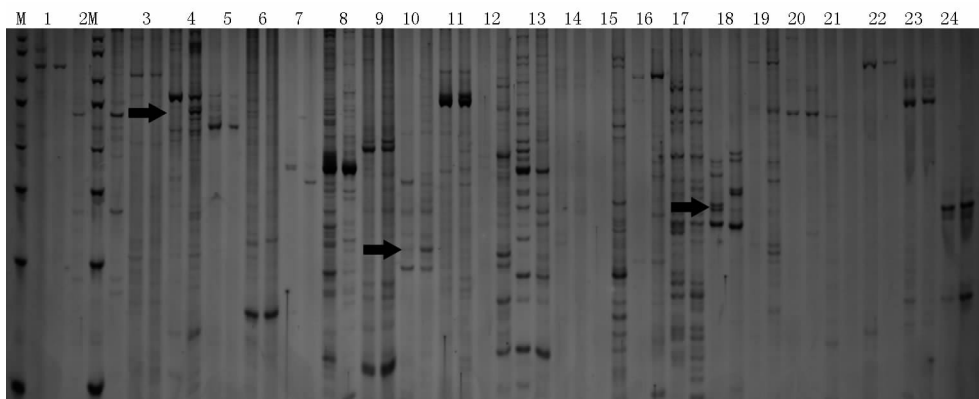


图 3 紫薇 SSR 引物筛选结果

M:50 bp DNA Maker;1~24 泳道:第 1~24 对紫薇 SSR 引物

Fig. 3 Result of SSR primer screening

M:50 bp DNA Maker;1~24lines:24 pairs of SSR markers from *Lagerstroemia indica*

24 对引物中共有 23 对扩增得到了清晰的条带,共扩增出 68 条清晰带,平均每对引物 2.9 条;其中具有多态性的引物 16 对,多态性条带占总带数的 57.4%;差异条带 39 条,有差异的引物多具有 2 条以上的差异带,仅有 2 对引物表现为单一条带差异。

3 结论与讨论

综上所述,紫薇 10 μ L SSR-PCR 的最优反应体系为 10 μ L 含 *Taq* 酶 0.2 U、镁离子 2.5 mmol·L⁻¹、dNTP 0.15 mmol·L⁻¹、引物各 0.25 mmol·L⁻¹、模板 DNA 60 ng,去离子水补至 10 μ L。研究筛选得到了 24 对可用的 EST-SSR 引物,其中有 16 对具有多态性,共扩增出条带 68 条,差异条带 39 条。

曾建立的研究认为中国石蒜体系为 20 μ L、树莓 15 μ L、櫻桃李 25 μ L^[21-22],从中得出的紫薇 10 μ L SSR-PCR 反应体系与其它体系相比,各种试剂的用量均下降,尤其是 *Taq* 酶,仅需 0.2 U,极大地降低了试验成本。由于正交试验设计能充分考虑各试验因素的平均分配和交互作用,常用于各种分子标记体系的建立,通常都能得到较为理想的试验结果。首次利用正交试验对紫薇 SSR-PCR 体系进行优化,在得到最优结果后利用其它不同紫薇品种验证最优体系,结果表明最优体系的稳定性,与 SSR 可重复性的特征一致^[23],为利用分子标记开展紫薇遗传多样性和遗传图谱构建等奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈俊愉. 中国花卉品种分类学[M]. 北京:中国林业出版社, 2001:162-171.
- [2] 方文培,张泽荣. 中国植物志(第 52 卷第 2 分册)[M]. 北京:科学出版社,1983:67-92.
- [3] 靳晓翠,范义荣. 紫薇种质资源概况及应用现状分析[J]. 河北农业科学,2009,13(1):16-17.
- [4] 宛成刚,吴锦华. 小花紫薇的引种栽培与园林应用[J]. 中国花卉园艺,2002(22):22-23.
- [5] 桂育谦. 矮生紫薇如何栽培与应用[J]. 中国花卉园艺, 2004(10):32-33.
- [6] 纵伟,夏文水. 大叶紫薇的化学成分和生理功能研究进展[J]. 食品与药品,2006,8(6):21-24.
- [7] 王献. 我国紫薇种质资源及其亲缘关系的研究[D]. 北京:北京林业大学,2004:36-38.
- [8] 顾翠花,王守先,张启翔. 我国紫薇属植物 AFLP 分子标记体系的优化[J]. 浙江林学院学报,2008,25(3):298-230.
- [9] 王献,柴永生,职永普. 紫薇叶片 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 河南农业大学学报,2004,38(2):189-192.
- [10] 王献,张启翔,杨秋生,等. 利用 AFLP 技术研究紫薇的亲缘关系[J]. 北京林业大学学报,2005,27(1):59-63.
- [11] Pooler M R. Molecular genetic diversity among 12 clones of *Lagerstroemia fauriei* revealed by AFLP and RAPD markers [J]. Hortscience,2003,38:256-259.
- [12] Cai M, Meng R, Pan H T, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Lagerstroemia caudata* (Lythraceae) and cross-amplification in other related species [J]. Conservation Genet Resour,2010,2:89-91.
- [13] 张亚东,杨彦伶. 湖北保康不同花色野生紫薇的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种,2004(5):683-688.
- [14] 徐静静,王立新,郁建锋. 不同花色紫薇的 ISSR 分析[J]. 常熟理工学院学报:自然科学,2010,24(4):13-17.
- [15] Wang X, Dean D, Wadl P, et al. Development of microsatellite markers from crape myrtle (*Lagerstroemia L.*) [J]. Hortscience,2010,45:842-844.
- [16] Fossati T, Labra M, Castiglione S, et al. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: The case of the varietal group known as "Schiave" [J]. Theor. Appl. Genet, 2001, 102:200-205.
- [17] Levinson G, Gutman G A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution [J]. Mol. Biol. Evolut., 1987, 4:203-281.
- [18] 李卫国,常天俊,龚红梅. EST-SSR 及其在植物基因组学研究中的应用[J]. 生物技术,2008(4):90-93.
- [19] 陈怀琼,隋春,魏建和. 植物 SSR 引物开发策略简述[J]. 分子植物育种,2009,7(4):845-851.
- [20] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1):8-15.
- [21] 李媛媛,郭修武,代汉萍,等. 树莓 SSR 体系的建立及优化[J]. 沈阳农业大学学报,2009,40(4):478-480.
- [22] 李芳,周龙,胡建芳. 新疆野生櫻桃李 SSR 体系的建立及应用[J]. 北方园艺,2010(13):120-123.
- [23] 时剑,童再康,黄华宏,等. 中国石蒜 SSR 体系的建立及性状对应分析[J]. 园艺学报,2011,38(3):571-578.

(下转第 27 页)