

# 番茄 SSR-PCR 反应体系的优化

赵建涛<sup>1</sup>, 尹延旭<sup>1</sup>, 常培培<sup>1</sup>, 胡晓辉<sup>1</sup>, 张 静<sup>1,2</sup>

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 园艺实验教学示范中心, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 为了确定番茄的 SSR-PCR 的最佳反应体系, 采用  $2\times Taq$  PCR Master Mix, 对  $Taq$  酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs 进行综合考虑, 探究其对番茄 SSR-PCR 反应体系的影响, 并优化出最佳的反应体系。结果表明: 引物用量对结果影响最大, 其次是 DNA 用量, Master Mix 用量对结果影响最小。最佳反应体系为: 模板 ( $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) DNA  $2\text{ }\mu\text{L}$ , Master Mix  $9\text{ }\mu\text{L}$ , 引物  $3\text{ }\mu\text{L}$ 。

**关键词:** 番茄; SSR-PCR 反应体系;  $2\times Taq$  PCR Master Mix; 正交设计

**中图分类号:** S641.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2014)12-0015-04

番茄作为一种重要的经济作物, 在世界范围内均有广泛的种植<sup>[1-2]</sup>。分子标记作为一种重要的辅助育种手段, 可在分子水平上直接反映了物种的遗传多样性<sup>[2]</sup>。目前常用的分子标记手段有 RFLP、RAPD、RFLP、ISSR、SCAR、SSR 和 CAPS 等<sup>[3-10]</sup>。SSR (Simple sequence repeat, 即简单重复序列), 又称微卫星序列 (microsatellites), 具有操作简单、多态性好、共显性遗传、信息量大、能覆盖整个基因组等优点<sup>[10-13]</sup>。确定 PCR 的最佳反应体系是 SSR 分子标记的基础工作<sup>[2,10,12]</sup>, 目前, 已有的反应体系通常分别研究  $Taq$  酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物和模板 DNA 共 5 个因素对反应体系的影响, 处理多, 工作量大且分析起来比较复杂<sup>[12-16]</sup>。该文采用使用效果较好的  $2\times$  Master Mix, 将  $Taq$  酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs 综合起来考虑, 既减少了试验因素, 又得到了较好的试验结果<sup>[16-17]</sup>。试验表明, 优化得到的反应体系, 重复性较好, 条带清晰, 为后续研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

番茄为野生种醋栗番茄 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) 和栽培种 (共 120 份) 由西北农林科技大学园艺学院番茄课题组提供。

引物根据茄科数据库 (<http://solgenomics.net/>) 公布的番茄 SSR 引物序列, 由上海生工合成。

供试试剂有 Master Mix (康为世纪公司), 产品编号为 CW0682、琼脂糖 (Sigma 公司)、四甲基乙二胺 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、甲基乙二胺二钠盐 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、异丙醇 (分析纯, 四川西陇化工有限公司)、硝酸银 (分析纯, 四川西陇化工有限公司)、异戊醇 (分析纯, 四川西陇化工有限公司)、乙醇 (分析纯, 四川西陇化工有限公司)、三羟甲基氨基甲烷 (分析纯, 科密欧化学试剂厂)、丙烯酰胺 (分析纯, 科密欧化学试剂厂)、 $\beta$ -巯基乙醇 (分析纯, 科密欧化学试剂厂)、聚乙烯吡啶烷酮 (分析纯, 科密欧化学试剂厂)。

主要仪器设备有电泳仪: ECP3000, 北京君意东方电泳设备有限公司; 水平电泳槽: DYCP-32A, 北京六一; 垂直电泳槽: JY-SCZ8, 北京君意公司; 水浴锅: BG25, 杭州朗基科学仪器有限公司; 冷冻离心机: 5424R, 德国 Eppendor 公司; PCR 仪: MYCYCLER, 美国 BIO-RAD 公司; 凝胶成像系统: GBDX-HR, 英国 SYNGENE 公司。

1.2 方法

试验于 2014 年 3 月在西北农林科技大学园艺学院试验教学中心进行。

1.2.1 基因组 DNA 的提取 将试验番茄种子播种于 96 孔育苗穴盘, 采用无土育苗基质, 气候室内培养番茄幼苗, 待番茄长出幼苗后, 取番茄的鲜嫩叶片, 参照方宣钧等<sup>[18]</sup>的 CTAB 法并略加改进提取番茄基因组 DNA, 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。

1.2.2 PCR 反应各因素水平的确定和正交方案的设计 Mix 中包含了  $Mg^{2+}$ 、dNTPs 和  $Taq$  酶, 可综合评价其对番茄 PCR 反应体系的影响。反应中

收稿日期: 2014-06-26

基金项目: 国家星火计划资助项目 (2012GA850001-1); 西北农林科技大学校基本业务资助项目 (2452013QN012)

第一作者简介: 赵建涛 (1990-), 男, 河南省周口市人, 硕士, 从事园艺作物品质调控及逆境调控机理研究。E-mail: zhao-jiantao712100@163.com。

通讯作者: 张静 (1979-), 女, 博士, 高级实验师, 从事园艺植物生理及代谢研究。E-mail: yzjhj@nwsuaf.edu.cn。

各个因素的水平见表 1,该试验采用  $L_9(3^3)$  正交设计,具体信息见表 2。试验所用样本 DNA 浓度为  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,引物浓度为  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 番茄 SSR-PCR 反应体系各因素水平

Table 1 The levels and factors of SSR-PCR reaction system

因素 Factors	水平 Levels		
	I	II	III
模板 DNA/ $\mu\text{L}$ Template DNA	1	2	3
Master Mix/ $\mu\text{L}$	8	9	10
引物/ $\mu\text{L}$ Primers	1	2	3

表 2 PCR 反应因素水平的  $L_9(3^3)$  正交设计方案

Table 2  $L_9(3^3)$  orthogonal design for different factors and levels of PCR reaction

编号 No.	DNA/ $\mu\text{L}$	Master Mix/ $\mu\text{L}$	引物/ $\mu\text{L}$ Primers
1	1	8	1
2	1	9	2
3	1	10	3
4	2	10	1
5	2	8	2
6	2	9	3
7	3	9	1
8	3	10	2
9	3	8	3

1.2.3 SSR-PCR 扩增产物及产物检测 PCR 反应体系为  $25 \mu\text{L}$ ,各反应如表 2 所示,不足部分用  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足。PCR 反应体系为  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ , $94^\circ\text{C}$  变性  $4 \text{ min}$ , $55^\circ\text{C}$  退火  $45 \text{ s}$ , $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ ,35 个循环,然后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ,最后  $4^\circ\text{C}$  保存。

PCR 反应产物首先在 1.5% 琼脂糖上检测扩增产物,然后利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.4 反应体系的验证 以野生种和栽培种等 8 份材料 DNA 为模板,随机选取番茄数据库中 30 对引物验证反应体系的可靠性,用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测试验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取结果检测

为保证及验证 DNA 提取质量,该试验一批次同时提取了 6 份样。由图 1 可以看出,样品 DNA 提取效果较好,条带清晰无杂带,且浓度较高。

### 2.2 PCR 扩增产物检测结果

为减少试验误差,该试验中每个反应均设置 3 个重复,9 个处理(见表 2)。从琼脂糖凝胶电泳



图 1 DNA 提取效果

Fig. 1 The extraction of template DNA

图(见图 2)中可以看出,27 个反应均出现目的条带,大小在  $100 \sim 250 \text{ bp}$ ,与 SSR-PCR 反应预期得到的条带大小相近,且条带差异比较明显,其中处理 3、6、8 效果最好,2、5、9 次之,1、4、7 最差。另外,同一处理不同重复之间差异较小,试验结果表明,该方法具有较高的可重复性。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明(见图 3),其和琼脂糖凝胶电泳效果一致,且具有更高的分辨率。综合比较可知,最优的反应体系为处理 6。

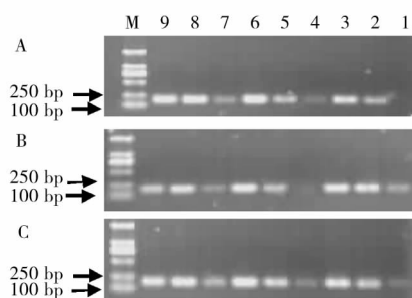


图 2 琼脂糖凝胶电泳结果

A,B,C 为 3 个重复结果

Fig. 2 PCR reaction effect of agarose gel electrophoresis

A,B and C mean three repeats

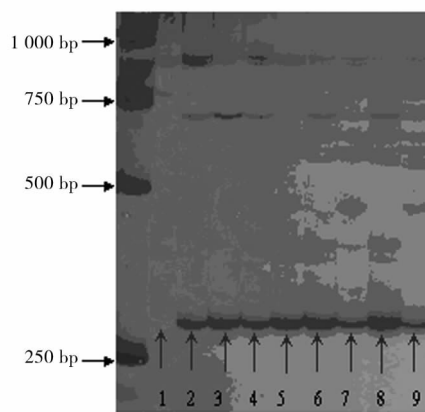


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 3 PCR reaction result of PAGE

### 2.3 对各处理及因素间的综合比较分析

结合琼脂糖凝胶电泳结果和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,综合分析后对各个处理进行评分,最优记为 9,最差记为 1,依此得到各个处理的具体分数(见表 3)。

2.3.1 评分结果及分析 根据表 3 的信息对各个处理进行极差分析和方差分析,结果见表 3、表 4。通过对模板、Master Mix 和引物的极差分析可知,极差由大到小的顺序为引物>模板>Mix,表明引物用量对反应结果影响最大,模板用量次之,Master Mix 对 PCR 结果影响最小。

通过利用 SPSS 数据分析软件对各个处理进

行分析(见表 3 与表 4),发现处理 6 和处理 8 之间无显著差异,且评分最高,是最好的处理组合;处理 8 和 9 之间存在极显著差异,而处理 9 和处理 3 差异不显著;处理 3 和处理 5 之间存在极显著差异,而处理 5 和处理 2 之间差异不显著;处理 1、4、7 之间差异不显著。

表 3 正交设计中 9 个处理的综合评分结果分析  
Table 3 Scores of 9 treatments in orthogonal design

重复 Repeat	各处理评分结果 Score of treatments								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	1	4	6	2	5	9	3	8	7
II	3	5	6	1	4	9	2	8	7
III	1	4	6	2	5	8	3	9	7
总分 Total	5 eD	13 cC	18 bB	5 eD	14 cC	26 aA	8 deD	25 aA	21 bB

注:不同大、小写字母表示差异极显著或差异显著( $P<0.01$ , $P<0.05$ )。  
Note: Different capital letters and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level respectively.

表 4 SSR-PCR 各因素极差分析  
Table 4 Range analysis of SSR-PCR  
reaction factors by orthogonal design

项目 Items	因素 Factors		
	A 模板 DNA	B Master Mix	C 引物 Prime
K1	36	40	18
K2	45	47	52
K3	54	48	65
X1	4	4.44	2
X2	5	5.22	5.78
X3	6	5.33	7.22
R	2	0.89	5.22

注:  $K_i$  指每个重复的相应得分和,  $X_i$  指相应重复的总得分均值。  
Note:  $K_i$  means corresponding scores of each repeat,  $X_i$  means average total score accordingly repeat.

结合琼脂糖凝胶电泳结果和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,发现最好的组合为处理 6,处理 8 次之,且两者之间无显著差异。所以 Master Mix 所加量在 8~10  $\mu\text{L}$  时均是可以的, DNA 的量在 2~3  $\mu\text{L}$  均可以,但在 2  $\mu\text{L}$  左右效果较好,引物浓度可控制在 2~3  $\mu\text{L}$ ,最好为 3  $\mu\text{L}$ 。

2.3.2 对反应体系的验证 通过对 30 对 SSR 引物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明,80% 以上的引物条带都比较清晰(见图 4),个别条带比较模糊,整体效果较好;从 30 对引物中共筛选出有多态性的引物 11 对,占全部引物的 36.7%(见表 5)。

为进一步验证引物的多态性和反应体系的可靠性,分别选取引物 SSR306、LEaat003 和 120 份番茄材料,对反应结果进行进一步验证。结果见图 5 和图 6。图 5 中竖向的 3 个箭头从左到右分别表示 3 种不同大小的带型,说明引物 SSR306 在这 120 份材料中有 3 种带型,且没有杂合体。

图 6 中前两个竖向箭头表示两种不同的带型,而第 3 个竖向箭头所指示的材料同时具有两种带型,表明其为杂合体。通过验证结果表明,这 120 份番茄材料在不同引物之间的多态性较大,且不同的引物的反应结果均较好。

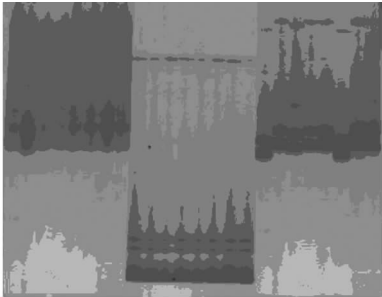


图 4 8 份番茄材料在引物 SSR33、SSR34、SSR142 (从左到右)中的多态性筛选结果  
Fig. 4 The polymorphism of 8 different tomato cultivars in SSR33, SSR34, SSR142 (from left to right)



图 5 SSR306 在 120 份番茄材料中的多态性  
Fig. 5 The phlymorphism of SSR306 in 120 tomato ctrivars

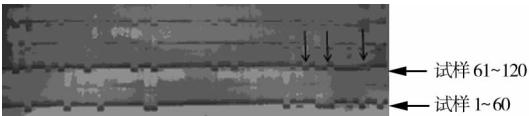


图 6 LEaat003 在 120 份番茄材料中的多态性  
Fig. 6 The polymorphism of LEaat003 in 120 tomato cultivars

表 5 筛选出有多肽的引物  
Table 5 Polypeptide SSR primers were selected in the experiment

引物 Primers	正向序列 Forward primer	反向序列 Inverse primer
SSR320	5'-ATGAGGCAATCTTCACCTGG-3'	5'-TTCAGCTGATAGTTCCTGCG-3'
SSR33	5'-GTCTTTACACAATCTCTCACTTGG-3'	5'-CTGGTCACTGAACTGCCAGA-3'
SSR34	5'-TTCGGATAAAGCAATCCACC-3'	5'-TCGATTGTGTACCAACGTCC-3'
SSR142	5'-CGAACAGATGCATAGATGAAGA-3'	5'-ACGGTGTGGACTCATGTGAA-3'
SSR306	5'-ACATGAGCCCAATGAACCTC-3'	5'-AACCATTCCGCACGTACATA-3'
LEaat003	5'-CTTGAGGTGGAATATGAACAC-3'	5'-AAGCAGGTGATGTTGATGAG-3'
SSR13	5'-GGGTACATACACTCATACTAAGGA-3'	5'-CAAATCGCGACATGTGTAAGA-3'
SSR46	5'-CCGAGGCGAATCTTGAATAC-3'	5'-GCACCATCTCTTGTGCCTCT-3'
TES6	5'-GCTTACTCTCCAATGGCGGAC-3'	5'-CGATTAGAAGGCGAAGAAG-3'
LEgata001	5'-CTCTCTCAATGTTTGTCTTTC-3'	5'-GCAAGGTAGGTAGCTAGGGA-3'
SSR345	5'-AAGCCAAGCTCGAACCTGTA-3'	5'-ATCCATGCTGTCGCTTTCAT-3'

### 3 结论

SSR 作为一种重要的分子育种辅助手段,在主要经济作物如番茄等的一些重要品质性状如果实大小、糖酸含量的研究具有重要意义。SSR-PCR 反应受到 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板 DNA 不同因素的影响,该试验采用 Master Mix,将 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs 综合起来进行考虑,减少了试验因素,并且便于分析。结果表明,在一定浓度范围内,引物用量对结果影响最大,合适的范围为 2~3  $\mu$ L;其次是 DNA 用量,合适的范围为 2~3  $\mu$ L,对结果影响最小的为 Master Mix 用量,合适范围为 8~10  $\mu$ L。最终确定最佳反应体系为:模板 DNA 2  $\mu$ L, Master Mix 9  $\mu$ L,引物 3  $\mu$ L。

#### 参考文献:

[1] 孙亚东,梁燕,吴江敏,等. 番茄数量性状与番茄红素相关性分析[J]. 中国蔬菜,2010(6):74-76.  
[2] Adriana Sacco, Antonio Di Matteo. Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato[J]. Molecular Breeding,2013,31:217-222.  
[3] Madan Mohan, Suresh Nair. Genome mapping, molecular markers and markers-assisted selection in crop plants[J]. Molecular Breeding,1997,3:87-103.  
[4] Grandillo, Tanksley S D. Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*[J]. Theor Appl Genet,1996,92:957-965.  
[5] Grandillo, S. D. Tanksley. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related *Lycopersicon pimpinellifolium* [J]. Theor Appl Genet 1996,92:935-951.

[6] 刘阳,陈火英,魏毓棠,等. 番茄 SSR 遗传连锁图谱的构建及几个产量相关 QTL 的定位[J]. 自然科学进展,2005,15(6):748-751.  
[7] Saskia Sulaiman-pollatschek, Kualla Kashkushg. Generation and mapping of AFLP, SSRs AND SNPs in *Lycopersicon esculentum* [J]. Cellular and Molecular Biology Letters, 2002,7:583-597.  
[8] Thomas C M, Vos P, Zabeau M, et al. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation[J]. Biol Reprod. ,2002,66(3):545-54.  
[9] 陈火英,刘阳. 番茄分子标记研究进展[J]. 上海交通大学学报,2003,21(4):356-359.  
[10] 杨东娟,马瑞君. SSR 分子标记在作物遗传多样性研究中的应用现状[J]. 甘肃科技,2007,23(8):100-102.  
[11] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Resource,1989,7:6463-6471.  
[12] 刘杨,陈火英,魏毓棠. 番茄微卫星标记(SSR)反应体系的优化研究[J]. 沈阳农业大学学报,2005,36(2):155-158.  
[13] 严长杰,徐辰武,裔传灯,等. 利用 SSR 标记定位水稻糊化温度的 QTLs[J]. 遗传学报,2001,28(11):1006-1011.  
[14] 曾艳玲,谭晓风,曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 湖北农业科学,2008,11(47):1235-1237.  
[15] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 反应条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.  
[16] 许玉兰,蔡年辉,段安安,等. SSR-PCR 反应体系建立与优化的研究概述[J]. 生物技术,2012,22(2):73-76.  
[17] 梁玉琴,李芳东. 正交设计优化柿属植物 SSR-PCR 反应体系[J]. 经济林研究,2012,29(4):17-22.  
[18] 王珍,方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种,2003,1(2):281-288.