

啤酒大麦 SSR 分子标记 PCR 反应体系的建立与优化

杨振华

(杨凌职业技术学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为建立及优化啤酒大麦 SSR 分子标记 PCR 反应体系,以 35 个啤酒大麦品种(系)为试验材料,利用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计研究 DNA、*Taq* 酶、dNTPs 及引物浓度对啤酒大麦 SSR 扩增效果的影响。结果表明:模板 DNA 2.0 ng、 $10\times$ PCR buffer 1.0 μL 、dNTPs 0.6 μL 、引物 (0.25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 1.5 μL 、*Taq* 酶 (2.5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.45 μL 的扩增效果最优,扩增结果重复性好且稳定。

关键词:啤酒大麦; PCR 反应体系; 优化

中图分类号:S512.31 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)05-0026-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.05.0026

分子标记技术已经在许多植物遗传标记领域中广泛应用,目前使用较多的有 RAPD、AFLP、ISSR 及 SSR 等几种标记方法^[1-4]。其中 SSR 较其它标记方法具有数量丰富、多态性优,试验重复性好、结果可靠性高等优点^[5-7],是一种极具实用价值的标记方法。根据相关报道显示,目前已经建立并优化了小麦、玉米、水稻等作物的 SSR-PCR 反应体系^[8-11],并根据反应体系分析了作物的遗传多样性^[12-13],但在啤酒大麦中,尚无人开展此方面的研究,虽然大麦与玉米、小麦同属于禾本科,但其植物属性差异及 SSR 扩增过程中 DNA 的纯度、引物用量、*Taq* 酶用量及 dNTPs 浓度及温度的差异影响,有必要对啤麦 SSR-PCR 反应体系进行研究,试图建立一种适用于啤麦遗传分析的 SSR-PCR 最佳反应体系,可为啤酒大麦品种纯度鉴定、品种遗传多样性分析等提供理论依据^[14]。

1 材料与方法

1.1 材料

参试材料为甘啤系列品种(系)与引进品种共 35 份(见表 1),由甘肃省农业科学院提供。*Taq* 酶、 $10\times$ Buffer、 Mg^{2+} 、dNTP、引物均购自西安天根生化公司(见表 2)。引物 EBmag0757 为体系建立及优化的固定引物,引物 EBmag0764 为验证引物。

表 1 供试啤酒大麦来源
Table 1 Source of beer barley

编号 No.	品种(系) Varieties (lines)	品种来源 Original	编号 No.	品种(系) Varieties (lines)	品种来源 Original
1	KH.GYONGYOS	匈牙利	19	MERIT	美国
2	KH LEDI	匈牙利	20	Qinta	匈牙利
3	Z109M050M	美国	21	ROXANA	匈牙利
4	G8810	中国	22	Jaxana	匈牙利
5	G231M004M	美国	23	KH.SZOFI	匈牙利
6	9413-6-3-3	中国	24	Z090M066M	美国
7	TRADITION	美国	25	甘啤 5 号	中国
8	6B98-9339	美国	26	M-22	匈牙利
9	TABORA	匈牙利	27	9404-13-1-3	中国
10	Pasadena	匈牙利	28	甘啤 4 号	中国
11	Jubelete	匈牙利	29	Jubilant	匈牙利
12	甘啤 3 号	中国	30	SCARLETT	匈牙利
13	9404-13-3	中国	31	甘啤 2 号	中国
14	PRESTIGE	美国	32	法瓦维特	德国
15	9416-4-1-3	中国	33	B1614	美国
16	KH DAMA	匈牙利	34	Raxana	匈牙利
17	Z053N066N	美国	35	B1202	美国
18	Z014J081J	美国			

1.2 方法

1.2.1 啤酒大麦的 DNA 提取及检测 对参试品种幼苗进行避光培养使之黄化,每个样品取 3 片幼叶。采用改良后的 CTAB 法进行啤酒大麦 DNA 提取,稀释到 20 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 于 -20°C 冰箱保存^[15]。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

收稿日期:2015-01-07
作者简介:杨振华(1981-),男,甘肃省泾川县人,硕士,讲师,从事教学科研工作。

26

表 2 标记引物序列

Table 2 The sequence of primers

引物 Primers	引物序列 Sequence
EBmag0757	F:5'-GTGTCTTTTTCACCTTCCTTTG-3' R:5'-AGTAGTAGAGTTGTCACTTCT-3'
EBmag0764	F:5'-AGAATCAAGATCGCCAAAC-3' R:5'-AAGTAGCCAAGTACAAAAA-3'

1.2.2 PCR 反应体系建立 参考 Biswasel 的方法确定初始反应体系(见表 3)^[16]。PCR 反应在 PTC-100 型热梯度循环仪(购自美国 MJ Research 公司)上进行。反应程序为 95℃ 退火 3 min; 92℃ 35 s, 70℃ 50 s, 30 个循环; 75℃ 4 min。

表 3 PCR 初步反应体系

Table 3 The reaction system for PCR

反应组分 Composition	反应体积/ μL Volume
ddH ₂ O	10
10×Buffer(Mg-free)	2
MgCl ₂ (50 mmol·L ⁻¹)	1.6
dNTP(2.5 mmol·L ⁻¹)	0.7
Taq 酶(2.5 U· μL^{-1})	0.2
DNA(10 ng· μL^{-1})	2.5
正向引物(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5
反向引物(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5

表 4 L₁₆(4⁴) 正交试验设计

Table 4 L₁₆(4⁴) orthogonal design

编号 No.	模板 DNA / μL Template	dNTPs/ μL	引物/ μL Primer	聚合酶/ μL Taq
1	1.5	0.3	0.5	0.15
2	1.5	0.4	1.0	0.25
3	1.5	0.5	1.5	0.35
4	1.5	0.6	2.0	0.45
5	2.0	0.3	1.0	0.15
6	2.0	0.4	0.5	0.25
7	2.0	0.5	2.0	0.35
8	2.0	0.6	1.5	0.45
9	2.5	0.3	1.5	0.15
10	2.5	0.4	2.0	0.25
11	2.5	0.5	0.5	0.35
12	2.5	0.6	0.1	0.45
13	3.0	0.3	2.0	0.15
14	3.0	0.4	1.5	0.25
15	3.0	0.5	1.0	0.35
16	3.0	0.6	0.5	0.45

1.2.3 PCR 反应体系优化 采用 L₁₆(4⁴) 正交试验设计, 确定模板 DNA、dNTPs、引物(EBmag0757)、Taq 酶 4 个因素对扩增效果的影响, 每个处理 3 次重复。

1.2.4 优化体系稳定性测试 使用引物 EBmag0764 对 35 份 DNA 材料进 PCR 扩增, 验证优化后的反应体系的稳定性和一致性。

1.2.5 退火温度的确定 选用最优体系对退火温度进行梯度试验, 在 PCR 仪上设置 6 个温度梯度, 分别为 52、54、56、58、60 和 62℃。比较退火温度对条带清晰度的影响。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

提取纯化后的部分基因组 DNA 样品, 经电泳检测条带明亮(见图 1)。

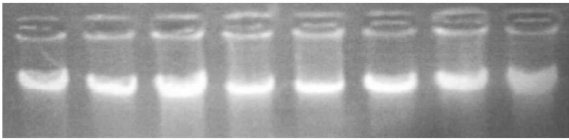


图 1 提取纯化后的部分基因组 DNA 样品
Fig. 1 Extraction and purification of DNA samples

2.2 PCR 反应体系优化

2.2.1 体系成分对 PCR 体系扩增的影响 由图 2 可以看出, 在 16 个处理中, 存在着明显的差异。其中第 1、2、9、12、14 号处理扩增条带弱, 第 13、15、16 号处理较好, 条带较亮, 第 4、8、10 号组合处理最亮, 说明体系配比最优, 从节约的角度考虑选用 8 号组合, DNA 2.0 ng、10×PCR buffer 1.0 μL 、dNTPs 0.6 μL 、Primers (0.25 mmol·L⁻¹) 1.5 μL 、2.5 U· μL^{-1} Taq 酶 0.45 μL 。

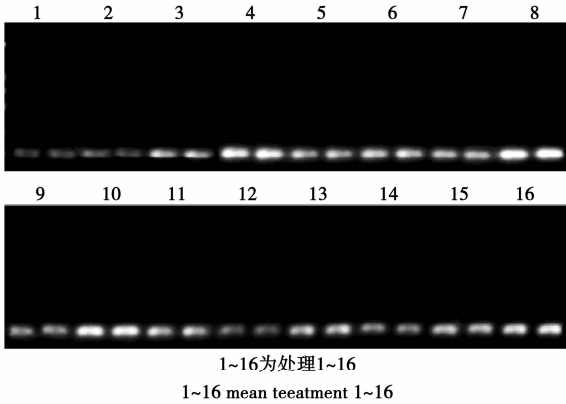
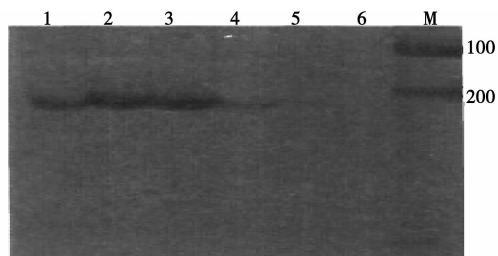


图 2 SSR-PCR 正交设计试验电泳图
Fig. 2 SSR-PCR orthogonal design test electrophoresis

2.2.2 退火温度梯度试验 选用最优体系对退火温度进行梯度试验,从图 3 看出,当退火温度为 54℃时,SSR 扩增产物电泳条带亮度最强。

2.2.3 试验稳定性试验 以 8 号处理构建体系,以验证引物 EBmag0764 分别对 35 个大麦品种进行 SSR 扩增分析,扩增带清晰,具有多态性且稳定,其大小为 100~400 bp(见图 4),说明 SSR-PCR 优化体系准确可靠,可以广泛应用到啤麦 SSR 标记的分析研究中。



1-6分别为52、54、56、58、60、62℃
1~6 mean the temperature was 52、54、56、58、60and 62℃respectively

图 3 退火温度对扩增效果的影响

Fig. 3 Effect of annealing temperature on the amplification

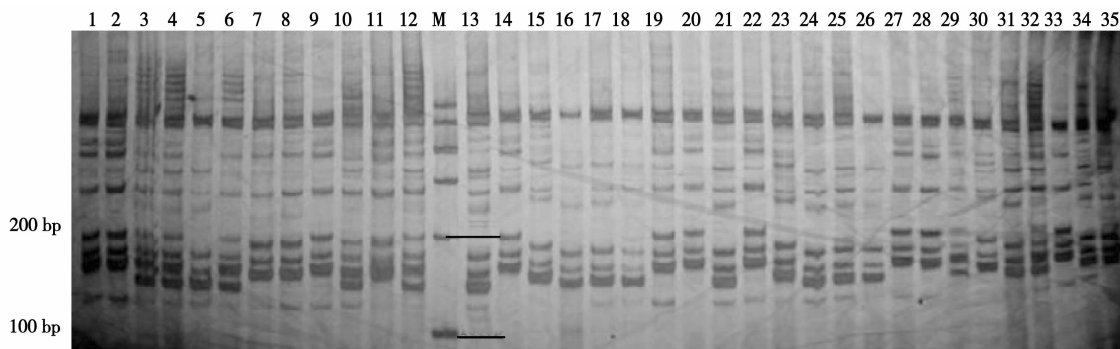


图 4 引物 EBmag0764 对 35 份 DNA 的扩增效果

Fig. 4 Expansion effect of primer EBmag0764 for 35 beer barley varieties (lines)

3 结论与讨论

本研究采用正交 $L_{16}(4^4)$ 试验设计,优化了 PCR 反应体系各组分用量,使其均匀分散,齐整可比,最终确立了最优组合,即反应体系为:模板 DNA2.0 ng、 $10 \times$ PCR buffer 1.0 μ L、dNTPs 0.6 μ L、引物 1.5 μ L、2.5 U $\cdot\mu$ L⁻¹ Taq 酶 0.45 μ L。PCR 反应体系中的主要影响因素是模板 DNA、dNTP、Taq 酶、引物浓度,要建立稳定高效的反应体系就必须对这些因素进行组合优化筛选,目前多采用单因素分析比较,试验过程繁杂,不能兼顾到各因素间的相互作用,本研究采用正交试验设计,筛选出优化组合体系,试验过程简单,筛选出的体系可靠稳定。^[17-18]。SSR-PCR 反应的引物退火温度也是决定反应成功的关键因素,虽然每对引物都有其特定理论退火温度,但在实际情况下,根据理论退火温度扩增的结果往往不理想,所以每对引物温度都要经过筛选才可确定其实际退火温度。

参考文献:

[1] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases[J]. Theoretical Applied Genetics, 1994, 87: 789-794.
[2] Rohlf F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multi variate analysis system[J]. Crop Science, 1990, 23(2): 956-961.

[3] 张赤红, 张京. 大麦品种资源遗传多样性的 SSR 标记评价[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(2): 214-219.
[4] Power A G. Entomoh Exp[J]. Applied, 1988, 49: 213-219.
[5] Teutch M R. Anim Biotechnol [J]. Applied, 1990, 1: 185-199.
[6] 陈灵芝. 中国的生物多样性[M]. 北京: 科学出版社, 1993, 99-113.
[7] Arrdcibia A, Gentinetta E, Cuzzoni E, et al. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardments or intace cell electroporatio[J]. Molcelar Breed, 1998, 4: 99-109.
[8] Arencibia A, Carmona E R, Comide M T, et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation[J]. Transgenic Resource, 1999, 2180: 1-2.
[9] 孙立军. 中国大麦遗传资源和优异种质[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
[10] Ward D J. Some evolutionary as peets of certain morphologic charaters in a world collection of barley[J]. USDA Tech Bull, 1962, 1276: 1100-1112.
[11] Tolbert D M, Qualset C O, Jain S K, et al. Adiversity analysis of a world collection of bari[J]. Crop Science, 1979, 19: 789-794.
[12] Graham R, Mc Nicol J A. Comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry[J]. Theorectial Applied Genetics, 1996, 93(3): 402-406.
[13] 冯宗云, 刘仙俊, 张正义, 等. 应用微卫星标记研究西藏野生大麦的遗传多样性[J]. 遗传学报, 2006, 33(10): 917-928.