

文章编号:1003-8701(2009)06-0034-03

# 东北山葡萄 SSR 反应体系的建立及优化

申海林, 邹利人, 陈 蕾, 温景辉\*

(吉林省农业科学院果树研究所, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:**以东北山葡萄(左山二)叶片为材料,对 SSR 反应体系中的主要影响因子进行了优化。研究了模板浓度、引物浓度、dNTP 浓度、TaqDNA 聚合酶量对扩增的影响。结果表明,在 20  $\mu$ L SSR 体系中各组分的适宜浓度为:1 $\times$ PCR buffer,引物 0.3  $\mu$ mol/L,模板 DNA 30 ng,dNTP 0.2 mmol/L,TaqDNA 聚合酶 1.0U。应用该 SSR 体系,用 3 对引物对 5 份山葡萄材料进行了扩增,证实了该体系的适用性和稳定性。

**关键词:**东北山葡萄;SSR 标记;反应体系

中图分类号:S663.1

文献标识码:A

## Establishment and Optimization of an SSR Reaction System for *Vitis amurensis*

SHEN Hai-lin, ZOU Li-ren, CHEN Lei, WEN Jing-hui\*

(Pomology Institute, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100;

**Abstract:** The main factors in SSR on *Vitis amurensis* were optimized using the leaves of grape cultivar 'Zuoshaner' as material in this study. The concentrations of primer, DNA, dNTP and the dosage of TaqDNA polymerase were screened to optimize SSR amplification system. The results showed that the optimum concentrations of components in 20 $\mu$ L SSR reaction system were as follows: 1  $\times$  PCR buffer, 0.3 $\mu$ mol/L primer, 30ng DNA, 0.2mmol/L dNTP, 1.0U TaqDNA polymerase. The system developed was successfully applied in the amplification of 5 cultivars of *Vitis amurensis* with three pairs of primer. This indicated the suitability and steadiness of the system.

**Keywords:** *Vitis amurensis*; SSR marker; Reaction system

我国山葡萄作为葡萄属的一个重要分支,资源丰富,是葡萄属中最抗寒的一个种。枝蔓可耐-40 $^{\circ}$ C低温,根系可耐-14~-16 $^{\circ}$ C低温,并且对白粉病、白腐病、炭疽病、黑痘病有较强抵抗力。是目前国内外葡萄抗寒、抗病育种的主要种质资源,也是东北酿造葡萄酒的主要原料。

SSR (simple sequence repeat) 即简单重复序列,具有多态性高、重复性好、共显性遗传、技术简单、特异性强等优点。作为一种中性的、共显性分子标记,SSR 分子标记在辅助育种实践中有着重要作用。作为目前一种重要的标记技术,已成为

居群遗传学研究、种质资源鉴定、亲缘关系分析和图谱构建首选的分子标记之一。

SSR 标记在东北山葡萄上的应用报道很少。以该分子标记研究山葡萄资源遗传多样性,可以更好的有助于葡萄分子育种,为合理有效利用山葡萄种质资源提供理论依据。为此,本研究以东北山葡萄为试材,探讨了山葡萄 SSR-PCR 反应体系中的几个主要影响因子对 PCR 扩增的影响,以期建立一套适合山葡萄资源的 SSR 标记反应体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为双丰、双优、左山一、左山二和双红 5 个品种叶片,取自于吉林省农业科学院果树所葡萄圃,取回实验室即进行 DNA 提取。用于

收稿日期:2009-11-16

作者简介:申海林(1977-),男,助理研究员,主要从事葡萄栽培和育种研究。

通讯作者:温景辉,男,研究员,E-mail:wj51777@126.com

SSR-PCR 反应的引物是根据加拿大哥伦比亚大学公布的序列设计,由上海生工合成,TaqDNA 聚合酶及 dNTP 购自天根生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组 DNA 的制备

采用改良 CTAB 方法进行山葡萄叶片基因组 DNA 提取。获得的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计检测后,将样品浓度调至 30 ng 保存备用。

### 1.2.2 山葡萄 SSR 体系的优化

体系优化材料采用左山二。PCR 基本反应体系 20  $\mu$ L 体系中包含 1 $\times$ PCR buffer,0.3 mmol/L dNTP,0.4  $\mu$ mol/L 引物,1.0U TaqDNA 聚合酶,60 ng DNA 模板。所用引物为 UDV-033 (引物序列 F: TTGTCCGTTTTAGCTCAATG R: TCTGCATAAGGGTGATTAAGA)。其中引物浓度设 5 个浓度梯度(0.15、0.3、0.45、0.6 和 0.75  $\mu$ mol/L),模板 DNA 用量设 5 个梯度(10、15、30、45 和 60 ng),dNTP 浓度设 5 个梯度(0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mmol/L),酶用量设 5 个梯度(0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5U),分别设置某一成分梯度变化,其他成分采用基本反应体系,比较扩增效果。采取 3 次重复。

### 1.2.3 DNA 的扩增

采用优化的 SSR 体系,在德国生产的 Biometra Tg PCR 仪上进行,扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min,95 $^{\circ}$ C 变性 40s,50~60 $^{\circ}$ C 退火 40s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。然后取 PCR 产物 4  $\mu$ L 进行点样,6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,胶干后在清华紫光 e100 扫描仪上成像保存。以 D2 000 bp DNA ladder Marker 产生的带为标准。

### 1.2.4 体系稳定性验证

采用优化后体系,用筛选出的 3 对引物(UDV-041、VVMD31、UDV-033),对 5 份材料进行了扩增,3 次重复。UDV-041 引物序列(F: AAGATCC-CTCCACCCAAAAA R: TGGGATCTCTTTCCACATCA);VVMD31 引物序列(F: CAGTGTTTTTCTTAAAGTTTCAAGG R: CTCTGTGAAA GAGGAAGAGACGC)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 反应体系的优化

#### 2.1.1 引物浓度对 PCR 扩增的影响

引物浓度关系到扩增产物的质量,浓度偏高会引起错配和非特异性产物扩增,增加引物二聚体的形成几率,浓度太低则无法进行有效扩增。从图 1 中

可以看出,在各引物浓度下,均能扩增出条带。引物浓度 0.15  $\mu$ mol/L 时得到的产物条带较弱,当浓度为 0.3~0.45  $\mu$ mol/L 时,反应稳定,条带最为清晰。引物浓度为 0.6~0.75  $\mu$ mol/L 时,随引物浓度增加,扩增产物反而减少,其原因可能与随引物浓度升高,增加了引物二聚体,导致与模板 DNA 不能有效结合有关。因此,本试验选出的合适的引物浓度为 0.3  $\mu$ mol/L。

#### 2.1.2 模板 DNA 浓度对 PCR 扩增的影响

模板 DNA 浓度直接关系到扩增产物的产量,浓度太低则无法进行有效扩增。从图 1 可以看出,不同浓度模板 DNA 均能扩增出产物条带,但模板浓度对扩增产物量有明显影响。模板浓度为 10~15 ng 时,扩增产物条带较弱,模板浓度为 30~60 ng 时,扩增产物条带效果较好且结果稳定。根据体系优化原则,模板用量建议采用 30 ng。

#### 2.1.3 dNTP 浓度对 PCR 扩增的影响

dNTP 是 SSR-PCR 反应中的主要组成部分,它的含量直接影响着产物的产量、特异性及忠实性。如图 1 中所示,dNTP 各浓度均可扩增出产物条带,浓度在 0.1 mmol/L 时条带较弱,在 0.2 mmol/L 时带型清晰且结果稳定,0.3~0.5 mmol/L 时扩增条带出现弥散。故 dNTP 浓度建议采用 0.2 mmol/L。

#### 2.1.4 Taq 酶量

Taq 酶量对扩增结果至关重要。Taq 酶浓度太低,将导致无扩增产物或产物量少,浓度过高不仅造

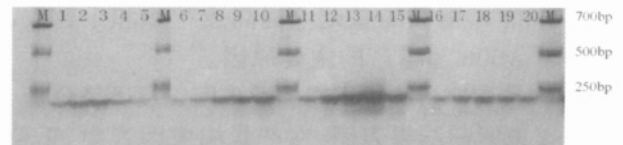


图 1 不同引物浓度、模板量、dNTP、酶浓度的扩增结果 1~5: 引物浓度依次为 0.15、0.3、0.45、0.6 和 0.75  $\mu$ mol/L; 6~10: 模板 DNA 浓度依次为 10、15、30、45 和 60 ng; 11~15: dNTP 浓度依次为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mmol/L; 16~20: Taq 酶浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5U。M 为 D2000bp DNA ladder Marker。

成经济上的浪费,而且将会出现非特异性扩增带,导致假阳性,甚至有时只出现亮的通带,而无任何扩增带。本试验结果表明(图 1),Taq 酶用量为 1.0 U 时,扩增效果较好,0.5U 时条带较弱,1.5~2.0 U 时带型比较弥散。说明酶量过大会使非特异性扩增产物增多。在保证试验结果准确性前提下,为节省试剂,建议 Taq 酶用量为 1.0 U。

### 2.2 山葡萄 SSR-PCR 体系适用性、稳定性验证

从 50 条引物中选取扩增条带清晰、重复性好、特异性高的 3 条带引物用于 PCR 扩增。应用优化后

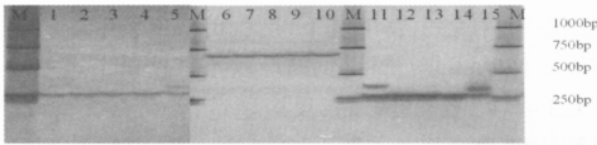


图2 优化后体系验证

1~5:引物为UDV-041,材料依次为左山一、左山二、双丰、双优、双红;6~10:引物为VVMD31号,材料依次为左山一、左山二、双丰、双优、双红;11~15:引物为UDV-033,材料依次为左山一、左山二、双丰、双优、双红.M为D2000bp DNA ladder Marker.

SSR-PCR 体系对 5 个不同品种的山葡萄材料 (双丰、双优、左山一、左山二、双红)进行了扩增,以验证该体系的适用性和稳定性。结果表明(图 2),采用优化后体系在多份山葡萄资源材料上均能有效扩增出比较稳定、清晰的 SSR 谱带。扩增片段范围在 200~750 bp 之间。

### 3 讨论与结论

SSR 分子标记技术是基因组研究中目前应用较为广泛的标记技术。近缘物种共享微卫星引物已经有很多成功报道,其中大多是根据片段大小判断是否为微卫星位点扩增。本文根据葡萄基因组 DNA 微卫星位点引物扩增山葡萄基因组 DNA,初步证实了一些引物对山葡萄通用。

PCR 反应体系优化中,反应条件的变化对 SSR 扩增影响是比较明显的。引物浓度太低,影响合成,

随引物浓度过高,扩增产物反而减少,其原因可能与随引物浓度升高,增加了引物二聚体,导致与模板 DNA 不能有效结合有关。模板 DNA 量太少会影响产物合成,但一定范围内,模板 DNA 浓度增加不会对扩增结果产生明显负面影响。dNTP 浓度过低影响合成效率,过高非特异性产物增加。酶量太少不利于扩增,酶量过大会使非特异性扩增产物增多,产物条带弥散。不同研究者往往选用不同公司试剂,药品质量、实验仪器和试验材料等也不尽相同,为了获得较为理想结果,在进行 SSR 标记前对反应体系进行优化是很重要的。

本研究通过对 SSR 反应体系中几个主要影响因素的研究,建立了一套东北山葡萄资源 SSR-PCR 反应体系。20 μl 反应体系中:1×PCR buffer 30 ng DNA 0.2 mmol/L dNTP 0.3 μmol/L 引物 1.0U TaqDNA 聚合酶。同时,采用 3 对引物应用该体系对 5 份山葡萄材料进行扩增,均能得到清晰、稳定的特征带谱,证实了该体系的适用性和稳定性。

参考文献:

[1] 蒋彩虹,王元英,孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J]. 中国烟草科学 2007, 28(2):1-5 .  
 [2] ZHEBENTYAYEVA TN,RE IGHARD G L,GORINA VM, et al. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm [J].Theor Appl Genet,2003,106: 425-444 .  
 [3] 高志红,章镇,韩振海,等. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(4):19-22 .



(上接第 30 页)穗数的基础上提高成粒率和千粒重,是春丰 A006 等增产的主要原因。

#### 2.4 产量与产量构成因素的逐步回归及通径分析

逐步回归结果表明,在产量构成因素中,千粒重( $X_1$ )、成粒数( $X_6$ )、结实率( $X_7$ )、千粒重( $X_8$ )与产量有显著线性效应。回归方程为:

$$Y = -659.92 + 7.811X_1 + 1.762X_6 - 1.048X_7 + 23.106X_8 (F = 7.53^{**}, n_1 = 4, n_2 = 12)$$

千粒重、成粒数、结实率、千粒重对产量都有直接促进作用,但性状间也存在相互制约关系,因此,在稳定穗数的基础上提高成粒数和千粒重,更有利于产量的进一步提高。

### 3 结论与讨论

根据对 16 个参试的旱稻品种产量构成因素的初步分析,春丰 A006 产量高于对照早 9710,其差异达到极显著水平。其株高、千粒重、有效分蘖、成粒率对产量作用更为明显,高产的原因主要是生物量较高,在保证穗数的基础上提高成粒率

和千粒重,是春丰 A006 等增产的主要原因。千粒重、成粒数、结实率、千粒重对产量都有直接促进作用,但性状间也存在相互制约关系,因此,在稳定穗数的基础上提高成粒数和千粒重,更有利于产量的进一步提高。在品种选育中,对鉴定性状的间接选择更具有指导意义,对于旱稻高成粒率往往是同生育期延长、株高增加相联系的,因此,在旱稻高产育种中,应注意在生态条件范围内适当增加其生物产量。

参考文献:

[1] George T, Magbanua R, Garrity D P, et al. Rapid yield loss of rice cropped successively in aerobic soil [J]. Agron J, 2002, 94: 981-989 .  
 [2] Peng S B, Bouman B A M, Visperas R M, et al. Comparison between aerobic and flooded rice in the tropics: Agronomic performance in an eight-season experiment [J]. Field Crop Res, 2006, 96: 252-259 .  
 [3] 李荣田,崔成焕,秋太权. 黑龙江省不同粳稻品种穗部性状差异及其对结实率的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(4): 318-325 .