

烤后烟叶 SSR 反应体系的优化研究

王广超^{1,2}, 马林¹, 康文功¹, 张锐¹, 帖金鑫¹

(1. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 山东中烟工业有限责任公司 滕州卷烟厂, 山东 滕州 277500)

摘要: 以烤烟 RG11 品种为原料, 研究烤后烟叶简单重复序列(SSR)分析中聚合酶链式反应(PCR)体系各主要因素及其之间的相互作用对 SSR 扩增的影响, 结果表明: 烤后烟叶 SSR-PCR 反应最佳体系为 20 μ L 体系中含 35 ng 模板 DNA, 1.5 U TaqDNA 聚合酶, 2.375 mmol/L $MgCl_2$, 0.6 mmol/L dNTPs 和 0.4 μ mol/L 引物。

关键词: 烤后烟叶; 简单重复序列; DNA 体系优化; 聚合酶链式反应

中图分类号: TS424; Q789 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.05.009

The optimization research of flue-cured tobacco SSR reaction system

WANG Guang-chao^{1,2}, MA Lin¹, KANG Wen-gong¹, ZHANG Rui¹, TIE Jin-xin¹

(1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Tengzhou Cigarette Factory, China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd., Tengzhou 277500, China)

Abstract: Using flue-cured tobacco varieties RG11 as raw materials, the influence of simple sequence repeat (SSR) amplification on flue-cured tobacco SSR analysis of polymerase chain reaction (PCR) system of the main ingredients and among was studied, and the results showed that flue-cured tobacco SSR-PCR for 20 μ L system, including template DNA 35 ng, 1.5 U TaqDNA polymerase, 2.375 mmol/L $MgCl_2$, 0.6 mmol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L primer.

Key words: flue-cured tobacco; simple sequence repeat (SSR); DNA system optimization; polymerase chain reaction (PCR)

0 引言

在卷烟工业生产中, 烟叶品种的稳定性直接影响卷烟质量的稳定性。如何保证烟叶原料品种准确性一直都是烟草工业生产中较为棘手的问题, 传统的种质鉴定仅限于对烟叶的一些表型评价, 受环境和人为因素影响较大。随着 DNA 分子标记技术的不断

断发展, 采用 DNA 指纹图谱技术可以从 DNA 水平上对烟草品种进行快速准确的鉴定。

SSR (simple sequence repeat), 即简单重复序列, 是由 S. Moore 等^[1]在 1991 年建立的分子标记技术, 也称微卫星标记。SSR 以 PCR (polymerase chain reaction) 为基础, 得到的遗传信息量大, 多态性好^[2]。该技术根据串联重复序列两端的保守序列设计引

收稿日期: 2013 - 01 - 29

作者简介: 王广超(1987—), 男, 河南省周口市人, 郑州轻工业学院硕士研究生, 主要研究方向为烟草生物技术。

通信作者: 马林(1964—), 男, 河南省信阳市人, 郑州轻工业学院教授, 博士, 主要研究方向为烟草生物技术和卷烟工艺。

物,由于不同品种基因组串联重复序列重复次数的不同,扩增产物大小不一,从而达到区分不同品种的目的。G. Bindler 等^[3]利用 684 对 SSR 引物在 16 个烟草品种中的扩增结果建立了第一张烟草 SSR 图谱。H. S. Moon 等^[4]分析了 100 对 SSR 引物对 5 个烟草品种基因组 DNA 扩增结果,共可获得 56 张 SSR 图谱。C. S. V. Rao 等^[5]利用 SSR 确定了 30 个烤烟品种遗传变异,通过遗传相似系数分析,观察到几乎所有研究所用的植物都是多形态的,SSR 标记为密切相关的烟草种类的区分做了充分解释。G. Bindler 等^[6]利用新功能性微卫星标记得到烟草基因组的高分辨率遗传图谱,其中包含 2 317 个微标记和 2 363 个位点,平均距离映射的微卫星标记间距小于 2 万个碱基对或 1.5 cm。

本研究以烤后烟叶为基础原料提取其 DNA,探讨影响烤后烟叶 SSR 扩增的各种因素,建立能够稳定扩增烤后烟叶基因组的体系,以期对烤后烟叶的品种鉴别奠定一定基础。

1 实验

1.1 材料与试剂

烟叶品种 RG11,由云南红云红河烟草(集团)有限责任公司提供。SSR 引物序列来自 *Solanum lycopersicum* consortium (ITGSP, <http://solgenomics.net/>),由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物编号 PT20306,引物序列为:F:5'-CCGAGTCTGTTTT-GGTG-3',R:5'-GCGAGCATCTCTCATTTTC-3'; Taq 酶、250 bp DNA ladder marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;dNTP 购自美国 Promega 公司;PCR 所用 TaqDNA 聚合酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

0.75 × CTAB 提取缓冲液: pH = 8.0,含 7.5 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris,0.02 mmol/L EDTA2Na,2% PVP 和 2% β-巯基乙醇;2 × CTAB 提取缓冲液:含 20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris,0.02 mmol/L EDTA2Na,2% PVP 和 2% β-巯基乙醇;CTAB 沉淀缓冲液: pH = 8.0,含 5 g/L CTAB,0.01 mol/L EDTA,0.5 mol/L Tris,0.04 mol/L NaCl。

1.2 主要仪器

Vetiti 型 PCR 仪,Applied Biosystems 产;DYY—6C 电泳仪,北京市六一仪器厂产;MicroCL17 型离心

机,Thermo electron corporation 产;T6 新世纪紫外分光光度计,北京普析通用有限责任公司产;Mini Bis Pro 型凝胶成像分析系统,以色列 DNR 凝胶成像系统有限公司产。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[7],利用琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测 DNA 完整性及浓度,样品稀释至 50 ng/μL,-20 °C 保存备用。

1.3.2 体系优化实验设计 参照文献[8]初步设计 SSR-PCR 反应为 20 μL 体系,含模板 DNA 35 ng,1.5 U Taq DNA 聚合酶,1.5 mmol/L MgCl₂,350 μmol/L dNTPs,0.25 μmol/L 引物。首先采用单因素试验确定各因素的最佳参数,再设计正交试验对反应体系进一步优化。反应程序为:94 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,34 个循环后延伸 5 min,4 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 模板用量对 SSR 扩增的影响

在保持其他反应因子不变的条件下,改变模板用量对 SSR 扩增的影响如图 1 所示,其中第 1—9 泳道的模板用量分别为 5 ng,15 ng,25 ng,35 ng,45 ng,55 ng,65 ng,75 ng,85 ng;M 泳道为 Mark。由图 1 可知,每个模板梯度均能扩增出条带,说明模板用量在一定范围内对 SSR-PCR 影响不大,从第 4 泳道开始,扩增条带变得清晰并且稳定。因此,为保证结果可重复性的同时节省模板材料,笔者选择 25 ~ 55 ng 为最适的模板用量范围。

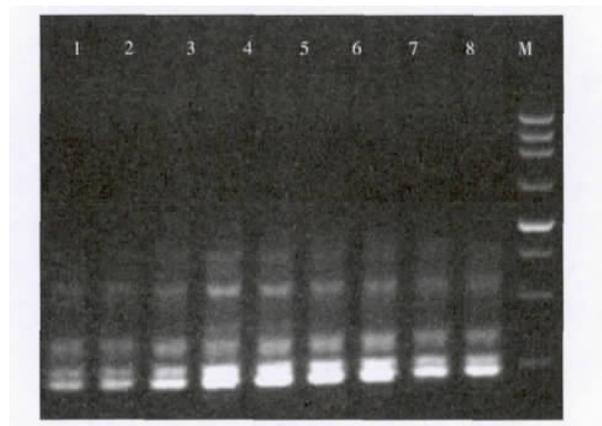


图 1 模板用量对 SSR 扩增的影响

2.2 Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增的影响

Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增的影响如图 2 所示。

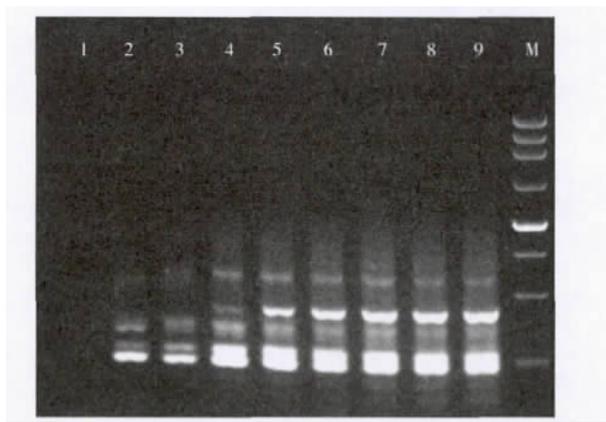


图 2 Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增的影响

其中,第 1—9 泳道的 Mg^{2+} 浓度分别为 0.875 mmol/L, 1.125 mmol/L, 1.375 mmol/L, 1.625 mmol/L, 1.875 mmol/L, 2.125 mmol/L, 2.375 mmol/L, 2.625 mmol/L, 2.875 mmol/L; M 泳道为 Mark。

在 SSR 反应体系中, Mg^{2+} 浓度对反应体系的扩增效率影响较大: Mg^{2+} 浓度太低会限制 Taq 酶的激活,影响扩增效果; Mg^{2+} 浓度较高,则会使扩增的严谨性及匹配度下降,导致扩增结果不稳定和失真。由图 2 可知,保持其他反应因子不变的条件下,在 5—9 泳道 Mg^{2+} 浓度范围内,扩增效果较好,带纹较清晰。因此,选定 1.875 ~ 2.625 mmol/L 为 Mg^{2+} 浓度的最佳应用范围。

2.3 dNTPs 浓度对 SSR 扩增的影响

dNTPs 浓度对 SSR 扩增的影响如图 3 所示。

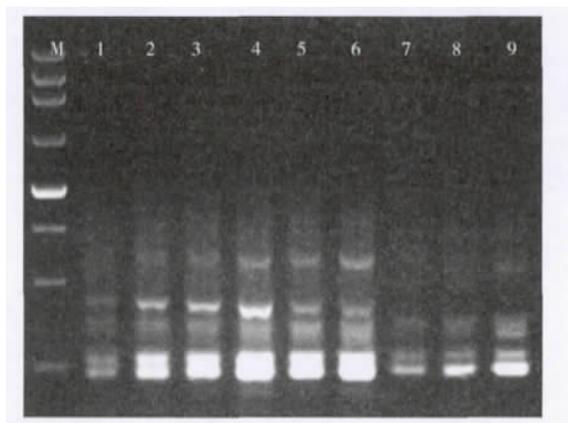


图 3 dNTPs 浓度对 SSR 扩增的影响

其中, M 泳道为 Mark, 第 1—9 泳道的 dNTPs 浓度分别为 0.200 mmol/L, 0.300 mmol/L, 0.400 mmol/L, 0.500 mmol/L, 0.600 mmol/L, 0.700 mmol/L, 0.800 mmol/L, 0.900 mmol/L, 1.000 mmol/L。dNTPs 在 SSR 反应中作为底物,其浓度过低,反应速率会下降,导致扩增出的带纹弱并且不清晰; dNTPs 浓度过高,会与大量的 Mg^{2+} 螯合,致使用来激活 Taq 酶的 Mg^{2+} 较少,影响酶的活性。由图 3 可知,在 2—6 泳道的 dNTPs 浓度范围内,扩增较为清晰。因此,选定 0.300 ~ 0.700 mmol/L 为 dNTPs 浓度的最佳应用范围。

2.4 引物浓度对 SSR 扩增的影响

引物浓度对 SSR 扩增的影响如图 4 所示。

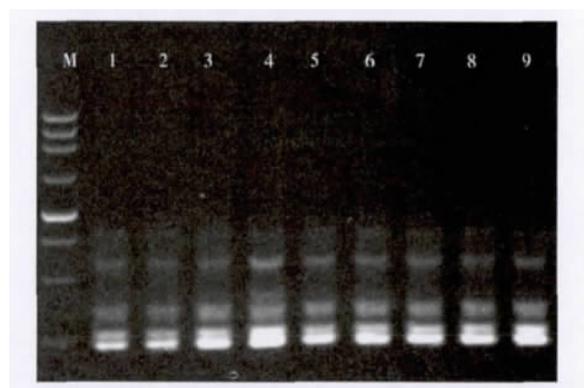


图 4 引物浓度对 SSR 扩增的影响

其中, M 泳道为 Mark; 第 1—9 泳道的引物浓度分别为 0.200 μ mol/L, 0.300 μ mol/L, 0.400 μ mol/L, 0.500 μ mol/L, 0.600 μ mol/L, 0.700 μ mol/L, 0.800 μ mol/L, 0.900 μ mol/L, 1.000 μ mol/L。引物浓度对 SSR 反应的影响较大: 引物浓度低时,由于存在竞争机制,模板与引物的结合率低,许多结合位点不能够被检测扩增出来,致使扩增带纹较浅,不能真实反映结果; 引物浓度高时,会产生模板与引物的非特异性扩增,造成扩增假象。由图 4 可知,在 3—6 泳道的引物浓度范围内,都有较清晰地扩增条带。因此,选定 0.400 ~ 0.700 μ mol/L 为烤烟引物浓度的最佳应用范围。

2.5 Taq 酶用量对 SSR 扩增的影响

Taq 酶用量对 SSR 扩增的影响如图 5 所示。其中, M 泳道为 Mark; 第 1—9 泳道的 Taq 酶用量分别为 0.50 U, 0.75 U, 1.00 U, 1.25 U, 1.50 U, 1.75 U, 2.00 U, 2.25 U, 2.50 U。Taq 酶用量增加并不能明显提高扩增产物的量,但减少 Taq 酶用量扩增出来

的条带会变得很弱. 因此, 1.25 ~ 2.50 U 为 Taq 酶用量的最佳范围.

2.6 不同退火温度对 SSR 扩增的影响

退火温度对 SSR 扩增的影响如图 6 所示. 其中第 1—8 泳道的退火温度分别为 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C; M 泳道为 Mark. 由图 6 可见, 以第 7 泳道的效果最好, 所以确定最适退火温度为 59 °C.

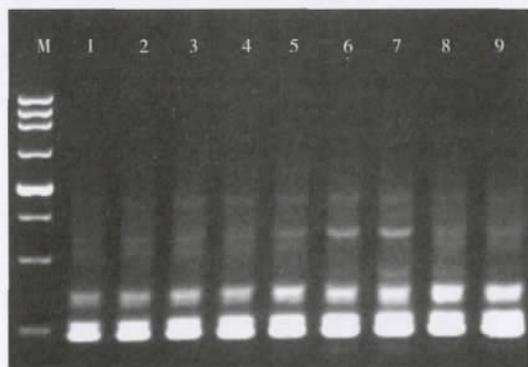


图 5 Taq 酶用量对 SSR 扩增的影响

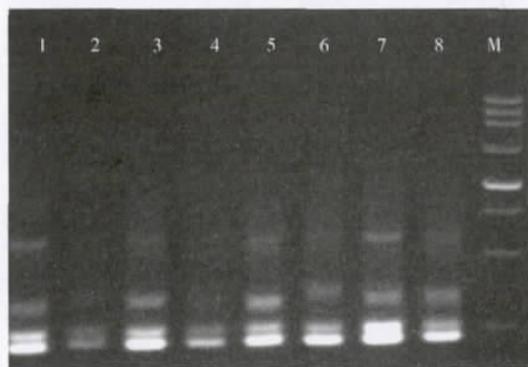


图 6 退火温度对 SSR 扩增的影响

2.7 SSR-PCR 反应体系的正交优化

在单因素试验确定模板用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度和 Taq 酶用量的基础上, 进行 5 因素 4 水平的 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 试验水平设计和试验结果分别见表 1 和图 7.

图 7 中第 1—16 泳道分别代表正交试验表中的 16 组数据, M 泳道为 Mark. 由图 7 可知, 第 7、8 组实验扩增的条带完整、清晰、亮度高容易分辨, 其中第 7 组试验的扩增效果最好. 因此, 烤后烟叶 SSR 反应体系最佳组合为: 20 μ L 反应体系中含 DNA 模板 35 ng, Mg^{2+} 浓度 2.375 mmol/L, dNTPs 浓度 0.6 mmol/L, 引物浓度 0.40 μ mol/L, Taq 酶用量 1.5 U.

表 1 SSR 反应体系正交试验表

试验号	模板/ ng	Mg^{2+} 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	引物/ (μ mol · L ⁻¹)	Taq 酶/ U
1	1(25)	1(1.875)	1(0.300)	1(0.400)	1(1.25)
2	1	2(2.125)	2(0.400)	2(0.500)	2(1.50)
3	1	3(2.375)	3(0.500)	3(0.600)	3(1.75)
4	1	4(2.625)	4(0.600)	4(0.700)	4(2.00)
5	2(35)	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3(45)	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4(55)	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

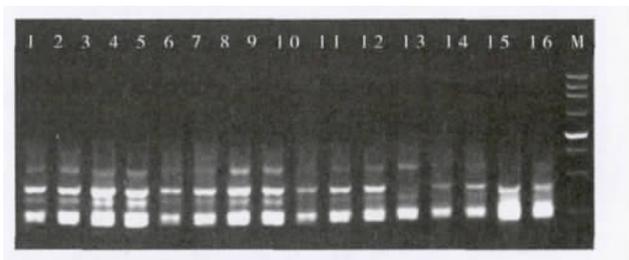


图 7 SSR 反应体系正交试验

3 结论

本文通过对烤后烟叶简单重复序列 DNA 反应体系的优化研究, 建立了一个适合烤烟的稳定的 SSR-PCR 反应体系, 主要结论如下:

1) 单因素的优化研究表明, 在 20 μ L 的反应体系中, 各因素的最佳浓度范围为: 模板 DNA 25 ~ 55 ng, Mg^{2+} 浓度 1.875 ~ 2.625 mmol/L, dNTPs 浓度 0.300 ~ 0.700 mmol/L, 引物浓度 0.400 ~ 0.700 μ mol/L, Taq 酶用量 1.25 ~ 2.50 U.

2) 考虑到 PCR 反应体系中各因素之间的相互作用, 通过正交试验得到 SSR-PCR 最佳反应体系条件为: 20 μ L 反应体系中含 DNA 模板 35 ng, Mg^{2+} 浓度 2.375 mmol/L, dNTPs 浓度 0.6 mmol/L, 引物浓度 0.4 μ mol/L, Taq 酶用量 1.5 U.

(下转第 58 页)

和正方形网格定位算法冗余节点过多等问题,提出了一种新的基于锚节点等边三角形分布的质心定位算法.运用该算法,克服了正六边形网格质心定位算法定位误差不稳定的弊端,当选取合理的搜索半径时,能够得到较高的定位精度.该算法简单,降低了设计难度,减少了硬件投入和能耗,适用于对硬件要求不高的定位环境.与正六边形网格质心定位算法相比,该算法的缺陷是增加了额外的锚节点,且在判断盲节点是否在搜索半径内时须与给定区域内所有的锚节点进行比对,这无疑大大增加了计算量.这两方面仍需改进.

参考文献:

- [1] 高珩,马玉红,鲍鹏.无线传感网络常用定位算法分析[EB/OL].(2009-06-08)[2013-02-05].<http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/200906-231>.
- [2] Whitehouse K, Culler D. Calibration as parameter estimation in sensor networks[C]//Proc ACM WSNA 2002, Atlanta [s. n.]. 2008:59-67.
- [3] 朱明辉,张会清.基于 ZigBee 网络 RSSI 的室内无线定位技术[J].现代电子技术,2010(17):45.
- [4] 郭瑞星.基于 ZigBee 的无线传感网络 RRRR 定位算法的改进与实现[D].太原:太原理工大学,2011.
- [5] 阎中江,龚红焱,沈中等.基于网格扫描的 WSN 节点定位算法[J].计算机工程,2011,37(21):69.
- [6] 翟正怡,张轮.无线传感网络正六边形网格划分方法[J].电脑知识与技术,2007(19):89.
- [7] 汪学清,杨永田.无线传感器网络中连通与覆盖问题的研究[J].计算机工程与应用,2006(36):136.
- [8] 万国成.基于 ZigBee 协议的无线区域定位系统的研究[D].武汉:湖北工业大学,2011.

(上接第 42 页)

参考文献:

- [1] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species [J]. Genomics, 1991, 10(3):654.
- [2] 蒋彩虹,王元英,孙玉. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J].中国烟草科学,2007,28(2):1.
- [3] Bindler G, Van der Hoeven R, Gunduz I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114:341.
- [4] Moon H S, Nicholson J S, Lewis R S. Use of transferable *Nicotiana tabacum L.* microsatellite markers for investigating genetic diversity in the genus *Nicotiana* [J]. Genome, 2008, 51:547.
- [5] Rao C S V, Prasad S B C, Anand P, et al. Molecular diversity analysis of non fcv tobacco varieties using SSR markers [J]. IJSID, 2011, 1(2):192.
- [6] Bindler G, Plieske J, Bakaher N, et al. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) obtained from large scale microsatellite marker development [J]. Theor Appl Genet, 2011, 123:219.
- [7] 杨友才,周清明,尹晗琪.烟草种质资源 AFLP 分析中 DNA 模板的制备[J].亚热带植物科学,2005,34(2):1.
- [8] 赵世浩,周清明,荆春林,等.正交设计优化烟草 SSR 反应体系[J].湖南农业科学,2007(6):48.