

## 鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系优化

贾波<sup>1</sup>, 徐海滨<sup>2</sup>, 徐阳<sup>1</sup>, 龙晓飞<sup>1</sup>, 陈金慧<sup>1</sup>, 施季森<sup>1\*</sup>

(1. 南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏南京 210037;  
2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193)

关键词: Genomic-SSR; 鹅掌楸; 正交试验; 单因素梯度试验

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

### Optimization of Genomic-SSR Reaction System in *Liriodendron*

JIA Bo<sup>1</sup>, XU Hai-bin<sup>2</sup>, XU Yang<sup>1</sup>, LONG Xiao-fei<sup>1</sup>, CHEN Jin-hui<sup>1</sup>, SHI Ji-sen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. The National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The optimization of the Genomic-SSR reaction system is a basic protocol when the Genomic-SSR is used for genetic analysis in *Liriodendron*. The concentrations of  $Mg^{2+}$ , dNTP, Primer and rTaq were tested by  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment and single factor gradient experiment to gain the optimal reaction system. The results indicated that the optimal reaction system should contain 75 ng of genomic DNA, 1  $\mu$ L of 10  $\times$  buffer, 0.4  $\mu$ L of 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP, 0.75  $\mu$ L of 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $MgCl_2$ , 0.25  $\mu$ L of 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Primer, 0.05  $\mu$ L of 5 U rTaq and final volume of 10  $\mu$ L. Repeated trials and two verification tests showed that this optimal reaction system was stable, reliable, efficient and suitable for the applications of Genomic-SSR in *Liriodendron* population genetics and quantitative genetics research.

**Key words:** Genomic-SSR; *Liriodendron*; orthogonal experiment; single factor gradient experiment

鹅掌楸属 (*Liriodendron* L.), 是木兰科 (Magnoliaceae) 植物, 属古老属种之一。由于第三纪晚期气候剧变和更新世冰川作用, 到目前为止仅剩中国马褂木 (*L. chinense* (Hemsl.) Sarg.) 和北美鹅掌楸 (*L. tulipifera* L.) 两个残遗种<sup>[1]</sup>。鹅掌楸属植物在植物系统学中有特殊地位, 以及具有原始的花结构等, 这使得它们成为研究植物进化、开花植物历史进程、群体结构以及交配系统等理想材料<sup>[2-4]</sup>。此外, 鹅掌楸植物具有重要的经济价值和生态价值<sup>[5]</sup>。除为生产提供优质木材外, 还具较强抗性<sup>[6-7]</sup>, 内含丰富的医用化合物<sup>[8-9]</sup> 以及生物质燃料的生产<sup>[10-12]</sup> 等。

鹅掌楸拥有木兰科最少的染色体数 ( $2n = 2x = 38$ ), 二倍体基因组大小约为 1 802 Mbp, 基因组巨大<sup>[13]</sup>。在常规育种周期较长及基因组信息较少的情况下, 借助分子标记辅助育种来加速鹅掌楸的育种工作是一种比较可行的方法。目前, SSR 标记在林木的研究中应用最为广泛。SSR 标记具备多态性高、共显性且均匀覆盖整个基因组等特点, 已成为遗传连锁图谱构建、群体遗传、交配系统分析和 QTL 定位等的林木遗传育种研究的有效工具<sup>[14]</sup>。

在对某一物种进行 SSR 标记开发以及利用 SSR 标记对植物基因组研究时都应对该物种的 SSR 标记反应体系进行优化, 以建立一套适宜该物种 SSR 标

收稿日期: 2013-02-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助 (课题编号: 2013AA102705), 国家自然科学基金 (31170619)

作者简介: 贾波 (1984—), 男, 山东泰安人, 博士研究生, 主要从事林木遗传改良研究。

\* 通讯作者: 施季森 (1952—), 男, 江苏启东人, 主要从事林木遗传育种研究。

记的 PCR 反应体系。目前有关鹅掌楸 Genomic-SSR 的反应体系以及 Genomic-SSR 在鹅掌楸中应用的研究还未见报道。因此,本研究利用正交试验设计结合单因素分析试验对鹅掌楸 Genomic-SSR 的反应体系进行优化,旨在建立一套高效的、稳定的 SSR 反应体系,为后期的鹅掌楸 Genomic-SSR 标记的开发、鹅掌楸连锁图谱构建、系统进化以及关联分析等研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

应用于鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系优化的实验材料为庐山(LS1)和南卡(NK)2个种源个体,采自于南京林业大学下蜀林场鹅掌楸种源试验林;应用于 PCR 反应体系验证的实验材料包括采自下蜀林场鹅掌楸种源试验林的4个北美种源个体:密苏里(MSL)、南卡(NK)、佐治亚(ZZY)、路易斯(LYS)和4个中国种源个体:桑植(SZ)、武夷山(WYS)、庐山(LS1)和松阳(SY)以及南京林业大学校园的16个NK×LS1的杂交子代。取健康植株上刚展开的嫩叶,液氮处理后放置-80℃备用。

### 1.2 DNA 提取及检测

DNA 提取,使用 DNeasy Plant Maxi kit (Qiagen) 试剂盒进行提取;DNA 质量检测,采用琼脂糖凝胶电泳检测及管家基因(18S)检测,18S-s: ATTTCTGCCCTATCAACTTTCG 和 18S-a: ATTTATTGTCCTACTCTCCCG;PCR 反应体系:20 μL 总体积,包括:2 μL 10×buffer、1.6 μL dNTP、1.2 μL MgCl<sub>2</sub>、1 μL primer、0.2 μL rTaq DNA polymerase、100 ngDNA。PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,52℃复性 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,72℃延伸 10 min,4℃保存。

### 1.3 Genomic-SSR 反应体系优化

SSR 扩增体系。10 μL 总体积,其中 DNA 模板量为 75 ng,1 μL 10×buffer,其余成分进行优化设计。随机选择 1 对本实验室所开发的鹅掌楸 Genomic-SSR 引物 LtGMS060, F: TGGGACAAGT-TCAACCCCTA 和 R:CGCAGAGGAGAGAGAGAAA,利用 LS1 和 NK 对 PCR 反应体系进行优化。首先选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表,进行 4 因素(Mg<sup>2+</sup>, dNTP, primer, rTaq)3 水平的正交试验共 9 个组合(表 1)。选择最佳组合作为反应的基本体系,再设计单因素梯度试验,逐个优化其他反应成分终用量,从而确定适合

鹅掌楸 Genomic-SSR 反应的体系。试验设 3 次重复。

表 1 PCR 正交试验设计表 [L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)]

| 组合号 | PCR 反应体系                  |               |                 |               |
|-----|---------------------------|---------------|-----------------|---------------|
|     | Mg <sup>2+</sup><br>体积/μL | dNTP<br>体积/μL | Primer<br>体积/μL | rTaq<br>体积/μL |
| 1   | 0.75                      | 0.1           | 0.25            | 0.05          |
| 2   | 0.75                      | 0.2           | 0.45            | 0.1           |
| 3   | 0.75                      | 0.3           | 0.65            | 0.15          |
| 4   | 1.25                      | 0.1           | 0.45            | 0.15          |
| 5   | 1.25                      | 0.2           | 0.65            | 0.05          |
| 6   | 1.25                      | 0.3           | 0.25            | 0.1           |
| 7   | 1.75                      | 0.1           | 0.65            | 0.1           |
| 8   | 1.75                      | 0.2           | 0.25            | 0.15          |
| 9   | 1.75                      | 0.3           | 0.45            | 0.05          |

注:Mg<sup>2+</sup>浓度,2.5 mmol·L<sup>-1</sup>;dNTP 浓度 10 mmol·L<sup>-1</sup>(SIG-MA),Primer 浓度 10 μmol·L<sup>-1</sup>,rTaq 浓度 5 U(TakaRa)

SSR 扩增程序。采用 Touch-down PCR, 94℃预变性 5 min,94℃变性 15 s,61℃复性 15 s(Δ℃=-1),72℃延伸 30 s,9 个循环;94℃变性 15 s,52℃复性 15 s,72℃延伸 30 s,15 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.4 Genomic-SSR 反应体系的验证

再随机选择 2 对鹅掌楸 Genomic-SSR 引物 LtGMS042, F: CATTAAAGCCATGCATCGAGA 和 R: GCTAGTGCTGTGTCCGTGAA; LtGMS 106, F: ACGT-GAAACCCTAGCGTGAA 和 R: CTCCCCTTGCCT-TCTCTTTT。利用 8 个种源个体和 16 个杂交子代对构建的鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系进行验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 鹅掌楸基因组 DNA 质量检测结果

获得高质量的 DNA, 是进行 PCR 扩增的前提。使用(Qiagen)试剂盒从新鲜鹅掌楸嫩叶中提取的基因组 DNA(图 1A)浓度介于 365.28~486.66 ng·μL<sup>-1</sup>之间, OD260/OD280 比值为 1.7~1.9, OD260/OD230 比值均为 2.0~2.4, 表明 DNA 质量高。为了进一步检测所提取 DNA 的质量,排除 DNA 质量问题是造成 PCR 扩增产生的‘空带’现象的原因,利用鹅掌楸的管家基因 18S 引物对其进行检测(图 1B)。经检测,所有 DNA 均能扩增出相应大小的片段,进一步证明了所提取的 DNA 能够满足 PCR 反应的要求。

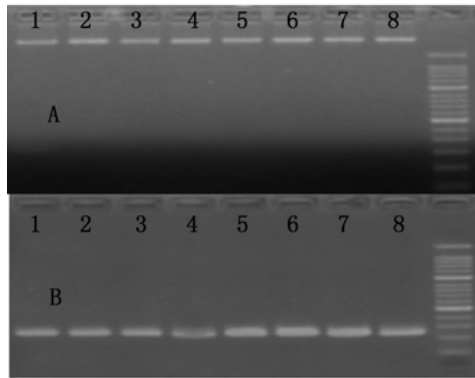
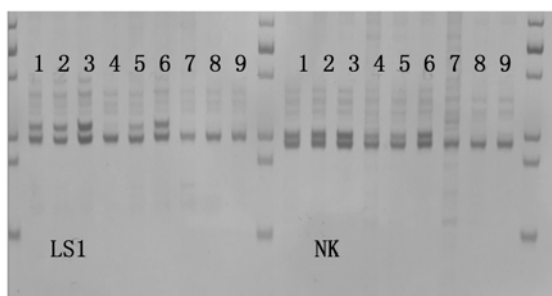


图1 A: 部分鹅掌楸基因组 DNA 的电泳检测结果  
B: 部分鹅掌楸基因组 DNA 的 18S 引物检测结果

2.2 利用正交设计和单因素梯度试验对鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系优化

2.2.1 正交试验设计初步优化反应体系 通过设计正交试验组合对 LS1 和 NK 基因组 DNA 进行 SSR 扩增(图 2),所有的组合都能扩增出清晰和易辨识的条带。但是,第 7、8 和 9 组合均造成一个等位基因丢失,导致 SSR 信息丢失;第 4 组合在 LS1 中丢失一个等位基因;第 5 组合在 LS1 和 NK 中虽都保持全部的等位基因信息,但其中一个等位基因均模糊不清。第 1、2、3 和 6 组合在两个个体中的扩增效果都较好。其中,第 3 个组合最佳,为此正交试验所获得的最佳反应条件。1~3 中  $Mg^{2+}$  用量为  $0.75 \mu L$ 、4~5 中  $Mg^{2+}$  浓度为  $1.25 \mu L$ 、7~9 中  $Mg^{2+}$  浓度均为  $1.75 \mu L$ ,而在这 3 个组合中其他 3 个因素浓度均处于不同的水平,表明  $Mg^{2+}$  用量为影响鹅掌楸 Genomic-SSR PCR 反应的关键因素,当其用量为  $0.75 \mu L$  时扩增效果最好,而其他 3 种反应成分的终浓度水平尚需进一步研究。

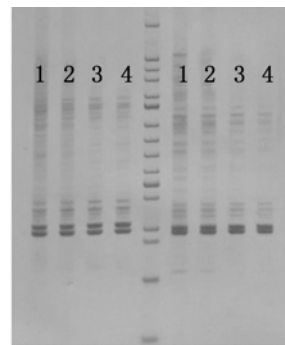


从左到右依次为组合 1~9  
图2 正交试验设计反应体系扩增结果

2.2.2 单因素梯度试验进一步优化反应体系 在正交试验设计初步优化反应体系的基础上,设计 3

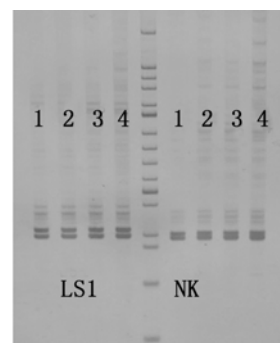
个单因素梯度试验包括 dNTP: $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$  和  $0.4 \mu L$ ;Primer: $0.25$ 、 $0.45$ 、 $0.65$  和  $0.85 \mu L$ ;rTaq: $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.15$  和  $0.2 \mu L$ ,当一种反应成分进行用量梯度变化实验时,其它反应成分的用量不变。

2.2.2.1 dNTP 用量对 PCR 反应体系的影响 在 4 个 dNTP 的水平下,PCR 反应所产生的特异性产物效果均较好,扩增出了所有的等位基因,带迹清晰(图 3)。4 个处理对 PCR 反应体系的影响差异不是很显著,但是随着 dNTP 用量的增加,条带的亮度也逐渐增加,且产生的杂带数也越来越少。经过多次试验重复后,决定最终选择  $0.4 \mu L/10 \mu L$  为反应体系的最优用量。



从左到右依次为  $0.1 \sim 0.4 \mu L$   
图3 不同 dNTP 的用量条件下 SSR-PCR 扩增的产物结果

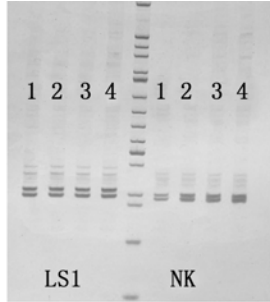
2.2.2.2 Primer 用量对 PCR 反应体系的影响 PCR 产物的亮度随着引物的用量的增加而增加(图 4)。LS1 中两个等位基因因为大小差别较大,很容易辨识,但是 NK 中两个等位基因因大小差别较小,随着 Primer 用量的增加而变得越来越难辨识,且杂带也随之增多。因此,选择  $0.25 \mu L/10 \mu L$  为反应体系的最优用量。



从左到右依次为  $0.25 \sim 0.85 \mu L$   
图4 不同 Primer 的用量条件下 SSR-PCR 扩增的产物结果

2.2.2.3 rTaq 用量对 PCR 反应体系的影响 图 5

所示,PCR 产物的亮度随着 rTaq 用量水平增加而增加。同 Primer 用量处理试验的结果基本一致,在 NK 中两个等位基因的大小差别较小,随亮度的增加而越发难以辨识。同样,杂带也是随之增多。因此,选择 0.05  $\mu\text{L}/10 \mu\text{L}$  为反应体系的最优用量。



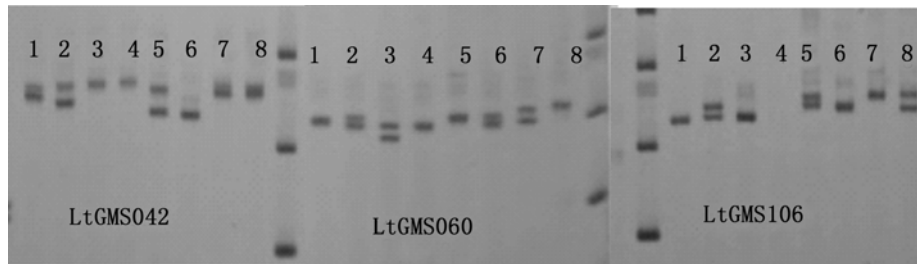
从左到右依次为 0.05 ~ 0.2  $\mu\text{L}$

图5 不同 rTaq 的用量条件下 SSR-PCR 扩增的产物结果

### 2.3 鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系的验证

随机选择对鹅掌楸 Genomic-SSR 引物: LtGMS041、LtGMS060、LtGMS106, 分别利用 MSL、NK、ZZY、LYS、SZ、WYS、LS1、SY 8 个个体以及 16 个 NK  $\times$  LS1 的杂交子代对优化后的反应体系: 75 ngDNA、1  $\mu\text{L}$  buffer、0.4  $\mu\text{L}$  dNTP、0.75  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.25  $\mu\text{L}$  Primer、0.05  $\mu\text{L}$  rTaq, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 10  $\mu\text{L}$  体积, 进行验证。

验证结果如图 6 所示: 带迹清晰, 可辨识度高, 表明此优化体系扩增效果较好, 可以广泛应用于引物开发、遗传多样性分析、基因分型、系统进化以及关联分析等方面的研究。其中, 以遗传多样性为例, 可以很好的统计等位基因数、期望杂合度和 PIC 等数据(表 2)。



1 ~ 8 分别为 MSL、NK、ZZY、LYS、SZ、WYS、LS 和 SY

图6 鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系验证结果 I

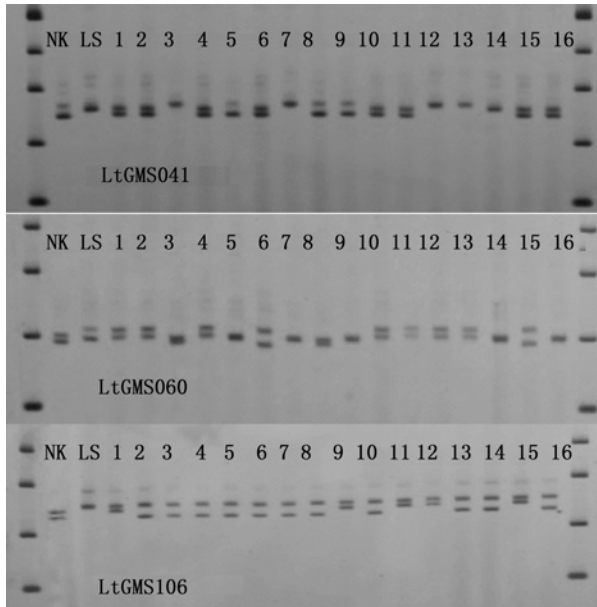
表 2 Genomic-SSR 引物扩增不同鹅掌楸种质的遗传多样性

| 引物编号     | 等位基因数量 | 杂合度     | 期望杂合度   | 多态性信息含量 |
|----------|--------|---------|---------|---------|
| LtGMS042 | 7      | 0.625 0 | 0.796 9 | 0.769 6 |
| LtGMS060 | 6      | 0.500 0 | 0.789 1 | 0.756 6 |
| LtGMS106 | 5      | 0.428 6 | 0.755 1 | 0.716 1 |

NK、LS1 及其 16 个杂交子代对反应体系进行验证, 结果如图 7 所示。LtGMS041、LtGMS060、LtGMS106 3 对引物通过优化后的体系对 NK、LS1 及其 16 个杂交子代进行扩增, 都可以得到清晰、稳定、特异性高的产物, 且杂带也较少。图 7 从雌雄交配角度去分析, LtGMS042 在 NK、LS1 及其 16 个杂交子代中的扩增产物的信息可判读为:  $ac \times bc$  产生  $ab$ 、 $ac$ 、 $bc$ 、 $cc$  4 种分离类型, 在 16 个杂交子代中的扩增产物也都符合这一孟德尔分离定律。LtGMS060 的扩增信息可判读为  $ab \times bc$ , LtGMS106 的扩增信息可判读为  $ab \times cc$ 。

### 3 结论和讨论

通过设计  $L_9(3^4)$  正交试验结合单因素梯度实验对 PCR 反应体系中的  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP、Primer 和 rTaq 的用量进行了优化, 最终确定了鹅掌楸 Genomic-SSR 的 PCR 最佳反应体系, 即 75 ng 的 DNA、1  $\mu\text{L}$  10  $\times$  buffer、0.4  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 dNTP、0.75  $\mu\text{L}$  2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的  $\text{MgCl}_2$ 、0.25  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 Primer、0.05  $\mu\text{L}$  5U 浓度的 rTaq、ddH<sub>2</sub>O 补齐至 10  $\mu\text{L}$  体积。



从左到右分别为 NK、LS1 和 1~16 个杂交子代  
图7 鹅掌楸 Genomic-SSR 反应体系验证结果 II

在 PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$  用量是一个关键的因素,其不但可以影响酶的活性,还会影响模板与引物的结合等。在本实验中,较高的  $Mg^{2+}$  用量会造成 SSR 信息丢失,故采用较低的  $Mg^{2+}$  用量。dNTP、Primer 和 rTaq 的用量同样也会影响 PCR 扩增产物的产量和质量,但是在本实验中,这 3 者相对于  $Mg^{2+}$  来说是次要因素。

#### 参考文献:

- [1] 刘玉壶,夏念和,杨惠秋. 木兰科(Magnoliaceae)的起源、进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4):1-12
- [2] 韦仲新,吴征镒. 鹅掌楸属花粉的超微结构研究及系统学意义[J]. 云南植物研究, 1993, 15(2):163-166
- [3] Hunt D. Magnolias and Their Allies[M]. International Dendrology Society & Magnolia Society, 1998:304
- [4] Zahn L M, Kong H, Leebens-Mack J H, et al. . The evolution of the SEPALLATA subfamily of MADS-box genes;a pre-angiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history[J]. Genetics, 2005, 169:2209-2223
- [5] Kim K D, Lee E J. Potential tree species for use in the restoration of unsanitary landfills[J]. Environ Manage, 2005, 36:1-14
- [6] 赵志新,乔瑞芳,季孔庶. 杂交鹅掌楸不同无性系对 Pb 胁迫的生理响应及抗性比较[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4):7-12
- [7] Klugh K R, Cumming J C. Variation in organic acid exudates among mycorrhizal species colonizing *Liriodendron tulipifera* L. (yellow poplar) in the presence of aluminum[J]. Ecological Society of America Annual Meeting Abstracts, 2003, 88:186
- [8] Moon M K, Oh H M, Kwon B M, et al. Farnesyl protein transferase and tumor cell growth inhibitory activities of lipiferolide isolated from *Liriodendron tulipifera*[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30:299-302
- [9] Bae K, Byun J. Screening of leaves of higher plants for antibacterial action[J]. Kor J Pharmacog, 1987, 8:1
- [10] Xiang Q, Lee L Y Y, Torget R W. Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2004, 1114:1127-1138
- [11] Berlin A, Maximenko V, Bura R, et al. A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 93:880-886
- [12] Hwang S S, Lee S J, Kim H K, et al. Biodegradation and saccharification of wood chips of *Pinus strobus* and *Liriodendron tulipifera* by white rot fungi[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18:1819-1826
- [13] Liang H, Fang E G, Tomkins J P, et al. Development of a BAC library for yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*) and the identification of genes associated with flower development and lignin biosynthesis[J]. Tree Genet Genomes, 2003, 3:215-225
- [14] 黄秦军,苏晓华,张香华. SSR 分子标记与林木遗传育种[J]. 世界林业研究, 2002, 15(3):14-21