

大白菜 EST-SSR 反应体系优化及引物筛选

佟海申¹, 宋琳¹, 张志刚², 赵智中², 宋希云¹, 李巧云²

1. 青岛农业大学生命科学学院, 山东青岛 266109

2. 山东省农业科学院蔬菜研究所; 国家蔬菜改良中心山东分中心; 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 济南 250100

摘要 探讨了大白菜 EST-SSR 反应体系的优化, 利用优化的体系筛选部分引物。采用 $L_{16}(4^4)$ 正交设计, 研究各主要参数的适宜浓度, 建立适合大白菜 EST-SSR 反应的最佳体系。结果表明, 各因素不同水平浓度对扩增结果均有一定影响, 其中以引物浓度影响最大, 其次是 dNTP 和 Taq DNA 聚合酶, 最小是模板 DNA 用量。优化后的最佳体系 (20 μ L) 为: 引物浓度 1.0 μ mol/L, dNTPs 0.25mmol/L, Taq 酶 0.5U, 模板 DNA 70ng。利用优化的体系, 根据大白菜 EST 序列设计引物 126 对, 分别以 2 对抗、感病毒病的大白菜材料的基因组 DNA 为模板进行扩增, 筛选出至少在一份材料中扩出多态性的引物 19 对。该优化体系可用于大白菜 EST-SSR 扩增, 初步筛选的引物可用于大白菜病毒病分子标记的进一步研究。

关键词 大白菜; EST-SSR; 正交设计; 体系优化; 引物筛选

中图分类号 S634.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)03-0076-06

Optimization of EST-SSR System on Heading Chinese Cabbage and Primer Screening

TONG Haishen¹, SONG Lin¹, ZHANG Zhigang², ZHAO Zhizhong², SONG Xiyun¹, LI Qiaoyun²

1. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

2. Institute of Vegetable Research, Shandong Academy of Agricultural Sciences; National Improvement Center for Vegetable, ShanDong branch; Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, Jinan 250100, China

Abstract The aim of this paper is to optimize the EST-SSR system on heading Chinese cabbage, and select a certain amount of primer pairs using the optimized system. $L_{16}(4^4)$ orthogonal design is used in the system optimization, and the concentrations of the main factors are studied to build the best system. The results show that the different levels of each factor have some effects on the results of EST-SSR, with the effect of the primer concentration being the greatest, those of dNTP and Taq DNA polymerase the next, and that of the concentration of DNA template the minimal. The optimized system (20 μ L) is: 2.0 μ L 10 $\times$ PCR Buffer with Mg^{2+} , 70ng DNA template, 250 μ mol/L dNTP, 1.0 μ mol/L primer, and 0.5U Taq DNA polymerase. One hundred and twenty-six primer pairs are designed according to the EST sequences of heading Chinese cabbage, and EST-SSR PCR is amplified by using the above primer pairs and optimized system, with nineteen primer pairs being selected based on their reproducible and polymorphism, which could be used for further research.

Keywords heading Chinese cabbage; EST-SSR; orthogonal designs; system optimization; primer screening

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 山东省农业科学院创新基金项目(2006YCX014); 山东省农业科学院博士科研启动基金项目(2006YBS007)

作者简介: 佟海申, 硕士研究生, 研究方向为作物分子生物学, 电子信箱: haishen1020@sina.com; 宋希云 (通信作者), 教授, 研究方向为作物分子育种, 电子信箱: songxy@qau.edu.cn; 李巧云 (通信作者), 博士, 研究方向为大白菜抗病分子标记, 电子信箱: liqiaoyun0606@126.com

表 3 两对抗、感材料中扩出多态性的 EST-SSR 引物

Table 3 Polymorphic EST-SSR markers in two pairs of resistant and susceptible materials

引物编号	引物序列	推测产物大小/bp
HCC1	Upper: 5' CCATTCAGCCAAATGCTC 3' Lower: 5' AACAAACTTTTCGGACCAG 3'	279
HCC5	Upper: 5' CCAAACGAAAGTCGGTCAA 3' Lower: 5' GCTCAAGTGGCAGGGTGT 3'	298
HCC6	Upper: 5' AGCCTTACGCAAGCCACT 3' Lower: 5' CCACCTCAGGGATCACCA 3'	170
HCC7	Upper: 5' GTCCATCCCAACTTCTGT 3' Lower: 5' GACCTGGTTCTACTTCC 3'	309
HCC16	Upper: 5' GATCCCCTGATGGTTTCAT 3' Lower: 5' CCTTCTCAGCCTCTGTA 3'	277
HCC77	Upper: 5' TGACCTAAGCGGAGACGA 3' Lower: 5' ACACCTTCCTTGCCACAA 3'	158
HCC78	Upper: 5' ACTCAGCCGAGGACTACCA 3' Lower: 5' AGATCATGCCACCAAACG 3'	237
HCC82	Upper: 5' AGCACAAGACGGACTGAC 3' Lower: 5' GACGGGTGGAGAAACATA 3'	308
HCC84	Upper: 5' AGCACAAGACGGACTGAC 3' Lower: 5' TATTGACGGGTGGAGAAA 3'	312
HCC85	Upper: 5' CCGTTGCTGTCGCCGTTT 3' Lower: 5' GGTCTGGCAGAGTCCTT 3'	232
HCC86	Upper: 5' AATTCCGTTGCTGTCGCC 3' Lower: 5' GAGCTTTGATGGATCACTCACT 3'	258
HCC91	Upper: 5' ATCGAATTCCGTTGCTGT 3' Lower: 5' TGAAAATGGCTTGAGGGT 3'	314
HCC92	Upper: 5' GGACGGTGCAGATCCTCT 3' Lower: 5' ACTCGGCGGGTGTCAAT 3'	240
HCC93	Upper: 5' GGACGGTGCAGATCCTCT 3' Lower: 5' ACCTTCCAACGCTCCTGT 3'	448
HCC94	Upper: 5' CTCAGAGGCTCGCTTACT 3' Lower: 5' TGTTCACCTTCTCCATT 3'	429
HCC96	Upper: 5' AAGGCGTGTCTAAATCCA 3' Lower: 5' AAAGCCCTCAAAGTCAGC 3'	197
HCC100	Upper: 5' ATCTGAGAAGGCGACGAA 3' Lower: 5' GACATTGAGCGACGGTAT 3'	220
HCC104	Upper: 5' AATCAAACCCCAACCAACA 3' Lower: 5' CCGTGAAAAGCGGAAGAC 3'	181
HCC108	Upper: 5' ACAGAATAACCAAACCCACC 3' Lower: 5' GCCAACATAGGCACAGCT 3'	439

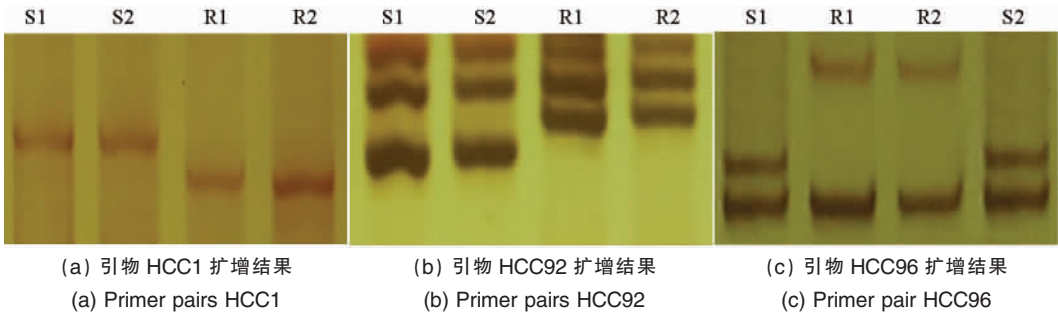


图 3 3 对引物在两对抗感材料中的扩增结果

Fig. 3 Amplified results of three primer pairs

注: S1 为冠 291; S2 为 71-36-2; R1 为 73; R2 为 8407

Notes: S1 is guan 291; S2 is 71-36-2; R1 is 73 and R2 is 8407

扩增产物减少;而浓度过高,又会增加碱基的错参率和影响 Taq DNA 聚合酶的活性。本研究中,当 dNTP 浓度为 0.1 和 0.15mmol/L 时的扩增效果明显不如 0.2 和 0.25mmol/L 时的扩增效果,其中,以 0.25mmol/L 时的扩增效果最好。本研究 dNTP 浓度对扩增结果的影响未呈正态分布,可能与所设计浓度水平还不够大有关。就扩增条带的特异性而言,DNA 含量对扩增结果的影响不大,当 DNA 含量分别为 30、50、70 和 100ng 时,均能扩增出特异性较好的条带;但就特异性和敏感性综合考虑而言,以 70ng 的扩增效果最好。在 PCR 反应中,Taq DNA 聚合酶对扩增效果的影响最直接,不同公司生产的不同质量的 Taq DNA 聚合酶的扩增效果有一定差异,最佳用量也不完全一样。本研究中所用的 Taq DNA 聚合酶为上海 Solarbio 公司生产,最佳用量为 0.5U。

本研究中的最适 DNA 用量、dNTP 浓度与以往的研究相似^[20,22-23];但最适引物浓度和 Taq DNA 聚合酶用量分别相对于以往的研究偏高或偏低,这可能分别与引物本身的存放时间和本研究所用的 Taq DNA 聚合酶试剂有关。另外,就特异性来说,3 号、4 号、5 号、11 号、12 号、13 号和 14 号组合均能满足实验要求,但如果对特异性和敏感性要求都非常高,则以 14 号组合最佳。因此,在实际操作中,应根据实验的情况进行选择或做适当调整。

另外,Mg²⁺浓度也很重要,尤其是对特异性和扩增效率影响较大,因本试验所用 Buffer 里包含了 Mg²⁺,因此,未对其最适宜浓度进行研究。不同的引物退火温度不完全相同,实验中可参考引物设计合成时的退火温度值或通过梯度 PCR 仪筛选最佳退火温度。

4 结论

采用正交实验设计方法对大白菜 EST-SSR 的 PCR 反应体系进行了优化,并分别以两对抗、感病毒病的大白菜材料的基因组 DNA 为模板,对部分引物进行扩增筛选。结果表明,在 20μL 体系中,当引物浓度为 1.0μmol/L,dNTPs 浓度为 0.25mmol/L,TaqDNA 聚合酶为 0.5U,模板 DNA 为 70ng 时,扩增效果最佳。引物筛选结果表明,在 126 对引物中,有 19 对引物至少在一对材料中扩出多态性,其中 3 对引物在两对抗、感材料中扩出一致多态性,可用于大白菜病毒病分子标记的进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Ail S, Muller S R, Epplen R W. DNA fingerprinting by oilgonucleotide probes specific for simple sequence repeat [J]. *Human Genet*, 1986, 74: 239-243.
- [2] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats[J]. *Theo Appl Genet*, 1994, 88: 1-6.
- [3] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Fang Xuanjun, WU Weiren, Tang Jiliang. Crop DNA maker-assisted breeding[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [4] Hatey F, Tosser K G, Cloucard-Martinato C, et al. Expressed sequenced tags for genes: A review[J]. *Genet Sel Evol*, 1998, 30(5): 521-541.
- [5] Luo M, Jia J Z. Progress in expressed sequence tags(EST) project of plant genome[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(4): 494-497.
- [6] 常玮, 赵雪, 李侠, 等. 大豆 EST-SSR 标记开发及与 Genomic-SSR 的比较研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 2: 149-156.
Chang Wei, Zhao Xue, Li Xia, et al. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2009, 2: 149-156.
- [7] 李建明, 李洪杰, 柴守诚, 等. 普通小麦 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记遗传差异. 安徽农业科学. 2007, 35(26): 8173-8175, 8183.
Li Jianming, Li Hongjie, Chai Shoucheng, et al. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(26): 8173-8175, 8183.
- [8] 宿俊吉, 柴守诚, 刘伟华, 等. 普通小麦 SSR 和 EST-SSR 引物对冰草通用性的比较分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1311-1316.
Su Junji, Chai Shoucheng, Liu Weihua, et al. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(7): 1311-1316.
- [9] Li Wei, Dong Pan, Wei Yuming, et al. Genetic Variation in *triticum turgidum* L.ssp.*turgidum* landraces from China assessed by EST-SSR markers[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, 7(9): 1029-1036.
- [10] 蔺宇, 徐静静, 王晓鸣, 等. 适用于大豆疫霉菌遗传分析的新 EST-SSR 标记[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2294-2301.
Lin Yu, Xu Jingjing, Wang Xiaoming, et al. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(8): 2294-2301.
- [11] 胡建斌, 李建吾. 黄瓜基因组 EST-SSRs 的分布规律及 EST-SSR 标记开发[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2429-2435.
Hu Jianbin, Li Jianwu. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(12): 2429-2435.
- [12] 李晶晶, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1219-1222.
Li Jingjing, Wang Shubin, Liu Jinbing, et al. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(6): 1219-1222.
- [13] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜 EST-SSR 标记的建立[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 137-144.
LI Xiaobai, Zhang Minglong, Cui Hairui. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2007, 40(2): 137-144.
- [14] Yang Tiantian, Mu Liqiang, Wang Jun. Optimizing SSR-PCR system of *Panax ginseng* by orthogonal design [J]. *Journal of Forestry Research*, 2007, 18(1): 31-34.
- [15] Jiang Shukun, Zhong Ming, Zhang Xijuan, et al. Optimization of a reaction system of sequence related amplified polymorphism and segregation of polymorphic loci in an F₂ population of rice [J]. *Rice Science*, 2008, 15(2): 95-100.
- [16] 朱世杨, 罗天宽, 张小玲, 等. 水稻 SSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3441-3443, 3447.
Zhu Shiyang, Luo Tiankuan, Zhang Xiaoling, et al. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(8): 3441-3443, 3447.
- [17] 苏辉, 李志刚, 宋书宏. 正交设计优化大豆 SSR-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 99-102.
Su Hui, Li Zhigang, Song Shuhong. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2009, 24(2): 99-102.
- [18] Meng Shuchun, Zhang Haiying. Studies on genomic DNA extraction and establishment of AFLP reaction system in Chinese cabbage [J].

- Agricultural Science & Technology*, 2009, 10(3): 29-35.
- [19] 史公军, 侯喜林. 不结球白菜 RAPD 反应体系的优化[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(1): 1-5.
Shi Gongjun, Hou Xilin. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2004, 26(1): 1-5.
- [20] 王永飞, 原英霞, 马三梅. 大白菜 RAPD 扩增体系的优化研究 [J]. 烟台师范学院学报: 自然科学版, 2002, 18(3): 195-198.
Wang Yongfei, Yuan Yingxia, Ma Sanmei. *Yantai Normal University Journal: Natural Science Edition*, 2002, 18(3): 195-198.
- [21] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 899-902.
Wang Yanhua, Hou Xilin, Xu Mingyu. *Acta Botanica Boreali - Occidentalia Sinica*, 2004, 24(5): 899-902.
- [22] 杨琦, 张鲁刚. 大白菜 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 119-123.
Yang Qi, Zhang Lugang. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2007, 16(3): 119-123.

- [23] 徐莹莹, 屈淑平, 崔崇士. 大白菜 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(8): 31-34.
Xu Yingying, Qu Shuping, Cui Chongshi. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 39(8): 31-34.
- [24] 石磊, 李丽, 郑晓鹰. 大白菜 SSR 检测体系的优化[J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 110-116.
Shi Lei, Li Li, Zheng Xiaoying. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(1): 110-116.
- [25] 王佳楠, 吕文河, 金光辉, 等. 马铃薯致病疫霉 EST-SSR PCR 反应体系的优化[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 11-16.
Wang Jianan, Lv Wenhe, Jin Guanghui, et al. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(6): 11-16.
- [26] Murry H G, Thomson W F. Rapid isolation of wheat DNA [J]. *Nucleic Acid Res*, 1980, 8: 4321-4325.
- [27] Bruno W S. High output genetic mapping of polyploids using PCR - Generated junkers[J]. *Theo Appl Genet*, 1993, 86: 105-112.

(责任编辑 吴晓丽)

中国科学技术协会

“青年科学家论坛”

促进学科交叉和融合
启迪新的学术思想
创立新的学术观点
培育新的学科生长

主办单位: 中国科协学会学术部
联系单位: 中国科协学会服务中心
联系电话: 010-62125017
电子信箱: xshdzzc@cast.org.cn