

# 柽柳 cpSSR-PCR 反应体系的建立和优化

张如华<sup>1</sup>, 张连梅<sup>2</sup>

(1. 临沂大学生命科学学院, 山东临沂 276005; 2. 临沂大学图书馆, 山东临沂 276005)

**摘要** [目的]建立并优化柽柳 cpSSR-PCR 反应体系和反应条件。[方法]对影响 PCR 反应的 5 个变量( $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度)进行  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计,并对引物退火温度进行梯度筛选。[结果]最优反应体系: $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L、dNTPs 0.125 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.25 U、引物 0.25  $\mu$ mol/L、模板 DNA 20 ng,共 10  $\mu$ L。反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,引物退火温度 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。[结论]该反应体系成功扩增 1 个柽柳天然群体的 23 个个体,为柽柳群体扩散路线的确定奠定基础。

**关键词** 柽柳;叶绿体微卫星;反应体系;正交试验

中图分类号 S718.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)09-0105-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.09.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Establishment and Optimization of cpSSR-PCR Reaction System of *Tamarix chinensis*

ZHANG Ru-hua<sup>1</sup>, ZHANG Lian-mei<sup>2</sup> (1. College of Life Sciences, Linyi University, Linyi, Shandong 276005; 2. Library of Linyi University, Linyi, Shandong 276005)

**Abstract** [Objective] To establish and optimize the cpSSR-PCR reaction system and amplification condition of *Tamarix chinensis*. [Method]  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design was used to identify the optimum  $Mg^{2+}$  concentration, dNTPs concentration, *Taq* concentration, primers concentration, and DNA concentration for cpSSR-PCR amplification of *T. chinensis*, and gradient annealing temperature test was also conducted. [Result] The optimized system was as follows: a 10  $\mu$ L reaction volume including 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.125 mmol/L dNTPs, 0.25 U *Taq*, 0.25  $\mu$ mol/L primers, 20 ng DNA. The suitable procedure was 4 min denaturation at 94  $^{\circ}$ C, followed by 30 cycles of 30 s denaturation at 94  $^{\circ}$ C, 30 s annealing step at 56.5  $^{\circ}$ C, 30 s elongation at 72  $^{\circ}$ C, and a final extension step at 72  $^{\circ}$ C for 10 min. [Conclusion] The optimized cpSSR-PCR system successfully amplified the 23 individuals from a natural *T. chinensis* population and could be applied to study on population dispersal of *T. chinensis*.

**Key words** *Tamarix chinensis* Lour.; Chloroplast microsatellites; Reaction system; Orthogonal design

柽柳(*Tamarix chinensis* Lour.)属柽柳科柽柳属,是起源于旧大陆的古老植物,为 3~6 m 的灌木或小乔木。柽柳科隶属于双子叶植物纲五桠果亚纲,分有 3 属:红砂属、水柏枝属、柽柳属,世界分布约 126 种植物,其中柽柳属 90 种<sup>[1]</sup>。我国是柽柳属植物的一个次级起源中心和分布中心,拥有 18 个种 1 个变种,许多为我国特有种,其中新疆分布有 16 个种<sup>[2]</sup>。柽柳耐盐碱和水湿,是沿海滩涂的重要生态防护树种<sup>[3]</sup>。柽柳自 19 世纪上半叶被美国自亚洲引进后,在美国西部大面积扩张建群,甚至替代了原生植被,被划为入侵树种<sup>[4]</sup>。

柽柳是柽柳属植物中在我国分布最广的一个种,天然分布于内蒙、北京、河北、河南、山东、江苏(北部)、浙江等省。目前在华东和华南部分省份发现有人工群体或小面积栽培。基于植物地理学研究认为柽柳自新疆次级分布中心向东扩散,但柽柳孢粉学证据较缺乏<sup>[5]</sup>,且又不连续,对小尺度的柽柳群体扩散路线较难进行推断。叶绿体 DNA 为单亲遗传(被子植物大多为母系遗传)的环状 DNA,进化速率慢,遗传变异的研究能在分子水平上重建植物的建群路线、鉴别栽植群体的材料来源<sup>[6]</sup>。笔者研究了柽柳叶绿体微卫星反应体系的建立,以期对柽柳群体扩散路线确定、柽柳不同品种遗传来源鉴别提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料 柽柳采自位于山东省昌邑柳疃镇盐场附近

的柽柳天然群体(119 $^{\circ}$ 21'22" E,37 $^{\circ}$ 05'16"N)。为避免相关性采样,所采植株尽量间隔 50 m 以上,由于群体受到人为破坏,共采取 23 株个体。选取植株中部成熟叶 3~5 g 放入装有硅珠的自封袋中,带回实验室保存于-80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱以备后序试验。采用改良的 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取 DNA,用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳进行定性和定量检测。提取的 DNA 检测后统一稀释至 20 ng/ $\mu$ L。

**1.2 引物合成和 PCR 反应试剂** 所用柽柳叶绿体微卫星引物为南京林业大学林木遗传育种实验室自行开发。引物上游序列: TCCCGGACGTAAGATCCTG,下游序列: ATCGTGGGACCGATTCAAT,重复单元为(TG)<sub>5</sub>,目的片段长度 181 bp。由南京金斯瑞生物公司合成引物,其他 PCR 反应试剂如 *Taq* 酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$  和 Buffer 均购自 TaKaRa 公司。50 bp DNA Marker 购自天根生化科技有限公司。

**1.3 PCR 扩增和产物电泳分离** PCR 扩增反应程序为南京林业大学林木遗传育种实验室设计的柽柳核叶绿体基因组 SSR 的 PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,引物退火温度 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 45 min;16  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。量取 50 mL 变性胶液(含 21 g 尿素,3.9 g 丙烯酰胺,0.1 g 甲叉双丙烯酰胺;1 $\times$ TBE 浓度),加入 180  $\mu$ L APS(10%过硫酸氨)和 35  $\mu$ L TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺)后灌胶。PCR 扩增产物加入 4  $\mu$ L 上样缓冲液(0.25%溴酚兰,15%聚蔗糖),取 1.5  $\mu$ L 混合液点在凝胶梳孔里,200 V 恒电压电泳 90 min 左右至溴酚兰跑出凝胶,所用仪器为北京六一仪器厂 DYCZ-30c 型电泳槽。胶板在固定液(10%乙醇 100 mL+

基金项目 临沂大学博士科研启动基金项目(2015A0031)。

作者简介 张如华(1970—),男,山东临沂人,讲师,博士,从事森林遗传研究。

收稿日期 2019-01-11

0.5 mL 纯乙酸)固定 10 min,  $\text{AgNO}_3$  溶液(浓度为 0.15%) 银染 8 min, 倒入显影液(100 mL 配方: 1.5 g 氢氧化钠+1 mL 0.756% 的四硼酸钠+1 mL 甲醛)直至显出清晰的条带, 检测分离结果。

**1.4 正交试验设计和引物退火温度筛选** 对 PCR 反应体系中的 DNA 模板浓度、引物浓度、dNTPs、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度和 DNA *Taq* 酶浓度进行 5 因素 4 水平正交试验设计  $L_{16}(4^5)$  (表 1), 每种处理统一加 10×PCR Buffer 1  $\mu\text{L}$ 。随机选取 2 个柞柳 DNA 模板进行温度梯度设计, 梯度值设为 1.5  $^\circ\text{C}$ , 退火温度 50.0~60.5  $^\circ\text{C}$ , 共设 8 个温度梯度。

**1.5 cpSSR-PCR 扩增体系的群体检测** 运用正交设计得到的最优反应体系和最佳引物退火温度对所采群体进行扩增初试, 检验所选扩增体系和退火温度能否有效进行群体扩增。

## 2 结果与分析

**2.1 柞柳 DNA 提取** 改良的 CTAB 法能够提取质量好的柞柳基因组(图 1)。琼脂糖凝胶电泳检测该方法所提取的柞柳 DNA 谱带清晰、明亮、无拖尾, 所提 DNA 在 23 130 bp 左右, 表明所提 DNA 质量好, 浓度较高, 经紫外分光光度计检测  $OD_{260/280}$  在 1.8~2.0, 浓度在 100~200  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 能够满足后

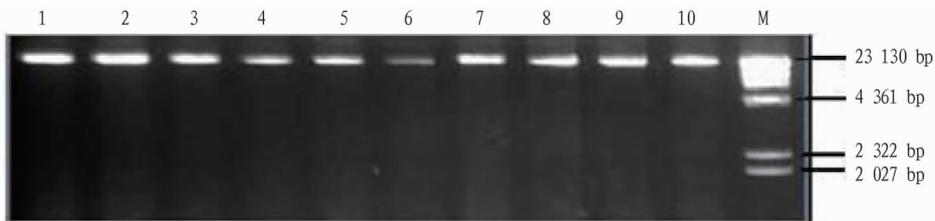


图 1 改良的 CTAB 法提取柞柳 DNA

Fig. 1 DNA extracted by the modified CTAB method

**2.2 cpSSR-PCR 正交试验结果** 基于正交试验设计的不不同 PCR 反应组合之间存在较大差异(图 2), 多数反应组合(C、D、F、G、H、I、J、K、L、N 及 O 等 12 组合)仅 1 个模板得到有效扩增, 有的反应组合(如 A、B 及 P 等 3 组合)2 个模板都不能得到有效扩增。仅 E、M 2 个组合有效扩增了 2 个供试

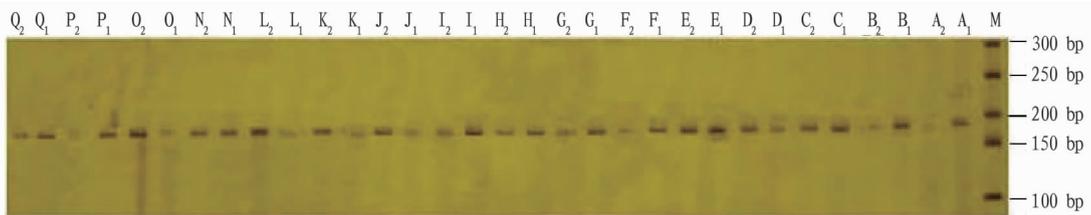
续试验的要求。

表 1 柞柳 cpSSR-PCR 反应正交试验设计 ( $L_{16}(4^5)$ )

Table 1 Orthogonal design of cpSSR-PCR ( $L_{16}(4^5)$ ) for *T. chinensis*

编号 No.	DNA 模板 (10 $\mu\text{L}$ ) DNA template concentration ng	引物浓度 Primer concentration $\mu\text{mol}/\text{L}$	dNTPs mmol/L	$\text{Mg}^{2+}$ mmol/L	<i>Taq</i> 酶 (10 $\mu\text{L}$ ) <i>Taq</i> polymerase U
1	15	0.25	0.100	1.0	0.10
2	15	0.30	0.125	1.5	0.15
3	15	0.35	0.150	2.0	0.20
4	15	0.40	0.175	2.5	0.25
5	20	0.25	0.125	2.0	0.25
6	20	0.30	0.100	2.5	0.20
7	20	0.35	0.175	1.0	0.15
8	20	0.40	0.150	1.5	0.10
9	25	0.25	0.150	2.5	0.15
10	25	0.30	0.750	2.0	0.10
11	25	0.35	0.100	1.5	0.25
12	25	0.40	0.125	1.0	0.20
13	30	0.25	0.175	1.5	0.20
14	30	0.30	0.150	1.0	0.25
15	30	0.35	0.125	2.5	0.10
16	30	0.40	0.100	2.0	0.15

模板, 但 M 组合所扩增产物条带模糊, E 组合扩增产物清晰、产物丰度高, 故选择 E 组合为柞柳叶绿体 SSR 扩增反应体系, 其各反应组分:  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L、dNTPs 0.125 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.25 U、引物 0.25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、模板 DNA 20  $\text{ng}$ 。



注: A~Q 为表 1 中对应的 1~16 编号, 每组合 2 个重复

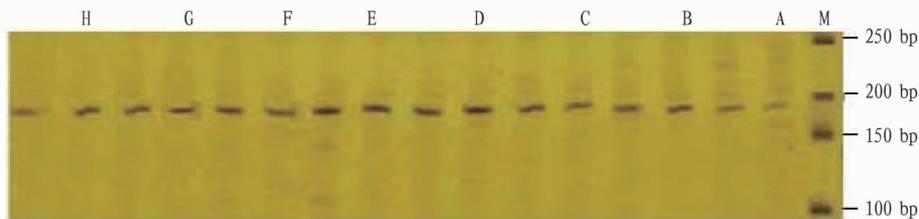
Note: A~Q represnets 1~16 of the table 1, each treatment has 2 DNA templates.

图 2 cpSSR-PCR 正交试验结果

Fig. 2 The results of cpSSR-PCR system with orthogonal design

**2.3 退火温度筛选** 柞柳叶绿体 SSR 引物在一定退火温度范围内, 目的产物均能得到扩增, 但产物的丰度和特异性存在差异(图 3)。较低的退火温度(如 A、B、C 3 个较低的温度梯度)导致非特异性扩增较多, 随着退火温度的增加, 非特异性扩增减少, 但较高的退火温度(如 G、H 2 个温度梯度)扩

增的产物丰度降低, 综合 8 种退火温度梯度处理, 选择 E (56  $^\circ\text{C}$ ) 为该引物退火温度。该退火温度下扩增产物丰度高、条带清晰、杂带较弱, 等位基因比较容易判读, 2 个模板的扩增产物具有相对一致的丰度。



注: M. 50 bp ladder; A~H 分别代表引物退火温度 50.0、51.5、53.0、54.5、56.0、57.5、59.0、60.5 ℃

Note: M. 50 bp ladder; A~H represents the primer annealing temperature 50.0, 51.5, 53.0, 54.5, 56.0, 57.5, 59.0, 60.5 ℃

图 3 柽柳 cpSSR-PCR 退火温度筛选

Fig. 3 Gradient annealing temperature test of *T. chinensis* cpSSR-PCR amplification

**2.4 反应体系的群体检测** 采用筛选出的 cpSSR-PCR 反应体系和退火温度(56 ℃)对所采群体进行检测,结果表明,所采用的反应体系能够有效扩增叶绿体目的片段(图 4)。

扩增的目的片段清晰,几乎无杂带,产物丰度相对一致,等位基因容易判读,可为柽柳群体的大规模扩增提供分子试验基础。

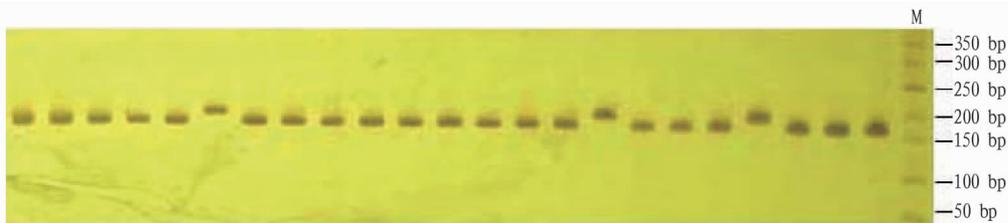


图 4 昌邑柽柳群体的 cpSSR-PCR 扩增

Fig. 4 cpSSR-PCR amplification of *T. chinensis* population from Changyi

### 3 结论与讨论

在 16 种正交组合中,除第 5 种和第 13 种组合能有效扩增 2 个模板 DNA 外,其他组合仅能对 1 个模板 DNA 进行目的片段的有效扩增,表明试验设计的各 PCR 反应组合比较灵敏,能够反映各 PCR 反应组分对柽柳叶绿体微卫星对目的 DNA 扩增效果。该试验退火温度能在较大的温度范围内有效扩增目的片段,只是有丰度上略有差别;另试验中较低的退火温度(A、B 和 C 3 个温度梯度)导致非特异性扩增的增加,这已在其他研究中得到证实<sup>[8-9]</sup>。DNA 模板浓度在试验中对各反应底物浓度组合较不敏感,这与郭海林等<sup>[10]</sup>对结缕草植物的 SSR 扩增与邵俊培等<sup>[11]</sup>对马尾松的 PCR-SSR 反应体系优化结果一致。该研究采用所选 cpSSR-PCR 反应体系及退火温度能够对昌邑群体进行成功扩增,表明正交设计得到的反应体系能够进行柽柳群体的检测,可为进一步柽柳分子地理系统学研究奠定基础。

### 参考文献

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 第 50 卷 第 2 分册

[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 142-143.

- [2] 张道远. 柽柳科系统学研究中一些问题探讨[J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 471-478.
- [3] 董必慧. 江苏沿海滩涂柽柳的繁殖生物学特性及开发前景[J]. 林业科技, 2004, 29(1): 4-7.
- [4] GASKIN J F, KAZMER D J. Comparison of ornamental and invasive saltcedar in the USA northern Great Plains using chloroplast and nuclear DNA sequence markers [J]. Wetlands, 2006, 26(4): 939-950.
- [5] 潘晓玲. 塔里木盆地植物区系的研究[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 1994, 11(4): 77-83.
- [6] DUMOLIN S, DEMESURE B, PETIT R J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method [J]. Theoretical and applied genetics, 1995, 91(8): 1253-1256.
- [7] 张博, 张露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 提取方法[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(1): 13-16.
- [8] 张美玲, 李巧明. 濒危植物望天树 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2011, 33(S2): 425-432.
- [9] 何仁锋, 冯尚国, 陈喆, 等. 药用菊花 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 367-378.
- [10] 郭海林, 王志勇, 薛丹丹, 等. 结缕草属植物 SSR 反应体系的优化及其应用[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 138-143.
- [11] 邵俊培, 李志辉, 杨模华, 等. 马尾松 EST-SSR PCR 体系的优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(4): 159-163.

(上接第 104 页)

- [13] 陈二龙, 范志勇, 王松峰, 等. 烟草 *Hsp70* 基因家族的鉴定及 *NH-sp70Chl* 基因的表达分析[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(2): 8-16.
- [14] MCKEE S, PERROTT R, DONACHY P, et al. GeneGrid: From "virtual" bioinformatics laboratory to "Smart" bioinformatics laboratory [C]//19th IEEE International Symposium on Computer-based Medical Systems (CBMS 06). Salt Lake City, UT, USA: IEEE, 2006.
- [15] BONNET E, HE Y, BILLIAU K, et al. TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics [J]. Bioinformatics, 2010, 26(12): 1566-1568.
- [16] MISHRA B, THINES M. siMBa—a simple graphical user interface for the

Bayesian phylogenetic inference program MrBayes [J]. Mycological progress, 2014, 13(4): 1255-1258.

- [17] 张绍进. 泛素激活酶 Ubal 对细胞自噬的调节机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [18] 李广起. 龙须菜泛素激活酶和泛素结合酶基因克隆及热激下表达模式分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [19] STEPHEN A G, TRAU SCH-AZAR J S, HANDLEY-GEARHART P M, et al. Identification of a region within the ubiquitin-activating enzyme required for nuclear targeting and phosphorylation [J]. Journal of biological chemistry, 1997, 272(16): 10895-10903.
- [20] 徐珍珍, 倪万潮, 张香桂, 等. 棉花 *YABBY* 基因家族的全基因组分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(11): 146-152.