

湿地松、加勒比松改进的 SSR - PCR 实验方法^{*}

王润辉 吴惠珊 赵奋成

(广东省林业科学研究院 广州 510520)

摘要 在开展分子标记辅助湿加松亲本选配研究过程中,为了获得较好的 PCR 扩增产物,尝试利用了三种不同的 PCR 实验方法。首先,利用梯度 PCR 确定不同微卫星引物的最优退火温度,再用降落 PCR 最大限度地扩增特异产物,最后,当有些反应在电泳中没有检测到产物时,尝试利用巢式 PCR 再重新扩增,但由于巢式 PCR 敏感性高,会把特异和非特异的产物放大很多倍,辨别特异谱带时要非常小心。

关键词 湿地松 加勒比松 微卫星 聚合酶链式反应

中图分类号:S791.246,S791.244 文献标识码:A 文章编号:1006-4427(2007)01-0018-04

Improvement of the SSR - PCR Methodology in PEE and PCH

Wang Runhui Wu Huishan Zhao Fencheng

(Guangdong Forest Research Institute, Guangzhou, 510520)

Abstract On the proceeding of a project of Nature Science Foundation of Guangdong, the molecular mark2 er2aided selection of the hybrid parents of *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, three types of variant PCR methods were attempted to obtain optimally amplified Simple Sequence Repeat products. Gra2 dient PCR was used to determine the optimal annealing temperature (T_m) firstly. Then touchdown PCR was used to amplify the SSR locus effectively. Finally, in the situation where no products detected in the PAGE, nested PCR was carried out to amplify it again using a little product as template DNA. But because of the high sensitivity of the nested PCR, great care must be taken when distinguished the special amplified products.

Key words *Pinus elliottii* var. *elliottii* (PEE), *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH), SSR, PCR

SSR 标记在众多分子标记方法中,具有共显性、实验方法相对简单和遗传信息含量丰富等优点,但其开发难度大,经费投入多。由于松属树种的基因组存在较大的保守性,SSR 位点在一定程度上较为保守^[12],跨树种的 SSR 标记的利用也被很多的研究者证明是一种有效的、经济可行的方法,如 Shepherd M 等^[3]成功地将火炬松上开发的微卫星引物用于湿地松和加勒比松群体遗传的研究中。然而,还是有少部分的 SSR 位点在不同松属树种间是有所不同的,如在 Genbank 发表的松属树种的部分 SSR 位点(如 PflTX3116 和 PflTX3091 等)的序列在不同松属树种间是有所差异的^[4];另外,不同重复间模板 DNA 的提取和纯化方法不同,及不同生产商的 PCR 反应组分功效的差异等等的因素都会影响到跨松树树种间 SSR 标记的利用(反应条件往往与原始报道的存在差别)。为了最大限度地得到好的 SSR - PCR 实验效果,湿地松、加勒比松的 SSR - PCR 的反应条件和反应体系应要求更高、更优化。以下是笔者在利用火炬松上开发的 SSR 位点,开展湿地松、加勒比松的 SSR 标记时,尝试改变常规的 PCR 方法,采用梯度 PCR、降落 PCR 与巢式 PCR 三种方法来进行的几个实验及其相应的结果。

^{*} 本研究是广东省自然科学基金资助项目“分子标记辅助湿加松杂交亲本选配的研究”的部分研究内容,项目编号:5004951。实验所用部分药品由广东省林业科学研究院分子育种实验室提供,特此鸣谢。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本实验用湿地松和加勒比松的侧枝嫩芽为材料提取 DNA，用于 SSR – PCR 分析，具体方法见文献[4]。SSR – PCR 反应体系为 20 μl，反应体系中用到 Sangon 生产的 Taq 酶和 Takara 生产的 dNTP 等；PCR 在 MJ 公司的 PTC – 200 型 PCR 仪上进行。

1.2 试验方法

1.2.1 梯度 PCR 利用 PTC200 型 PCR 仪的梯度功能，根据不同引物的 Tm 值，设定最高退火温度为 Tm + 6℃，最低退火温度为 Tm – 6℃，其它条件依文献[4]所述，进行 PCR 扩增。

1.2.2 降落 PCR 利用 PTC200 型 PCR 仪的降落功能，根据不同引物的 Tm 值，以 Tm + 5℃ 为最高退火温度开始 PCR 扩增，两个循环后退火温度降 1℃，直到退火温度变为 Tm – 5℃ 后，不改变退火温度再做 25 个循环的 PCR 扩增。

1.2.3 巢式 PCR 按一般方法配制 PCR Master，以 1 μl 和 1.5 μl 相同引物的 PCR 反应液（通常是没有检测到产物的样品）代替模板 DNA，进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 梯度 PCR (Gradient PCR)

退火温度 (annealing temperature) 是整个 PCR 扩增过程中最为关键的因素，它决定了 PCR 的成败。过低的退火温度会使引物非特异地与模板结合，从而导致出现较多的非特异性谱带；而过高的退火温度会导致引物不能与模板结合，扩增不同产物。理论上，退火温度与引物的碱基组成、长度和扩增反应中的离子浓度等因素都有较大的关系，Rychlik W 等^[5b]根据以上的因素总结了计算最优退火温度的几条公式，但由于公式较为繁琐，且理论上决定的条件往往与实际上的实验条件（如离子浓度等）有所偏差，因此用公式算出的退火温度就不太理想。用梯度 PCR 来决定引物的退火温度是行之有效的实验方法。

如图 1 所示，随着退火温度的增加，两个样本都呈现出同样的趋势，即目标谱带（特异性扩增）由弱变强，相反杂带（非特异性扩增）由强变弱（直到完全消失）。在较低的退火温度下，特异性的扩增也是存在的，但由于非特异的扩增与其竞争，消耗大量的资源，从而导致特异性的扩增结果有限（谱带非常弱）；而在较高的退火温度下，由于非特异的扩增减少，有的甚至消失，所以使特异性的扩增加强，得到量较多的特异性产物。图 2 是 12 个样本在 57℃ 下退火的扩增结果，尽管还存在部分非特异的扩增谱带，但该位点的特异性扩增结果还是非常清晰可辨的。

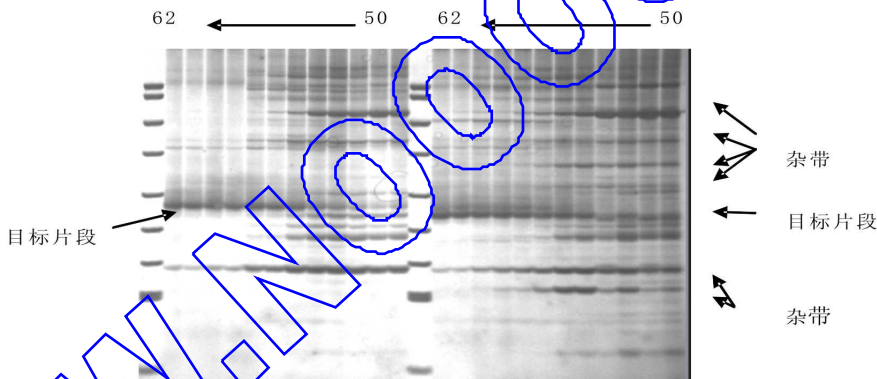


图 1 两个样本在不同退火温度下所扩增出的谱带，引物 P fTX3105

2.2 降落 PCR (Touchdown PCR)^{[7]254}

降落 PCR 是针对复杂的 DNA 模板而提出的扩增方法，由于模板的复杂性使得扩增某一特定位置点（如微卫星位点）变得非常困难，有较多的因素影响引物特异扩增的效率。除了常见的 Mg²⁺、dNTP 浓度等因素外，

退火温度是否最优也是重要的影响因素(如前所述)。降落 PCR 就是在不知道引物的最优退火温度的前提下,极大提高扩增效率的扩增方法;其原理是在高于引物最优退火温度开始的循环,每隔一个或两个循环向下降 1℃,从而使得特异产物在较高的退火温度下积累,当退火温度低于引物的最优退火温度时,特异产物的模板就产生数量上的优势,达到抑制非特异扩增的目的^[8]。当然,抑制效果的好坏主要还是由引物的特异性扩增效率等因素决定。

图 3 系统地比较了降落 PCR 与常规 PCR 扩增 5 个相同的样本模板得出的不同结果。图左边降落 PCR 的扩增程序为:94℃ 变性 5 m in;紧接着是 10 个循环的降落 PCR,94℃ 30 s,退火温度由 64℃ 开始,每循环降 1℃,退火 45 s,10 个循环后退火温度降到 55℃;72℃ 延伸 45 s;接着用 55℃ 退火做 25 个循环,变性与延伸的温度和时间同上。图右边常规 PCR 的扩增程序为:94℃ 变性 5 m in;紧接着是 30 个循环的变性(94℃ 30 s)、退火(55℃ 45 s)、延伸(72℃ 45 s)。两个程序都以 72℃ 5 m in 结束。如图所示,在相同的上样量(2 μl)情况下,降落 PCR 的扩增产量明显要多于常规 PCR,尽管这可能是由于循环次数的差异而造成的,但从杂带的情况来看,降落 PCR 扩增出的杂带明显要比常规 PCR 的少。这些足以证明降落 PCR 在扩增湿加松微卫星位点上的优越性。

2.3 巢式 PCR (Nested PCR)^{[7]258}

理论上,PCR 产物是指数式增长的,每一循环的产物是前一循环的两倍,这就是 PCR 的指数增长期。但当循环数到了 30 个左右时,由于某种原因(反应组分的耗尽、Taq 酶活力下降等等),PCR 产物就会停止增长,出现高原效应(Plateau effect)。在一些扩增反应中,由于反应体系某一组分(通常是模板 DNA)起始反应的浓度过低,当完成 30 个循环的扩增反应后,并不能得到可检测水平的 PCR 产物。此时,由于前述高原效应的影响,盲目地增加循环数不一定能增加扩增产物。在这样的情况下,用巢式 PCR 就非常有效。

如图 4 和图 5 所示,巢式 PCR 非常有效地放大 PCR 产物的检测信号(如图 5 中泳道 4 与泳道 2 和 3 相比,泳道 7 与泳道 5 和 6 相比,图 4 中泳道 B 与泳道 8 和 9 相比,图 4 中泳道 C 与泳道 11 和 12 相比)。由于非特异性的谱带同时增加很多倍,原来没有检测到的非特异性谱带经巢式 PCR 后能清晰地检测出来(图 5 箭头所示),所以在辨别特异性谱带时要非常小心。泳道 G 中特异性谱带隐约可辨,经巢式 PCR 后,特异性的条带虽然不是很清晰,但还是能辨别。其原因可能由于较小的弥散条带在扩增时竞争消耗了大量的资源所致的,具体原因还要作进一步的研究。

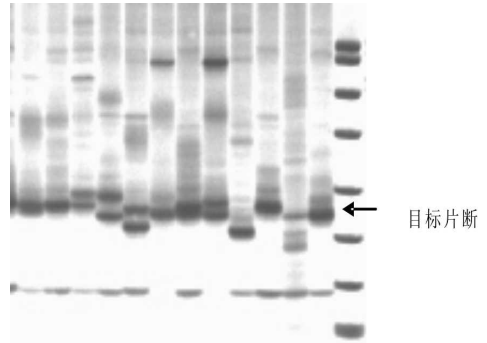


图 2 12 个样本在 P fTX3105 位点的扩增结果(57℃ 退火)

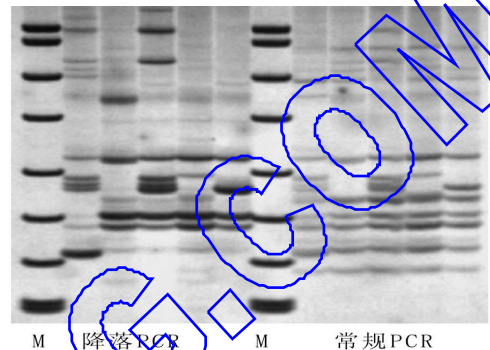


图 3 5 个样本用不同程序的扩增结果(引物 P fTX3029)

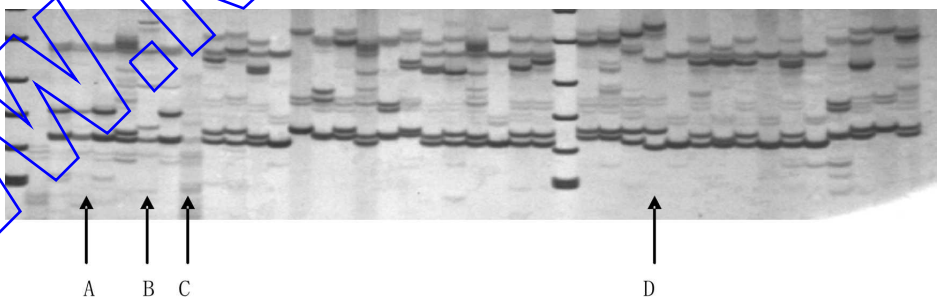


图 4 用引物 P fTX3107 扩增 31 个杂交父母本及 7 个子代的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)图谱