

# 磁珠富集法开发毛竹 SSR 标记引物

彭镇华<sup>1,2</sup>, 刘贯水<sup>1</sup>, 李潞滨<sup>2</sup>

(1. 国际竹藤网络中心,北京 100102; 2. 中国林业科学研究院林业研究所,国家林业局林木培育重点实验室,北京 100091)

**摘要:**用磁珠富集法筛选毛竹基因组 DNA 的 SSR 分子标记,利用磁珠法对毛竹基因组 DNA 的 AFLP 片段进行了富集,分别构建了富含 GT、AG、CCA 重复基元的富集文库,利用克隆 PCR 法对文库进行筛选,检测菌落数分别为 1080、620、630 个,阳性菌落中含目的重复的序列分别为 137、73、41 个,富集效率分别为 12.7%、11.8%、6.5%。双碱基重复的富集效率高于三碱基富集效率。根据获得的序列结果,设计了 53 对 SSR 引物,其中 31 对引物在毛竹中成功扩增出目的大小的条带,扩增成功率为 58.9%。

**关键词:**毛竹;磁珠富集法;文库筛选;SSR 引物

中图分类号:Q346.5

文献标识码:A

## Development of Polymorphic Simple Sequence Repeats Markers in *Phyllostachys edulis* by Magnesphere

PENG Zhen-hua<sup>1,2</sup>, LIU Guan-shui<sup>1</sup>, LI Lu-bin<sup>2</sup>

(1. International Centre for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** The objective of this work is to seek SSR markers for *Phyllostachys edulis*. Magnesphere method was used to concentrate SSR containing sequences from *Ph. edulis* Genomic DNA AFLP fragments. Three SSR-enriched libraries (GT, AG, and CCA) were constructed. The Clone-PCR method was used to screen positive clones, 1 080, 620, 630 clones were screened in GT, AG, CCA libraries, and 137, 73, 41 SSR-containing sequences were obtained, at concentration rate of 12.7%, 11.8%, 6.5% respectively. The result showed that the concentration rate of dinucleotide repeat libraries is higher than trinucleotide libraries. After sequences analyzing, 53 pairs of SSR primers were designed, 31 of which amplified the objective fragment in *Ph. edulis* at the rate of 58.9%.

**Key words:** *Phyllostachys edulis*; Magnesphere Method; Libraries Screening; SSR Primers

微卫星 DNA 是广泛分布于基因组中的一类高变异的串联重复 DNA 序列,其变异来源于 DNA 复制时链的滑动所造成的重复数目的差异<sup>[1]</sup>。微卫星具有分布广且均匀、多态信息含量高、共显性遗传、选择中性等特点,因而在植物遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、DNA 指纹图谱构建、品种鉴定、QTL 分析及分子辅助育种中广泛应用。近年来,它已逐渐成为最流行的分子遗传标记之一<sup>[2-3]</sup>。传统的微卫星

开发策略筛选过程复杂,效率低,并且需要大量的人力和资金投入<sup>[4]</sup>。磁珠富集法是近几年发展起来的一种基于选择性杂交筛选微卫星的新方法。该方法首先是基于基因组 DNA 的小片段化,对小片段库中含微卫星序列的片段进行生物素标记探针的杂交,利用联霉亲和素与生物素之间高的亲和力对杂交上的片段进行收集,利用严谨的洗脱条件对非特异结合片段进行洗脱,从而达到微卫星富集的目的。该

方法已经应用于一些植物和动物的微卫星的分离<sup>[5-6]</sup>。它的基本原理是磁珠上所包被的链霉素亲和素可与生物素标记探针,如生物素标记的( CA)<sub>10</sub>的生物素共价结合;含有微卫星片段基因组通过碱基互补与生物素标记探针特异性杂交,通过磁力将探针连同与之互补的含有微卫星片段基因组一起直接被磁铁吸附回收。这种方法能显著提高微卫星的分离效率,降低不含微卫星片段的干扰。

毛竹(*Phyllostachys edulis* ( Carr. ) H. de Lehaie)隶属禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)刚竹属(*Phyllostachys*),是我国分布最广、面积最大、经济价值最高的竹种之一,具有生长快、周期短、产量高、用途广等诸多优点,有着广泛的开发前景<sup>[7-8]</sup>。目前,在分子水平上研究毛竹,多采用RAPD标记<sup>[9-11]</sup>。SSR标记在毛竹中的应用很少有报道,因而开发毛竹SSR标记显得迫切而重要。本研究利用磁珠富集法筛选出具有多态性、可重复的SSR引物,对毛竹的种质评价以及相关种群的遗传特性研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 DNA提取与酶切

本研究选用的毛竹采自浙江安吉市竹博园,取样部位为幼嫩的叶片。用CTAB-高盐沉淀法提取核基因组<sup>[12]</sup>,然后用乙醇沉淀法来纯化DNA粗提液。

用限制性内切酶EcoRI和MspI对毛竹基因组DNA进行双酶切。20 μL酶切体系中含有:DNA模板300 ng,EcoRI和MspI各10 U;酶切反应在1倍T4连接酶缓冲条件下进行,酶切3 h;酶切效果用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.2 接头的连接及预扩增

将EcoRI和MspI双酶切的毛竹基因组DNA连接上EcoRI和MspI接头。20 μL连接体系中含有:双酶切的毛竹基因组DNA 10 μL,EcoRI和MspI接头各100 pmol,T4连接酶1.2 U;连接反应在1倍T4连接酶缓冲条件下进行,于16 °C连接过夜;将连接产物用引物E<sub>00</sub>和M<sub>00</sub>进行PCR扩增,扩增产物经过纯化用于磁珠回收实验。

接头制备过程参考Albani等<sup>[13]</sup>和Chen等<sup>[14]</sup>的方法。接头序列分别为EcoRI:5'CTCG-TAGACTGCGTAC3',5'TTAACCATGCGTCAG3';MspI:5'GACGATGAGTCCTGGC3',5'GGCGGTCT-GAGTA3';E<sub>00</sub>、M<sub>00</sub>引物序列为:5'GAUTGCG-

TACCAATTG3',5'GATGAGTCCTGAGCCG3'。

### 1.3 亲和捕捉

参考李炬<sup>[15]</sup>的方法,于磁场中收集上清液,将收集到的DNA浓缩后用E<sub>00</sub>、M<sub>00</sub>再次进行PCR扩增。

### 1.4 克隆富集的微卫星DNA片段

将PCR产物连接到载体(pMD18-T Vectors,Takara)上,然后转化到感受态细胞E. coli中。涂布到含有Amp的平板培养基上,37 °C培养过夜。

### 1.5 用克隆PCR法筛选阳性克隆

根据PMD18-T载体M13测序通用引物与微卫星探针序列(GT)8组成的引物组合对GT富集文库进行三引物和双引物特异PCR扩增。

三引物特异PCR检测(以下称为三引物克隆PCR)对扩增出2条或2条以上条带的菌落定义为阳性克隆。扩增体系为15 μL,其中,模板为单菌落,10×Buffer(1.5 μL),2.5 mmoldNTP(1.2 μL),20 μmol RV-M(1.2 μL),20 μmol M13-47(0.1 μL),20 μmol相应探针引物(0.1 μL),TaqDNA聚合酶(0.15 U),其它用水补齐。

双引物特异PCR检测(以下称为双引物克隆PCR),其中,任何一对引物扩增出清晰条带的菌落定义为阳性克隆。扩增体系为15 μL,其中模板为单菌落,10×Buffer(1.5 μL),2.5 mmoldNTP(1.2 μL),20 μmol RV-M/M13-47(0.1 μL),20 μmol相应探针引物(0.1 μL),TaqDNA聚合酶(0.15 U),其它用水补齐。

反应程序为:94 °C预变性10 min,94 °C变性35 s,60 °C退火35 s,72 °C延伸45 s,32个循环,72 °C延伸5 min。

根据克隆PCR的电泳结果,对2种方法进行比较。采用筛选效果较好的方法对3个文库进行筛选,并对阳性克隆的质粒进行测序。

### 1.6 引物设计与扩增分析

利用Primer5.0软件对测序结果进行SSR引物设计,并送上海英骏生物公司合成。以稀释的毛竹基因组DNA为模板对引物是否工作及扩增条件进行了优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 毛竹基因组DNA EcoRI、MspI双酶切

酶切电泳结果(图1)显示:酶切片段分布均匀,片段大小为100~2 000 bp,适于载体连接及之后的序列

测定。

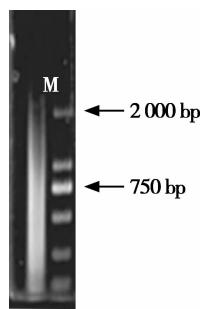
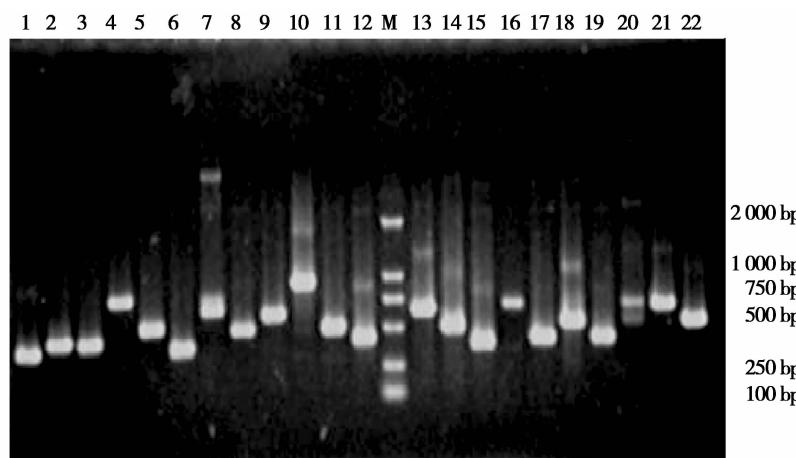


图 1 毛竹基因组 DNA *EcoR* I、*Msp*I 双酶切电泳图

## 2.2 克隆 PCR 检测

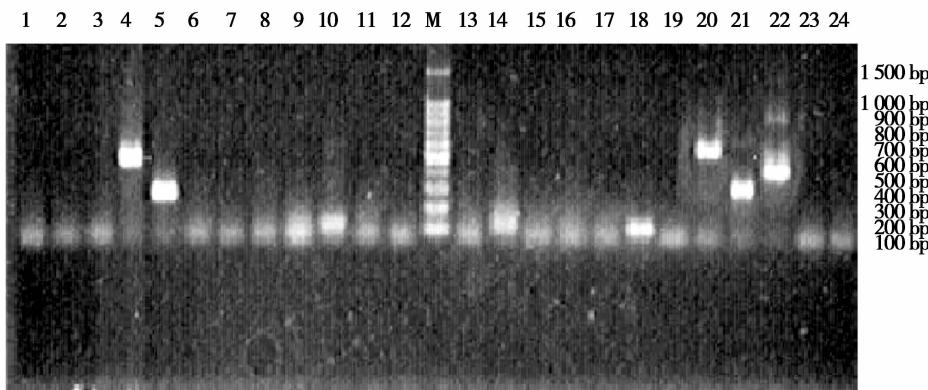
利用三引物克隆 PCR 检测(图 2)。结果显示:阳性菌落比率偏低,约为 3.6% (4/112),对阳性克隆进行了质粒测序,有 2 条序列中含有目的重复结果,假阳性率偏高,达到 50% (2/4)。

利用双引物菌落 PCR 方法对获得的 3 个富集文库进行克隆 PCR 检测(图 3)。结果显示:阳性克隆扩增条带清晰且单一,阳性菌占到检测菌落数的 10.8% (251/2330)。



1 ~ 22 是不同菌落的克隆 PCR 结果,20 号对应菌落为阳性克隆,M 是 DL2000

图 2 三引物克隆 PCR 电泳图



1 ~ 24 为克隆 PCR 检测的不同菌落,4、5、18、20、21、22 显示亮带对应菌落为阳性克隆,M 为 Marker

图 3 双引物克隆 PCR 电泳图

## 2.3 SSR 重复序列的统计

利用双引物克隆 PCR 法对 GT、AG 和 CCA 3 个富集文库进行筛选,检测的菌落数分别达到 1 080、620、630 个,获得含目的重复的序列数分别为 137、73、41 个,阳性率分别为 12.7%、11.8%、6.5%。结果显示:双碱基富集文库 GT、AG 的富集效率高于三碱基富集文库 CCA 的富集效率(表 1)。

表 1 克隆 PCR 检测统计

文库	检测克隆数/个	含目的重复序列数/个	阳性序列比率/%
GT	1 080	137	12.7
AG	620	73	11.8
CCA	630	41	6.5
总计	2 330	251	10.8

## 2.4 引物设计

根据测序结果,共设计53对SSR引物。以毛竹基因组DNA为模板对引物是否工作及引物的退火温度进行摸索。其中,31对引物扩增出了目的条带

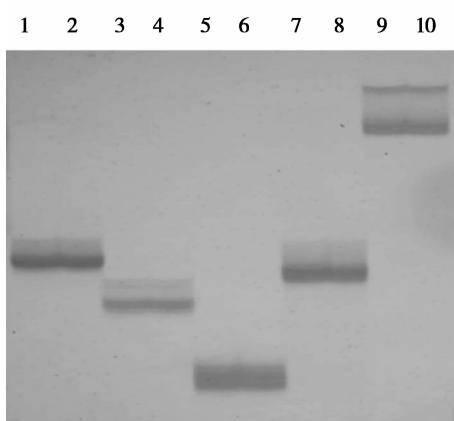
大小的片段,将序列上传至GenBank,序列登录号如表2。毛竹部分SSR位点的电泳结果如图4,显示扩增出预期大小的片段。

表2 毛竹SSR引物信息

位点	引物序列	产物大小/bp	核心基序	退火温度/℃	GenBank 登录号
1	F:CCGGAGGAGAACAGGGCTCG R:GCCAACACAGGCTTGATT	180	(GA)10	62	HM218953
2	F:CGCAACGATTACTAAATGCC R:TAATGGGTGGTGTATGTG	175	(TC)7(AC)7	63	HM218954
6	F:ACGGGTCCAAGGCAAGCAGCG R:CCTCCTCCATAAAGGATTCAA	157	(AG)19	58	HM218958
8	F:ACCCTGGCATGTAGTTGTCT R:GACTGGATCTGATCTCCTG	140	(CT)10	63	HM218959
11	F:ATTCACTACAAACATCCTACGTG R:TGTGGTATGACTATTATCCTTGC	132	(AC)4AGAGCCAT(AC)4	58	HM218962
13	F:AACAAAAGCAAGGAGAACTAA R:TGGCTGAAGAAGTATCAATGTAT	117	(GT)10	62	HM218964
15	F:AAGGGAGACCAAGGACAAGGAG R:TCGTAGCAGGCCATTACATCA	139	(CT)7(CA)9CTCCT(TC)4	66	HM218966
17	F:TCCCCTGTTCTCTCTGTATGC R:AAACACTAACATCACATTCTCA	184	(CT)9(GT)7	60	HM218968
18	F:CCGGCACTGCACCAAAGGAATCG R:CCCCAACTCCATCCCTCTATCTG	120	(TC)11	63	HM218969
21	F:GCCCTGCCACTGCTCCATTCC R:ATTCTTGCCTCATTGATCCAA	168	(CA)2C(CA)7	66	HM218972
24	F:CAGCCAGCTTGCCTCAGTACG R:GCGGTTTGCAGGTTGGTTT	191	(TG)20	68	HM218975
25	F:GAGATGGCGGAGGAAAGAT R:TAGGGGCAAGAGCCAAGAAC	181	(GGT)4	67	HM218976
26	F:TATTCCTCATCACGGCATTACCA R:CCTTCCTCCACCACTCCAAGC	159	(GGT)5	55	HM218977
28	F:AGGAGCACTGTAACCTGAAAT R:GTTTATTGATGACTCCTCGG	203	(AG)11	63	HM218979
29	F:TGCCATGGTCAATTTGTGCG R:CGCAGATTACCAAGAAAACCC	187	(GGT)4	67	HM218980
31	F:CCGGTTCCAATTTCATTGAA R:GAATTCGATGATCCTGGAGCC	110	(ACC)5	62	HM218982
32	F:GAGTTGTAATTTCATTGTTGCTT R:AGAATAGGTTCCGGCAGACGG	191	(CT)12	63	HM218983
33	F:GTCAGCAACAAAAGCAAGGGAG R:GGGAACATTAAGGAGATTCTACC	151	(GT)10	67	HM218984
34	F:TAAAGCCGAAAGTCAACTACCA R:ACTAAGCCAAGCGATTATTGTG	246	(AC)2A(AC)7	65	HM218985
37	F:ATTCCCATTGTTGGTGTCC R:TGTTGATGCATTCCCTAGTG	83	(ACC)5	62	HM218988
38	F:TAGTTGAGAACCGCAGTAGTAAG R:GCACAAGCAAGGAACCGAAC	127	(GC)5(TC)5	63	HM218989

续表2

位点	引物序列	产物大小/bp	核心基序	退火温度/℃	GenBank 登录号
39	F:GAGCCAGCATCTCAAGCACAAT R:AGGGAGGAGGAGGAGGCCATA	91	( ACC)6	68	HM218990
41	F:CAATTCAACCAGAGCACCT R:GCGGAGAAACTCACTCAC	95	( TG)8	62	HM218992
42	F:CAATTCCAAGCTCCCTTCACCA R:GGTGCTGAGATGCTGTATGAC	152	( CA)7	65	HM218993
43	F:CTCTCATACAGTCATACACTGGC R:GACGGCAAGCCTCACCTTT	148	( GT)7	67	HM218994
46	F:TITACAAACGGCGAAGTGATT R:TGGCTCCTGGCTTGACATTA	194	( AC)10	66	HM218997
48	F:ATTCCAGACACGGCACCTAAC R:CGGTCCAATACAAAAGAACAG	196	( CA)9( CT)3CG( CA)5	66	HM218999
49	F:CACGCTAACTTAGGATGGGTAA R:ACAAAACAGACTGGACACCAAA	91	( TG)6TCT( TC)6	66	HM219000
50	F:CCTTTCTCCCTTCCCTACCC R:GACTGGATCTGGAGGAGGTTGA	145	( CT)12	63	HM219001
51	F:ATCAAGCGATTGGCATTGTAGTGT R:CATCCCAGATAGTGGCGTAGAGC	168	( TG)9	68	HM219002
53	F:TATTGTAAGAGGAGGGTTTC R:ATTGGGTCTGAATTGGTGA	152	( CA)10	58	HM219004



1~2,3~4,5~6,7~8,9~10 号分别为位点 8,11,13,15,17  
扩增毛竹的电泳结果

图4 毛竹 SSR 位点聚丙烯酰胺凝胶电泳图

### 3 结论与讨论

本研究应用磁珠富集法设计了 53 对 SSR 引物,其中,31 对引物扩增出了目的条带大小的片段,证明此种方法适合于毛竹的 SSR 位点的开发,开拓了磁珠富集法的应用领域。由于采用磁珠法进行的富集并不能完全去除不含 SSR 位点的片段,按以往方法只有通过测序来确定是否含有 SSR 位点;然而,即使含有 SSR 位点,所得序列中存在简单重复靠近一端接头,也无法设计引物,但这些信息只有在得到测

序结果后才能知道,增加了试验成本<sup>[16]</sup>。

本研究先是采用 M13 测序通用引物的 RV-M、M13-47 与重复序列组成的三引物对菌落进行克隆 PCR 检测,具有 2 条带以上认为是含有 SSR 插入的阳性菌;然而,检测结果却不好,阳性菌落偏低,并且阳性菌落的测序结果显示含 SSR 的序列比率较少,分析认为 RV-M、M13-47 的扩增影响了重复序列引物的使用,从而导致检测结果中阳性菌落较少。本试验采用 M13 测序引物 RV-M、M13-47 单引物分别与重复序列引物对菌落进行 PCR 扩增,条带单一且清晰,每个菌落进行 2 次 PCR,检测效果较好。测序结果显示,所测序列含有目的重复序列的比率达到 10.8%,能够满足去除大部分非特异性克隆的目的。

测序结果显示:所测序列大多含有目的 SSR 序列。双碱基富集文库 GT、AG,含有 4 次以上目的重复的序列占文库克隆的比率分别为 12.7% 和 11.8%,高于三碱基富集文库 CCA(6.5%)。分析认为,这与毛竹基因组中三碱基位点的数量低于双碱基位点的数量具有一定关系。

根据序列结果共设计了 53 对毛竹 SSR 引物,其中,31 对引物在毛竹中成功扩增。这些引物对于揭示毛竹的种群多样性和种群进化历史以及遗传连锁图谱的构建、QTL 定位及对其进行更深入地研究提

供了基础资料。

### 参考文献:

- [1] Lai Y, Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(12):2123~2131
- [2] Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review [J]. *Exp Appl Acarol*, 2000, 24(10~11):751~774
- [3] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(12):2453~2465
- [4] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(1):1~16
- [5] O'Reilly P T, McPherson A A, Kenchington E, et al. Isolation and characterization of tetranucleotide microsatellites from Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002, 4(4):418~422
- [6] Li X G, Tian J J, Tani N. Isolation and characterization of nuclear microsatellites from *Chamaecyparis obtusa* Endl [J]. *Yi Chuan Xue Bao*, 2004, 31(4):375~379
- [7] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 沈阳:辽宁科技出版社, 2002
- [8] 李璐滨, 武静宇, 胡陶, 等. 毛竹基因组大小测定[J]. *植物学通报*, 2008, 25(5):574~578
- [9] 师丽华, 杨光耀, 林新春, 等. 毛竹种下等级的 RAPD 研究[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2002, 26(3):65~68
- [10] 张守锋, 马秋香, 丁雨龙. 毛竹居群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *林业科技开发*, 2007, 21(2):26~28
- [11] 魏瑜. 36 种竹类植物的 RAPD 分析[D]. 福州:福建师范大学, 2005
- [12] 高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6):725~728
- [13] Albani D, Cote M J, Armstrong K C, et al. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple tube reaction [J]. *Plant J*, 1993, 4: 889~903
- [14] Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome [J]. *Genome*, 1995, 38:706~714
- [15] 苗元, 李璐滨, 唐征, 等. 亲和素磁珠分离毛竹 SSR 标记方法的优化 [J]. *河北农业大学*, 2008, 31(3):51~55
- [16] 李炬, 季孔庶, 龚佳. 磁珠富集法筛选马尾松微卫星标记 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(1):141~144

## 《中国种业》征订启事

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。该刊系全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊。

**刊物目标定位:**以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

**读者对象:**各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开本,每期 8.00 元,全年 96.00 元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

邮发代号:82-132

地 址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院

电 话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

传 真:010-82105796 网址:[www.chinaseedqks.cn](http://www.chinaseedqks.cn)

E-mail: [chinaseedqks@sina.com](mailto:chinaseedqks@sina.com) [chinaseedqks@163.com](mailto:chinaseedqks@163.com)