

利用磁珠富集法开发花榈木微卫星引物*

胡磊^{1,2} 高丽¹ 杨波^{1**}

1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 将花榈木(*Ormosia henryi* Prain)基因组 DNA 用 *Mse* I 酶切后, 连接相应的接头, PCR 扩增后回收 500~1 000 bp 片段, 与用生物素标记的微卫星探针 (GA)₁₂, (AAG)₈ 杂交后, 运用磁珠富集含有微卫星序列的 DNA 片段。获得的序列经 PCR 扩增, 连接载体 pMD19-T, 构建富含微卫星序列的小片段插入文库; 用 PCR 法筛选文库, 获得 78 个阳性克隆, 经测序分析得到 24 个微卫星序列, 成功设计出 9 对引物。

关键词 花榈木; 微卫星标记; 磁珠富集; 多态性

中图分类号 Q 346⁺.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0629-05

微卫星标记又称为简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR), 是广泛分布于真核生物基因组中, 由 1~6 个碱基串联、重复组成的 DNA 序列, 序列因重复单元与重复次数的不同而表现出高度的多态性^[1]。由于微卫星序列的两端多是保守的单拷贝序列, 因此, 可以根据两端序列设计特异性引物, 经 PCR 扩增出微卫星序列, 其长度多态性可以作为 DNA 分子标记。微卫星分子标记具有需要 DNA 样品量少、广泛分布在真核基因组中、多态性高、重复性好、共显性遗传等优点, 已被广泛应用于遗传多样性研究、分子辅助育种、遗传图谱的构建、基因定位、品种指纹图谱构建等领域; 缺点是使用微卫星标记之前必须要知道两端的保守序列, 设计出引物。目前, 开发微卫星分子标记引物的方法主要有: 从已知的表达序列标签 (EST) 序列中查找, 构建富含微卫星位点的基因组文库, 从近缘物种已开发出的 SSR 引物中寻找合适的引物^[2]; 其中, 以构建富含微卫星的基因组文库, 用磁珠富集特异性片段的方法效率最高。

花榈木 (*Ormosia henryi* Prain), 为豆科红豆树属常绿乔木, 属国家二级重点保护树种, 主要分布于我国亚热带地区, 生长在 100~1 300 m 的山地、溪边, 是制作高档家具的用料, 也是优良的园林绿化观赏树木, 还是一种重要的中药材^[3]。目前, 对花榈木

还没有进行分子水平上的研究, 本试验首次开发花榈木 SSR 引物, 旨在为后续花榈木的遗传多样性的研究及种质资源的保护等打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

DNA 提取材料为花榈木试管苗, 来源于中国科学院武汉植物园组织培养室。用于引物多态性分析的材料为分别采自湖北省咸宁市和恩施地区的 8 个不同表型的花榈木叶片。

1.2 试验方法

1) 花榈木基因组 DNA 的提取。采用改良的 CTAB 法^[4]提取花榈木基因组 DNA, Brim-IOA-0004 型紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 处的吸光值, D_{260} 和 D_{280} ; 根据 D_{260}/D_{280} 的比值计算 DNA 的质量浓度, 并将其调整为 0.050 g/L 备用。

2) 基因组 DNA 的酶切与接头连接。用 *Mse* I (10^5 U/L) 在 37 °C 下酶切 3 h, 65 °C 下, 20 min 灭活内切酶; 反应体系 25 μ L, 包括 2.5 μ L 的 10 \times NE Buffer 2, 0.25 μ L 的 100 \times BSA, 0.5 μ L 的 *Mse* I 内切酶, 10 μ L 的 DNA, 11.75 μ L 的灭菌双蒸水。酶切后的基因组 DNA 与相应的接头连接, *Mse* I 的接头分别由 14 bp 的寡核苷酸链 5'-TACTCAG-

收稿日期: 2010-03-17; 修回日期: 2010-06-10

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCXZ-YW-N-032) 资助

** 通讯作者. E-mail: yangbo@wbcas.cn

胡磊, 男, 1984 年生, 硕士研究生. 研究方向: 植物生物技术. E-mail: hulei@wbcas.cn

GACTCAT-3' 和 16 bp 的寡核苷酸序列 5'-GACGATGACCTGAG-3' 组成; 反应体系 30 μL , 包括 T4 DNA Ligase (4×10^4 U/L) 0.1 μL , 1 μL 的上下接头, 3 μL 的 $10 \times$ T4 Buffer, 酶切后的 DNA 15 μL , 灭菌双蒸水 10.9 μL , 16 $^\circ\text{C}$ 过夜连接; 连接后的混合物在 65 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min, 灭活连接酶。

3) 连接产物的扩增。过夜连接后的混合物以由 17 bp 组成的 *Mse* I - N 兼并引物进行 PCR 扩增, PCR 程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 53 $^\circ\text{C}$ 60 s, 72 $^\circ\text{C}$ 60 s, 30 个循环; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。 *Mse* I - N 碱基序列为 5'-GATGAGTCCTGAG-TAAN-3'。

4) 生物素探针杂交与磁珠富集。以 (AAG)₈, (GA)₁₂ 为生物素探针, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min, (AAG)₈ 探针杂交温度为 48 $^\circ\text{C}$, (GA)₁₂ 探针杂交温度 55 $^\circ\text{C}$ 。 250 μL 杂交体系包括 20 μL 的 DNA, 52.5 μL 的 $20 \times$ SSC (3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L C₆H₅Na₃O₇), 1.75 μL 的 10% SDS, 4.5 μL 的 50 pmol/L 的生物素探针及 171.25 μL 的双蒸水。磁珠富集采用 Promega 的 MagneSphere 磁珠, 将与生物素探针杂交好的 DNA 与处理好的磁珠悬浮液混合, 室温放置 30 min 并混匀; 在磁场中吸附磁珠, 吸取上清; 低严谨洗脱时采用 500 μL 的 TEN1000 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 7.5) 在室温下冲洗磁珠, 重复 2 次, 每次 8 min。高严谨洗脱时采用高严谨洗脱液 (10 μL 的 $20 \times$ SSC + 10 μL 10% SDS + 980 μL 的双蒸水), 每次 500 μL , 在 42 $^\circ\text{C}$ (AAG 探针)/50 $^\circ\text{C}$ (GA 探针) 下冲洗磁珠 2 次, 每次 8 min, 然后室温下冲洗磁珠 4 次, 每次 8 min。磁场中吸附, 吸取上清液后, 加入 50 μL TE, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 使目的片段从杂交复合物上解离下来, 磁珠吸附收集上清液。

5) 富集 DNA 片段的克隆与测序。取富集回收产物 5 μL , 以 *Mse* I - N 简并引物 PCR 扩增, 1.5% 凝胶电泳检测, 发现高严谨洗脱液中条带越来越淡, 表明非特异性吸附产物已基本洗脱下来。切胶回收 500~1 000 bp 的条带, 连接到载体 pMD19-T 上, 然后转化到大肠杆菌 (DH 5 α) 感受态细胞中, 涂布于含有 100 mg/L 的氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养, 挑取阳性克隆, 在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 摇床上 37 $^\circ\text{C}$, 225 r/min 培

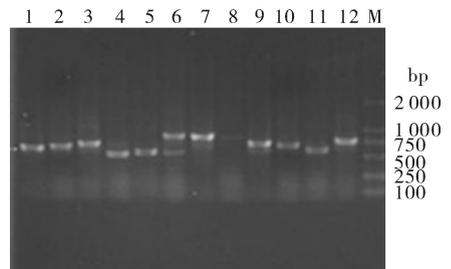
养过夜。用 M13 引物进行 PCR 扩增检测, 选取 500 bp 左右的片段送至上海英骏生物技术有限公司测序。

6) 引物设计及多态性分析。测序所得结果用 Vectorscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 和 SSR Hunter 1.3 软件分析, 找出含有重复单元的序列, 用 Primer Premier 5 软件设计引物, 以 8 个不同表型的花榈木基因组 DNA 为材料检测引物多态性。PCR 扩增体系为 10 μL , 包括 4.5 μL 的灭菌双蒸水, 1 μL 的 $10 \times$ *Taq* buffer, 0.6 μL 的 Mg²⁺ (25 mmol/L), 0.2 μL 的 dNTPs (10 mmol/L), 0.1 μL 的 *Taq* 酶 (5 U/ μL), 前后引物各 0.3、3 μL 的 DNA。PCR 反应程序为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 各引物的退火温度 (见表 2) 60 s, 72 $^\circ\text{C}$ 90 s, 35 个循环, 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物在 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后, 放置在冰上, 取 3 μL 在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电泳缓冲液 $1 \times$ TBE, 在 Sequi-Gen GT system (BIORAD, USA) 电泳仪上, 75 W 电压下, 电泳约 1 h, 银染后检测多态性。根据 Nei^[5] 和 Bostein 等^[6] 公式计算有效等位基因数 (N_e), 群体遗传杂合度 (H) 和多态信息含量 (PIC)。

2 结果与分析

2.1 阳性克隆检测

以菌液为模板, PCR 扩增, 筛选重组克隆。选取片段长度在 500 bp 左右的 78 个阳性克隆测序, 经 Vectorscreen, SSR Hunter 软件分析测序结果, 其中 23 个含有微卫星序列, 成功设计出 9 对表现出多态性的引物, 已在 GeneBank 中登记 (GeneBank Accession Number 为 GU270298-GU270321)。



M. Maker; 1~12: 阳性克隆 Positive clones.

图 1 PCR 筛选花榈木基因组阳性克隆电泳检测结果
Fig. 1 Screening of positive clones from *Ormosia henryi* Prain genome by PCR amplification

2.2 花榈木微卫星特征分析

根据 Weber^[7] 提出的微卫星分类标准, 将所获得的微卫星序列分为完美型(重复序列中没有间隔或是其他类型的重复序列), 非完美型(重复序列中存在其他碱基)和复合型(由不同碱基核心序列串联重复组成); 从表 1 中可以看出完美型的微卫星有 21 个, 非完美型的有 2 个, 复合型的有 1 个, 其中可以发现 GA、CT 居多, 也有 TCC、TCT、GAA 等重复单位。

表 1 花榈木 DNA 富集文库中的微卫星序列特征¹⁾

Table 1 Characters of microsatellite sequences from an enriched DNA library in *Ormosia henryi* Prain

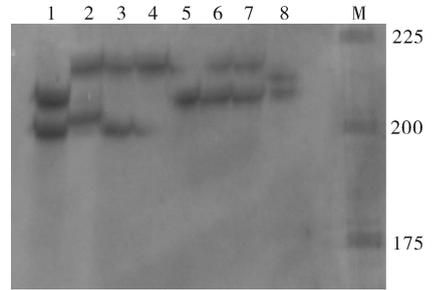
位点 Locus	重复序列 Repeat region	重复类型 Repeat type
A01	(GA) ₁₇	P
A02	(AG) ₁₄	P
A05	(GT) ₆ (GA) ₁₃	C
A06	(GA) ₁₁	P
A07	(TC) ₁₀	P
A08	(AG) ₁₃	P
B01	(TC) ₆ T ₂ (TC) ₅	I
B02-1	(CT) ₁₅	P
B02-2	(TG) ₉	P
D01	(GAA) ₅	P
E06	(AG) ₁₂	P
E07	(TCT) ₆	P
E08	(AG) ₁₁	P
E09	(GA) ₁₄	P
E10	(GA) ₁₅	P
E11	(GA) ₁₄	P
E12	(TCC) ₅	P
F05	(TCT) ₈	P
F07	(CT) ₈ C ₂ (CT) ₇	I
F10	(GA) ₁₁	P
F11	(AG) ₂₀	P
G06	(TC) ₁₁	P
G07	(CT) ₁₃	P
G10	(GAA) ₈	P

1) P. 完美型 Perfect; I. 非完美型 Imperfect; C. 复合型 Compound.

2.3 花榈木微卫星引物的初步筛选及多态性分析

以采自湖北省咸宁市和恩施地区的 8 个不同表型的花榈木基因组 DNA 为材料, 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选微卫星引物。在 24 对引物中, 有 9 对表现出多态性, 可用于后续研究。图 2 为花榈木微卫星引物 E10 的扩增结果, 该引物在 6 个花榈木基因型中扩增出 2 条谱带, 另 2 个中检测出 1 条

谱带, 但各条谱带分子量大小不一样, 说明 E10 为高多态性引物。各微卫星引物序列及多态性分析结果见表 2。



M. Maker; 1~4. 采集自咸宁的花榈木 *Ormosia henryi* Prain collected from Xianning in Hubei Province; 5~8. 采集自恩施的花榈木 *Ormosia henryi* Prain collected from Enshi in Hubei Province.

图 2 花榈木微卫星引物 E10 初步筛选扩增结果

Fig. 2 The screening results of E10 microsatellite marker of *Ormosia henryi* Prain

3 讨论

试验采用磁珠富集法开发花榈木微卫星分子标记, 安全、快速、高效, 避免了传统的 SSR 开发策略中用到的同位素标记。从 78 个阳性克隆中筛选得到 24 个富含微卫星的序列, 效率达到 30.7%, 远高于传统方法的 2%~3% 的微卫星获得率^[2]。

从表 1 中可以看出, 所获得的微卫星序列中以完美型为主, 有 21 个, 占到整个微卫星序列的 87.5%, 非完美型与混合型较少。重复碱基数以双核苷酸居多, 其中以 (GA)_n / (CT)_n 最多, 与报道的豆科模式植物蒺藜苜蓿的 EST—SSRs 中的重复碱基的类型有一致性^[8]。

Weber^[7] 认为只有核心序列的重复次数高时, 才能表现出较高的多态性信息含量—PIC (polymorphic information content) 值, 前人的研究^[9-10] 表明重复次数低于 5 的微卫星序列, 几乎检测不出多态性, 重复次数多的微卫星序列既能在种间又能在种内产生多态性, 但重复次数少的微卫星序列仅能在种内产生多态性。本次试验所得微卫星的核心序列重复次数在 10 以上的有 18 个, 占所得微卫星序列的 75%, 有利于后期筛选多态性信息含量高的分子标记, 进行花榈木的遗传多样性分析和遗传图谱的构建。

在运用磁珠富集法分离微卫星序列时, 影响微卫星序列富集的主要因素是富集回收阶段洗脱的效率。洗脱的目的是为了洗去非特异性结合的序列。

Refseth 等^[11]发现这些非特异性结合的片段在经过非严谨洗脱与严谨洗脱后依然难以完全洗脱。周国庆等^[12]认为磁珠富集法最大的障碍是 DNA 与磁珠表面的非特异性结合。在使用磁珠富集产物回收阶段,洗涤的温度是影响磁珠富集效率的重要因素。试验发现在洗涤液浓度不变的情况下,洗涤的温度

与洗脱的效率成正比,但当洗脱的温度过高时,洗脱效率反而下降,与之前的报道^[13-14]略有不同。试验中,以(GA)₁₂, (AAG)₈为探针,当杂交温度分别为 48、55 °C,洗脱温度分别为 42、50 °C 时,富集效果比较理想。洗脱温度超过这个温度时,富集效率反而下降。

表 2 花桐木微卫星位点分析及其引物序列¹⁾

Table 2 Characteristics and primer sequences of nine microsatellite loci in *Ormosia henryi* Prain

位点 Locus	重复序列 Repeat region	引物序列 Primer sequences(5'~3')	<i>t</i> /°C	片段大小/bp Size range	<i>N_A</i>	<i>N_e</i>	<i>H</i>	<i>PIC</i>	登录号 Accession No.
A01	(GA) ₁₇	TGTGGGATGAAGAAGAAGC CCCCATTTTGTCTTGGTTAC	56	161~210	4	2.40	0.583 3	0.529 5	GU270298
A05	(GT) ₆ (GA) ₁₃	AATGGGAGTTTCATAGACGC ATTTTGGGGACAGCATACGG	56	223~268	3	2.90	0.656 2	0.581 5	GU270300
B02-1	(CT) ₁₅	GAGTCTGAGTAACCATCCA CTTCTTTATGTGGTGTCC	52	133~163	4	3.77	0.735 0	0.685 4	GU270305
E06	(AG) ₁₂	GTCATTGCTGTTGAAGATTG TTGGATAGAACTCACCTTAG	52	184~217	3	2.31	0.567 9	0.489 0	GU270308
E08	(AG) ₁₁	GTAGAGCAACCCACCGAT ACCCGACAAAGTCCACA	55	215~225	2	1.69	0.408 1	0.324 9	GU270310
E09	(GA) ₁₄	TCCCAATCAAACCCCTAA ATCCTTGTGAAATCATAGACGA	54	137~165	3	2.78	0.640 0	0.563 2	GU270311
E10	(GA) ₁₅	CCTGAGTAAACGGCAAAA CATGAGTATCGCCTTGAA	52	200~220	5	3.50	0.714 3	0.665 7	GU270312
F05	(TCT) ₈	TCGCTCCCTTTCTTGTCT CATTTCCCCATTCACGGT	54	205~250	3	2.12	0.528 9	0.473 2	GU270315
F11	(AG) ₂₀	AACATGAAGATGATGGAAAGR CCTGAGTAATTAGTAGCACC	54	153~195	3	1.95	0.486 1	0.423 5	GU270318

1)*t*:退火温度 Annealing temperature; *N_A*:等位基因数 Number of alleles revealed; *H*:位点杂合度 Heterozygosity; *N_e*:有效等位基因数 Effective number of alleles; *PIC*:多态信息含量 Polymorphic information content.

花桐木为国家二级重点保护野生植物、优良的园林绿化树种、制作高档家具的用料和重要的中药材,但关于花桐木遗传多样性的研究还未见报道,而微卫星分子标记是构建遗传图谱,分析遗传多样性的理想工具,试验开发的 9 对 SSR 引物,在 8 个不同表型的花桐木基因组 DNA 中表现出多态性,可以应用于后续研究。

参 考 文 献

- [1] TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [2] 张增翠,侯喜林. SSR 分子标记开发策略及评价[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 763-768.
- [3] 姚军,杨波. 优良园林绿化树种——花桐木[J]. *中国城市林业*, 2007, 5(1): 65-65.
- [4] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for

- small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11-15.
- [5] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
- [6] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [7] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [8] EUJAYI I, SLEDGE M K, WANG L, et al. Medicago truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(3): 414-422.
- [9] VALDES A M M, SLATKIN M, FREIMER N B. Allele frequencies at microsatellite loci - the stepwise mutation model revisited[J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 737-749.
- [10] SMULDERS M J M, BREDEMEIJER G, RUSKORTEKAAS W, et al. Use of short microsatellites from database sequences

- to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(2): 264-272.
- [11] REFSETH U H, FANGAN B M, JAKOBSEN K S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA[J]. Electrophoresis, 1997, 18(9): 1519-1523.
- [12] 高国庆, HE G H, 李杨瑞. 用磁珠富集法从 AFLP 片段中分离微卫星 DNA 标记[J]. 花生学报, 2003, 32(Z1): 272-276.
- [13] 阮小凤, GABI K, 杨勇. 磁珠富集法分离柿微卫星标记[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(5): 97-102.
- [14] CORDEIOR G M, MAGUIRE T L, EDWARDS K J, et al. Optimisation of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(3): 225-229.

Development of Microsatellite Primers in *Ormosia henryi* Prain by Magnetic Beads Enrichment

HU Lei^{1,2} GAO Li¹ YANG Bo¹

1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The genomic DNA of *Ormosia henryi* Prain was digested by *Mse* I and ligated with adapters. After PCR amplification, the fragments ranging from 500 to 1 000 bp were isolated, purified and hybridized with biotin-labeled probes (GA)₁₂ and (AAG)₈. Fragments containing simple sequence repeats (SSR) were enriched using magnetic beads coated with streptavidin, then cloned into pMD19-T vectors and transformed into *E. coli* to construct SSR genomic DNA library. 78 positive clones were screened with PCR method. After sequenced, 24 microsatellite sequences were identified and 9 pairs of SSR primers of *Ormosia henryi* Prain were developed successfully.

Key words *Ormosia henryi* Prain; microsatellite markers; magnetic beads enrichment; polymorphic

(责任编辑: 陆文昌)