

文章编号: 1005-0906(2006)02-0027-03

玉米 SSR 指纹技术反应体系的优化

孔祥彬, 张春庆

(山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018)

摘要: SSR 指纹技术是一种非常有效的遗传分析技术, 在生物遗传多样性分析、遗传图谱构建、品种鉴定和品种保护等方面有着广泛的用途。SSR 技术简单、重复性高、采用银染显色技术等优点, 为 SSR 的广泛应用奠定了良好的基础和可行性。在 SSR 扩增过程中, 影响因素很多, 如 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq polymerase、引物等。本实验通过对各种影响因素不同浓度梯度的比较, 得出优化后的 SSR 扩增的反应体系为: 20 μ L 的反应体积中包括 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.1 mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 引物, 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μ L 和 40 ng 模板 DNA。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。

关键词: 玉米; SSR; 指纹图谱; 分子标记

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Optimization on SSR Fingerprinting Technique of Maize (*Zea Mays* L.)

KONG Xiang-bin, ZHANG Chun-qing

(College of Agronomy, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: SSR is an efficient technique for genetic analysis, and very useful to diversity analysis, genetic mapping and variety fingerprinting. This paper studied some factors which affect amplified product, such as Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA polymerase, primer and so on. Optimum condition as follows: 20 μ L PCR reaction consisted of 1 $\times$ PCR buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.10 mM dNTPs, 0.5 unit of Taq polymerase, 0.25 μ M of each primer, and 40 ng of DNA. The amplification conditions were 94 $^{\circ}$ C for 5 min; 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 60 $^{\circ}$ C for 2 min, and 72 $^{\circ}$ C for 2 min; and a terminal extension step at 72 $^{\circ}$ C for 5 min.

Key words: Maize; SSR; Fingerprinting; Molecule mark

近年来植物分子生物学的迅猛发展使人们对作物的分析进入了分子水平。目前分子标记技术正逐渐成为分析生物遗传多样性和构建品种指纹图谱的有力工具, 现在被大量应用的主要有 RFLP、AFLP、SRAP 和 SSR 等。其中 SSR 标记是一种共显性标记, 重复性好, 可靠性高, 分析简便, 而且检测遗传变异的能力较高。在玉米的遗传多样性分析、杂交优势群划分、品种指纹图谱构建、种子纯度检测、QTL 定位等方面都有大量应用。王风格等针对变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 优化了反应程序和电泳检测技术, 得到了可用于纯度检测的 SSR 技术体系。本试验主要针对非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 探讨影响 SSR 扩增的因素, 从而优化 SSR 的反应体系, 以利于 SSR 技

术能得到广泛应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验采用了黄早四、黄野四、Mo17 这 3 个玉米自交系为材料, 按照酚-氯仿法提取种子 DNA。材料由中国农业科学院作物科学研究所张世煌研究员和王天宇研究员提供。

1.2 SSR 扩增反应体系

SSR 引物 nc009 购自上海生物工程公司, 反应在 PTC-100 PCR 仪 (MJ Research, Watertown, MA) 上进行, 反应体系和扩增程序设置包括:

(1) Mg^{2+} 设 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 6 个浓度梯度。

(2) dNTP 设 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L 6 个浓度梯度。

(3) Taq 酶用量设 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U 6 个浓度梯度。

收稿日期: 2005-08-09

作者简介: 孔祥彬(1980-), 男, 山东曲阜人, 硕士, 主要从事品种 DNA 指纹研究。Tel: 0538-8242458

E-mail: kongbin1980@126.com

张春庆为本文通讯作者。

- (4)SSR 引物浓度设 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 6 个浓度梯度。
- (5)模板 DNA 设 5、10、20、40、60、80 ng 6 个浓度梯度。
- (6)反应体积设 5、10、15、20、25、30 μL 6 种体积。
- (7)扩增程序:预变性 94℃ 5 min,1 个循环;变性 94℃ 1 min,退火 60℃ 2 min,延伸 72℃ 2 min,35 个循环;最后延伸 72℃ 5 min。

(8)扩增产物的检测:采用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,凝胶经银染后采用凝胶成像系统拍照记录。

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 离子

SSR 扩增反应对 Mg^{2+} 浓度很敏感,从图 1 的实验结果可以看出,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0、1.5 mmol/L 时,出现大量非特异性扩增产物; Mg^{2+} 浓度高于 3.0 mmol/L 时出现背景模糊,没有扩增产物出现,难以观察;只有 Mg^{2+} 浓度在 2.0、2.5 mmol/L 时,扩增的条带清晰,又无杂带出现。合适的 Mg^{2+} 浓度是扩增的关键步骤, Mg^{2+} 浓度过低或过高都影响到 Taq 酶的活性,使扩增产物减少或者非特异性增加。

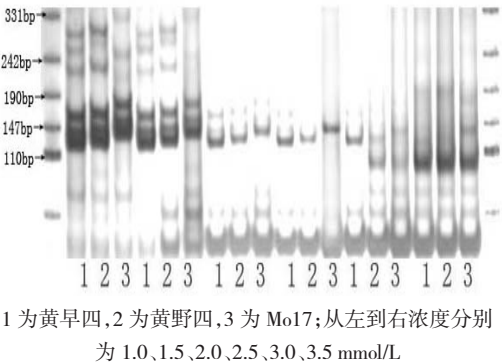


图 1 Mg^{2+} 不同浓度梯度 SSR 扩增结果

2.2 dNTPs

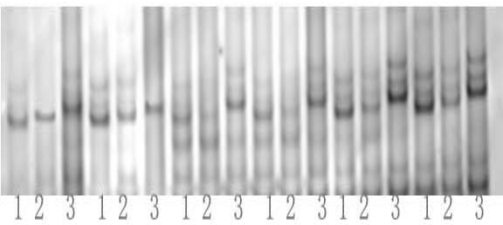


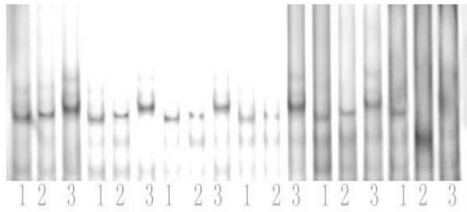
图 2 dNTP 不同浓度梯度 SSR 扩增结果

图 2 显示,dNTPs 浓度在 0.05 ~ 0.15 mmol/L 范围内,可以扩增出清晰的条带,差异不显著;在浓度

为 0.20 ~ 0.30 mmol/L 时,扩增产物增加,但是出现少许非特异性扩增,可能是当 dNTPs 浓度较高时也给非特异性扩增增加了材料。

2.3 Taq 酶

本试验在 20 μL 的反应体积内设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U 6 个 Taq 聚合酶浓度梯度,在浓度为 0.5 ~ 2.5 U 时,扩增出的条带清晰可见,无明显变化(图 3)。当用量在 3.0 U 时没有扩增产物,或者扩增背景加重,具体原因不太清楚。



1 为黄早四,2 为黄野四,3 为 Mo17;从左到右 Taq 酶用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U

图 3 Taq 酶不同用量 SSR 扩增结果

2.4 引物

由图 4 可知,随着引物浓度的增加,扩增产物增加。当引物浓度在 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时,所得的扩增产物清晰度较高,且非特异扩增片段不明显;当引物浓度大于 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,所得的产物增加明显,但是非特异性扩增量增加,引物二聚体形成。引物浓度过高时,会导致形成二聚体和非特异性扩增产物,从而与靶序列竞争 DNA 聚合酶和底物 dNTP,进而会出现其他条带增多的现象。



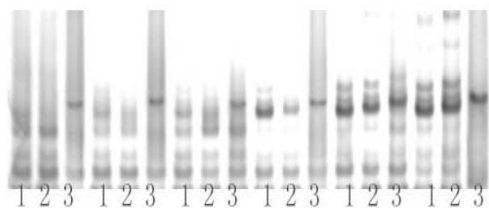
1 为黄早四,2 为黄野四,3 为 Mo17;从左到右浓度分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$

图 4 引物不同浓度梯度 SSR 扩增结果

2.5 模板 DNA

不同浓度模板 DNA 所扩增出的条带有一定的差异,当 DNA 量为 5、10 ng 时,所得的谱带不清楚,量较少;当 DNA 量在 40 ng 时,所得的谱带清晰度最高,且没有杂带;当 DNA 在 60、80 ng 时,所得的扩增产物较多,但是背景较重(图 5)。由于 DNA 量少时,扩增效率低,产物少;当 DNA 量过多时,过早消

耗尽引物,使退火发生在 PCR 产物 3'-OH 端和模板 DNA 间或 PCR 产物之间,从而进行随机延伸或终止,出现背景弥散或加重。

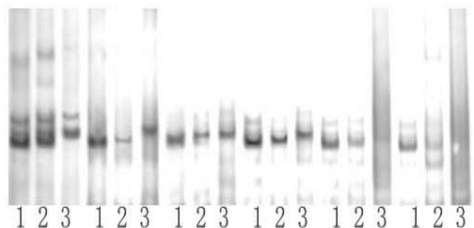


1 为黄早四,2 为黄野四,3 为 Mo17;从左到右 DNA 用量分别为 5、10、20、40、60、80 ng

图 5 DNA 不同用量 SSR 扩增结果

2.6 反应体积

根据以上的浓度梯度试验,选择最佳的反应浓度,然后分别在 5、10、15、20、25、30 μL 反应体积中扩增。结果如图 6 所示,体积对扩增结果影响不大,但是体积过大所得的产物浓度较小,应该加大点样量,才能得到清晰的谱带。本试验上样在 10 μL 左右,发现 25、30 μL 体积得到的谱带浅,模糊不易观察;15、20 μL 体积得到的谱带清晰,易于观察。考虑到可以重复上样的话,20 μL 体积是最好的选择。



1 为黄早四,2 为黄野四,3 为 Mo17;从左到右体积分别为 5、10、15、20、25、30 μL

图 6 不同反应体积 SSR 扩增结果

2.7 SSR 反应体系的建立

根据以上试验结果和其他学者的研究成果,本试验认为 SSR 扩增的反应体系为:20 μL 的反应体积中包括 2.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.1 mmol/L dNTPs、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 引物、0.5 U TaqDNA 聚合酶、10 $\times$ PCR buffer 2.0 μL 和 40 ng 模板 DNA。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

3 讨 论

SSR 指纹图谱的构建从 DNA 提取到凝胶染色,每一个步骤都是相当重要的。DNA 的质量是实验得以进行的前提,优化的反应体系是图谱质量好坏的关键,电泳和染色是实验得以成功的直接制约条件。有一个好的反应体系才能够应用到指纹图谱的构建,从而得以交流和重复。本研究是以 10%非变性聚丙烯酰胺电泳分离扩增产物,经过银染方法显带观察。如果反应体系不经过优化,谱带的质量会受到影响,产生非特异性带或者伪带以及引物二聚体的出现。但是后期电泳检测技术和染色显带技术也不容忽视,下一步我们针对该方面开展研究,以期得到好的结果,应用到理论和实践研究中。

参考文献:

- [1] Smith J S C, Chin E O L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize(*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and Pedigree [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 163-173.
- [2] George M L C, Regalado E, Li W, et al. Molecular characterization of Asian maize inbred lines by multiple laboratories[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 109: 80-91.
- [3] George M L, Regalado E, Warburton M, et al. Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew[J]. *Euphytica*, 2004, 135: 145-155.
- [4] Clerc V L, Bazante F, Baril C, et al. Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2005, 110: 294-302.
- [5] 郭瑞星,刘小红,荣廷昭,等.植物 SSR 标记的发展及其在遗传育种中的应用[J]. *玉米科学*, 2005, 13(2): 8-11.
- [6] 李凌雨,闫彩清,邢亚静,等. SSR 标记在玉米遗传多态性及杂种优势群划分中的应用[J]. *玉米科学*, 2005, 13(2): 12-15.
- [7] 袁力行,傅骏骅,Warburton M,等.利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. *遗传学报*, 2000, 27(8): 725-733.
- [8] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度鉴定中的应用[J]. *作物学报*, 2003, 29(1): 63-68.
- [9] 吴渝生,杨文鹏,郑用琰. 3 个玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建[J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 496-500.
- [10] 杨俊品,荣廷昭,向道权,等. 玉米数量性状基因定位[J]. *作物学报*, 2005, 31(2): 188-196.
- [11] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 I. 玉米品种纯度及真伪鉴定中 SSR 技术标准实验体系的建立[J]. *玉米科学*, 2003, 11(1): 3-6.
- [12] 张春庆,贾继增. 利用 AFLP 鉴定玉米自交系及杂交种[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2003, 34(3): 427-430.
- [13] 李汝玉,李群,谭振馨,等. 利用 SSR 标记技术检测玉米杂交种纯度[J]. *玉米科学*, 2005, 13(1): 15-18.