

文章编号: 1005-0906(2007)06-0010-06

TP-M13-SSR 技术及其在玉米遗传多样性研究中的应用

刘志斋^{1,2}, 王天宇¹, 黎 裕¹

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; 2. 西南大学农学与生物技术学院, 重庆 400716)

摘 要: 遗传多样性分析是种质资源研究的重要组成部分。由于研究群体通常都较大, 简便可靠的高通量分析技术显得尤为重要。本文概述了在 SSR 扩增产物检测过程中的一种基于荧光测序技术的高通量低成本分析技术体系 TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13) 的发展历程、反应原理和应用, 并比较了它与普通银染、琼脂糖检测以及常规荧光检测体系在 SSR 扩增产物检测上的优劣, 讨论了该技术在植物遗传多样性研究中的应用潜力。

关键词: TP-M13-SSR; 高通量; 遗传多样性**中图分类号:** S513**文献标识码:** A

TP-M13-SSR Technique and Its Applications in the Analysis of Genetic Diversity in Maize

LIU Zhi-zhai^{1,2}, WANG Tian-yu¹, LI Yu¹

(1. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

2. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Genetic diversity analysis is one of important components in studies on germplasm resources. However, due to the huge size of samples tested in most studies, simple, reliable and high-throughput techniques are required. This paper briefly summarized an economical method of simple sequence repeat (SSR) detection in which fluorescent labeling of SSR-PCR products was used, with tailed primer M13 (TP-M13-SSR), including its development, reaction principles, and some key points. Its advantages and disadvantages were also compared with those of other detection methods, agarose electrophoresis and ordinary fluorescent labeling methods. In addition, the potential of application of the TP-M13-SSR technique in analysis of genetic diversity in maize was assessed.

Key words: TP-M13-SSR; High-throughput; Genetic diversity

遗传多样性分析是了解种质资源遗传基础的重要途径, 同时还可以为种质资源在育种研究和实践的应用提供参考和指导。分子标记的开发及其技术

体系的成熟与完善, 为在 DNA 水平上分析与了解种质资源的多样性提供了一条有效途径。在分析通量和检测的环节上常规的标记技术体系仍然存在一定的局限性, 如分析群体相对较少(分析通量较低)、扩增产物检测流程繁琐、数据记录的工作量过大等。TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13, TP-M13-SSR) 检测技术的完善为这一问题的解决提供了一种新的方法。

1 TP-M13-SSR 检测技术的发展过程

1.1 普通荧光测序技术与 SSR 标记体系的结合

自 Litt 和 Luty 首次将 SSR 技术 (simple sequence repeat, 又称 microsatellite) 用于进行人类遗传学研究

收稿日期: 2007-08-12; **修回日期:** 2007-10-20**基金项目:** 科技部科技支撑计划(2006BAD13B03)、北京市自然科学基金重点项目(6071003)、北京市农业育种基础研究创新平台项目(YZPT02-06)**作者简介:** 刘志斋(1978-), 男, 湖北孝感人, 在读博士, 研究方向: 基于基因组学的作物种质资源研究。Tel: 010-62186652

E-mail: liuzz003@126.com

黎 裕为本文通讯作者。Tel: 010-62131196

E-mail: yuli@mail.caas.net.cn

以来,SSR 技术因多态性高、分布广、重复性好、共显性以及成本较低等优点而被广泛应用。

一般 SSR 标记的检测应用 PAGE 电泳和银染检测法。随着 DNA 测序体系的不断成熟,研究者又开发出了基于荧光测序技术的 SSR 体系。常规荧光 SSR 检测技术是将 SSR 引物中一条的 5' 端以荧光基团标记,所采用的荧光基团多为 6-carboxy-X-rhodamine(ROX, 红色)、hexachloro-6-carboxy-fluorescein(HEX, 黄色)、tetrachloro-6-carboxy-fluorescein(TET, 绿色)或者 6-carboxy-fluorescein(FAM, 蓝色)。

1.2 常规荧光 SSR 检测技术的优缺点

荧光测序技术在 SSR-PCR 扩增产物检测上的应用,不仅实现了扩增产物电泳的自动化,同时借助相应的识别和分析软件(如 ABI 系统开发的 GeneScan 和 Genotyper),实现了电泳数据记录的自动化。此外,荧光 SSR 技术的另一个显著优点就是分辨率高,可以识别 2 个核苷酸差异的扩增产物。荧光 SSR 技术的开发,为大规模样本的分子标记分析提供了一种快速而高效的研究途径,在遗传多样性研究中得到一定的应用。

常规荧光 SSR 检测技术的一个重要限制因素即是其成本过高。一条 50 nmol 的引物序列,标记荧

光基团的成本为 1 000 元(标记的荧光基团类型不同,价格有所差异),而在一般的研究中,如果要检测 50 个左右的 SSR 位点,仅合成荧光引物的花费就达到 50 000 元。此外,一旦实验需要增加另外的 SSR 位点时,又必须得重新合成新增位点的荧光引物,该技术也仅仅在少量材料和较少位点的研究中应用较多。

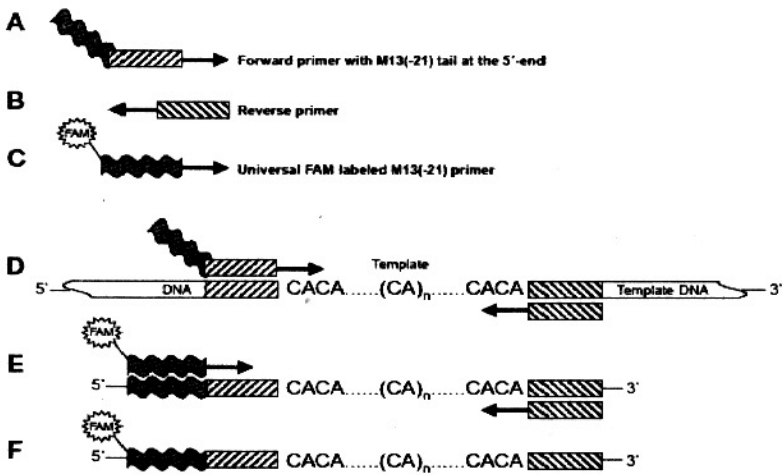
1.3 TP-M13-SSR 检测技术的产生

Oetting 等(1995)首次将一段 19 bp 的核苷酸序列(称为 Tailed primer,即尾巴引物)引入到短串联重复(short tandem repeat,STR)标记体系中,并与荧光分析技术和多重 PCR (Multiplex PCR) 技术相结合。Schuelke 又用 M13 序列作为尾巴引物和通用引物对该技术体系进行了完善,最终实现了 SSR 技术与荧光自动测序技术的完美整合,形成了一套低成本的基于荧光测序技术的 SSR 扩增产物检测体系,即 TP-M13-SSR 技术。

2 TP-M13-SSR 检测技术

2.1 TP-M13-SSR 检测技术体系的反应原理

与常规的 PCR 体系不同,在采用 TP-M13-SSR 体系进行 PCR 扩增时,反应体系中包括 3 条引物序列,其反应原理见图 1。



注:A 表示带有尾巴序列的左引物;B 表示右引物;C 表示带荧光基团的通用引物(即 M13)。
Note: A expressed tailed left primer. B expressed right primer. C expressed universal primer(M13).

图 1 TP-M13-SSR 技术的反应原理图示
Fig.1 Reaction principle of TP-M13-SSR

在进行 PCR 反应时,A 和 B 首先同模板 DNA 进行特异性扩增,产生特定 SSR 位点的扩增产物(E),随后,C 再与 B 对扩增产物进行退火,形成带荧光基团的测序扩增产物(F)。TP-M13-SSR 技术结合了 SSR 与荧光检测的优点,并且其成本也相对低

廉。合成 50 nmol 的荧光引物的成本大约是 700 ~ 900 元,其合成成本与普通荧光引物的差异不大,但 M13 具有通用性,即当研究中需要增加额外的 SSR 位点时,只需合成带尾巴序列的引物,而荧光引物(M13)则不需重新合成。

2.2 应用 TP-M13-SSR 技术的技术环节

在应用 TP-M13-SSR 进行扩增产物的检测时,因其反应体系的相对复杂性(3 条引物,2 步 PCR 反应程序),技术环节包括以下 6 个方面:

(1)带荧光基团的通用引物(M13)在量上必须与不带尾巴序列的引物保持相等,即图 1 中的 B 与 C 在 PCR 扩增体系中的量相同。

(2)带尾巴序列的引物的量,即图 1 中 A 的量应该小于或等于 B 的 1/4,以保证在 B 与 C 的 PCR 反应中,E 能够完全转变成 F。

(3)通用引物的退火温度会相对低于左、右引物,因此在 PCR 反应中前 30 个循环退火温度为 SSR 引物的实际退火温度,最后 8 个循环的退火温度应当调整为所用 M13 序列的实际退火温度。

(4)尽管可以通过 Touchdown-PCR 程序实现对带尾巴引物的扩增,但是为了得到最佳的扩增效果,最好还是为每一对带 M13 尾巴的引物确定出最适的退火温度。如反应原理所示,在 A 与 B 退火时,两条引物序列之间相差 19 bp(尾巴序列),而当 B 与 C 退火时,两条引物序列之间也存在一定的碱基数差

异,所以这种在引物序列上的不对等性使得在应用 TP-M13-SSR 检测技术时,必须严格控制 PCR 反应的退火温度。在实际运行过程中,各引物的确切退火温度可以通过梯度 PCR 方法来确定。

(5)在 PCR 反应中的最后延伸时间应不少于 10 min,普通的 Taq 酶具有在扩增产物末端加 A 的特性。如果延伸时间太短,最后经毛细管电泳产生的峰图会出现相差 1 bp 的波峰,从而给扩增产物片断大小的识别带来困难。

(6)在筛选引物时,一般都是先用 PAGE 检测尾巴引物的扩增效果,然后选取扩增效果理想的扩增产物进行荧光检测。但是,有时在 PAGE 检测表现清晰条带的扩增产物,进行荧光检测时效果并不理想,甚至出现连续峰的现象(图 2)。部分 2 碱基或 3 碱基重复的 SSR 引物有此表现。所以,PAGE 检测后最好对 PAGE 检测筛选出的引物再次进行荧光检测后再用荧光检测出的峰图表现比较理想的引物进行大批量材料的整体扩增。此外,在筛选引物时,对部分 2 碱基或 3 碱基重复的 SSR 引物,应持慎重的态度。

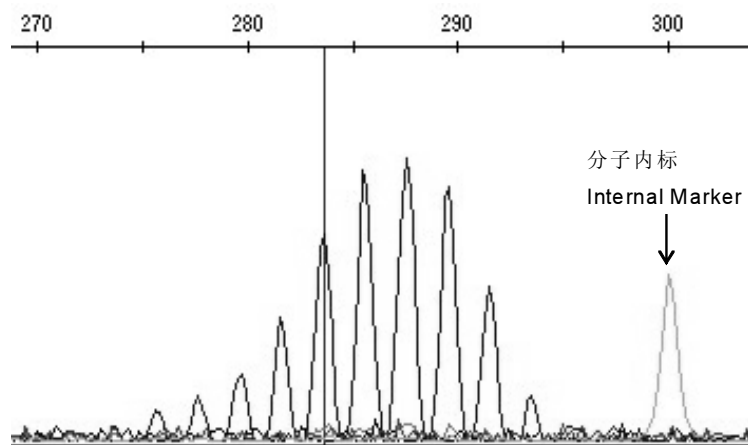


图 2 bnlg2331y11(重复单位为 TGG)在荧光检测中表现出的连续峰

Fig.2 The continuous peaks detected in PCR products of bnlg2331y11 with the repeat unit TGG

2.3 TP-M13-SSR 检测技术与几种常用的扩增产物检测方法的比较

根据检测平台的不同,SSR-PCR 扩增产物的检测方法大致可以分为 3 大类:凝胶电泳检测、测序检测和生物素标记检测。根据凝胶介质的不同,前者又可分为琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE);测序检测通常又包括常规荧光 SSR 检测、TP-M13-SSR 检测以及远红外荧光检测法。

2.3.1 SSR-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测

琼脂糖凝胶中的 SSR-PCR 扩增产物通过染色,可以在波长为 300 nm 的紫外灯下检测。在琼脂糖凝胶检测中,通常采用的染色方法有:溴化乙啶(ethidium bromide,EB)染色法、SYBR Gold 染色法和 SYBR Green 染色法。

EB 染色法是琼脂糖凝胶中 DNA 检测的最简便、最常用的方法。其最大优点是在电泳过程中或电泳结束后,经 EB 染色的扩增产物可以直接在紫外灯下检测,并且检测成本非常低。其不足则表现在

EB 存在致癌的可能性,并且受琼脂糖凝胶的限制,其分辨率相对较低。

SYBR Gold 是一种特有的能激发荧光的非对称花青染料,与 DNA 具有很高的亲和力,并且结合后,能够极大程度的增强荧光信号。据统计,SYBR Gold-DNA 复合物激发的荧光信号强度是 EB-DNA 复合物的 1 000 多倍,可以极大地提高琼脂糖凝胶电泳检测的分辨率,这是该染色法明显优于 EB 的一个显著特点。此外该染色法对操作人员无任何损害。其不足之处在于 SYBR Gold 的价格过于昂贵。

SYBR Green 同 SYBR Gold 类似,与 DNA 结合后形成的 SYBR Green-DNA 复合物也可以极大程度地增强荧光信号,分辨率与 SYBR Gold 相当,但是其价格相对于后者则低廉很多,是目前在扩增产物的常规检测中替代 EB 的一种理想染色剂。

琼脂糖凝胶检测法的一个明显不足在于只能检测扩增条带的有无,而不能确定其具体大小。此外,用于进行 PCR 扩增产物检测的普通琼脂糖凝胶的分辨率都不高。但是有一种低熔点的 MetaPhor 琼脂糖,其分辨率显著高于普通的琼脂糖凝胶。浓度为 2%~4% 的 MetaPhor 琼脂糖凝胶与 4%~8% 聚丙烯酰胺凝胶的分辨率接近。

2.3.2 SSR-PCR 扩增产物的 PAGE 检测

同琼脂糖凝胶电泳的检测方法一样,PAGE 也可以通过不同的显影方法实现 SSR-PCR 扩增产物的检测。通常采用的是放射性标记法和银染法。利用放射性标记法对 SSR-PCR 产物检测时,扩增产物带有放射性同位素如(α - ^{32}P)标记的 dNTP,待扩增产物电泳完毕后,凝胶与 X 光片一起进行曝光,即可获得扩增产物的放射自显影图片。

受放射性同位素半衰期的影响,标记的引物合成后必须马上进行扩增和产物的检测,否则会显著影响检测效果。分辨率高是该方法的一个突出优点,但是放射性同位素对人体存在很大危害,尽管后来采用地高辛标记代替放射性同位素,但是其高昂的实验成本,极大限制了该方法在常规 SSR-PCR 扩增产物检测中的应用。

到 20 世纪 80 年代,银染已经被用作蛋白质和 DNA 电泳的显色剂。银染的主要特点表现在以下几个方面:

(1)分辨率高。用银染法进行 5%~8% 的 PAGE 检测可以分辨微卫星 DNA 中 1~2 个核苷酸的变异,在实际应用上受模板质量、PCR 扩增产物的质量以及其它诸多因素的影响,最终能实现的分辨率

大约为 4~16 bp。

(2)操作简便易行。电泳完毕后,将凝胶进行固定、水洗、银染、显色,即可获得扩增产物的检测结果。

(3)整个操作过程无放射性危害。因为扩增的引物不带任何标记,所以整个染色过程不致癌或放射性危害。在银染和显色的过程中用到的甲醛,具有一定的毒性。

(4)检测成本低廉。在银染检测时,所用到的都是很常规的化学药品,价格都不高。在大规模的扩增产物的检测方上,银染法应用最普遍。

正是基于以上几个突出优点,银染检测法已经成为了包括 SSR 在内的多种分子标记 PCR 扩增产物检测的主要方法。同琼脂糖凝胶电泳一样,PAGE 也适于所有引物扩增产物的检测,具有高度灵活性的特点。但是该方法也存在琼脂糖凝胶一样的不足,无法确定 PCR 产物片断的具体大小。

2.3.3 SSR-PCR 扩增产物的荧光检测法

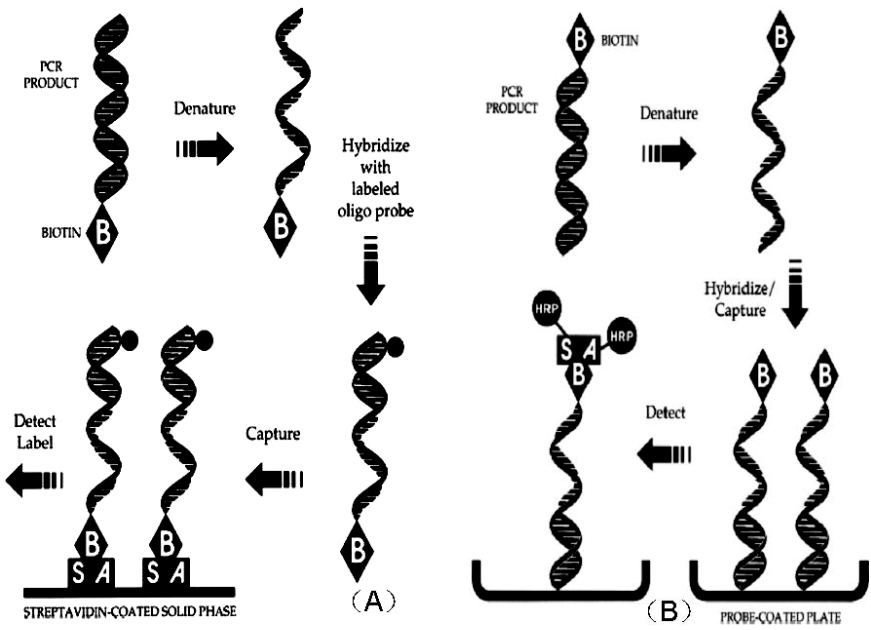
荧光检测法是基于测序技术发展起来的,其显著特点即是可以确切检测出扩增产物的片断大小,并且分辨率都很高,这是前述几种检测方法都无可比拟的。在应用荧光检测法对扩增产物进行检测时,都需要借助特定的 DNA 测序仪器,检测成本都比较昂贵。

2.3.4 SSR-PCR 扩增产物的生物素标记检测法

图 2 显示的是两种不同模式的生物素标记法进行 SSR-PCR 扩增产物检测的基本原理。其中 A 表示寡核苷酸探针模式,B 表示寡核苷酸捕获模式。两种模式都包括一个相同的过程:带有生物素标记的引物与模板的 PCR 扩增→扩增产物的变性→带有生物素标记的扩增产物单链与寡核苷酸探针的杂交→杂交分子的捕获→洗脱→捕获产物的检测。

生物素标记法在早起有一定的应用,其检测成本相对较低,检测效率比较高。同电泳检测法一样,该方法也适于包括 SSR 在内的所有引物,同样不能确定扩增产物片断的具体大小。此外,能被用来辅助检测酶种类比较有限,所以该检测法在优化与选择性上也受到了相应的限制。不同探针的杂交条件是明显不同的,相同基因型的材料,在应用该法对其 PCR 扩增产物进行检测时,检测效率可能会产生比较大的差异。

对各种不同的 SSR-PCR 扩增产物检测方法进行了比较(表 1)。



注:A 表示的是寡核苷酸探针模式,B 表示的是寡核苷酸捕获模式。
Note: A expressed oligonucleotide patterns, B expressed oligonucleotide capture mode

图 3 两种不同模式的生物素标记法检测 PCR 扩增产物的反应原理

Fig.3 Reaction principal of two different biotin labeling formats in PCR products detection

表 1 几种 SSR 扩增产物检测方法的优缺点

Table 1 Comparison of the different detection methods in SSR-PCR products

检测方法	分辨率	检测成本	复杂程度	数据记录方式	灵活性
Detection method	Precision	Detection costs	Complexity	Data collection	Flexibility
琼脂糖凝胶电泳	EB 染色	较低	低	手工	高
	SYBR Gold 染色	较高	低	手工	高
	SYBR Green 染色	较高	低	手工	高
	放射性标记法	高	较高	手工	高
	银染	较高	低	手工	高
GAGE	红外荧光检测法	最高	高	半自动	较低
测序法	普通荧光检测法	最高	高	半自动	较低
	TP-M13-SSR	最高	较高	半自动	高
	生物素标记法	*	较高	手工	高

注:* 无法确定片断大小。
Note: * The accurate size of SSR-PCR product can not be determined.

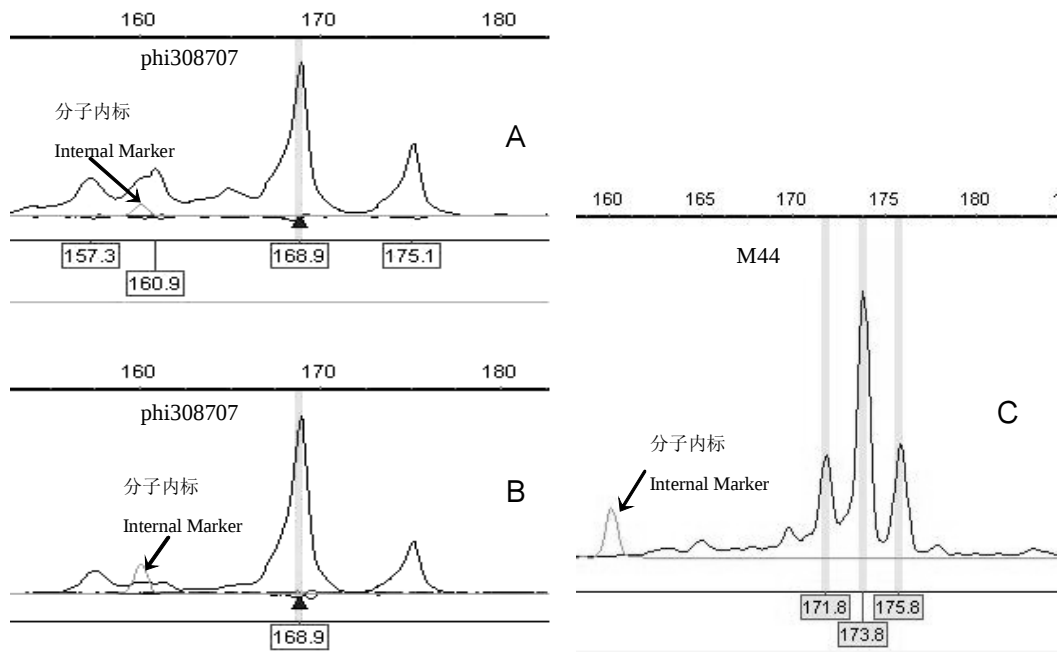
3 TP-M13-SSR 检测技术在玉米种质资源研究中的应用

TP-M13-SSR 检测技术的完善,为在低成本的基础上对实验材料进行高通量的分析提供了一种高效的研究手段。中国农业科学院作物科学研究所玉米种质资源课题组选择全覆盖玉米基因组的 49 个 SSR 位点,已经成功运用这种方法对我国玉米自交系的核心种质(共 242 份自交系)和骨干系(共 46 份自交系)进行了多样性研究,并对这些材料进行了杂

种优势群的划分。该实验室目前正在对近 900 份地方品种核心种质进行类似的研究,已经取得了一些阶段性的结果。

图 4 显示运用 TP-M13-SSR 检测技术所获得的部分 SSR 位点在玉米地方品种上的扩增图谱。目前,运用 TP-M13-SSR 检测技术,已经完成了部分引物在我国玉米地方品种上的扩增,表 2 是南方生态区部分玉米地方品种在引物 phi127、phi062 等 5 个 SSR 位点上扩增产物的分析结果。5 个 SSR 位点所揭示出的 89 份材料的遗传多

样性(基因多样性)的变化范围为 0.39 ~ 0.71,最高的是 phi085,最低的是 phi062,平均值为 0.57。这一多样性水平与欧洲开放性授粉群体(0.53)以及美国马齿带种质(0.53)相近,均略低于墨西哥玉米族(0.61),而明显的低于大刍草的水平(0.77)。



注:A 和 B 表示引物 phi308707 在不同的地方品种上的扩增产物,C 表示引物 M44(北京农林科学院玉米中心提供)在地方品种上的扩增产物。
Note: A and B refer to the fragment size revealed by phi308707, and C refers to the fragment size revealed by M44 (offered by Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural & Forestry Sciences).

图 4 TP-M13-SSR 所检测的我国不同玉米地方品种扩增产物的片断大小
Fig.4 Fragment size revealed by TP-M13-SSR in landraces of maize

表 2 5 个 SSR 位点在 3 份自交系 86 份地方品种上检测到的遗传多样性
Table 2 Genetic diversity of three maize inbred lines and 86 landraces revealed by five SSR primers

标 记 Marker	主等位基因频率 Allele.frequency	基因型数 Genotype no.	等位基因数 Allele no.	基因多样性 Gene diversity	杂合度 Heterozygosity	多态性信息含量 PIC
phi127	0.66	14.00	9.00	0.53	0.44	0.49
phi062	0.76	8.00	7.00	0.39	0.34	0.36
phi075	0.39	8.00	5.00	0.66	0.78	0.59
phi079	0.65	13.00	7.00	0.54	0.54	0.52
phi085	0.37	11.00	8.00	0.71	0.38	0.66
平 均	0.57	10.80	7.20	0.57	0.49	0.52

4 展 望

尽管 TP-M13-SSR 检测技术具有比较高的性价比,但在 2 步的 PCR 反应过程中退火引物都具有不对等性,对 PCR 反应过程中退火温度的要求比较严格,这在一定程度上给引物的筛选造成了一定的难度。所以可以考虑双尾巴引物,即给 SSR 引物的左右链都加上尾巴序列,把通用引物也相应地改成

2 条,这在一定程度上解决了退火引物的不对等性,可能会降低 PCR 反应对引物退火温度的要求。
从实际应用上讲,SSR-PCR 扩增产物的所有其它检测方法都可以用 TP-M13-SSR 替代,该方法不存在电泳检测法中的一系列烦琐的配胶、染色和显色等过程,检测通量和分辨率都很高,检测时间短。在 ABI3730XL 测序仪上,一个份 96 孔的样本在 20 ~ 30 min 内即可检测完毕,并且检测(下转第 31 页)