

两种凝胶电泳系统 对 SSR 标记多态性的影响

李新海¹, 焦少杰², 傅骏骅¹, 张世煌¹, 袁力行¹, 李明顺¹

(1 中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京 100081; 2 黑龙江省农业科学院育种研究所, 哈尔滨 150036)

摘要: 利用 35 个 SSR 引物和 14 个玉米自交系直接比较了 3% Metaphor 琼脂糖凝胶和 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳对 SSR 位点多态性水平的影响。结果表明, 两种凝胶系统检测出的等位基因数目和基因多态性水平存在显著差异, 12% 聚丙烯酰胺凝胶在区分微小差异片段能力上明显高于 3% Metaphor 琼脂糖凝胶。另一方面在两种电泳检测系统下, 14 个自交系之间的遗传相似系数相关性($r = 0.516$)达到了极显著水平($P < 0.01$)。在 10 个具有最大多态性信息量的 SSR 引物中, 8 个在两种凝胶系统中保持相同。利用 8 个引物可以对供试自交系进行初步鉴定。笔者认为, 3% Metaphor 琼脂糖凝胶电泳比较适合在遗传作图或基因定位研究中应用; 而在品种指纹图谱分析或遗传多样性研究中, 应采用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳作为检测工具。

关键词: 玉米; SSR 标记; 遗传变异; 多态性信息量

中图分类号: S513.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2001)02-0043-06

SSRs (Simple Sequence Repeat) 即简单序列重复, 亦称微卫星 DNA (Microsatellite DNA) 是近年来发展起来的建立在 PCR (Polymerase Chain Reaction) 基础之上的新型遗传标记。研究发现, SSRs 极丰富地分布在植物基因组中, 并具有很高的多态性, 如水稻^[1]、大豆^[2]、玉米^[3]、油菜^[4]、小麦^[5]、大麦^[6]等。现在 SSR 标记已被广泛用于基因定位^[1], 种群进化及遗传多样性研究^[1, 2, 7]。研究表明 SSR 位点的等位基因数目比其他类型标记揭示的等位基因数目多, 同时因其使用程序简单、快速、重复性好, 被认为是一种理想的遗传标记。在研究中发现, SSR 位点的等位基因数目除与供试材料数目、种类以及所用引物有关外, 与凝胶电泳检测系统的关系也很密切。本文以 14 个玉米自交系为材料比较 3% Metaphor 琼脂糖凝胶和 12% 聚丙烯酰胺凝胶对 35 个 SSR 引物扩增产物多态性水平的影响, 探讨不同凝胶检测系统在玉米遗传变异研究中的应用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试的 14 个玉米自交系及其来源见表 1, 其中多数自交系为我国玉米生产上推广杂交种的亲本。

1.2 SSR 引物

试验所使用的 35 个引物取自 bngl/phi 引物盒 (Research Genetics, Huntsville)。

1.3 DNA 提取

采用 Saghai-Maroo 等^[8] 提出的 CTAB 法提取 DNA。用 Beckman DU-65 型分光光度计检测 DNA 浓度和质量, 把 DNA 浓度统一调至 10 ng/μL, 备用。

1.4 扩增反应

PCR 扩增反应在 PTG-225 PCR 仪 (MJ Research, Watertown, MA) 上进行。每 20 μL 反应体积中含有 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 1 单位 TaqDNA 聚合酶, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L -4dNTP, 10% 甘油, 0.6 μmol/L SSR 引物对, 50 ng DNA 模板。反应液上加盖 28 μL 矿物油 (Sigma), 以防止反应过程中水分蒸发。

热循环反应过程包括: 93 °C 模板 DNA 预变性 1 min, 1 个循环; 93 °C 模板 DNA 变性 1 min, 60 °C 引物与模板靶位点结合 2 min, 70 °C 引物沿模板延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后在 72 °C 延伸 5 min。

1.5 Metaphor (3%) 凝胶电泳检测

在扩增产物中加入 5 μL 溴酚蓝指示剂, 上样 20 μL, 在 3% 浓度的 Metaphor 琼脂糖 (FMC Rockland, ME) 凝胶上分离。以 ΦX174/Hae II 片段为分子量标准, 在 100 V 恒压下电泳 3 h, 用溴化乙锭 (0.15 μg/mL) 染色。在紫外检测仪下观察电泳结果, 用保利来 (Polarid) 665 型相纸一次成像。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶 (12%) 电泳检测

采用 JIRCAS ATTA 型电泳装置 (日本制造, 规格 16cm × 20 cm × 0.1 cm), 双面电泳。配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶 40 mL: 12 mL 40% Polyacrylamide (acrylamide: bisacrylamide = 19:1), 4 mL 1×TBE, 24 mL ddH₂O, 20 μL TEMED, 160 μL 25% APS (Ammonium persulfate 25% w/v)。在加入 TEMED 和 APS 后, 立即倒胶, 约 30 min 后, 胶凝固。固定玻璃板, 倒入 1 000 mL 1×TBE 缓冲液 (内、外槽各 500 mL)。在 250 V 电压下, 电泳 2 h。然后凝胶依次在 10% 冰乙酸中浸泡 30 min, 水洗 3 次 (每次 10 min), 0.1% AgNO₃ (加入 100 μL 38% Formaldehyde) 中浸泡 30 min, 快速用水冲洗 2 次, 然后在 2.5% Na₂CO₃ (加入 50 μL 2.5% Na₂S₂O₃, 50 μL 38% Formaldehyde) 中显影至带型可以区分为止。用 10% 冰乙酸终止显影。在白炽灯下观察电泳结果, 用保利来 (Polarid) 665 型相纸一次成像。

1.7 数据统计分析

SSR 扩增产物以 0, 1, 9 统计建立数据库。在相同迁移率位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 缺失数据记为 9。以简单配对参数 (Simple matching coefficient) 估计基因频率, 采用 NTSYS-pc version 1.8 (Rohlf 1992)^[9] 统计软件, 依据 $GS = m / (m + n)$ 计算供试自交系之间的遗传相似系数, 其中 m 为基因型间共有带数目, n 为差异带数目。

表 1 14 个玉米自交系及系谱来源

编号	自交系	系谱来源
1	自 330	可利 67 × Oh43
2	5003	PN 种质
3	掖 478	U8112 × 5003
4	CA156	基因库 33
5	K12	陕西省农科院
6	K22	陕西省农科院
7	Pa405	美国 Ohio 州立大学
8	77	(黄小 162 × 南 70) × (南 107 × 南 55)
9	B77	综合种 BS11
10	中自 451	PN 种质
11	丹 340	白骨旅 9 × 有稃玉米
12	B73	BSSC2
13	U8112	PN 种质
14	农大 178	PN 种质

每一个 SSR 位点的多态性信息量(Polymorphic Information Content 简称 PIC)按 Senior M S 等^{〔3〕}提供的公式计算, 即 $PIC=1-\sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 两种凝胶电泳系统检测结果的比较

表 2 35 个 SSR 引物在 14 个玉米自交系间的扩增产物在两种凝胶上的检测结果比较

编号	SSR 引物	图谱位置	重复级数	等位基因		多态性信息量	
				Metaphor	Acrylamide	Metaphor	Acrylamide
1	bogl 149	1. 00	2	2	2	0. 484	0. 490
2	phi 056	1. 01	3	2	4	0. 484	0. 603
3	bngl 176	1. 03	2	2	2	0. 337	0. 337
4	bngl 439	1. 03	2	4	4	0. 704	0. 562
5	phi 001	1. 03	2	3	4	0. 587	0. 653
6	phi 011	1. 09	3	4	5	0. 418	0. 765
7	phi 098*	2. 02	2	1	3	0	0. 459
8	bngl 125	2. 02	2	4	5	0. 648	0. 740
9	phi 083	2. 04	4	3	4	0. 623	0. 704
10	phi 090	2. 08	5	2	2	0. 337	0. 337
11	phi 099	3. 02	2	2	2	0. 484	0. 132
12	phi 053	3. 05	4	4	4	0. 703	0. 693
13	phi 073	3. 05	3	2	2	0. 245	0. 490
14	phi 072	4. 01	4	3	3	0. 440	0. 418
15	phi 021	4. 03	2	2	2	0. 245	0. 337
16	phi 096	4. 04	5	2	2	0. 337	0. 245
17	phi 079	4. 05	5	2	2	0. 408	0. 459
18	phi 113	5. 02	4	3	4	0. 507	0. 663
19	bngl 653*	5. 04	2	1	2	0	0. 337
20	phi 075	6. 00	2	2	2	0. 484	0. 500
21	bngl 161	6. 00	2	3	5	0. 623	0. 781
22	phi 126	6. 00	2	3	4	0. 643	0. 724
23	phi 078	6. 05	4	2	2	0. 409	0. 459
24	phi 112*	7. 01	2	1	2	0	0. 245
25	phi 034	7. 02	3	2	3	0. 337	0. 459
26	bngl 155	7. 03	2	4	5	0. 627	0. 643
27	phi 116	7. 06	7	2	2	0. 484	0. 132
28	phi 119*	8. 02	2	1	3	0	0. 245
29	phi 125	8. 03	2	2	3	0. 132	0. 500
30	bngl 162	8. 05	2	4	4	0. 745	0. 724
31	phi 080	8. 09	5	3	3	0. 623	0. 541
32	phi 033	9. 01	3	2	2	0. 408	0. 245
33	phi 022	9. 03	4	3	5	0. 541	0. 745
34	bngl 619	9. 07~ 9. 08	2	3	3	0. 582	0. 521
35	phi 062*	10. 04	3	1	2	0	0. 337
总和				86	108	14. 693	17. 215
平均				2. 46	3. 09	0. 419	0. 492

注: SSR 引物染色体位置参见 Maize DB(1999); * 在 3% Metaphor 凝胶上呈单态性位点。

采用来自 bngI/ phi 引物盒的 45 个 SSR 引物对 14 个玉米自交系进行同源位点扩增, 其中有 30 个引物(见表 2) 的扩增产物在 3% Metaphor 凝胶上具有多态性, 带型稳定; 5 个引物扩增产物带型呈单态性; 10 个引物不能有效地启动基因组 DNA 或扩增质量差。选用在 3% Metaphor 凝胶上带型稳定的 35 个引物, 其扩增产物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上重新检测, 结果 35 个引物的扩增产物带型都呈多态性。

能有效地扩增 14 个玉米自交系 DNA 的 35 个引物分布于玉米 10 条染色体上。用 3% Metaphor 凝胶检测时, 共揭示出 86 个等位基因, 每个位点 1~ 4 个, 平均为 2. 46 个; 平均多态性信息量(PIC) 为 0. 419, 变化范围为 0~ 0. 745。在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上, 共检测出 108 个等位基因, 每个位点 2~ 5 个, 平均为 3. 09 个; 平均多态性信息量(PIC) 为 0. 492, 变化幅度为 0. 132~ 0. 781。比较分析表明, 在 12% 聚丙烯酰胺上检测到的等位基因数和多态性信息量都显著多于在 3% Metaphor 琼脂糖凝胶上检测的结果。这说明聚丙烯酰胺凝胶区分差异微小片段的能力显著高于 3% Metaphor 琼脂糖凝胶。

从表 2 可以看出两种凝胶电泳系统下, 前 10 位具有较大 PIC 值的 SSR 引物所揭示的遗传多态性信息量分别占总变异的 44. 4% 和 41. 7%, 扩增的等位基因数占总等位基因数的 40. 7% 和 40. 8%。这说明不同的 SSR 引物在 14 个自交系之间揭示的基因变异存在明显差异。在 10 个引物中 bngI161, bngI162, phi001, bngI125, phi126, bngI155, phi083 及 phi053 八个引物在两种凝胶系统下均检测出高等位基因数和 PIC 值。

2. 2 遗传变异比较分析

分别利用 86 和 108 个多态性 SSR 标记计算 14 个玉米自交系之间的遗传相似系数(GS) (表 3) 。在 3% Metaphor 凝胶电泳下, 玉米自交系之间 GS 范围为 0. 537~ 0. 842, 平均为 0. 654。K12 和中自 451 的 GS (0. 537) 最小, 而 CA156 和掖 478 之间的 GS (0. 842) 最大。在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上检测得到玉米自交系之间 GS 范围为 0. 456~ 0. 814, 平均为 0. 602。

表 3 14 个玉米自交系的 SSR 标记在两种凝胶系统下遗传相似系数

自交系	自 330 0. 648*	Pa405 0. 569	中 451 0. 549	5003 0. 581	B77 0. 604	B73 0. 611	8112 0. 606	77 0. 587	农大 178 0. 546	丹 340 0. 642	掖 478 0. 630	CA156 0. 621	K12 0. 589	K22 0. 632
自 330(0. 695*)	0. 518	0. 580	0. 654	0. 629	0. 654	0. 667	0. 610	0. 604	0. 728	0. 641	0. 728	0. 703	0. 703	
Pa405(0. 671)	0. 685		0. 469	0. 543	0. 666	0. 592	0. 481	0. 545	0. 543	0. 567	0. 604	0. 592	0. 617	0. 666
中 451(0. 631)	0. 703	0. 574		0. 555	0. 555	0. 629	0. 567	0. 558	0. 555	0. 629	0. 567	0. 481	0. 456	0. 530
5003(0. 657)	0. 768	0. 694	0. 638		0. 481	0. 506	0. 493	0. 584	0. 604	0. 654	0. 691	0. 629	0. 580	0. 580
B77(0. 653)	0. 703	0. 685	0. 592	0. 601		0. 580	0. 567	0. 688	0. 506	0. 629	0. 567	0. 654	0. 629	0. 703
B73(0. 656)	0. 694	0. 620	0. 694	0. 648	0. 657		0. 814	0. 506	0. 506	0. 604	0. 617	0. 679	0. 580	0. 679
8112(0. 661)	0. 731	0. 694	0. 657	0. 611	0. 675	0. 796		0. 623	0. 617	0. 567	0. 703	0. 641	0. 543	0. 592
77(0. 636)	0. 703	0. 703	0. 611	0. 675	0. 666	0. 657	0. 712		0. 584	0. 662	0. 623	0. 584	0. 506	0. 558
农大 178(0. 576)	0. 555	0. 629	0. 574	0. 583	0. 592	0. 583	0. 564	0. 537		0. 629	0. 617	0. 456	0. 481	0. 530
丹 340(0. 666)	0. 740	0. 666	0. 703	0. 638	0. 685	0. 675	0. 657	0. 629	0. 629		0. 641	0. 703	0. 654	0. 679
掖 478(0. 673)	0. 731	0. 657	0. 638	0. 685	0. 712	0. 648	0. 648	0. 620	0. 564	0. 657		0. 740	0. 567	0. 617
CA156(0. 681)	0. 703	0. 703	0. 629	0. 712	0. 666	0. 638	0. 638	0. 555	0. 574	0. 667	0. 842		0. 679	0. 703
K12(0. 629)	0. 648	0. 685	0. 537	0. 620	0. 592	0. 601	0. 620	0. 592	0. 555	0. 648	0. 638	0. 703		0. 679
K22(0. 665)	0. 675	0. 731	0. 657	0. 666	0. 657	0. 611	0. 592	0. 601	0. 546	0. 657	0. 703	0. 824	0. 731	

注: * 为自交系平均相似系数。

K12 和中自 451 的 GS (0.456) 依然最小, 表明两系间遗传差异较大; 8112 和 B73 之间具有最大 GS (0.814); CA156 和掖 478 的 GS (0.740) 仅次于 8112 和 B73, 居第 2 位。两种电泳系统下, 14 个玉米自交系之间 GS 矩阵的相关系数为 0.561, 达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。这表明两种凝胶电泳检测系统在分析 14 个玉米自交系遗传变异方面可以获得相似信息; 但比较而言采用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 所获得遗传多态性信息会更丰富。

从表 3 可以看出, 农大 178, 中自 451 和 K12 与其他供试自交系之间具有较大的遗传距离, 而自 330, 丹 340, 掖 478, CA156 和 K22 与其他材料之间的平均遗传距离较小, 这在两种凝胶系统下基本一致。此外, 在两种检测系统下, 均检测出自 330 和丹 340 具有较大的遗传相似性, 这种现象似乎与育种实践不符, 值得进一步研究。

3 讨论

本研究利用 35 个 SSR 引物和 14 个玉米自交系比较分析了 3% Metaphor 凝胶和 12% 聚丙烯酰胺两种电泳系统对 SSR 位点遗传多态性的影响。从研究结果看, 3% Metaphor 琼脂糖凝胶在区分差异微小片段能力上不如 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 但其操作方便, 快速, 带型容易区分, 不需要复杂的电泳装置, 使用成本较低, 因此笔者认为, 在遗传作图或基因定位研究中, 可以选用 3% Metaphor 凝胶作为检测手段, 因为 SSR 标记为共显性标记, 只要在两亲本间筛选出稳定的多态性带, 就可以在群体中得到体现, 然后通过连锁遗传分析, 可以将其确定在染色体上。但在品种指纹图谱分析或遗传多样性研究中建议采用 12% 聚丙烯酰胺电泳作为检测手段, 在这类研究中一般需要尽可能区分出各种差异片段, 这样在品种遗传变异分析中才能得到准确结果。

参考文献:

- [1] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. Mol Gen Genet, 1993, 241: 225– 235.
- [2] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. Genetics, 1992, 132: 1131– 1139.
- [3] Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, *et al.* Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system[J]. Crop Sci, 1998, 38: 1088– 1098.
- [4] Kresovich S, Szewc-McFadden A K, Blick S M, *et al.* Abundance and characterization of simple-sequence repeats(SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed)[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 206– 211.
- [5] Roder M S, Plaschke J, König S U, *et al.* Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat[J]. Mol Gen Genet, 1995, 246: 327– 333.
- [6] Struss D, Plieske J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 308– 315.
- [7] Saghai-Marooif M A, Biyashev R M, Yang G P, *et al.* Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 1994,

91: 5466– 5470.

- [8] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgenson R, *et al.* Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 1984, 81: 8014– 8018.
- [9] Rolf J F. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system [M]. Version 1. 7 Exeter Software, Setauket, NY. 1992.

Comparative Analysis of Polymorphism of SSRs Detected on Two Gel Electrophoresis Systems

LI Xin-hai¹, JIAO Shao-jie², FU Jun-hua¹,

ZHANG Shi-huang¹, YUAN Li-xing¹, LI Ming-shun¹

(1 Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2 Institute of Crop Breeding, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150036, China)

Abstract: Thirty-five SSR primers and 14 maize inbred lines were used to comparatively analyze polymorphic level of SSRs on two gel electrophoresis systems. The results showed that the number of alleles and PIC value over 35 SSR primers were significantly different between two gel systems. Polyacrylamide gel(12%) had higher ability than Metaphor agarose gel(3%) in discriminating amplified fragments. On the other hand, the correlation coefficient of genetic similarities between 14 lines obtained on two gel systems was 0.516, significantly correlated at $P < 0.01$ level, indicating that the information explored by two gel systems were relatively similar. Eight SSR primers of 35 primers were identified to have high PIC value and number of alleles over 14 lines on both two gel systems, and could be used for unique DNA fingerprinting of each inbred line tested. Based on the results, 3% Metaphor agarose gel was suggested to be used in genetic mapping, while 12% polyacrylamide gel would be used in DNA fingerprinting or genetic variation studies.

Key words: Maize; SSR marker; Genetic variation; Polymorphic information content(PIC)