

玉米品种 SSR 标记毛细管电泳荧光检测法与变性 PAGE 银染检测法的比较研究

易红梅^{1,2}, 王凤格¹, 赵久然¹, 王璐¹, 郭景伦¹, 原亚萍³

(1. 北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089; 2. 首都师范大学, 北京 100089; 3. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062)

摘要:以 192 份玉米品种为材料, 用 7 对 SSR 引物对毛细管电泳荧光检测和常规的变性 PAGE 银染检测两种 SSR 标记检测方法进行比较分析。结果表明, 两种方法检测的 SSR 标记片段大小一致。毛细管电泳荧光检测法检测的结果更为精确、灵敏、高效, 更适用于高通量材料的检测分析。对少量材料进行检测分析以及 SSR 标记的筛选时, 使用常规的变性 PAGE 银染检测法更经济适用。

关键词:玉米; SSR; 毛细管电泳; 银染

中图分类号: S513 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0064-04

Comparison of Two Maize SSR Detection Methods: Capillary Electrophoresis with Fluorescence Detection Method and Denaturing PAGE Silver_staining Detection Method

YI Hong_mei^{1,2}, WANG Feng_ge¹, ZHAO Jiu_ran¹, WANG Lu¹, GUO Jing_lun¹,
YUAN Ya_ping³

(1. Maize Reaserch Center, Beijing Academy Agricultural and Forestry Science, Beijing 100089, China;
2. Capital Normal University, Beijing 100089, China; 3. Department of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Seven SSR primers and 192 maize hybrid were used to comparatively analyze SSR markers between capillary electrophoresis with fluorescence detection and denaturing PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) silver_staining detection. The results indicated that SSR markers fragment sizes explored by two decetion systems were relatively similar. Capillary electrophoresis with fluorescence detection has the advantages of high accuracy, sensitiveness, cost effectiveness and high_throught. Therefore, the capillary electrophoresis with fluorescence detection system is suggested to be suitable for scanning and analyzing large_scale material. While denaturing PAGE silver_staining detection would be used in examining a few samples, especially in screening SSR markers.

Key words: Maize; SSR; Capillary electrophoresis; Silver_staining

SSR(Simple sequence repeat)简单序列重复, 亦称微卫星 DNA, 是近年来发展起来的建立在 PCR 基础上的第 2 代分子标记, 它是一类短的、串连重复序列基序(1~6 个核苷酸)组成的简单重复序列, 均匀地分布在真核生物基因组中, 二侧有保守的 DNA 序列。SSR 标记具有共显性、高度可重复性、高度丰

富的多态性等优点, 是构建遗传连锁图谱、DNA 指纹图谱, 研究群体遗传学, 进行分子标记辅助育种、系谱分析和法医鉴定的理想工具^[1]。

SSR 标记的检测可采用琼脂糖凝胶电泳、非变性 PAGE、变性 PAGE 或毛细管电泳荧光检测法, 所揭示的多态性因采用方法的不同而有所差别。由于

收稿日期: 2006-04-20

基金项目: 北京市自然科学基金项目(YZPT02-06); 北京市科技新星项目(2003B23); 吉林省科技计划项目(20030555)

作者简介: 易红梅(1982-), 女, 湖北石首人, 在读硕士, 主要从事玉米分子遗传学研究工作; 赵久然为通讯作者。

SSR 主要表现为 2~ 5 个核苷酸重复次数的变化, 多态性片段长度的差异可以小到 2~ 4 bp, 这就需要更灵敏有效的检测方法, 目前, 最常规的 SSR 检测方法主要是利用变性 PAGE 结合放射性标记或银染技术。毛细管电泳荧光检测法是一种快速、准确、高效率的 SSR 标记检测方法, 但仪器及试剂的高成本限制了其应用的广泛性, 本试验将毛细管电泳荧光检测与变性 PAGE 银染检测这两种 SSR 标记检测方法做了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验采用 192 份玉米杂交种为材料, 材料来自于 2005 年国家区试品种。

1.2 试验方法

本试验选用的 7 对 SSR 引物信息详见表 1, 引物的所有资料来源于 Maize Database。

表 1 7 对 SSR 引物信息

Tab 1 Information of seven SSR primers used in study				
引物名称 Primer name	在染色体上的位置 Bin	片段大小 Fragment size(bp)	等位基因数 Allel number	荧光标记 Dye
bnlg439	1. 03	200~ 244	10	FAM
bnlg125	2. 02	323~ 423	11	FAM
phi072	4. 00	140~ 162	4	VIC
bnlg161	6. 00	129~ 179	8	FAM
bnlg162	8. 05	212~ 266	10	VIC
phi066	9. 03	131~ 153	4	PET
bnlg1450	10. 07	153~ 235	13	NED

1.2.1 DNA 提取 采用郭景伦等^[2]的玉米单粒种子 DNA 快速提取法并加以改进: 将单粒干种子的胚剥下, 放入 1. 5 mL 离心管中, 加入 140 μ L 氯仿后研磨。然后加入 400 μ L DNA 提取液(100 mmol Tris_HCl, 100 mmol EDTA 8. 0, 500 mmol NaCl, 1. 5% SDS) 混匀后 10 000 r/ min 离心 2 min, 吸上清液加入预先装有 400 μ L 异丙醇和 400 μ L NaCl(500 mmol) 的 1. 5 mL 离心管中, 等 DNA 成团后用灭菌枪尖挑出, 经 70% 乙醇洗涤后加入 200 μ L TE 8. 0, 待充分溶解后备用。

1.2.2 PCR 扩增 变性 PAGE 银染检测法。PCR 扩增反应体系: 20 μ L 反应液其中包括 10 mmol/L Tris_HCl, 50 mmol/L KCl, 0. 001% Gelatin, 2. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 16 mmol/L 4dNTP, 0. 25 μ mol/L SSR 引物, 1U Taq DNA 聚合酶, 4 μ L DNA 模板。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 一个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 一个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存待用。PCR 扩增在 PTC₁₀₀

PCR 仪(MJ Research, Watertown, MA) 上进行。

毛细管电泳荧光检测法的 PCR 扩增反应体系和程序与变性 PAGE 银染检测法大致相同, 在模板量与循环数上稍做调整。

1.2.3 扩增产物的检测

1.2.3.1 变性 PAGE 银染检测法 电泳: PCR 产物 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保温 10 min 后在 4. 5% 测序胶上分离。预电泳 85 W, 20 min, 电泳 80 W, 40 min。采用王凤格等^[3]的快速银染法: 10% 冰醋酸固定液, 轻轻晃动 3 min; 双蒸水快速漂洗 1 次, 不超过 10 s; 0. 2% AgNO₃ 溶液中染色 5 min; 双蒸水快速漂洗, 时间不超过 10 s; 3% NaOH+ 5 mL/L 甲醛显影, 轻轻晃动至带纹出现; 10% 冰醋酸溶液中定影 5 min。

1.2.3.2 毛细管电泳荧光检测法 将 PCR 产物稀释 30 倍, 在 96 孔板的各孔中分别加入 9. 05 μ L 去离子甲酰胺、0. 05 μ L GS3730_500 分子量内标和 1 μ L 稀释后的 PCR 产物, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 于 4 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 3 000 r/ min 离心 1 min, 于 ABI3730XLDNA 分析仪上进行毛细管电泳。预电泳 15 kV, 2 min; 2 kV 电进样 10 s; 电泳 15 kV, 20 min。用 Data Collection 软件收集原始数据。

1.2.4 数据分析 变性 PAGE 银染检测法: 将银染所检测到的目的 DNA 片段与已知分子量 Marker 对比, 估测出各目的 DNA 片段的大小。毛细管电泳荧光检测法: 用 Genemapper 软件对 Data Collection 软件收集的原始数据进行分析。系统将各峰值的位置与其泳道中的 LIZ 500 分子量内标做比较。

2 结果与分析

2.1 两种方法检测结果的准确性比较

两种方法检测的 192 份玉米品种 SSR 标记片段大小一致, 毛细管电泳荧光检测法比变性 PAGE 银染检测法的结果更精确。毛细管电泳荧光检测法检测的各电泳样品中均含有分子量内标, 各泳道的 DNA 片段大小直接与其泳道中的分子量内标相比就可精确获得。图 1 横坐标上给出了 SSR 片段的大小, 纵坐标给出了扩增 DNA 产物的相对数量, 清晰明了。而常规的变性 PAGE 银染法检测的不同样品 DNA 片段大小, 通过银染后与已知分子量标准做比较得出, 由于不可能在每个泳道中点入分子量标准, 所得片段大小只能用肉眼与分子量标准做比较估测得出, 而且远离分子量标准泳道的数据准确性也会受到一些影响。

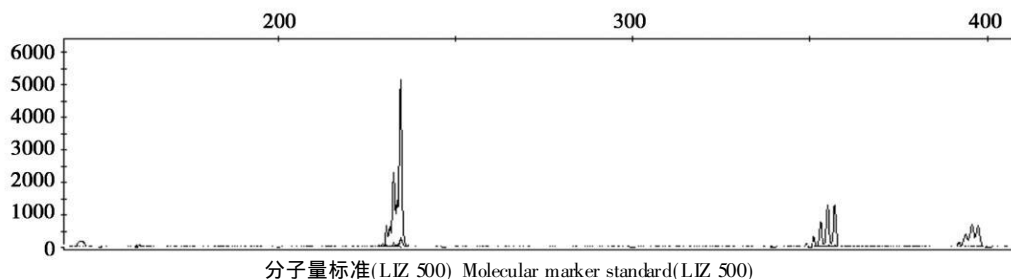


图1 > 350 bp 的 DNA 片段用毛细管电泳荧光检测法检测的结果

Fig. 1 > 350 bp DNA fragment amplified by common PCR and detected by capillary electrophoresis with fluorescence detection

2.2 大片段 DNA 用两种方法检测的结果比较

大片段样品 DNA 用毛细管电泳荧光检测法检测的结果如图 1 所示。用相同的 PCR 扩增体系与 100~ 300 bp 的样品 DNA 片段峰值相比, 大于 350 bp 的样品 DNA 片段的峰值明显要低, 而大于 350bp 的样品 DNA 片段银染后的谱带强度要明显高于 100~ 300 bp 的 DNA 片段谱带(图略)。

由于两种方法的检测原理不相同, 导致两种方法的检测结果在谱带(峰值)强度(高低)上出现差异。常规的变性 PAGE 银染检测法检测的是 PCR 产物中目的 DNA 片段的碱基总数。由于大片段 DNA 的碱基总量要高, 如果 PCR 扩增效率一致, 大片段 DNA 银染检测谱带的信号强度要明显高于小片段 DNA。而毛细管电泳荧光检测法检测的是 PCR 产物中带标记的目的 DNA 片段的数目, 而不是碱基的总数。由于常规的 PCR 扩增体系和扩增程序使大的 DNA 片段不能得到充分的延伸, 因而检测的谱带会出现几个连续的低峰。如果优化 PCR 扩增体系和扩增程序, 使大片段 DNA 能得到充分的变性和延伸, 那么用毛细管电泳荧光检测法检测大、小 DNA 片段的峰值会在同一个水平上。

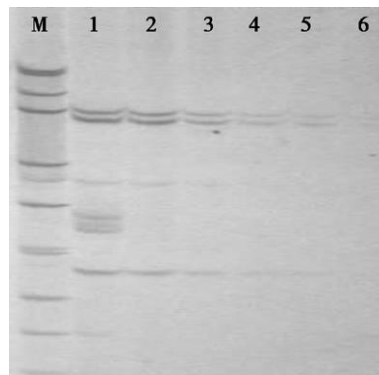
2.3 两种检测方法灵敏性的比较

PCR 产物稀释 10 倍后, 用常规的变性 PAGE 银染检测法检测谱带就比较弱, 稀释到 20 倍时 PCR 产物难以检测到(图 2)。而 PCR 产物即使稀释 200 倍后, 用毛细管电泳荧光检测法检测的结果仍然能够正常分析(图 3)。毛细管电泳荧光检测法的灵敏性要远高于常规的变性 PAGE 银染法, 在微量的 PCR 产物分析中表现出了强大的分析能力。

2.4 两种方法的工作效率比较

分析相同的 192 份玉米杂交种, 每份品种选 3 个重复。根据引物片段大小的分布及标记的颜色, 将 7 个引物的扩增产物混点, 毛细管电泳荧光检测法只需要电泳 6 块 96 孔板, 2 h 就能完成 192 份样品 7 个 SSR 位点的电泳检测。192 份样品 7 个 SSR

位点用变性 PAGE 银染法检测共需要电泳 77 块板, 每人每天只能完成 4 块板, 共需要约 20 d 的时间。使用毛细管电泳荧光检测法能大大提高玉米品种 SSR 标记的检测效率。



M. 分子量标准(Puc18DNA/MspI); 1. 未稀释; 2. 稀释 2 倍;
3. 稀释 5 倍; 4. 稀释 10 倍; 5. 稀释 15 倍; 6. 稀释 20 倍
M. Molecular marker standard(Puc18DNA/MspI); 1. Undiluted;
2. Diluted two_fold; 3. Diluted five_fold; 4. Diluted ten_fold; 5.
Diluted fifteen_fold; 6. Diluted twenty_fold

图2 PCR 产物稀释不同倍数后变性 PAGE 银染检测结果
Fig. 2 PCR products diluted different fold detected by
denatured PAGE silver staining

3 讨论

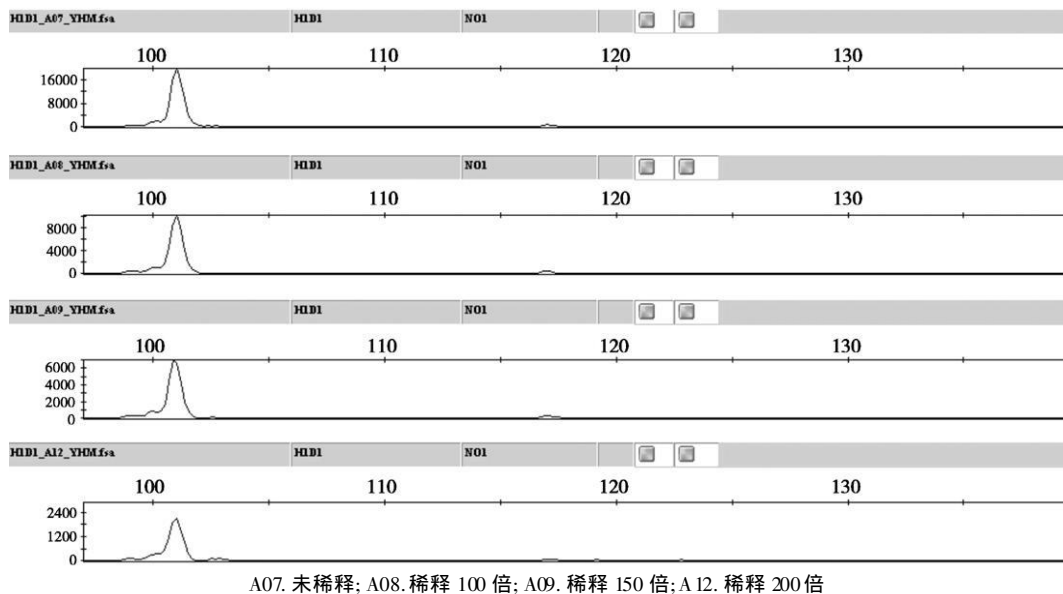
毛细管电泳荧光检测法与变性 PAGE 银染检测法的分辨率都能达到 1 bp, 两种方法检测到的数据具有一致性, 而且两种方法检测到的等位基因数目相同, 不同实验室用这两种不同方法检测到的数据均能整合到一起, 实现了各实验室数据的交流。

由于毛细管电泳荧光检测法系统自动化程度很高, 不仅省去了人力, 提高了工作效率, 也避免了这些操作中的人为误差, 从而增强了试验结果的稳定性和可重复性。并且毛细管电泳荧光检测法的系统软件能校正各毛细管间的电泳差异, 最大程度上减少了实验的系统误差。

用变性 PAGE 银染检测法分析样品时, 不同样品 DNA 的片段大小要与已知分子量 Marker 做比较, 或者是将每个引物所有的等位基因的标准样品点在

每块胶板上作参照,待分析样品 DNA 片段与参照样品做比较来统计实验数据。在分析的材料和位点较

多时,如何整合各胶板的数据以及保证数据的准确性是一个很棘手的问题。



A07. 未稀释; A08. 稀释 100 倍; A09. 稀释 150 倍; A12. 稀释 200 倍
A07. Undiluted; A08. Diluted one hundred fold; A09. Diluted one and half hundred fold; A12. Diluted two hundred fold

图 3 PCR 产物稀释成不同倍数后,毛细管电泳荧光检测的结果

Fig. 3 PCR products diluted different fold detected by capillary electrophoresis with fluorescence detection

变性 PAGE 银染检测法每次点样量为 5 μ L, 每次试验均必须保证重复 1 次, 每 5 μ L 上样时加入 1 μ L 变性上样缓冲液, 将粘壁、扩增时挥发等消耗因素考虑进去, 10 μ L 体系为最小体系。而毛细管电泳荧光检测法所需的样品量极少, 每次上样量为 1 μ L, 稀释 30 倍 PCR 产物, 将粘壁、扩增时挥发等消耗因素考虑进去, 5 μ L 体系为最小体系, 这样便极大节约了成本^[4,5]。郝晨阳等^[6]用多重 PCR SSR 荧光标记分析技术和常规的变性 PAGE 银染技术分析 5 000 份北方冬小麦样品、78 个位点后, 对这两种方法的费用做了比较, 结果表明, 完成 5 000 \times 78 个反应, 在不考虑仪器成本的前提下, 这两种方法的费用基本持平, 但毛细管电泳 SSR 荧光标记分析技术的效率显著高于变性 PAGE 银染检测法。

Pinar 等^[7]利用毛细管电泳荧光检测法在 50 h 内就完成了 198 份样品约 1 000 个位点的分析。毛细管电泳荧光检测系统建立的高通量、高效率、高精确定性的 DNA 自动分析技术, 尤其适用于大规模材料的分析研究。常规的变性 PAGE 银染检测法由于无需昂贵的实验仪器, 而且试剂成本也较为低廉, 在分析少量材料时显得经济适用, 尤其是 SSR 标记的筛选时。因为普通合成的引物能保存 3~5 年时间, 而荧光标记引物只能保存 1~2 年, 并且普通引物的合

成本远远低于荧光标记引物。建议在实验中可以将这两种方法有效地结合起来, 利用常规的变性 PAGE 银染检测法筛选 SSR 标记, 对入选的 SSR 标记采用荧光标记, 在分析少量材料时, 使用变性 PAGE 银染检测法, 对于大量材料的检测分析时, 用毛细管电泳荧光检测法来完成。

参考文献:

- [1] LI You_chun. Microsatellites: Genesis, Genomic Distribution, Function and Evolutionary Dynamics[J]. J of Sichuan Agri Uni, 2001, 19(4): 202–316.
- [2] 郭景伦, 赵久然, 尉德铭, 等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学, 1997, 15(2): 1–2.
- [3] 王风格, 赵久然, 郭景伦, 等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 606–607.
- [4] 庄启南, 张静, 熊晓燕, 等. 应用毛细管电泳技术进行高效、准确的微卫星位点自动基因组扫描[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(3): 253–256.
- [5] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 144–149.
- [7] Pinar Bor, Johnny Hindkjar, Steen Kolvræ. A new approach for screening for Y microdeletions: capillary electrophoresis combined with fluorescent multiplex PCR[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2003, 20(1): 46–51.