

技术主题

Technology Feature

基于棉花 SSR 的多色荧光标记检测技术

匡猛[✉], 杨伟华[✉], 许红霞[✉], 王延琴[✉], 周大云[✉], 冯新爱[✉], 张玉翠[✉], 苏畅[✉]

中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 安阳, 455000

✉ 通讯作者: yangwh@cricaas.com.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第31篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0031

收稿日期: 2010年12月10日

接受日期: 2011年03月10日

发表日期: 2011年03月21日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

匡猛等, 2011, 基于棉花 SSR 的多色荧光标记检测技术, 分子植物育种 Vol.9 No.31 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0031)

摘要 基于棉花 SSR 多色荧光标记技术拟构建我国棉花主栽品种 DNA 指纹数据库。分析了试验中出现的三种主要特异峰峰型: 尖锐单峰、连续多峰与 N+1 峰, 对棉花杂交种杂合峰的三种表现形式与荧光多重 PCR 组合建立的基本原则进行了总结。比较了多色荧光标记检测技术与常规聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测技术, 分析了各自的优缺点, 探讨了两种检测技术结合使用的方式。

关键词 棉花; SSR; 荧光检测; 多重 PCR

Multiplex Fluorescence Detection Technology Base on Cotton SSR Marker

Kuang Meng[✉], Yang Weihua[✉], Xu Hongxia[✉], Wang Yanqin[✉], Zhou Dayun[✉], Feng Xinai[✉], Zhang Yucui[✉], Su Chang[✉]

Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, 455000, P.R. China

✉ Corresponding author, yangwh@cricaas.com.cn; ✉ Authors

Abstract DNA fingerprinting database of cotton major cultivars in China was to be constructed based on SSR marker technology with fluorescent-labeled. Three main types of special peak were analyzed, including sharp peak, consecutive multi-peak and N+1 peak. Three heterozygous peak types of hybrid and the fundamental principle for establishing fluorescent multiplex PCR sets were summarized. Two detection technologies were compared between fluorescent system and conventional silver staining system, the virtues and defects were analyzed. The combinative way of the two detection technologies was discussed.

Keywords Cotton; SSR; Fluorescence detection; Multiplex PCR

研究背景

与其他分子标记相比, 以微卫星序列为基础的 SSR (Simple Sequence Repeat) 标记在 DNA 指纹鉴定上显示了独特的优越性: SSR 标记数量丰富, 覆盖整个基因组, 揭示的多态性高, 以孟德尔方式遗传, 呈共显性(匡猛等, 2009)。已在品种鉴定、基因组作图及遗传多样性研究等领域得到了广泛的应用 (Chen et al., 1997; Rödera et al., 1998; Struss and Plieske, 1998)。但基于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染技术的检测方法在分析的材料和位点较多时, 不同胶板间数据的整合与统一是一项很繁琐的工作, 数据结果的准确性也很难保证。笔者在构建我国棉花主栽品种 DNA 指纹数据库的研究工作中, 采用了

多色荧光标记检测技术, 以四种不同颜色的荧光染料标记在棉花 SSR 引物的 5' 端, 荧光检测器对标记有荧光染料的扩增产物进行信号采集, 并通过与各泳道的分子量内标进行比对, 可自动读取产物片段大小, 大大提高检测效率的同时保证了数据的准确性。王风格等构建了基于毛细管五色荧光检测系统的高通量多重 PCR 复合扩增体系用于玉米 DNA 指纹库的构建研究中, 并建立了相应的指纹库标准化规范 (Wang et al., 2007; 王风格等, 2007)。郝晨阳等采用荧光标记技术构建了我国普通小麦核心种质指纹库 (Hao et al., 2008)。然而, 基于棉花 SSR 的多色荧光标记检测技术构建我国棉花品种 DNA 指纹数据库的研究还未见相关报道。

本课题在已有的研究基础上, 采用36对SSR荧光标记引物构建我国主栽棉花品种的DNA指纹数据库, 对试验中出现的各种荧光峰型, 杂交种杂合峰的表现形式及多色荧光组合的建立进行了总结, 对多色荧光标记检测技术与常规聚丙烯酰胺凝胶电泳检测进行了比较分析。

1 结果与分析

1.1 主要荧光峰型表现形式

常规PAGE电泳银染检测中, 扩增产物以谱带的形式表现。而在荧光检测中, 扩增产物以荧光峰的形式表现, 理想的特异峰峰型应为尖锐单峰, 在本研究的36对荧光标记引物中, 15对标记扩增产物表现为尖锐单峰(图1A), 占41.7%, 其他标记的扩增产物特异峰主要表现为以下两种类型的荧光峰: ①连续多峰, 即在同一等位基因位置上出现相差2 bp的递减重复序列的峰, 这种峰型一般具有最高峰, 数据统计时只需取最高峰峰值即可(图1B)。表现为连续多峰的标记有11个, 占30.6%, 这种情况在常规PAGE电泳检测时表现为宽带或弥散带。分析这11个标记对应的重复序列均以两碱基为重复基序, 这可能是由于以两碱基为重复基序的标记在PCR扩增时容易造成滑移所致。②N+1峰, 即在同一位置出现了两个相差1 bp的两个峰, 且这两个峰的峰高差异不大, 且不同的扩增批次较高峰可能不固定(图1C)。表现为N+1峰的标记有10个, 占27.8%。这可能是由于普通Taq DNA聚合酶在扩增产物3'端自动添加一个碱基所造成的。在进行数据取值时一般统计较大峰值即可。而关于非特异峰的甄别, 主要是从峰型、峰高和峰面积三个方面对比同一批次中主要特异峰的表现形式, 如果相差较大则可判定为非特异峰。

1.2 杂交种的杂合峰表现形式

棉花作为异源四倍体作物, 其杂交种的基因型组合较二倍体作物的表现形式要相对复杂。对于具有双亲共显性标记的品种而言, 杂交种的杂合峰主要表现为以下三种类型: ①当亲本均表现为单峰时, 其对应杂交种的杂合峰表现为双峰(图2A); ②当亲本均表现为双峰时, 其对应杂交种的杂合峰表现为三峰(图2B); ③当亲本均表现双峰时, 其对应杂交种的杂合峰表现为四峰(图2C)。在实际检测中发现, 以上三种杂合峰表现形式以前两种为主, 第

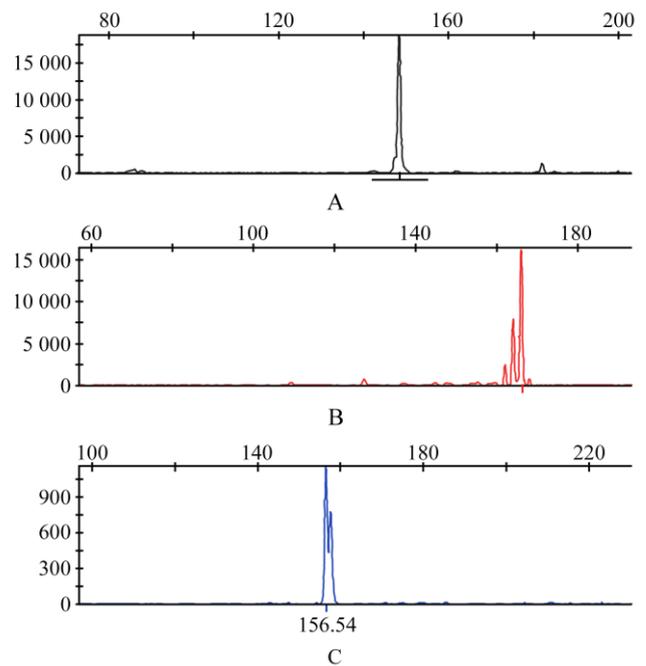


图1 三种主要特异峰峰型

注: A: 尖锐单峰; B: 连续多峰; C: N+1峰

Figure 1 Three main types of special peak

Note: A: Sharp peak; B: Consecutive multi-peak; C: N+1 peak

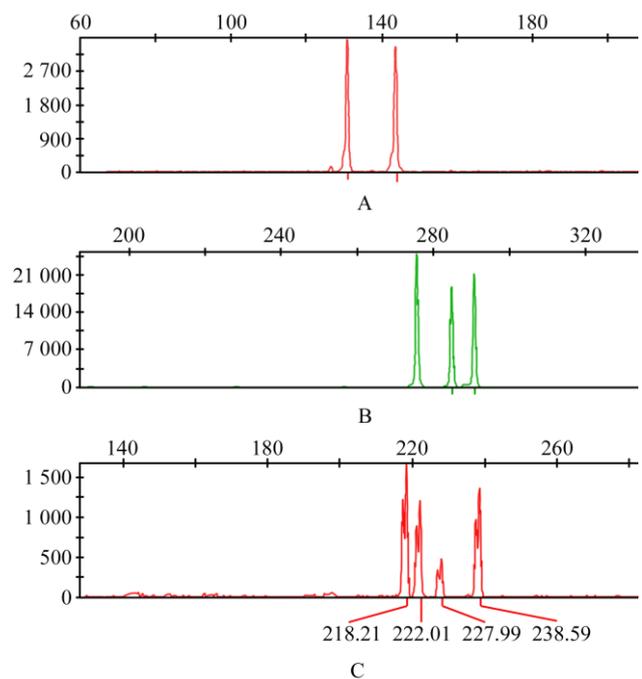


图2 三种杂交种杂合峰峰型

注: A: 双峰; B: 三峰; C: 四峰

Figure 1 Three heterozygous peak types of hybrid

Note: A: Double peak; B: Three peak; C: Four peak

三种情况出现的比例相对较低。如图2C所示, 当两个或两个以上等位基因同时扩增时, 多个特异峰的峰高可能会存在差异, 即表现为高低峰, 这种情况在常规PAGE电泳银染检测时表现为强弱带, 可能是由于不对称扩增造成。

1.3 荧光多重PCR组合的建立

通过预实验的反复摸索, 本研究对36对SSR引物进行了适当的组合, 分成了9个四重组合, 每个组合中的四个SSR引物分别以FAM、HEX、TMR和ROX四种不同颜色的荧光染料标记(见表1), 多重

PCR组合的建立主要依据如下基本原则: ①组合中各引物的扩增产物片段范围不能交叉; ②避开非特异扩增产物峰的相互影响; ③采用多色荧光标记; ④对于扩增效率较低的引物优先使用FAM进行标记(因FAM染料的荧光信号较其他染料要强); ⑤选择SSR左右引物中较好的5'端进行染料标记, 尽量避开二聚体结构。如图3所示为四色荧光组合六在一个样品上的毛细管电泳检测效果(橙色低峰均为Liz-500分子量内标)。

表1 供试引物名单及荧光多重组合

Table 1 Fluorescent-labeled primers and sets used

组合编号	引物编号	重复序列	标记荧光	组合编号	引物编号	重复序列	标记荧光
Set No.	Primer No.	Repeat sequences	Fluorescence labeled	Set No.	Primer No.	Repeat sequences	Fluorescence labeled
1	M11-1	CA	FAM	6	M23-1	GA	FAM
	M01	GCA	HEX		M05-1	CAG	HEX
	M11	AG	TMR		M16	CTT	TMR
	M04	GAC	ROX		M02	ACAT	ROX
2	M05	TC	FAM	7	M03-1	TTC	FAM
	M06-1	AAT	HEX		M13	AG	HEX
	M06	AT	TMR		M20	TC	TMR
	M17-1	AATT	ROX		M10	GA	ROX
3	M21	GA	FAM	8	M17	GATAGG	FAM
	M15-1	AC	HEX		M14	TG	HEX
	M19	AGA	TMR		M22	GT	TMR
	M13-1	GA	ROX		M03	GGC	ROX
4	M18	CA	FAM	9	M26	TG	FAM
	M12	GA	HEX		M24	GGCTTC	HEX
	M08	AC	TMR		M15	ATAC	TMR
	M25-1	GTA	ROX		M07	ATA	ROX
5	M23	GA	FAM				
	M21-1	AGC	HEX				
	M09	AG	TMR				
	M25	CA	ROX				

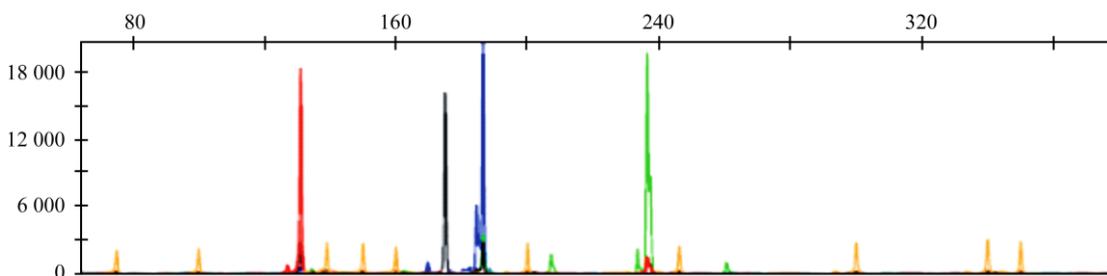


图3 四色荧光多重PCR组合的毛细管电泳检测效果

Figure 3 Four fluorescent multiplex PCR sets detected in capillary electrophoresis

2讨论

对常规PAGE电泳银染检测结果进行分析时, 各泳道样品扩增产物片段的大小需要与分子量Marker对比获得, 当样品泳道离Marker泳道相距较远或片段相差较小时, 实验数据会产生一定的误差, 尤其在分析的材料和位点较多时, 不同胶板间数据的整合与统是一项很繁琐的工作, 数据结果的准确性也很难保证。而在多色荧光检测系统中, 各毛细管泳道中均含有分子量内标, 具有荧光信号的扩增产物片段大小通过与其所在泳道分子量内标对比即可准确的获得其分子量大小, 最大程度上保证了数据结果的准确性, 且数据的读取均是通过仪器自动采集, 大大减少了读板时人为造成的误差。

为提高SSR检测效率, 适应高通量DNA指纹分析的需要, 1988年Chamberlain等(Chamberlain et al., 1988)首次提出多重PCR这一概念, 该方法已成功地应用到DNA检测的各个领域, 如缺失、突变、多态性分析、RT-PCR分析等, 在植物生物学的各个领域发挥着重要作用, 如在种质纯度鉴定(James et al., 2003)、病虫害检测(Dovas et al., 2002)、植物分子育种(Ma et al., 2003)等方面已成为重要而有效的研究方法。马雪霞等(马雪霞等, 2007)利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染技术, 选取6对棉花SSR引物, 配成三组两重PCR用于构建亚洲棉(*Gossypium arboreum*)遗传图谱, 对棉花SSR多重PCR技术进行了初步研究。而基于多色荧光标记构建多重PCR组合相比常规PAGE电泳银染检测方法要相对容易, 且可以实现通量更高的组合, 本研究基于四色荧光标记, 仅通过对SSR引物标记不同的荧光染料, 依据多重组合的基本原则, 实现了四重PCR组合, 若进一步研究同色标记引物间的多重组合, 则可在同一泳道中形成更多的组合, 进一步提高检测通量。

总而言之, 多色荧光检测系统具有高精度、高通量、自动化程度高的优点, 尤其适用于大规模材料的分析研究, 但购置与运行DNA遗传分析仪的所需费用很高, 荧光标记引物的合成成本较普通引物也高出很多, 一般实验室条件无法承受, 而常规的PAGE电泳检测由于无需昂贵的实验仪器, 在分析少量材料时显得经济适用。在实际检测过程中可将这两种方法有效的结合起来, 利用常规PAGE电泳

进行标记筛选或少量材料的分析, 对筛选获得的核心引物采用多色荧光检测系统进行大批量材料的高通量检测分析。

3材料与方法

3.1供试材料

所用材料为2007-2009年三年的全国棉种质量抽查项目获得的我国棉花主栽品种101份, 本单单位自育中棉所系列品种37份(包括4份常规种与11份成套杂交种), 合计138份(材料名单略)。

3.2 SSR引物

36对SSR引物为本课题通过前期大量筛选获得, 分布于棉花全基因组26条染色体, 每条染色体1~2对, 荧光引物的序列由北京阅微基因技术有限公司合成(见表1)。

3.3试验方法

DNA提取: 采用匡猛等(匡猛等, 2010)的单粒棉花种子DNA快速提取方法制备DNA样品, 每个品种6个重复。

20 μ L反应液其中包括: 2 μ L DNA模板, 0.15 mol/L SSR左右引物, 1 \times Buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 1 U *Taq* 聚合酶。PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性45s, 55 $^{\circ}$ C 退火45s (个别引物适当调整退火温度), 72 $^{\circ}$ C 延伸45s, 共32个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸12 min, 一个循环。

毛细管电泳五色荧光检测: 将PCR产物进行适当稀释后, 取1 μ L稀释液加8.5 μ L去离子甲酰胺、0.5 μ L Liz-500分子量内标, 于ABI 3730xIDNA分析仪上进行毛细管电泳检测。预电泳13 kV, 3 min; 1.5 kV进样10s; 电泳10 kV, 40 min。用GeneMapper软件对检测结果进行分析。

作者贡献

匡猛、杨伟华和许红霞是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王延琴、周大云及冯新爱完成数据分析, 匡猛完成论文初稿的写作; 苏畅和张玉翠参与实验设计, 试验结果分析; 杨伟华是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由中央级公益性科研院所基本科研业务费专项

重点项目(SJA0904)、农业部全国棉种质量抽查项目(农办农[2009]129号)和国家棉花产业技术体系项目共同资助。

参考文献

- Chamberian J.S., Gibbs R.A., and Ranier J.E., 1988, Deletion screening of the Duchene muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, *Nucleic Acids Res.*, 16(23): 11141-11156
- Chen X., Temnykh S., Xu Y., and Cho Y.G., 1997, Develop of a microsatellite framework map providing genome2 wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 95: 552-562
- Dovas C.I., Katis N.I., and Avgelis A.D., 2002, Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece, *Plant Disease*, 86(2): 1345-1349
- Hao C.Y., Dong Y.C., Wang L.F., You G.X., Zhang H.N., Gai H.M., Jia J.Z., and Zhang X.X., 2008, Genetic diversity and establishment of core collection in Chinese wheat genetic resources, *Chinese Science Bulletin*, 53(10): 1518-1526
- James D., Schmidt A.M., Wall E., Green M., and Masri S., 2003, Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis, *Agric. Food Chem.*, 51(20): 5829-5834
- Kuang M., Yang W.H., Xu H.X., Wang Y.Q., Zhou D.Y., Feng X.A., and Wang J.F., 2009, Research progress of molecular marker technology applied in cotton variety identification, *Mianhua Xuebao (Cotton Science)*, 21(4): 330-334 (匡猛, 杨伟华, 许红霞, 王延琴, 周大云, 冯新爱, 王俊芳, 2009, 分子标记技术在棉花品种鉴定上的研究进展, *棉花学报*, 21(4): 330-334)
- Kuang M., Yang W.H., Xu H.X., Wang Y.Q., Zhou D.Y., and Feng X.A., 2010, A rapid method of DNA extraction from single cotton seed, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 8(4): 827-831 (匡猛, 杨伟华, 许红霞, 王延琴, 周大云, 冯新爱, 2010, 单粒棉花种子DNA快速提取方法, *分子植物育种*, 8(4): 827-831)
- Ma W., Zhang W., and Gale K.R., 2003, Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat, *Euphytica*, 134(1): 51-60
- Ma X.X., Wang K., Guo W.Z., and Zhang T.Z., 2007, Multiple SSR-PCR Techniques and their Application in Cotton, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 5(5): 648-654 (马雪霞, 王凯, 郭旺珍, 张天真, 2007, 棉花 SSR多重PCR技术的初步研究和利用, *分子植物种*, 5(5): 648-654)
- Rödera M.S., Korzuna V., Wendehakea K., Plaschkea J.S., Tixierb M.H., Leroyb P., and Ganala M.W., 1998, A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149: 2007-2023
- Struss D., and Plieske J., 1998, The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations, *Theor. Appl. Genet.*, 97: 308-315
- Wang F.G., Zhao J.R., Dai J.R., Guo J.L., Yuan Y.P., Wang L., Yi H.M., Sun S.X., and Lv B., 2007, Criteria for the construction of Maize DNA fingerprint database, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 5(1): 128-132 (王风格, 赵久然, 戴景瑞, 郭景伦, 原亚萍, 王璐, 易红梅, 孙世贤, 吕波, 2007, 玉米品种DNA指纹数据库构建的标准化规范, *分子植物育种*, 5(1): 128-132)
- Wang F.G., Zhao J.R., Dai J.R., Yi H.M., Kuang M., Sun Y.M., Yu X.Y., Guo J.L., and Wang L., 2007, Selection and development of representative simple sequence repeat primers and fluorescent multiplex SSR sets for high throughput automated genotyping in maize, *Chinese Science Bulletin*, 52(23): 215-223



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>