

大豆 SSR 检测体系的优化研究

宋显军, 谢甫绋, 张 伟, 曹 萍, 郭玉华

(沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161)

摘要 以大豆为试材, 研究了大豆 SSR 检测体系中 PCR 扩增的各主要成分对检测结果的影响, 确立了适宜的退火温度和反应体积, 改进了 PCR 扩增程序和银染方法, 进一步优化了适用于大豆的 SSR 检测体系。优化后的 SSR 反应体系为: $10\times$ Buffer $1.00\mu\text{L}$ 、 $2.00\text{ ng}/\mu\text{L}$ 模板 DNA、 $0.15\mu\text{mol/L}$ SSR 引物、 $150.00\mu\text{mol/L}$ dNTPs、 0.50 U Taq 酶、 2.00 mmol/L Mg^{2+} , 加 ddH_2O 至终体积 $10.00\mu\text{L}$ 。优化的 PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 3 min ; 94°C 变性 25 s , 47°C 退火 25 s , 72°C 延伸 30 s , 共 35 个循环; 72°C 延伸 5 min , 4°C 保存。优化后的检测体系更为经济有效。

关键词 大豆; SSR; 检测体系; 优化

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0036-05

OPTIMIZATION OF SSR DETECTION SYSTEM IN SOYBEAN

SONG Xian-jun, XIE Fu-ti, ZHANG Wei, CAO Ping, GUO Yu-hua

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract Effects of major components of PCR amplification on soybean SSR detection results were studied. A SSR detection system suitable for soybean was established with improved PCR reaction system, PCR program and silver staining method. The optimized PCR amplification system was $10\times$ Buffer $1.00\mu\text{L}$, $2.00\text{ ng}/\mu\text{L}$ template DNA, $0.15\mu\text{mol/L}$ SSR primer, $150.00\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.50 U Taq enzyme, 2.00 mmol/L Mg^{2+} , adding ddH_2O to terminal volume $10.00\mu\text{L}$. The optimized PCR cycles started at 94°C (3 min), followed by 35 cycles of 25 s at 94°C , 25 s at 47°C and 30 s at 72°C , and then extended 5 min at 72°C . The optimized soybean SSR detection system was proved more economic and useful.

Key words Soybean; SSR; Detection system; Optimization

简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSR) 是指由 1~5 个核苷酸组成的短序列首尾相连重复多次构成的一段 DNA, 又称微卫星 (Microsatellite), 广泛存在于真核生物基因组中。同其它 DNA 分子标记相比, SSR 标记具有以下优点: ①数量丰富, 覆盖整个基因组; ②通常为共显性遗传; ③重复

性、稳定性较好; ④对 DNA 数量及质量要求不高。因此 SSR 标记技术很快在动植物的遗传分析中得到了广泛的应用。

SSR 标记技术目前已广泛用于遗传作图、遗传多样性分析、系谱与进化关系探讨、基因定位、标记辅助育种 (MAS) 等各个领域^[1~7]。SSR 标记虽具

收稿日期: 2006-04-25

基金项目: 本研究得到辽宁省教育厅科技项目 (05L3781) 和辽宁省科学技术计划项目 (2006201008) 的资助

作者简介: 宋显军 (1980-), 男, 在读硕士, 从事大豆数量遗传研究。E-mail: mrsong1192003@yahoo.com.cn

通讯作者: 谢甫绋教授, 博士生导师。

有试验程序简单、具有物种及染色体组特异性等优点,但因其检测过程中受诸多因素的影响,从而给研究工作带来诸多不便。因此,建立一套稳定可靠、经济实用的 SSR 检测体系变得至关重要。

本研究以沈阳农业大学大豆课题组选育的沈农 6 号(SN6)和美国俄亥俄州立大学选育的 OhioFG1 (FG1)及由它们构建的用于特定农艺性状 QTLs 定位的 92 个重组自交系为研究材料,从反应体系的主要成分、PCR 扩增程序、电泳检测以及银染等环节对 SSR 技术进行了综合优化,最终建立一套完善的适用于大豆的 SSR 检测体系,为应用该技术进行大豆分子遗传图谱的构建、基因定位和标记辅助育种(MAS)提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 大豆材料 本课题组选育的具有长花序短果枝特异株型的沈农 6 号(SN6)大豆,美国俄亥俄州立大学 Steven S. K. Martin 教授提供的 OhioFG1,及由 SN6×FG1 构建的用于特定农艺性状 QTL 定位的 92 个 F_7 重组自交系。

1.1.2 引物 根据 Cragen 实验室发表的微卫星引物序列^[8],由 Soybase 网址获得。选用不同连锁群上的 400 对 SSR 引物,由上海生工生物工程公司合成。本文涉及的引物有 GMABAB、Sat_084、Satt082、Satt207、Satt_136、Satt230、Satt192、Satt367、Satt181、Satt279、GMRUBP 和 Satt540。

1.1.3 主要生化试剂 Marker、RNaseA、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、无菌超纯水、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Repel-Silance、Bind-Silance 和 TEMED 等均购自上海生工生物工程公司或北京天为时代。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 参照 Rogers 等^[9]的方法,略有改进。提取的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶和 UV2000 紫外分光光度计检测,DNA 基本无降解,测定的 $OD_{260/280}$ 的比值在 1.8~2.0 之间,适合于 SSR 扩增。

1.2.2 SSR 反应体系 先采用 20.00 μ L 反应体系进行 PCR 扩增,基本组成为:10×Buffer(含 1.50mmol/L $MgCl_2$)、250.00 μ mol/L dNTPs、1.00 U Taq 酶、0.10 μ mol/L SSR 引物、4.00 ng/ μ L 模

板 DNA,加 ddH₂O 至终体积 20.00 μ L。

在不改变其它成分浓度的条件下,分别对反应体系各组成成分进行浓度或用量梯度试验,比较不同处理对扩增结果的影响。

在确定各组分的最适浓度后,总反应体积设:25.00 μ L、20.00 μ L、15.00 μ L 和 10.00 μ L 4 个处理,比较不同反应体积对扩增结果的影响。

1.2.3 PCR 扩增程序 PCR 扩增反应在 TECHNE 公司生产的 TC-512 梯度 PCR 仪上进行,基本程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30s,47℃退火 30s,72℃延伸 30s,共 35 个循环;72℃延伸 10min,4℃保存。并利用 PCR 仪的梯度功能,对 10 对引物进行梯度扩增,寻找不同引物的最适退火温度。

确定对不同引物均较适宜的退火温度后,参照刘学义^[10]和关荣霞^[11]等方法后,设以下三个反应程序:①94℃预变性 3min;94℃变性 25s,47℃退火 25s,72℃延伸 30s,共 35 个循环;72℃延伸 5min,4℃保存。②94℃预变性 4 min;94℃变性 45s,47℃退火 45s,72℃延伸 45s,共 35 个循环;72℃延伸 5min,4℃保存。③94℃预变性 5min;94℃变性 1min,47℃退火 1min,72℃延伸 1min,共 35 个循环;72℃延伸 10min,4℃保存。比较不同反应时间对扩增结果的影响。

1.2.4 PCR 产物检测 电泳在 BIO-RAD 公司生产的 Sequi-Gen DNA 测序电泳槽上进行,PCR 产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶上分离,预电泳 30min 后上样,根据分子量大小,70W 恒功率电泳 1~2h。在参照 Sanguinetti 等^[12]的基础上采用本实验室改进的快速银染方法进行银染:染色液(10%乙醇、0.5%乙酸和 0.2% $AgNO_3$)染色 5 min;水洗 30s;显影液(1.5% NaOH 和 0.4% 甲醛)显影 5~10min;0.75% Na_2CO_3 定影。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应体系的优化

以大豆 SN6 的 DNA 为模板,选用 GMABAB、Sat_084 和 Satt082 三对引物,研究了 PCR 反应体系中的模板 DNA、引物、dNTPs、Tag 酶、 Mg^{2+} 等成分对 SSR 扩增结果的影响。

2.2.1 模板浓度对 SSR 扩增结果的影响 对本研究所设的 6 个模板浓度(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00ng/ μ L),3 个引物反应不尽一致(图 1 中

1~6泳道)。引物 GMABAB 和 Sat_084 的条带随模板浓度的增加而变深,而 Satt082 在 0.25ng/ μ L 和 0.50ng/ μ L 时无条带,然后条带清晰,到 8.00ng/ μ L 时减弱。相对而言,模板浓度为 2.00ng/ μ L 时 3 个引物扩增效果最好。

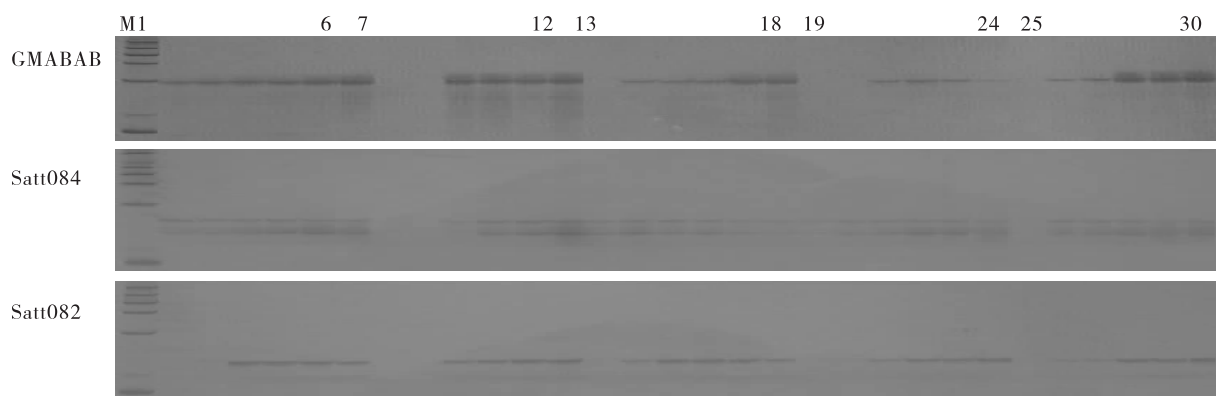
2.2.2 引物浓度对 SSR 扩增结果的影响 随着引物浓度的增加(0.025、0.05、0.10、0.15、0.20、0.30 μ mol/L),3 个引物扩增条带的变化趋势基本一致(图 1 中 7~12 泳道),在 0.025 μ mol/L 和 0.05 μ mol/L 时均无条带,然后条带逐渐变深,当引物浓度达 0.15 μ mol/L 时,条带清晰。

2.2.3 dNTPs 浓度对 SSR 扩增结果的影响 对应于 6 个 dNTPs 浓度(25.00、50.00、150.00、

250.00、350.00、450.00 μ mol/L),3 个引物表现截然不同,GMABAB 条带逐渐加深,Sat_084 逐渐减弱,而 Satt082 先加深再减弱(图 1 中 13~18 泳道)。综合比较,dNTPs 浓度为 150.00 μ mol/L 时扩增效果最好。

2.2.4 Tag 酶用量对 SSR 扩增结果的影响 3 个引物对 Tag 酶用量梯度(0.125、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00U)反应不尽一致(图 1 中 19~24 泳道),当 Tag 酶用量为 0.125U 和 0.25U 时,引物 GMABAB 和 Satt082 无条带;当 Tag 酶用量为 2U 时,引物 GMABAB 和 Sat_084 条带变弱;当 Tag 酶用量为 1U 时,效果最好。

2.2.5 Mg^{2+} 浓度对 SSR 扩增结果的影响 对应 6



1~6: Template 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00ng/ μ L; 7~12: Primer 0.025、0.05、0.10、0.15、0.20、0.30 μ mol/L; 13~18: dNTPs 25.00、50.00、150.00、250.00、350.00、450.00 μ mol/L; 19~24: Tag 0.125、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00U; 25~30: Mg^{2+} 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L; M: Marker.

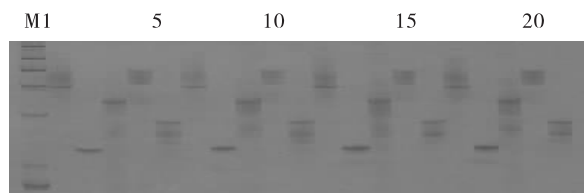
图 1 大豆 SSR 反应体系不同组分对扩增结果的影响

Fig.1 Effects of different PCR components on SSR amplification of soybean

个 Mg^{2+} 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L),引物 GMABAB 和 Satt082 的条带逐渐加深,而引物 Sat_084 反应不敏感,但当 Mg^{2+} 浓度为 2.0mmol/L 时,3 个引物的条带均清晰稳定。

2.2.6 不同反应体积对 SSR 扩增结果的影响 在确定上述各组分的最适浓度后,以 SN6 为模板,随机选取 Satt207、Satt082、Satt_136、Satt230 和 Satt_084 共 5 对引物,总反应体积设: 25.00 μ L、20.00 μ L、15.00 μ L 和 10.00 μ L 4 个处理,比较相同组分浓度下不同反应体积对扩增结果的影响(如图 2)。结果表明:不同反应体积对扩增结果无明显影响,因而确定 10.00 μ L 为最经济实用的反应体积。

综上所述,优化后的 SSR 反应体系为: 10 \times Buffer 1.00 μ L、2.00 ng/ μ L 模板 DNA、0.15 μ mol/L



1~5: 25.00 μ L; 6~10: 20.00 μ L; 11~15: 15.00 μ L; 16~20: 10.00 μ L; M: Marker; 1,6,11,16: Satt207; 2,7,12,17: Satt082; 3,8,13,18: Satt_136; 4,9,14,19: Satt230; 5,10,15,20: Satt_084

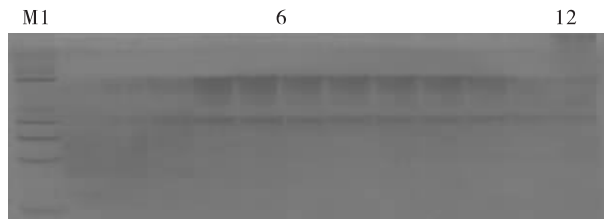
图 2 不同反应体积对 SSR 扩增结果的影响

Fig.2 Effects of different reaction volume on SSR results

SSR 引物、150.00 μ mol/L dNTPs、0.50 U Taq 酶、2.0mmol/L Mg^{2+} ,加 ddH₂O 至终体积10.00 μ L。

2.2 PCR 扩增程序的优化

2.2.1 最适退火温度的确定 为确定引物与模板组合的最适退火温度,本试验选用 Satt192、Satt_136、Satt367、Satt230、GMRUBP、Satt279、Satt_084、GMABAB、Satt082 和 Satt540 共 10 对引物,以 FG1 为模板,设计了梯度 PCR 反应,退火温度梯度依次为:41.8℃、42.2℃、43.4℃、44.8℃、46.0℃、47.3℃、48.6℃、50.1℃、51.4℃、52.8℃、53.6℃、54.1℃。扩增后电泳结果表明,对于引物 Satt192 和 Satt279,各退火温度下均有扩增产物,其中退火温度 41.8℃、42.2℃、43.4℃ 条带模糊不清且非特异条带多,46.0℃ 和 47.3℃ 处理条带最清晰,然后随温度增加扩增量减少条带变弱,到 53.6℃ 和 54.1℃ 时条带又模糊不清(图 3)。而引物 Satt_136、Satt_084 和 GMABAB 的适宜退火温度大于 47.0℃,引物 Satt367 的适宜退火温度小于 47.0℃,引物 Satt230、Satt082 和 Satt540 对退火温度反应不敏感。表明对于同一引物,退火温度不同得到的扩增结果也不同。不同引物有不同的适宜退火温度,综合比较,47.0℃ 对不同引物均较适宜,因而确定为最适的退火温度。



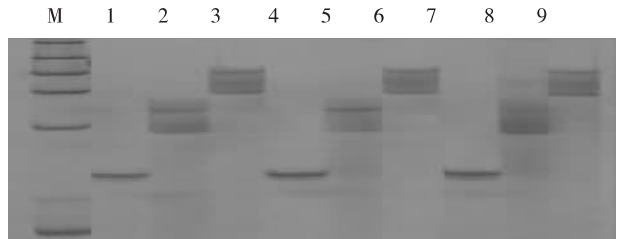
1~12; Annealing temperatures are 41.8℃、42.2、43.4、44.8、46.0、47.3、48.6、50.1、51.4、52.8、53.6、54.1℃ respectively

图 3 不同退火温度下引物 Satt192 对 PCR 扩增的结果
Fig. 3 Results of PCR under different annealing temperatures amplified by Satt192

2.2.2 PCR 程序选择 选用后代材料‘RIL6’为模板,用引物 Satt082、Sat_136 和 Satt230 进行 SSR 扩增。第一种 SSR 扩增程序由于缩短了变性、复性、延伸时间,大约只需 1.5h;第二种 SSR 扩增程序约需 2.5h;第三种所需时间最长,大于 3h。比较三种反应程序对大豆的 SSR 扩增效果的影响(如图 4),可见缩短反应时间对大豆 SSR 谱带无明显影响。最终确定第一种程序为更为省时有有效的大豆 PCR 反应程序。

2.3 PCR 产物的电泳与检测

由于琼脂糖凝胶成本相对较高,EB 引起的污染



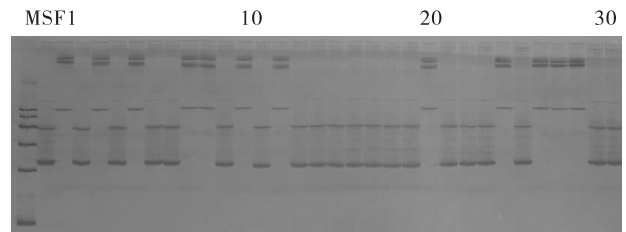
1~3;program 1; 4~6;Program 2; 7~9;Program 3; M; Marker; 1, 4, 7; Satt082; 2, 5, 8; Sat_136; 3, 6, 9; Satt082

图 4 不同反应程序的 SSR 扩增结果

Fig. 4 Amplification results of different PCR program's 较大,因此,SSR 检测技术以聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染更为有利,本试验采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶对扩增产物进行电泳,并用本实验室改进的方法进行银染,获得了较好的检测效果(如图 1、图 2、图 3、图 4)。

2.4 体系稳定性鉴定

本实验室正在利用 SSR 标记对由 SN6×FG1 得到的 92 个 F₇ 重组自交系群体进行大豆遗传图谱的构建及重要农艺性状的 QTLs 定位。根据本研究所优化 SSR 检测体系,从 400 对引物中筛选出 180 对引物,对群体进行了 SSR 分析,结果大多数引物都能扩出清晰可辨的条带,且分辨率高、重复性好(图 5)。



M: Marker; S: SN6; F: OhioFG1; 1~30: Some RILs of F₇ progenies

图 5 引物 Satt181 对部分 F₇ 重组自交系的 SSR 扩增结果
Fig. 5 SSR products amplified by Satt181 in some RILs of F₇ progenies

3 讨论

PCR 反应是 SSR 检测过程中的一个重要环节,反应体系中的模板 DNA、引物、dNTP、Tag 酶以及 Mg²⁺ 等各组成成分均影响扩增结果。同时,不同作物的最佳 PCR 反应所需的各组成成分的适宜浓度不同。因此在具体某一作物的 PCR 反应过程中,必

须确定各组成成分的适宜浓度,以提高 PCR 反应的效率,并减少非特异性扩增。本试验对大豆 SSR 检测体系中 PCR 反应各组成成分的适宜浓度和反应体积进行了研究,优化后的 SSR 反应体系为: $10\times$ Buffer $1.00\mu\text{L}$ 、 $2.00\text{ ng}/\mu\text{L}$ 模板 DNA、 $0.15\mu\text{mol/L}$ SSR 引物、 $150.00\mu\text{mol/L}$ dNTPs、 0.50 U Taq 酶、 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 加 ddH_2O 至终体积 $10.00\mu\text{L}$ 。目前,已有一些植物的 PCR 反应体积为 $10.00\mu\text{L}$,而大豆的 PCR 反应体积只有 $25.00\mu\text{L}$ 和 $20.00\mu\text{L}$ 的报道,本研究用优化的反应体系将反应体积确定为 $10.00\mu\text{L}$,极大地降低了成本。

在 SSR 扩增中,每对引物都有其最适宜的退火温度(T_m), T_m 的高低对扩增结果也有较大影响。本试验用 12 个不同温度对 10 对引物进行梯度扩增,发现退火温度太低时,扩增量小且有非特异性扩增产物,电泳检测条带不清晰,温度过高则扩增量减少,甚至有可能导致无扩增产物,并且不同引物对温度梯度的反应不同,本研究经综合比较,将 T_m 确定为 47°C ,同 Soybase 网址推荐的 T_m 值一致。研究发现,在一定条件下,PCR 反应时间的长短对扩增结果无明显影响。因此,将 PCR 程序优化为: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 25s, 47°C 退火 25s, 72°C 延伸 30s,共 35 个循环; 72°C 延伸 5min, 4°C 保存。

PCR 扩增产物的染色与鉴定是 SSR 检测体系的另一重要环节。因为琼脂糖凝胶成本相对较高,EB 引起的污染较大,分辨率较低,而聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率极高(可分辨出长度仅差 1bp 的 DNA 片断),所以本研究选用聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,并采用改进的快速银染法,进一步简化了操作、降低了成本。

参 考 文 献

- [1] 宛煜嵩,王珍,肖英华,等. 一张含有 227 个 SSR 标记的大豆遗传连锁图[J]. 分子植物育种,2005, 3(1): 15—20.
- [2] Brown G L, Guedira J A, Nelson R L, et al. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers [J]. Crop Science,2000, 40: 815—823.
- [3] 刘峰,东方阳,邹继军,等. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传变异性分析[J]. 遗传学报,2000,27(7):628—633.
- [4] 吴晓雷,王永军,贺超英,等. 大豆重要农艺性状的 QTL 分析[J]. 遗传学报, 2001,28(10):947—955.
- [5] Zenglu Li, Richard F, Warren E, Wilson, et al. Molecular mapping genes conditioning reduced palmitic acid content in N87-2122-4 soybean [J]. Crop Science,2002, 42:373—378.
- [6] Matthew D, Smalley, Walter R F, et al. Quantitative trait loci for soybean seed yield in elite and plant introduction germplasm [J]. Crop Science,2004, 44: 436—442.
- [7] Burnham K D, Dorrance A E, VanToai T T, et al. Quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean [J]. Crop Science,2003, 43: 1610—1617.
- [8] Cregan P B, Jarvik T, Bush A L, et al, An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Science,1999, 39:1464—1490
- [9] Roders M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat[J]. Genetics,1998,149:2007—2023.
- [10] 刘学义,宛煜嵩,王珍,等. 大豆重组自交系 Jinf 的构建及主要农艺性状和 SSR 基因型分析[J]. 分子植物育种,2003,1(2): 157—177.
- [11] 关荣霞,刘燕,刘章雄,等. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种,2003,1(3):357—360.
- [12] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques,1994,17(5):914—921.