

文章编号: 1005-0906(2003)04-0003-04

中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究

Ⅲ. 多重 PCR 技术在玉米 SSR 引物扩增中的应用

王凤格¹, 赵久然¹, 余花娣^{1,2}, 郭景伦¹,
陈刚¹, 廖琴³, 孙世贤³, 陈如明⁴

(1. 北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089; 2. 河北农业大学, 河北 保定 071001;

3. 全国农技推广服务中心, 北京 100026; 4. 农业部植物新品种保护办公室, 北京 100026)

摘要: 根据 21 对玉米 SSR 引物扩增片段大小范围组成不同的引物组合进行多重 PCR 反应的研究。在与单一 PCR 相同的反应条件下, 47 个两重 PCR 组合出现 5 种不同的扩增情况, 其中 30 个组合扩增正常; 10 个三重 PCR 组合中有 9 个组合扩增正常; 两个四重 PCR 组合中有 1 个扩增正常, 这些筛选出的正常扩增的组合可应用于今后玉米 DNA 指纹库构建研究中。研究表明, 应用与单一 PCR 完全相同的反应条件, 大部分能够获得正常扩增的多重 PCR 组合, 在此基础上提出了简化的多重 PCR 优化程序。

关键词: 玉米; SSR; 多重 PCR; DNA 指纹库

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Series of Research on Establishing DNA Fingerprinting Database of Chinese New Maize Cultivars

Ⅲ. Multiplex PCR Applied in Maize SSR Amplification

WANG Feng-ge¹, ZHAO Jiu-ran¹, SHE Hua-di^{1,2}, GUO Jing-lun¹,
CHEN Gang¹, LIAO Qin³, SUN Shi-xian³, CHEN Ru-ming⁴

(1. *Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China;*

2. *Heibei Agricultural University, Heibei Baoding 071001, China;*

3. *The Whole Country's Service Center on Agricultural Technique Popularization, Beijing 100026, China;*

4. *Plant New Variety Protection Office, Agricultural Ministry, Beijing 100026, China)*

Abstract: Twenty-one pairs of maize SSR primers were used for building various multiplex-PCR-sets according to their amplified bands' size range. Under the same conditions as single PCR reaction, 47 two-PCR-sets appeared five different amplification behaviors, of which 30 were amplified normally. Nine of 10 three-PCR-sets and one of 2 four-PCR-sets were amplified normally. These screened normally-amplified multiplex-PCR-sets could be applied in maize DNA fingerprinting database. The results showed that most multiplex-PCR-sets could be amplified normally under just the same conditions as single PCR. Based on our experience, we proposed a simplified protocol for developing a multiplex PCR assay.

Key words: Maize; SSR; Multiplex PCR; DNA fingerprinting database

多重 PCR 是指在同一反应体系中同时进行多个位点的特异性扩增的一类特殊的 PCR 反应类型,

具有快速高效、成本低廉等优点, 适应高通量 DNA 指纹分析的需要。自 1988 年 Chambercian 等^[1]首次提出这一概念以来, 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。不同的研究者在多重 PCR 反应的优化方面进行了大量的研究, 并提出了一些优化策略^[2~4], 包括引物序列、反应体系、反应体积、循环参数等因素

收稿日期: 2003-08-05

基金项目: 农业部及北京市重点科技项目(H030730010690)

作者简介: 王凤格(1975-), 女, 硕士, 主要从事玉米分子生物技术应用研究。Tel:010-51503588, 88439751 E-mail: Jiuran@public.bta.net.cn

的调整原则。但总的来说,优化程序比较繁琐,不同的研究获得的优化程序不具有通用性,因此,大大降低了多重 PCR 的适用性,限制了多重 PCR 的应用范围。本研究主要探讨在单一 PCR 扩增已经成功的情况下,应用与单一 PCR 相同的反应条件,能否获得正常扩增的多重 PCR 组合,为简化多重 PCR 的优化程序提供有益的参考,提高玉米 DNA 指纹库构建的效率。

1 材料与方法

1.1 供试材料

玉米材料来自赵久然等^[5]研究中的部分玉米自交系。

1.2 SSR 引物

表 1 供试 21 对 SSR 引物信息

No.	Primer name	Bin	Rep seq.	Allel no.	PIC
1	bnlg439	1.03		6	0.58
2	phi402893	2.00	AGC	5	0.53
3	bnlg125	2.02		5	0.72
4	phi053	3.05	ATAC	4	0.56
5	umc1399	3.07	(CTAG)5	4	0.54
6	bnlg197	3.07	AAAC	6	0.71
7	phi072	4.01	AAAC	4	0.66
8	umc1294	4.02	(GAG)4	4	0.54
9	nc004	4.03	AG	5	0.24
10	umc1559	4.09	(ATG)5	3	0.45
11	bnlg589	4.11		3	0.64
12	bnlg238	5.06		6	0.80
13	bnlg161	6.00		8	0.85
14	phi126	6.00	AG	8	0.82
15	phi116	7.06	ACTG/ACG	5	0.57
16	bnlg240	8.05		5	0.77
17	bnlg162	8.05		6	0.68
18	phi080	8.08	AGGAG	6	0.79
19	phi065	9.03	CACTT	4	0.52
20	bnlg619	9.07		6	0.83
21	umc1196	10.07	CACACC	4	0.68

根据已有研究基础^[5]和进一步的研究结果,确定了 21 对多态性和稳定性较好的 SSR 引物用于多重 PCR 研究(表 1)。引物由上海生工合成。引物的选择与分组按照以下原则:①每种引物在选定的退火

温度作单一 PCR 时能得到有效扩增;②同一组合的引物扩增片段大小的范围不能重叠;③尽量避免同一组合的引物序列形成引物寡聚体及引起竞争性扩增。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取

采用改进的郭景伦等^[6]的玉米单粒种子 DNA 快速提取法。

1.3.2 多重 PCR 反应

将 PCR 反应液装入 96 孔微量板中,在 PTC-100 PCR 仪(MJ Research, Watertown, MA)上进行扩增。每组 2~4 对 SSR 引物。20 μ L 反应液中包括:10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L 4dNTP, 每对 SSR 引物均为 0.25 μ mol/L, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 2 μ L DNA 模板。反应程序:94℃预变性 5 min, 一个循环;94℃变性 40 s, 60℃退火 35 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环;72℃延伸 5 min。

1.3.3 电泳检测

PCR 产物变性后在 4.5%测序胶上分离。预电泳 85 W, 20 min;电泳 80 W, 40 min。银染:10%冰醋酸固定 3 min;双蒸水快速漂洗 1 次,不超过 10 s;0.2% AgNO₃ 溶液染色 5 min;显影液(3%NaOH, 0.5%甲醛)显影;10%冰醋酸定影。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的分组

根据引物扩增片段大小范围,按由大到小的顺序排列如下(图 1),其中位于同一排的为扩增片段大小范围相似或交叉部分较大的引物,位于同一排的引物不进行多重 PCR 组合,只有位于不同排的引物才可能组合到一起。在此基础上进行 2~4 重引物的组合扩增。

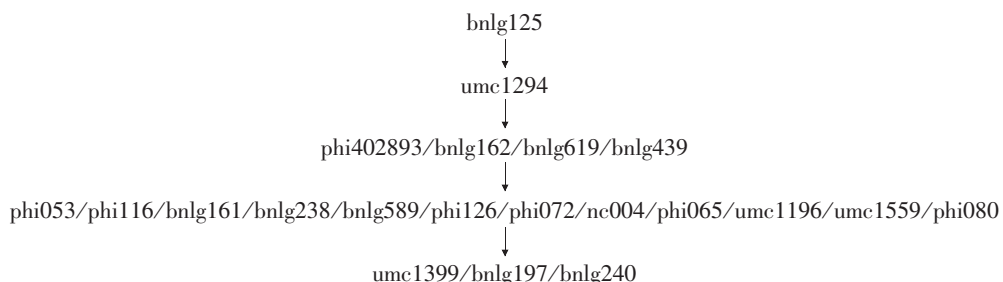


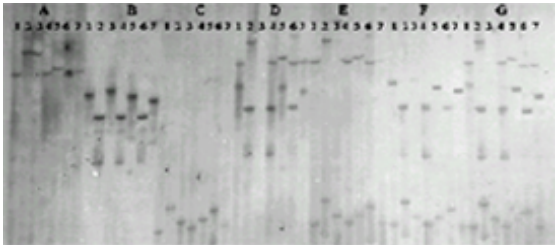
图 1 21 对引物的扩增片段大小范围排序(由大到小)

2.2 多重 PCR 组合扩增结果

选取若干引物组合,进行了两重、三重及四重 PCR 扩增,扩增条件与单一 PCR 完全相同,为确定多重 PCR 中扩增的带型与对应的单一扩增的带型是否一致,同时对组合中的引物进行了单一 PCR 扩增,并在同一测序胶上进行电泳检测。由表 2 可见,47 个两重 PCR 组合扩增结果出现五种情况:两对引物均扩增正常(30 个)、一对引物扩增正常而另一对扩增带弱(8 个)、两对引物均扩增带弱(4 个)、一对引物扩增正常而另一对未扩增(3 个)、一对引物扩增正常而另一对的扩增带型与单一扩增时不同(2 个)。选取前两种情况的部分引物进行三重 PCR,在引物 umc1294/bnlg439 与其它引物组成的 8 个三重组合和引物 bnlg162/umc1399 与其它引物组成的 2 个三重组合中,除组合 umc1294/bnlg439/bnlg240 外,其它 9 个组合均得到正常扩增。值得注意的是,在 bnlg439/umc1196 两重 PCR 组合中,umc1196 扩增带弱,而在 umc1294/bnlg439/umc1196 三重 PCR 组合中,三者均得到正常扩增;在 bnlg162/bnlg589 两重 PCR 组合中,bnlg162 和 bnlg589 均扩增带弱,而在 bnlg162/bnlg589/umc1399 三重 PCR 组合中,三者均得到正常扩增;相反,在 bnlg439/bnlg240 两重 PCR 组合中,bnlg240 扩增正常,而在 umc1294/bnlg439/bnlg240 三重 PCR 组合中,bnlg240 扩增带弱。这似乎表明,不同引物间的相互关系对扩增具有

一定的影响,因此,通过简单的增减不同引物的浓度并不一定必然改善扩增效果。在三重 PCR 扩增的基础上,选取扩增正常的引物组合 umc1294/bnlg439/umc1399 分别与引物 phi072 和 bnlg589 组成两个四重 PCR 组合,结果组合 umc1294/bnlg439/umc1399/phi072 得到正常扩增,而组合 umc1294/bnlg439/umc1399/bnlg589 中,bnlg589 扩增带弱。这些扩增正常的多重 PCR 组合可直接应用到今后玉米 DNA 指纹库构建等研究中。

图2显示部分筛选结果:引物umc1294、bnlg439、umc1399 的单一、两重(umc1294/bnlg439、umc1294/umc1399、bnlg439/umc1399)及三重(umc1294/bnlg439/umc1399)PCR 组合均获得正常扩增,三对引物的扩增片段大小范围没有交叉,在两重和三重组合中的带型与分别单独扩增时完全一致。



A: 引物 umc1294; B: bnlg439; C: umc1399; D: umc1294/bnlg439; E: umc1294/umc1399; F: bnlg439/umc1399; G: umc1294/bnlg439/umc1399。1~7 为 7 个不同玉米自交系 DNA。

图 2 多重 PCR 筛选的部分电泳结果

表 2 多重 PCR 组合扩增结果

组合类型	引物组合	bnlg125	umc1294	phi402893	phi053	phi116	bnlg161	bnlg238	bnlg589	phi126	phi072	nc004	phi065	umc1196	umc1559	phi080	umc1399	bnlg197	bnlg240
两重	bnlg439	+	+	+	+/-	+	+	+R	+R	R/+	+	+	+	+R	+	+R	+	+R	+
三重	umc1294/bnlg439						+				+	+	+	+	+		+		++/R
四重	umc1294/bnlg439/umc1399								+++ /R		+								
两重	bnlg162					+	R	+	R		+	+	+	+	+	+	+	R	R
三重	bnlg162/umc1399								+		+								
两重	phi402893		?/+		+	+	+	+	+	-/+	?/+	+	+	+	-/+	+R	+	+R	+

注: +为扩增正常, -为未扩增, R 为扩增带弱, ?为扩增带型与单一扩增时不同。

3 结论与讨论

不同的研究者在多重 PCR 反应程序的优化上提出各种策略。况少青等^[3]的研究认为,以 Tag start 抗体为酶保护剂,可以提高 PCR 扩增的特异性和敏感性,减少非特异性扩增,改善亚质量标准 DNA 及多重 PCR 反应的扩增能力;设置退火温度在一定梯

度范围内递降的统一 PCR 程序,可以使得具有不同退火温度的引物在同一 PCR 反应中得到共同扩增,保证了多重 PCR 的可行性。本研究所用的引物尽管理论退火温度略有不同,但在固定退火温度 60℃的条件下进行单一 PCR 反应都得到了有效的扩增。因此,在进行多重 PCR 时仍采用固定退火温度,结果多数组合扩增正常,说明设置梯度退火温度在多重

PCR 中并非是必须的;所用反应体系为普通 PCR 体系,未加入 Tag start 抗体。由于所用 DNA 纯度较高,质量较好,因此,对多重 PCR 反应的效果影响不明显。由于加入 Tag start 抗体增加了操作步骤和反应成本,因此,在今后的检测实践中是否有必要加入 Tag start 抗体,仍需进一步研究确定。目前常用的多重 PCR 反应体积有 50、25、20、15、10 和 5 μL 等,黄银花等^[4]的研究认为,反应体积和循环次数对多重 PCR 扩增效果影响较小。本研究选用 20 μL 反应体积,既便于机械化操作,又相对降低了加样误差,有利于该技术的推广普及。为控制不同引物在多重 PCR 反应中产物量一致,许多研究采用根据扩增带型清晰度调整引物添加量的策略。Rofls^[7]报道,由于通常 SSR 引物扩增片段越短其扩增效率越高,其终产物量也就越多,则引物的添加量就可以少一些;徐宁迎等^[8]的研究则发现,在某些多重 PCR 反应组合中,扩增片段较长的 SSR 引物添加量却比片段较短的 SSR 的添加量少,即某些扩增片段较短的 SSR 引物扩增效率比扩增片段较长的低。在本研究中出现的扩增带强弱有差异的组合中,多数为扩增片段较短的 SSR 引物带弱,即扩增效率低,表明这并非特殊现象。分析其原因,由于 SSR 引物扩增效率不仅与扩增片段大小有关,还与引物和模板结合的难易程度有关。因此,SSR 引物扩增效率与扩增片段大小并不是简单的线性关系。

解建云等^[9]采用与单一 PCR 相同的反应条件,对近交系小鼠进行两重和三重 PCR 检测,结果两重 PCR 获得预期结果,而三重 PCR 出现干扰现象。因此,认为在不改变 PCR 反应条件时,进行两重 PCR 比较容易获得预期结果,而对三重或以上的 PCR 扩增比较困难。但他在组合引物时没有考虑不同引物序列之间可能的相互作用。本研究在单一 PCR 扩增已经成功的情况下,遵循引物组合的一般原则,应用与单一 PCR 完全相同的反应条件,进行了两重、三重及四重 PCR 反应组合,结果大部分组合都能得到正常的扩增结果,这些筛选出的正常扩增的组合可应用于 DNA 指纹库构建等研究中。这一结果表明,只要选用的单一 PCR 反应条件能够获得稳定有效的扩增结果,并遵循引物组合的一般原则,就能够直接应用到多重 PCR 反应中,而不需要进行大量繁琐的优化程序。该结果为简化多重 PCR 的优化程序提

供了有益的参考,为多重 PCR 的广泛应用创造了条件。

多重 PCR 技术在动物上,尤其是人类上得到了广泛深入的研究及应用。目前,四色荧光技术与多重 PCR 技术相结合,可以在一个反应中同时扩增多达 12~15 对不同引物。由 PE 公司^[10]、Promega^[11]公司等开发的 STR 复合扩增试剂盒,已被应用于人类 DNA 指纹库构建及亲子鉴定和个体识别的研究中。毛细管电泳技术与多重 PCR 技术相结合^[12],使基因分型效率提高一倍,结果更精确可靠。然而,在包括玉米在内的植物上,多重 PCR 技术的研究较少。因此,借鉴动物及人类上的研究成果,并结合玉米核心 SSR 引物的确定,迅速开发适用于玉米的一套完善的多重 PCR 程序及相关试剂盒产品,将为进行大规模、高通量的玉米 DNA 指纹库构建创造有利条件。

参考文献:

- [1] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier Jenguyen P N, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucl Acids Res, 1988, 16: 11141-11156.
- [2] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. Biotechniques, 1997, 23: 504-511.
- [3] 况少青,王建民,黄薇,等.应用多重 PCR 进行微卫星荧光标记-半自动基因组扫描[J].中华医学遗传学杂志,1998,15(2): 104-107.
- [4] 黄银花,胡晓湘,徐慰倬,等.影响多重 PCR 扩增效果的因素[J].遗传,2003,25(1):65-68.
- [5] 赵久然,王凤格,郭景伦,等.中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 II.适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的 SSR 核心引物的确定[J].玉米科学,2003,11(2):3-5,8.
- [6] 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.
- [7] Rofls A, Schuller I, Finckh U, et al. PCR: Clinical diagnostics and research. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1992.
- [8] 徐宁迎,傅衍,Loof C,等.多重聚合酶链反应筛选方法的研究[J].畜牧兽医学报,2001,32(2):108-112.
- [9] 解建云,邵伟娟,高诚.多重 PCR 在几个近交系小鼠遗传检测中的应用初探[J].中国实验动物学报,2003,11(2):92-95.
- [10] Perkin-Elmer Corporation. AmpF1 STR CofilerTM PCR amplification kit[R]. User Bulletin. 1998.
- [11] Promega Corporation. GenePrint STR Systems Technical Manua. 2000.
- [12] 庄后南,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.