

# 盐溶蛋白法与SSR标记品种鉴定技术的比较研究

聂琼, 柏光晓, 徐如宏, 张文龙, 郭燕枝 (1. 贵州大学农学院, 贵州贵阳550025; 2. 贵州省种子站, 贵州贵阳550025)

**摘要** 利用SSR标记法与盐溶蛋白法进行了鉴定玉米品种的对比如试验。结果表明: 盐溶蛋白法能很好地鉴定出供试的32份自交系和14个杂交种, 且具有简单、快速、准确、稳定和低成本的特点; SSR分子标记法筛选了50个引物; 用筛选出的多态性好的6个引物组合能鉴定出所有材料, 具有独特的优越性, 但设备要求高, 成本相对较高, 普及较困难。因此, 在玉米品种鉴定上, 应以盐溶蛋白法为主。

**关键词** 玉米种子; 纯度鉴定; 盐溶蛋白电泳; SSR分子标记

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)22-5798-02

## SSR and Salt-soluble Protein PAGE in Maize Seed Purity Test

NE Qiong et al (College of Agronomy, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

**Abstract** SSR and salt-soluble protein PAGE analysis were used in seed purity test. The results showed that 32 maize inbred lines and 14 hybrid could be distinguished by salt-soluble protein PAGE, and it was simple, quick, accurate, stable and cheap. 50 primers were used in SSR analysis and only 6 primer combinations could distinguish all the hybrid and inbred lines. But it can't be applied in a large scale on account of high expenses. In conclusion, salt-soluble protein PAGE can be used in most cases.

**Key words** Maize seed; Purity test; Salt-soluble protein PAGE; SSR

随着社会经济和农业科学技术的发展, 特别是作物新品种保护法的实施, 品种鉴定已越来越引起人们的关注。建立快速、经济、准确的鉴定技术是农业生产、作物育种和种子检验部门的迫切需要, 有利于保护育种家和农民利益, 避免因伪劣杂交种造成的经济损失。

生化鉴定技术和DNA分子标记技术是近年发展较快、应用面广、准确性高的室内鉴定技术。它们在分子水平、基因水平上对不同遗传特性的品种给予鉴别, 具有快速、准确、可靠等优点, 克服了传统形态鉴定方法的缺陷。蛋白质电泳技术利用不同品种的遗传组成、电泳形成的蛋白质亚基谱带鉴别品种的真实性和纯度。其中, 盐溶蛋白PAGE法以其快速、准确、经济和可批量鉴定的特点得到广泛应用<sup>[1-2]</sup>。与蛋白质电泳技术相比, 分子标记技术可直接检测品种的基

因, 可供选择的DNA分子标记数量多、准确性高, 不受环境的影响, 无器官发育时期的特异性。目前, 在作物品种鉴定中应用的有RFLP、RAPD、SSR和AFLP技术等。大量资料表明, 只有SSR技术是最有潜力和应用前景的品种鉴定方法, 且在玉米、水稻等种子真实性和品种纯度鉴定上的应用研究进展很快<sup>[3-9]</sup>。

目前还没有一种能够准确、快速、经济地进行种子检验的方法。该文通过盐溶蛋白电泳技术和SSR分子标记技术对玉米品种鉴定进行对比研究, 以期快速鉴定技术提供理论依据。

## 1 材料与试验方法

**1.1 材料** 目前贵州省生产上常用玉米自交系32份、杂交种14份(表1)都由该校玉米育种家柏光晓教授提供。

表1 试验所用玉米自交系及杂交种

序号	品种名称	序号	品种名称	序号	品种名称	序号	品种名称	序号	品种名称
1	S37	11	P138	21	478	31	S89	41	交三单交
2	黄C	12	掖107	22	丹340	32	自330	42	西山68
3	5311	13	昌7-2	23	79-1E	33	登海3号	43	贵毕303
4	T32	14	毕S37	24	SI-1	34	贵农单3号	44	贵毕302
5	S11	15	木6	25	S7913	35	安单136	45	贵毕301
6	大19	16	035-6	26	18599	36	毕单4号	46	黔玉2号
7	4011	17	79-1	27	7922	37	黔兴4号		
8	交51	18	616	28	B73	38	黔玉3号		
9	93-63	19	K12	29	郑22	39	兴黄丹89-2		
10	黄早四	20	53	30	S611	40	黔西4号		

## 1.2 方法

**1.2.1 蛋白质电泳技术。**参照玉米种子纯度盐溶蛋白电泳法(NY/T449-2001)<sup>[10]</sup>。主要步骤: 种子盐溶蛋白质的提取、凝胶液的制备、电泳缓冲液的配制、电泳、染色、蛋白质谱带分析。

**1.2.2 DNA分子标记技术。**

**1.2.2.1 DNA提取。**采用改进后的CTAB种子提取法。取

种子胚在研钵中, 加入2×CTAB(2%CTAB, 700 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0)提取液600 μl研磨后转入1.5 ml离心管, 65℃保温20~30 min。冷却后加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)混匀10 min, 10 000 r/min离心10 min, 取上清液于1 ml冰冷乙醇沉淀DNA, 挑出DNA沉淀, 用70%乙醇洗净干燥, 溶解于50 μl TE中。

**1.2.2.2 SSR分析。**

(1) SSR引物。选用分布于玉米10条染色体上的50对多态性好的SSR引物。引物序列信息来源于http://www.maizegdb.org, 由上海生物工程公司合成。

(2) PCR反应体系。反应总体积为10 μl, 反应体系包括1

基金项目 贵州省自然科学基金项目(2004)3026]。

作者简介 聂琼(1972-), 女, 贵州毕节人, 硕士, 讲师, 从事作物遗传育种教学和研究工作。

收稿日期 2006-08-17

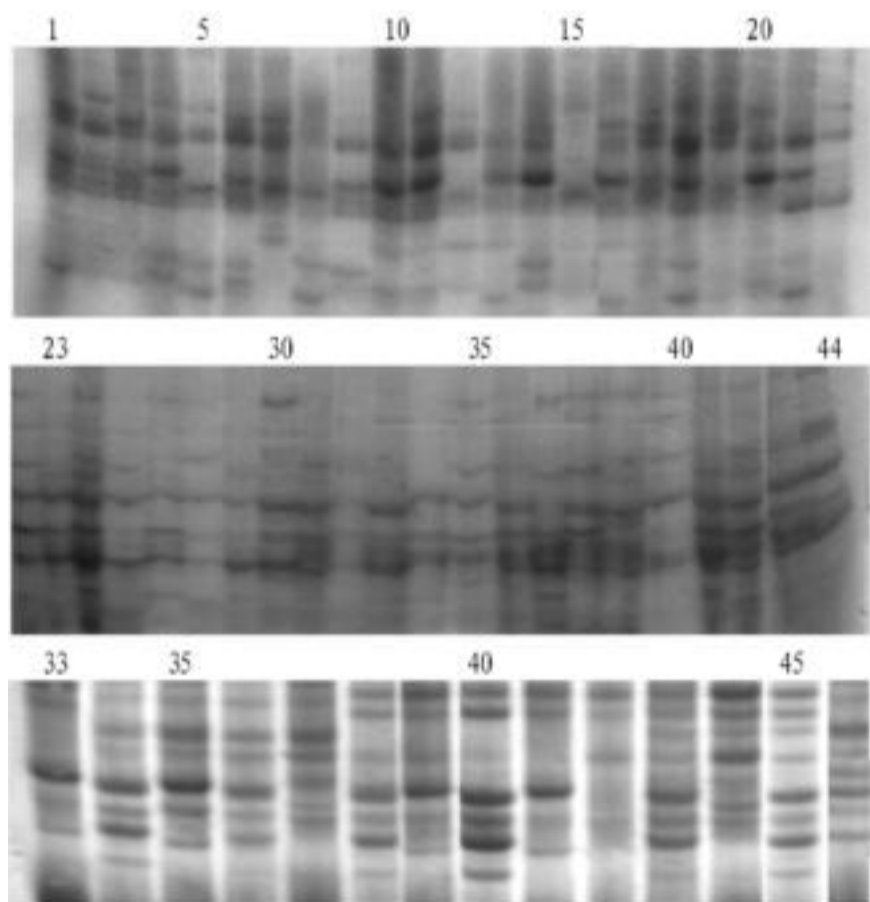
×PCR Buffer 2.5 mmol/L dNTP、20 ng 前引物、20 ng 后引物、1 U DNA 聚合酶和20 ng 模板DNA。

(3) PCR 扩增程序。DNA 扩增反应在 PE5331 反应仪上进行。程序:94 预变性5 min,94 40 s,60~55 40 s,72 1 min,35 个循环,最后72 延伸7 min。

(4) 电泳检测。PCR 产物经1% 琼脂糖凝胶(含1% EB)或6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,照相。

## 2 结果与分析

**2.1 蛋白质电泳鉴定** 图1表明,32 个自交系和14 个杂交种的蛋白质指纹图谱都不同,说明该省常用玉米自交系和杂交种具有遗传多样性;亲缘关系较近的贵毕303、302、301 3 个品种都能找到特征带被区分开(图1 中43、44、45 泳带),说明盐溶蛋白电泳技术分辨率高、重复性好,可用于玉米品种纯度鉴定。



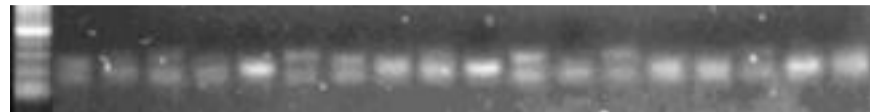
注:编号与表1 相同。

图1 种子盐溶蛋白指纹图谱

**2.2 SSR 标记鉴定** 从50 对引物中筛选到多态性较丰富的24 对引物,利用其中的 zag238、bmc1246、bmc1614、zct161、phi056、phi072 6 个核心引物获得SSR 指纹图谱(图2~5)。这些指纹组合可将供试自交系和杂交种完全区分开来。用6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,仅用引物 zag238 就能将供试杂交种完全区分开来(图6)。部分自交系有其特异分子标记,只需用1 对引物就能与其他自交系区分,如昌7-2 即可用引物 bmc1246 区别于其他自交系。试验表明,利用SSR 技术进行玉米自交系和杂交种鉴定是可行、有效的。

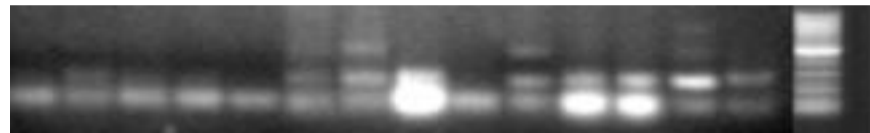
**2.3 两种鉴定技术的比较** 试验表明,这两种方法都能准确地鉴定玉米自交系和杂交种。表2 表明,所有供试材料的盐溶蛋白电泳结果共有33 条不同的谱带,有多态性的25 条,多态性信息量占75.76%,平均每样品0.54。在所有供试材料中,6 个SSR 引物共检测到29 个位点,平均每个引物4.83 个,有多态性的27 条,平均每样品0.59,表明SSR 分析的多态性较高、分辨率较高,在鉴定玉米品种上有较好的分离效果。用6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测14 个杂交种,仅用1 个引物就检测到9 个位点,把所有杂交种分开,说明聚

丙烯酰胺凝胶的分辨率更高,分离效果更好。在操作程序上,SSR 分子标记鉴定需DNA 的提取、PCR 扩增、电泳检测,而盐溶蛋白电泳只需蛋白质的提取、电泳、染色检测,且蛋白质的提取比DNA 的提取容易、不需低温。如果用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,那么银染技术也比较麻烦。盐溶蛋白电泳由于没有PCR 扩增这一步就节省了SSR 引物、Taq 酶等试剂的成本。



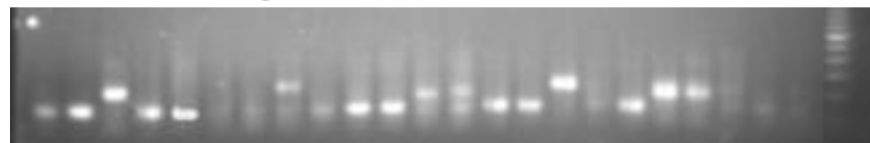
注:从左到右1~18 供试材料;编号与表1 相同。

图2 phi072 对部分玉米自交系SSR 标记图谱



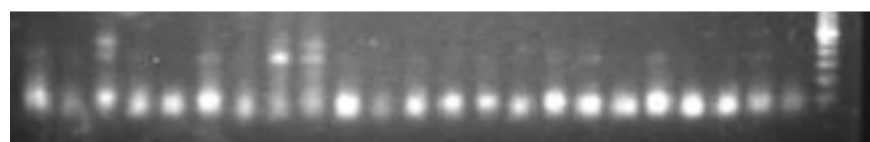
注:从左到右33~46 供试材料;编号与表1 相同。

图3 zag238 对14 个杂交种的SSR 标记图谱



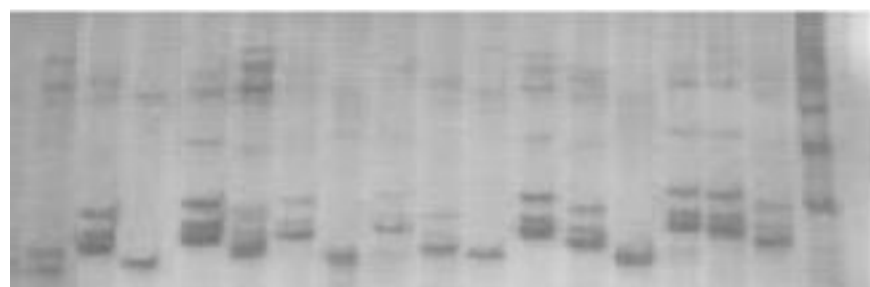
注:从左到右1~23 供试材料;编号与表1 相同。

图4 bmc1246 对玉米部分自交系的SSR 标记图谱



注:从左到右1~23 供试材料;编号与表1 相同。

图5 bmc1614 对玉米部分自交系的SSR 标记图谱



注:从左到右33~46 供试材料;编号与表1 相同。

图6 zag238 对14 个杂交种的SSR 标记图谱

表2 两种鉴定结果比较

	谱带总数	多态性条带数	多态性信息量 %	平均每样品的多态性
盐溶蛋白法	33	25	75.76	0.54
SSR 分子标记法	29	27	93.10	0.59

## 3 讨论

2001 年我国把《玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法》作为中华人民共和国农业行业标准<sup>[10]</sup>之后,盐溶蛋白电泳技术就广泛用于玉米的纯度鉴定。但蛋白质是基因表达的产物,不能完全显示品种间的多态性。对于某些遗传组成非常接近的品种,如保持系和不育系,采用蛋白质电泳难以发现特征带<sup>[11]</sup>。SSR 技术是从DNA 分子水平检测基因组中的遗传位点,基因组DNA 序列不同则产生不同的DNA 指纹,所以对亲缘关系很近的品种也能予以辨别,分辨力更高、更准确,多态性更高,易于分析,且不受环境影响。但该技术程序

(下转第5821 页)

(上接第5799页)

复杂,费用较高,所以尽管在种子纯度检验上具有潜力,但SSR分析中进行引物筛选和建立SSR标准模式还有一定的困难,目前尚不能普及。试验表明,这2种方法都能区分玉米自交系和杂交种。盐溶蛋白电泳技术简单、经济、快速,当天可得结果;而SSR标记技术需精密仪器、昂贵药品,程序复杂,一般1~2d内不可能得到结果,除非有筛选好的特异引物。相对而言,蛋白质电泳技术具有用种量少、时间短、结果稳定性好且重复性高、技术简单、费用低廉等优点。因此,在进行种子纯度检验时,应先用盐溶蛋白电泳技术来鉴定,不能鉴定的品种再用SSR分子标记技术。只有将生化标记和分子标记技术相结合,发挥综合优势,才能达到准确、经济、快速检测的目的。在目前实验条件和实验技术尚未完全成熟的时候,不能一味追求DNA分子标记的鉴定,但随着分子生物学技术的快速发展和更新,可以逐渐构建主要品种的基因指纹图谱,并筛选出其特异引物。DNA分子标记技术必将作为高精度的品种鉴定技术应用于种子检验的实践中。

## 参考文献

- [1] 方玉春,张兴和,冯德举.应用盐溶蛋白电泳图谱鉴定玉米种子纯度[J].吉林农业大学学报,2001,23(4):6-10.
- [2] 兰海燕,李立会.蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J].中国农业科学,2002,35(8):916-920.
- [3] 袁力行,傅骏骅,WARBURTON M,等.利用RFLP、SSR、AFLP和RAPD标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J].遗传学报,2000,27(8):725-733.
- [4] 李汝玉,杨平平,宋国安.简单重复序列(SSR)及其在品种鉴定种子检测中的应用[J].种子,1999(5):33-35.
- [5] 王风格,赵久然,郭景伦,等.中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究——玉米品种纯度及真伪鉴定中SSR技术标准实验体系的建立[J].玉米科学,2003,11(1):3-6.
- [6] 李晓辉,李新海,李文华,等.SSR标记技术在玉米杂交种种子纯度鉴定中的应用[J].作物学报,2003,29(1):63-68.
- [7] 李汝玉,李群,谭振馨,等.利用SSR标记技术检测玉米杂交种纯度[J].玉米科学,2005,13(1):15-18.
- [8] 李云海,肖晗,张春庆,等.用微卫星DNA标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异[J].植物学报,1999,41(10):1061-1066.
- [9] 李晶癖,何平,李仕贵,等.利用微卫星标记鉴定杂交水稻冈优22种子纯度的研究[J].生物工程学报,2000,16(2):211-214.
- [10] 国家标准局.中华人民共和国农业行业标准NY/T449-2001玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法S.北京:中国标准出版社,2001.
- [11] 陆作楣,王华,沈又佳.杂交稻胚乳贮藏蛋白多态性及其应用研究[J].南京农业大学学报,2001,24(2):6-11.