

# 玉米品种真实性鉴定中SSR技术体系的优化

刘勋辉<sup>2</sup>, 陆徐忠<sup>2</sup>, 钟昌松<sup>3</sup>, 马芹<sup>2</sup>, 汪名春<sup>2</sup>, 李莉<sup>2</sup>, 杨剑波<sup>\*</sup>

(1. 安徽农业大学研究生学院, 安徽合肥230039; 2. 安徽省农业科学院水稻研究所, 安徽合肥230031; 3. 广西玉米研究所, 广西南宁530227)

**摘要** [目的] 优化玉米品种真实性鉴定中的SSR技术体系。[方法] 以11份玉米骨干自交系为材料, 通过对影响SSR扩增质量的 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶的浓度等因素进行优化和比较, 建立了适于玉米品种真实性鉴定的SSR标记技术体系, 并以5个玉米杂交种为例, 验证该体系在玉米杂交种真实性鉴定中的可行性。[结果]  $Mg^{2+}$ 浓度为2.5 mmol/L时, 扩增效果最佳。dNTPs浓度为0.3 mmol/L时, 扩增效果最好。引物浓度为0.2  $\mu$ mol/L较为适宜。Taq DNA聚合酶浓度为1.0 U时, 扩增效果较好。优化后的PCR反应体系为: 1  $\times$  PCR缓冲液, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.2  $\mu$ mol/L正、反向引物, 1.0 U Taq DNA聚合酶, 40 ng样品DNA, 总体积25  $\mu$ l。[结论] 该研究优化的SSR技术体系可以有效地对玉米杂交种进行真实性鉴定。

**关键词** 玉米; SSR标记; 真实性鉴定

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06220-03

## Optimization on SSR Marker Technology for Authenticity Identification of Maize Varieties

LIU Xunhui et al (Graduate School, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230039)

**Abstract** [Objective] The aim of the research was to optimize SSR technology system for authenticity identification of maize variety. [Method] With 11 shares of main maize inbred lines as materials, such factors as  $Mg^{2+}$ , dNTPs, primer, Taq DNA polymerase that affected the quality of SSR amplification were optimized and compared to establish SSR marker technology system for the authenticity identification of maize variety. Taking 5 main crossbreeds as an example, the feasibility of this system in the authenticity identification of maize crossbreeds was validated. [Result] When  $Mg^{2+}$  concn. was 2.5 mmol/L, the amplification effect was best. When the concn. of dNTPs was 0.3 mmol/L, the amplification effect was best. The suitable concn. of primer was 0.2  $\mu$ mol/L. When the concn. of Taq DNA polymerase was 1.0 U, the amplification was better. The optimized PCR reaction system was 1  $\times$  PCR buffer, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.2  $\mu$ mol/L positive and reverse primer, 1.0 U Taq DNA polymerase, 40 ng template DNA, with total volume of 25  $\mu$ l. [Conclusion] The optimized SSR technology system in this research could make the authenticity identification of crossbreeds in maize breeding.

**Key words** Maize; SSR marker; Authenticity identification

应用DNA分子标记技术分析和鉴定植物品种差异, 既不受组织器官及发育阶段的影响, 也不受季节和环境因素的限制, 是一种准确、快速地鉴定品种真伪和纯度的方法。常用的分子标记方法主要有RFLP、RAPD、AFLP、SRAP和SSR等, 其中SSR标记因其重复性好、多态性丰富、遗传上呈共显性且操作简便而受到广泛关注<sup>[1]</sup>。杨剑波等利用SSR标记技术建立了《三系杂交水稻及亲本真实性和品种纯度鉴定DNA分析方法》的国家标准<sup>[2]</sup>。李晓辉等探讨了SSR分子标记在玉米杂交种种子纯度鉴定中的应用<sup>[3]</sup>。王凤格等利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对SSR扩增体系和电泳检测技术进行了优化, 但对其反应体系中各因素对扩增结果的影响未作进一步说明<sup>[4]</sup>。笔者以11份玉米骨干自交系为材料, 通过对SSR扩增体系进行优化, 利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染显色技术, 建立了适用于玉米杂交种真实性鉴定的SSR扩增体系, 并以5个杂交种的真实性鉴定为例, 验证了该体系在玉米杂交种真实性鉴定中的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 11个玉米骨干自交系黄早4、Lx9801、黄C、郑58、昌7-2、济522、济533、178、E28、齐319、M17和5个主栽杂交种鲁单981、济单7号、济单8号、农大108、郑单958, 分别由中国农业科学院作物科学研究所谢传晓副研究员和安徽隆平高科种业有限公司提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA提取。**采用CTAB法<sup>[5]</sup>提取玉米幼苗DNA, 幼苗

按GB/T 3543.4规定的方法培养<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 引物选择。**参考文献[7-8], 选用多态性高、重复性好以及带型清晰的3对引物umc1551、brlg381、brlg2181, 均由上海英骏生物公司合成。

**1.2.3 SSR扩增。**

**1.2.3.1 反应体系。**根据安徽省农业科学院水稻研究所生物技术室前期的研究<sup>[2]</sup>, 反应体系(25  $\mu$ l)初步设定为: 1  $\times$  PCR缓冲液, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.5 mmol/L dNTPs, 0.2  $\mu$ mol/L正向和反向引物, 0.5 U Taq DNA聚合酶, 40 ng被测样品DNA。并对反应体系中各主要因素作了多水平设计:  $Mg^{2+}$ 浓度设1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L 4个梯度; dNTPs浓度设0.20、0.25、0.30、0.50、0.80 mmol/L 5个梯度; SSR引物浓度设0.2、0.4、0.6、0.8  $\mu$ mol/L 4个梯度; Taq DNA聚合酶浓度设0.5、1.0、1.5、2.0 U 4个梯度。

**1.2.3.2 反应程序。**94  $^{\circ}$ C预变性5 min后, 94  $^{\circ}$ C 40 s, 55  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共35个循环, 72  $^{\circ}$ C 7 min, 4  $^{\circ}$ C保存待测。扩增反应在ABI9600 PCR仪上进行。

**1.2.4 电泳检测。**PCR扩增产物变性后用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。4~5 V/cm电压下预电泳10~30 min, 点样后, 在13~20 V/cm电压下电泳2~3 h。银染: 胶取下浸入固定液10%(V/V)乙醇和0.5%(V/V)冰乙酸, 固定12 min; 双蒸水洗2次, 每次1~2 min; 0.2% AgNO<sub>3</sub>溶液染色12 min; 显影液1.5%(m/V) NaOH和0.4%(V/V)甲醛显影至条带清晰; 在X光片灯下观察、拍照。

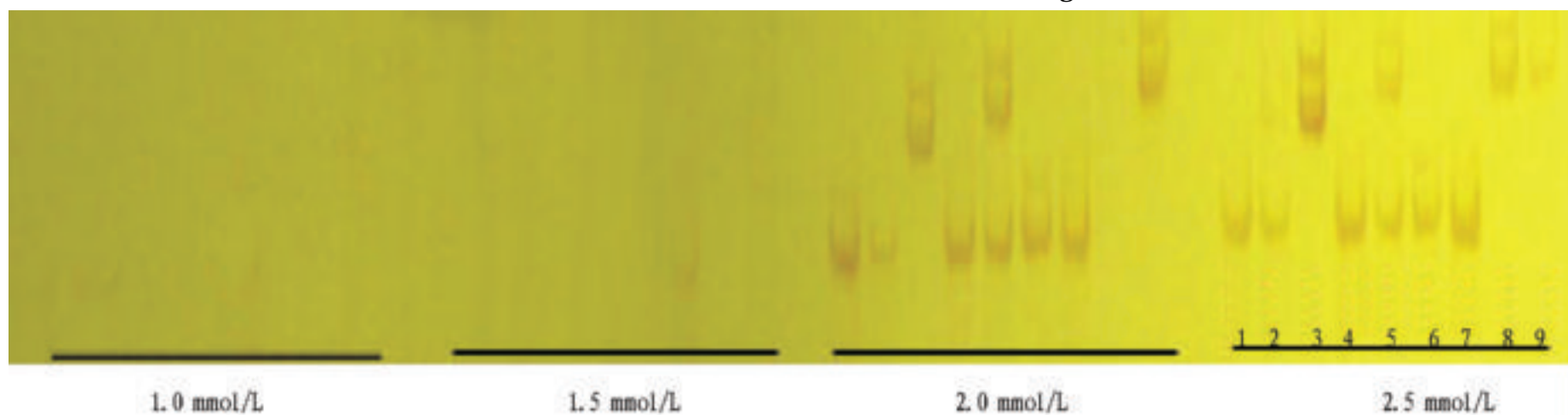
## 2 结果与分析

**2.1  $Mg^{2+}$ 浓度的优化** 在扩增反应体系中,  $Mg^{2+}$ 浓度直接影响到Taq DNA聚合酶的活性, 选择最佳的 $Mg^{2+}$ 浓度不仅有利于酶活性的提高, 而且可以增加扩增片断的产率<sup>[9]</sup>。浓

作者简介 刘勋辉(1982-), 男, 黑龙江兰西人, 硕士研究生, 研究方向: 玉米真实性及其纯度鉴定。\* 通讯作者, 博士生导师, 研究员, E-mail: yjlanbo@263.net。

度低时,扩增条带细弱而模糊;浓度过高时,非特异性扩增增

加。由图1 可知: $Mg^{2+}$  浓度为2.5 mmol/L 时,扩增效果最佳。



注:1 ~9 号依次为Lx9801、黄C、郑58、昌7-2、济522、济533、178、E28、齐319, 下图同;SSR 引物为umc1551。

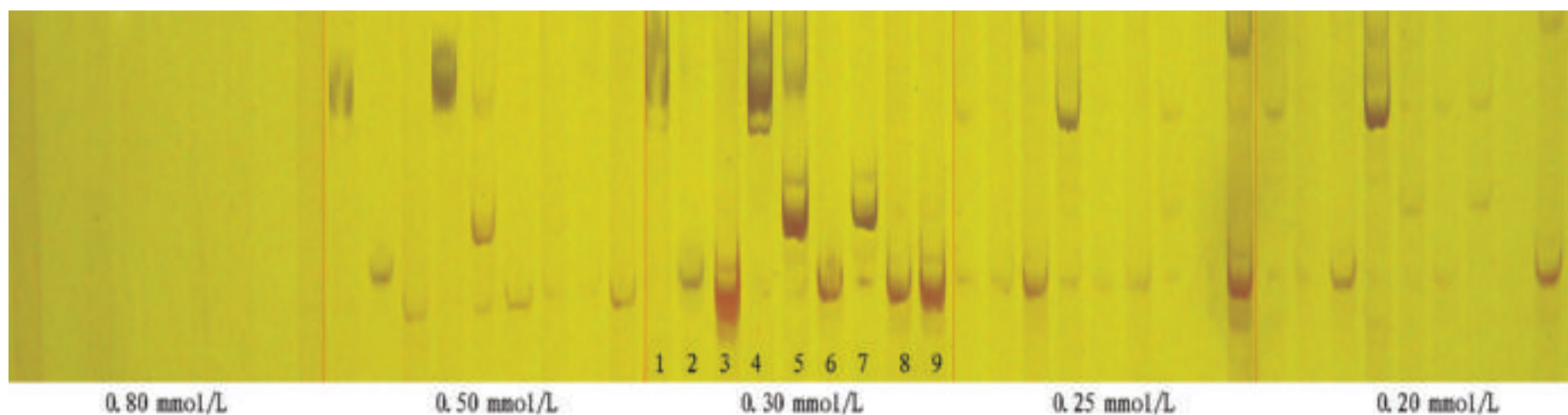
Note :No . 1 - 9 are Lx9801 ,Huang C,Zheng 58 ,Chang 7-2 ,J 522 ,J 533 ,178 ,E28 and Q 319 . The same as follows . SSR primer is umc1551 .

图1  $Mg^{2+}$  浓度对SSR 扩增的影响

Fig.1 Effects of  $Mg^{2+}$  concentration on SSR amplification

**2.2 dNTPs 浓度的优化** dNTPs 是DNA 扩增的原料,图2 显示:浓度在0.20、0.25 mmol/L 时,即可扩增出清晰的条带,但

差异不够明显;dNTPs 浓度高于0.50 mmol/L 时,扩增效果明显变差;dNTPs 浓度为0.30 mmol/L 时,效果最好。



注:SSR 引物为brlg381。Note :SSR primer is brlg381 .

图2 dNTPs 浓度对SSR 扩增的影响

Fig.2 Effects of dNTPs concentration on SSR amplification

**2.3 引物浓度的优化** 由图3 可见,寡核苷酸引物浓度对DNA 扩增效果也有一定的影响,但不是十分显著,从节约成

本考虑,引物浓度选择0.2  $\mu\text{mol/L}$  较为适宜。

**2.4 Taq DNA 聚合酶浓度的优化** Taq DNA 聚合酶浓度是

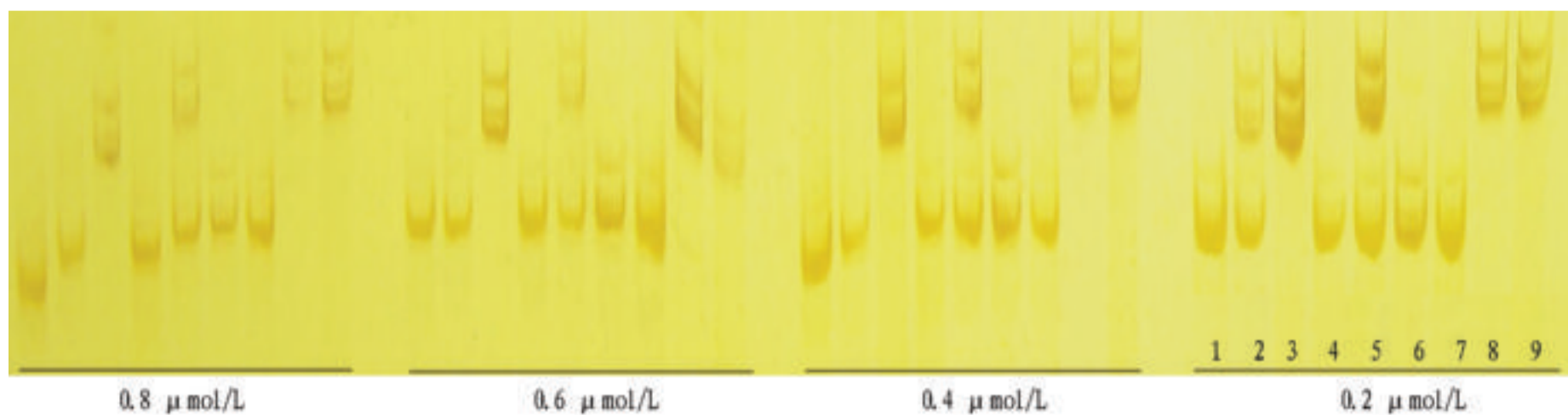


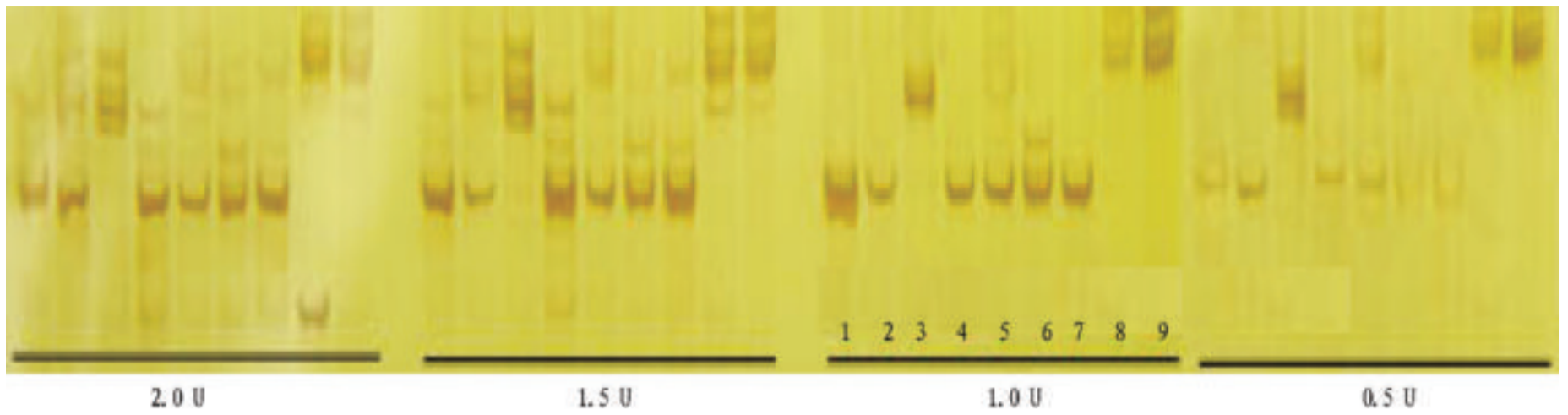
图3 引物 brlg2181 浓度对SSR 扩增的影响

Fig.3 Effects of primer brlg2181 concentration on SSR amplification

DNA 扩增的关键。图4 显示,Taq DNA 聚合酶浓度在0.5 U 时,扩增条带较弱,且有明显的残缺;Taq DNA 聚合酶浓度为1.0 U 时,扩增效果较好,条带亮且非特异性扩增少,清晰度和对比度均较好;当 Taq DNA 聚合酶浓度较大时,非特异性扩增明显增加,背景颜色也相应加深。

**2.5 SSR 扩增体系的确立和验证** 根据上述试验结果,确定优化的PCR 反应体系为:1 × PCR 缓冲液,2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.3 mmol/L dNTPs,0.2  $\mu\text{mol/L}$  正、反向引物,1.0 U Taq DNA 聚合酶,40 ng 样品DNA,总体积25  $\mu\text{l}$ 。为检验经过优化

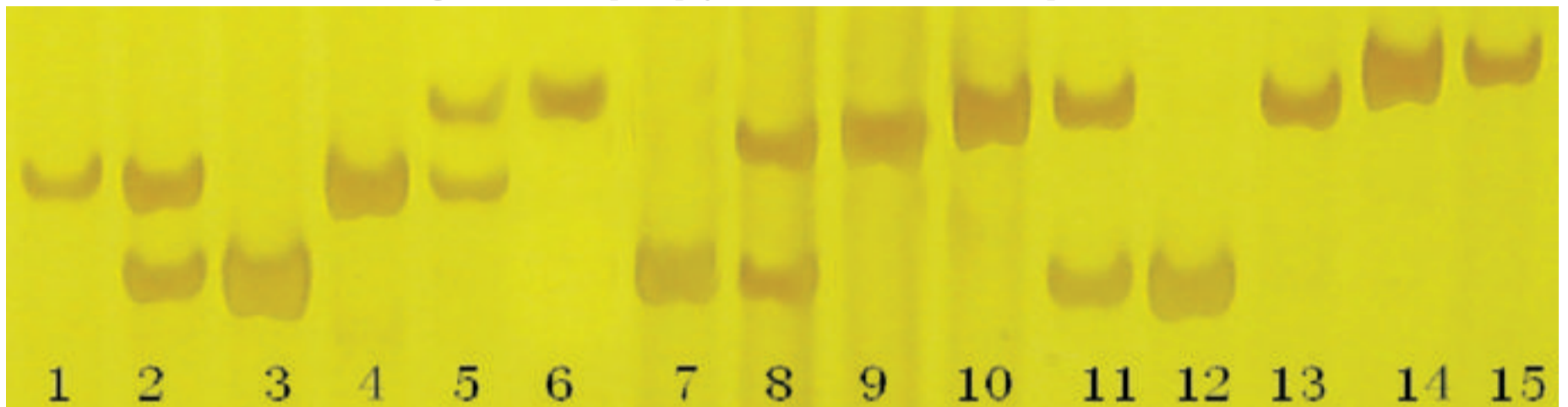
的PCR 反应体系在区别不同玉米杂交种上的效果,笔者使用引物brlg2181 对5 个玉米杂交种及其父母本进行SSR 扩增比较。从理论上讲,杂种包含了双亲的全部遗传信息,双亲无论任何一方能扩增出的条带,杂种也应该同时具有,故杂种的多态性应为双亲的互补型。图5 显示,鲁单981(齐319 × Lx9801)、济单7 号(济533 × 昌7-2)、济单8 号(济522 × 昌7-2)、农大108(178 × 黄C)、郑单958(郑58 × 昌7-2)这5 个杂交种扩增结果均表现为“双亲互补带型”。结果表明:该反应体系可以有效地实现对玉米杂交中杂交种的区别和鉴定。



注:SSR 引物为 brlg2181。Note:SSR primer is brlg2181.

图4 TaqDNA 聚合酶浓度对SSR 扩增的影响

Fig.4 Effects of TaqDNA polymerase concentration on SSR amplification



注:1-15 号依次为 Lx9801、鲁单981、齐319、济522、济单8号、昌7-2、178、农大108、黄C、昌7-2、郑单958、郑58、昌7-2、济单7号、济533。

Note:No.1~15 are Lx9801,Ludan 981,Q 319,Ji 522,Jidan No.8,Chang 7-2,178,Nongda 108,Huang C,Chang 7-2,Zhengdan 958,Zheng 58,Chang 7-2,Jidan No.7 and Ji 533, respectively.

图5 引物brlg2181 对玉米杂交种及其双亲SSR 扩增结果

Fig.5 SSR amplification results of corn hybrids and their parents by primer brlg2181

### 3 讨论

SSR 标记技术从 DNA 提取到 PCR 扩增再到电泳检测和银染,每一个过程都会影响最终结果。该研究虽未对模板 DNA 质量和浓度加以讨论,但 DNA 质量的好坏,在整个试验中起着先决作用,应严格加以控制。另外,由于扩增体系成分的复杂性和各种因素的关联性,维持反应体系稳定是非常重要的。除了上述讨论的因素外,其他一些次要的因素也要严格控制,甚至试剂生产的厂家和批号都不应忽视,只有这样才能确保试验的稳定性和重演性。

#### 参考文献

[1] SMITH J S C, CHNE C L, SHU H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 163-173.

(上接第6195页)

#### 参考文献

[1] RAYMOND C S, SHAMU C E, SHEN M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex determining genes[J]. *Nature*, 1998, 391: 691-695.  
 [2] SMITH C A, MCCLIVE P J, WESTEMP S, et al. Conservation of a sex determining gene[J]. *Nature*, 1999, 402: 601-602.  
 [3] GRANDI A D, CALVARI V, BERIINI V, et al. The expression pattern of a mouse Doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation[J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 90(2): 323-326.  
 [4] BRUNNER B, HORNUNG U, SHANZ, et al. Germic organization and expression of the Doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1[J]. *Genomics*, 2001, 77(1/2): 8-17.  
 [5] REN L L, CHENG H H, GUO Y Q, et al. Evolutionary conservation of Dmrt gene family in amphibians reptiles and birds[J]. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(23): 1992-1996.  
 [6] MONOT B, BETA P, SCHER G, et al. Male specific expression suggests role of

[2] 国家技术监督局,国家质量监督检验检疫总局.三系杂交水稻及亲本真实性和品种纯度鉴定DNA分析方法(GB/T 20396-2006)[S].北京:中国标准出版社,2006.  
 [3] 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测定中的作用[J]. *作物学报*, 2003, 29(1): 63-68.  
 [4] 王凤格,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.  
 [5] 中华人民共和国农业部.NY/T 674-2003 转基因植物及其产品成分检测DNA提取和纯化[S].北京:中国标准出版社,2003.  
 [6] 中华人民共和国农业部.GB/T 3543.1-3543.7-1995.农作物种子检验规程[S].北京:中国标准出版社,1995.  
 [7] 段运平,陈卫国,李明顺,等.利用SSR 标记分析27个玉米群体的遗传关系[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(6): 1102-1113.  
 [8] KALINKA CARLA PADOVANI, DE CARVALHO SALGADO, MARIA DAS GRACAS, et al. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers[J]. *Revista Brasileira de Semeadura*, 2006, 28(1): 169-175.  
 [9] 曹仪植.植物分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2002.

DMRT1 in human sex determination[J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 91: 323-325.

[7] KIMS, KETILEWELL J R, ERSON R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad[J]. *Gene Expression Patterns*, 2003, 3(1): 77-82.  
 [8] SMITH C A, SINCLAIR A H. Sex determination insights from the chicken[J]. *BioEssays*, 2004, 26(2): 120-132.  
 [9] KONDO M, FROSCHAUER A, KITANO A, et al. Molecular cloning and characterization of Dmrt genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platfish *Xiphophorus maculatus*[J]. *Gene*, 2002, 295: 213-222.  
 [10] RAYMOND C S, KETILEWELL J R, HIRSCH B, et al. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development[J]. *Developmental Biology*, 1999, 215: 208-220.  
 [11] MARCHAND O, GOROUN M, DCOTTA H, et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493: 180-187.