

水稻常用分子标记(SSR InDel SNP)检测

Detection of Commonly-used Molecular Markers (SSR InDel SNP) in Rice

孙文强, 申国境, 余四斌*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: ysb@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 孙文强, 申国境, 余四斌. (2018). 水稻常用分子标记(SSR InDel SNP)检测. *Bio-101* e1010108.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010108.

How to cite: Sun, W. Q., Shen, G. J. and Yu, S. B. (2018). Detection of commonly-used molecular markers (SSR InDel SNP) in rice. *Bio-101* e1010108. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010108. (in Chinese)

实验原理: 分子标记(Molecular Markers)是以个体间核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映。

序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR), 又称微卫星序列, 其串联重复的核心序列为 1-6 bp, 重复单位数目一般 10-60 个, 其多态性主要来源于串联基序数目的不同。其原理是根据串联重复序列设计引物, 通过 PCR 反应扩增出不同长度的 PCR 产物, 将扩增产物进行凝胶电泳, 根据分离片段的大小确定基因型。

插入缺失(Insertion-Deletion, InDel), 指不同品种(系)在基因组中有小片段的核苷酸序列的插入或缺失, 其原理是根据插入缺失位点设计引物, 通过 PCR 反应扩增出不同长度的 PCR 产物, 将扩增产物进行凝胶电泳, 根据分离片段的大小确定基因型。

核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 指同一位点的不同等位基因之间仅有个别核苷酸的差异。其原理是根据多态性位点设计引物, 通过 PCR 反应扩增出目标片段, 利用测序技术来确定核苷酸差异。

实验目的: 利用分子标记可以进行品种的基因型分析, 真假杂种鉴定, 遗传连锁图谱构建, 分子标记辅助选择育种, 基因定位、克隆, 物种亲缘关系鉴别等。

关键词: 水稻, 分子标记, SSR, InDel, SNP

材料与试剂

1. PCR试剂

- 1) 10x PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) (Takara Bio, catalog number: R10T1)
- 2) rTaq (Takara Bio, catalog number: R10T1)
- 3) dNTPs Mix (Pharmacia分装)
- 4) ddH₂O

2. 测序试剂

- 1) EXOI (New England Biolabs, catalog number: M0293L)
- 2) SAP (Takara Bio, catalog number: D2660A)
- 3) BigDye (ABI, catalog number: 4336913)
- 4) 5x Buffer (ABI, catalog number: 4336699)
- 5) 甲酰胺(ABI, catalog number: 4311320)
- 6) 上样用指示剂 (10x loading buffer) (见溶液配方)

3. 琼脂糖胶电泳试剂

- 1) 琼脂糖 Agarose (G-10, BIOWEST)
- 2) 核酸染料 GoldView (AMRESCO 分装)
- 3) DNA Marker (DL2000 Plus, TransGen, catalog number: BM111)
- 4) 0.5x TBE 溶液
- 5) 5x TBE (见溶液配方)

4. 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)胶电泳试剂

- 1) 丙烯酰胺 (Acrylamide, Ultra pure, BIO BASIC INC, catalog number: AB1032)
- 2) 甲叉-丙烯酰胺 (Bis-Acrylamide, Ultra pure, BIO BASIC INC, catalog number: BB0025)
- 3) 过硫酸铵 AP (Ammonium persulfate, Sigma-Aldrich, catalog number: A3678)
- 4) 去离子甲酰胺 (deionized formamid, 生工生物, catalog number: F0606)
- 5) NaOH (分析纯, 光复)
- 6) 溴酚蓝 (Bromophenol blue, Sigma-Aldrich, catalog number: B0126)
- 7) 二甲苯氰 (Xylene cyanol FF, Sigma-Aldrich, catalog number: X4126)

- 8) 硅化剂 (Plusone Repel-Silane, Amersham. Biosciences, catalog number: 17-1332-01)
- 9) 反硅化剂 (Plusone Bind-silane, Amersham. Biosciences, catalog number: 17-1330-01)
- 10) TEMED (Sigma-Aldrich, catalog number: T9281)
- 11) 95%乙醇 (分析纯, 沪试, 国药化试, catalog number: 10009134)
- 12) 硝酸银 (分析纯, 国药化试, catalog number: 10018461)
- 13) 甲醛 (分析纯, 湖北奥生新材料科技有限公司, catalog number: 83012)
- 14) Tris 粉 (Tris Amino, Angus Chemical Company, catalog number: 77-86-1)
- 15) 硼酸 (分析纯, 国药化试, catalog number: 10004818)
- 16) EDTA (分析纯, 沪试, 国药化试, catalog number: 10009717)
- 17) 尿素 (分析纯, 国药化试, catalog number: 10023218)
- 18) 1x TBE 溶液
- 19) 1.40%的丙烯酰胺胶母液 (见溶液配方)
- 20) 过硫酸胺(AP)溶液 (见溶液配方)
- 21) 4% PAGE 胶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. PCR 仪 (ABI9700)
2. 电泳仪 (LIFE TECHNOLOGIES, MODEL 250EX)
3. 水平电泳槽 (北京六一)
4. 垂直电泳槽 (北京六一)
5. 通风橱 (SUNLAB, 2004-SFH)
6. 凝胶成像系统
7. 测序仪 (ABI, 3730)

实验步骤

1. PCR 反应
 - 1.1 调整模板浓度至~50 ng/μl。

1.2 按下列体系配制反应混合液，混匀，加 20 μ l 矿物油，离心 5 秒。

Template DNA	2 μ l
10x PCR buffer	2.0 μ l
dNTPs Mix (2 mM)	1.6 μ l
Primer F (10 μ M)	0.3 μ l
Primer R (10 μ M)	0.3 μ l
rTaq (5 U/ μ l)	0.1 μ l
Add ddH ₂ O to	20 μ l

1.3 PCR 反应程序：

94 °C	4 min	1 cycle			
94 °C	30 sec	55 °C	30 sec	72 °C	30 sec 35 cycles
72 °C	5 min	1 cycle			
25 °C	1 min				

注：以上退火温度可以根据不同引物适当调整。

1.4 检测：加~2 μ l 10x Loading buffer，短暂离心。

2. 琼脂糖凝胶电泳(适合 InDel 标记和多态性较大的 SSR 标记)

2.1 将制胶板洗净、晾干，水平放置在工作台上，两端用封条封口，放置梳子，调整好梳子的高度。

2.2 称取 1.2 g 琼脂糖于 120 ml 0.5x TBE 中，用微波炉加热使琼脂糖颗粒完全溶解，取出冷却至 50 °C 左右时加入 5 μ l GoldView 混匀，倒入制胶板中。

2.3 凝胶凝固后(~30 min)，小心拔去梳子，取 8 μ l PCR 样品依次点入加样孔中，最后一孔点入 5 μ l DNA Marker。

2.4 将制胶板小心放入电泳槽中，打开电泳仪电源，使核酸样品向正极泳动，250 V 电泳 20-30 min (根据多态性大小调整)。

2.5 电泳完成后，切断电源，取出凝胶，在清水中短暂漂洗，用保鲜膜包好置于凝胶成像系统中观察照相，读取数据。

3. PAGE 胶电泳(适合一般 SSR 标记和多态性较小的 InDel 标记)

3.1 胶板的制备

1) 将玻璃底板和盖板洗净、晾干。

- 2) 在通风橱中用滤纸片沾上 95%乙醇擦拭底板和盖板 3-5 遍至玻璃板洁净无污渍。
- 3) 取 1 ml 95%乙醇至 1.5 ml 离心管，加入 2 μ l 反硅化剂，于涡旋震荡器上混匀，均匀倒在用(步骤 3.1.2)中 95%乙醇擦拭过的玻璃底板上，并用滤纸涂抹均匀。
- 4) 取 1 ml 硅化剂均匀倒在用(步骤 3.1.2)中 95%乙醇擦拭过的玻璃盖板上，用滤纸涂抹均匀。
- 5) 将底板水平放置(涂抹反硅化剂的一面朝上)，在两侧放好压条(spacer)，将盖板(涂抹硅化剂一面朝下)重合在底板上，两侧各用两个夹子夹紧。
- 6) 配制胶液：取 60 ml 4% PAGE 胶液至烧杯中加入 500 μ l AP 液和 50 μ l TEMED，混匀，将夹好的玻璃底板和盖板倾斜 45 度，往玻璃底板和盖板之间的缝隙灌胶，待胶液充满整个玻璃板，将玻璃板水平放置，水平插入梳子。胶板制备完后需放置至少 1 个小时才可使用。

3.2 电泳

在水槽中清洗胶板，小心拔出梳子(注意不要弄破胶面)，用水冲去碎胶，垂直放入电泳槽中，两边用 3 个夹子夹紧，扭紧下部螺丝，加入 1x TBE 溶液至胶孔覆盖，电泳条件设置：电压：2,000 V，电流：200 mA，功率：90 W，预热 40 分钟后插入梳子，取 3-5 μ l PCR 产物点样。

3.3 显影

- 1) 硝酸银溶液配制：称取 2 g 硝酸银于试剂瓶中，加入 2,000 ml 蒸馏水溶解完全，倒入塑料盆中，盖上盖子避光保存。
- 2) NaOH 溶液配制：称取 40 g NaOH 于试剂瓶中，加入 2,000 ml 蒸馏水溶解，加入 2 瓶盖甲醛溶液，混匀倒入塑料盆中，盖上盖子。
- 3) 取下电泳完毕的胶板，分开玻璃底板和盖板，将胶板用蒸馏水漂洗一遍后置入硝酸银溶液中浸泡 10 分钟，然后取出用蒸馏水漂洗一遍，再放入含甲醛的 NaOH 溶液中，至带型清晰显出时捞出，用蒸馏水漂洗 4-5 遍，平放至胶面干燥，进行照相和数据读取。

4. SNP 标记检测

4.1 PCR 扩增

参照前面一般 PCR 扩增。

4.2 PCR 产物检测

制备琼脂糖胶(1%)，检测 PCR 扩增产物。特异性扩增带与预期大小相符，亮度(浓度)与 Marker (DL 2000, ~50 ng/μl)相仿即可。

4.3 PCR 产物消化处理

PCR 产物	5 μl	
10x SAP Buffer	0.3 μl	① 37 °C 水浴 1 h
25 mM MgCl ₂	0.18 μl	② 80 °C 水浴 20 min 灭活
ExoI(20 U/μl)	0.25 μl	③ 1 Kb 左右的片段取 3 μl 作 DNA 测序模板
SAP(2 U/μl)	0.13 μl	<i>注*</i> : 取 PCR 产物尽量避免取到上层矿物油
Add ddH ₂ O to	8 μl	

4.4 测序反应

DNA 模板	3 μl	反应程序:
Primer(单引物)	0.16 μl	96 °C 3 min;
5x Buffer	1.75 μl	96 °C 10 sec, 50 °C 10 sec, 60 °C 4 min, 30~35 Cycles;
BigDye	0.5 μl	25 °C 10 min
Add ddH ₂ O to	10 μl	

4.5 测序产物的纯化

- 1) 1 ml 95%乙醇中加入 40 μl 3 M NaAC, 混匀后按 26 μl/孔分装进测序样品, 混匀, 放置 15 min, 3,000 x g 离心 30 min, 弃上清。
- 2) 分装 75%乙醇, 75 μl/孔, 3,000 x g 离心 10 min。
- 3) 弃上清, 于超净工作台吹干, 约 5 min。
- 4) 分装甲酰胺, 7 μl/孔, 94 °C 变性(~5 min), 置于冰上冷却。

4.6 上机(ABI3730 测序仪)测序

按测序仪操作说明进行。

注意事项

1. 制备 PAGE 胶之前，用梳子插入两玻璃板之间，检查玻璃板之间空隙是否均匀；若梳子两侧不能顺利插入，务必调整盖板和底板组合，以免出现制胶厚度不均匀或者是梳子插不进去的情况。
2. 使用 SSR 标记可以先登录网站 <http://www.gramene.org/> 查询标记的退火温度和 PCR 产物大小，选择合适的退火温度和电泳检测条件。
3. 同一 PAGE 胶板进行多道电泳时，应根据 PCR 产物大小和标记在两亲本之间多态性大小，确定点样顺序和时间间隔。如果标记有拖带现象可以在点样之前将 PCR 产物进行 96°C 3 min 变性。
4. 把握好显影时间，小心 PAGE 胶从玻璃底板上脱落；显影完毕后，尽量在水中漂洗多次，以去除甲醛。

溶液配方

1. 1.40%的丙烯酰胺胶母液

丙烯酰胺(Acrylamatide) 380 克

甲叉一丙烯酰胺(Bis- Acrylamatide) 20 克

加 60 °C 左右的 ddH₂O 定容至 1,000 ml，迅速搅拌至澄清透明。过滤后 4 °C 保存。

2. 过硫酸胺(AP)溶液

终浓度 10%，用分析天平称取 4 g AP 粉末，加 ddH₂O 40 ml，摇匀溶解，4 °C 保存。

注：不要超过 2 个星期，最好新鲜配制。

3. 上样用指示剂(10x loading buffer)

甲酰胺(deionized formamid) 500 ml

4 N NaOH 1.32 ml

溴酚蓝(Bromophonel blue) 263 mg

二甲苯氰(Xylene cyanol FF) 263 mg

ddH₂O 25 ml

混匀后放在摇床上摇 12 小时，4 °C 保存。

4. 5x TBE

Tris 粉	54 g
硼酸(Boric acid)	27.5 g
0.5M EDTA(PH7.9)	20 ml
加 ddH ₂ O 至	1,000 ml

搅匀后室温保存，0.5 和 1x TBE 溶液用此分别稀释 10 倍和 5 倍后用。

5. 4% PAGE 胺胶液

配制一板胶

40%丙烯酰胺胶母液	11 ml
5x TBE 溶液	15 ml
尿素	36.04 g
ddH ₂ O	22 ml

配制 40 板胶

40%的丙烯酰胺胶母液	440 ml
5x TBE 溶液	600 ml
尿素	1,441.6 g
ddH ₂ O	880 ml

实际配制时每次配制 40 板用量，搅拌过夜后过滤，滤液 4 °C 保存。