

文章编号: 1001-1498(2000) 04-0349-06

# PCR-SSCP 用于针叶树种遗传分析的可行性

卢孟柱<sup>1</sup>, 王晓茹<sup>2</sup>, Alfred E. Szmidt<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091; 2. 瑞典农业大学 森林遗传与生理系, 瑞典于默奥 90183)

**摘要:** 利用松树单倍体胚乳、双倍体的针叶材料, 扩增了叶绿体基因组和核基因组的 5 个 DNA 片段, 研究了 SSCP 这一分析方法的可靠性。结果表明 SSCP 分析方法具有坚实的分子基础、较高的分辨率和试验重复性。通过对 SSCP 谱带在杂交子代和单倍体胚乳的分离分析, 证明了 SSCP 还具有良好遗传稳定性。

**关键词:** PCR-SSCP; 针叶树; 遗传分析; 多态型

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

SSCP(Single Stranded Conformation Polymorphism, 单链构型多型性)是 90 年代发展起来的用于遗传分析的方法, 它的基本原理是双链 DNA 高温解链后再快速冷却, 使单链 DNA 在低温下由于碱基的部分互补发生自身折叠, 形成二级结构。构型的特异性主要由 DNA 的一级结构即单链的核苷酸序列所决定, 通常一个碱基的改变就会导致构型的变异<sup>[1]</sup>。利用分辨率非常高的介质如聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测出这种构型的改变, 即在胶上相应的单链谱带出现迁移位置的不同。决定检测效率的因子主要有 DNA 变异的大小、DNA 片段的大小和电泳的条件<sup>[2]</sup>。

SSCP 分析首先需要获得待分析样品的 DNA 片段。医学上某些遗传疾病的基因及其序列、功能研究得较多, 加之与 PCR 技术的结合(称为 PCR-SSCP), DNA 片段的分离、扩增非常容易, 所以该方法最初用于检测基因的突变, 诊断某些遗传病或进行基础研究<sup>[2]</sup>。后来随着植物基因序列的不断积累, PCR-SSCP 开始用于植物的遗传分析<sup>[3]</sup>。SSCP 的优点在于一旦获得了 DNA 序列, 就可以采用相对简单的技术(PCR 及凝胶电泳)分析许多样品, 非常适合于群体遗传学研究。

由于 SSCP 的谱带数目与 DNA 片段的拷贝数(单倍体、双倍体、多倍体)和变异程度(在个体或群体中存在变异的个数)成正相关, 而 SSCP 谱带越多, 其遗传背景(基因型)分析就越困难。所幸的是针叶树种的胚乳为单倍体, 一粒种子就可以分析母本和子代的基因型, 适合用 SSCP 作群体的遗传分析。SSCP 分析同其它分子标记一样, 首先应对方法的可靠性(重复性)、灵敏度及是否符合孟德尔遗传规律进行评价<sup>[3]</sup>。因此, 本研究将在不同 DNA 片段大小、变异程度、拷贝数等条件下, 测定 SSCP 分析的重复性、灵敏度以及遗传规律, 为在针叶树的群体遗传和进化研究上应用 PCR-SSCP 分析方法奠定基础。

收稿日期: 2000-03-02

基金项目: 中国—瑞典科技合作项目

作者简介: 卢孟柱(1964-), 男, 河北任丘人, 副研究员, 分子遗传学博士。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

欧洲赤松(*Pinus sylvestris* L.) 10 个优树亲本、Y3088 × AC3065 的杂交后代针叶及 AC1016、AC4210 亲本种子, 北美乔松(*P. strobus* L.) 和加那利松(*P. canariensis* C. Smith) 的针叶样品分别采自瑞典于默奥林业研究所、日本林业及林产品研究所及葡萄牙, 欧洲白冷杉(*Abies alba* Mill.) 针叶采自意大利。针叶放在-20℃ 冰箱保存, 用于总 DNA 的提取。叶绿体 DNA 特异引物 1F、1R, 2F、2R, 3F、3R 按已发表的黑松(*P. thunbergii* Parl.) 叶绿体基因组序列设计合成<sup>[4]</sup>, 分别位于其基因组 43937、44453、43511、44032、31377、31946, 序列分别为 ACCCAATTTTGGTTTGATAG、ATGTCACCAAAAACAGAGACT, GGACATACGCAATGCTTTAG、CCCTGCTTATTCAAAACCTT, CTTCGTCGTTTGTGGATTAC、AGTCG-ATTTATTAGTGAGCA, 退火温度为 55℃, 它们的大小分别为 510 bp、720 bp 和 580 bp。松树核基因组的特异引物 4F、4R 和 5F、5R 按欧洲赤松的 *gapcp* (依赖于 NAD 的 3-磷酸甘油醛脱氢酶) 和 *chs* (查耳酮合成酶) 基因序列设计并合成, 序列分别为 TGACCGAAATTTGACTA-AACTT、ACAGGGCAATCTACACTAACAT, AAGTGTCAGTAGCAAGAGGCAGAA、TGGCAGTAGCAGATTTATTTCAATG, 退火温度分别为 52℃ 和 60℃。人工合成的寡聚核苷酸引物稀释到 20 pmol·μL<sup>-1</sup> 备用。

### 1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 的提取 取针叶 5 g 液 N<sub>2</sub> 冷冻后研磨成粉末, 用 CTAB 法<sup>[5]</sup> 提取总 DNA。种子浸湿后去胚, 加 50 μL CTAB 在离心管研磨提取。DNA 的浓度及质量用琼脂糖凝胶电泳估测和检查, 最后稀释至 50~100 ng·μL<sup>-1</sup> 备用。

1.2.2 DNA 片段的扩增 DNA 扩增采用 Gibco BRL 公司的 PCR 扩增试剂盒, 在小离心管中加入上述 DNA 样品 2 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 引物 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.15 μL, 25 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 0.15 μL, 超纯水补足 25 μL。样品放在 Perkin Elmer 公司 PCR 仪 (GenAmp PCR System 9600) 上扩增。首先 94℃ 保温 3 min, 热循环程序为 94℃ 1 min, 按引物的退火温度保持 1 min, 72℃ 2 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 保持 10 min。产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上鉴定大小和估测浓度。

1.2.3 SSCP 分析 PCR 产物 1~6 μL (约 20 ng DNA) 放入 10 μL SSCP 样品缓冲液 (95% 甲酰胺, 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mg·mL<sup>-1</sup> 二甲基苯酚, 1 mg·mL<sup>-1</sup> 溴酚蓝) 中, 95℃ 保持 6 min, 迅速在冰浴中冷却 2 min, 直接在 6% 的 MDE<sup>TM</sup> (FMC BioProducts, 美国) 胶上样。聚丙烯酰胺凝胶的制备按 MDE<sup>TM</sup> 产品说明进行, 制胶设备为 PROTEAN<sup>TM</sup>- (Bio-Rad, 美国), 胶厚度为 1 mm。电泳条件为稳压 200 V, 1×TBE 缓冲液, 电泳 24 h, 冷却水温度为 10℃。采用银染色方法<sup>[5]</sup> 检测 DNA 泳带, 主要有如下步骤: (1) 胶在 10% 乙醇和 0.5% 乙酸中固定 2 次, 每次 7 min; (2) 在 0.15% AgNO<sub>3</sub> 中浸泡 40 min; (3) 在 375 mmol·L<sup>-1</sup> NaOH、2 mmol·L<sup>-1</sup> Na(BH<sub>4</sub>)、0.4% 甲醛溶液中染色 5~10 min, 至谱带清晰为止。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

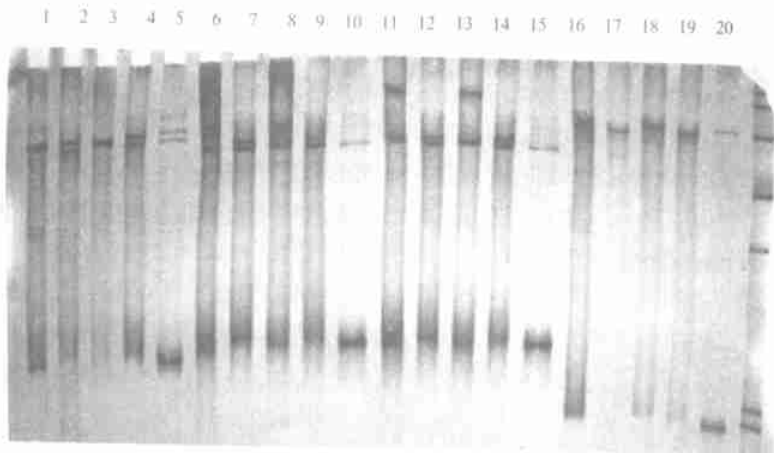
叶绿体基因组的特异引物 1F、1R、2F、2R 及 3F、3R 分别扩增出了欧洲赤松相应 DNA 片

段,分别命名为  $Psy_1$ 、 $Psy_2$  和  $Psy_3$ ,从北美乔松用 1F、1R 扩增出的 DNA 片段命名为  $Pst_1$ ,从北美乔松与欧洲白冷杉用 2F、2R 扩增出的 DNA 片段分别命名为  $Pst_2$ 、 $Aab_2$ ,从加那利松用 3F、3R 扩增出的 DNA 片段命名为  $Pca_3$ 。这些片段的 DNA 序列除  $Aab_2$  外已经被测定<sup>[4]</sup>, $Psy_1$  与  $Pst_1$  之间有 6 个碱基的差别, $Psy_2$  与  $Pst_2$  有 11 个。由于欧洲白冷杉不属于松属, $Psy_2$  与  $Aab_2$  的序列差别会更大。 $Psy_3$  与  $Pca_3$  之间有 6 个碱基的置换及 4 bp 的缺失。这些差别用于鉴定 SSCP 的灵敏度。核基因组的两对引物 4F、4R 及 5F、5R 分别用于扩增欧洲赤松 10 个优树亲本相应的 DNA 片段,用于寻找具有差异的杂交组合。Y3088 与 AC3065 的 4F、4R 扩增片段( $Psy_4$ ) 长度为 1 300 bp,它们的 SSCP 谱带表明其为杂合子。据此进一步扩增了它们 4 个  $F_1$  杂交个体的  $Psy_4$  片段,用于 SSCP 在双倍体材料中的遗传性分析。AC1016、AC4210 各 5 个单倍体胚乳用 5F、5R 扩增了相应的 PCR 片段( $Psy_5$ ),大小为 1 350 bp,用于 SSCP 在单倍体材料中的遗传性分析。

## 2.2 SSCP 分析的重复性和分辨率

PCR 产物变性、冷却后,直接在聚丙烯酰胺凝胶上分离,检测 SSCP。叶绿体 DNA 片段的 SSCP 分析见图 1。图 1 表明,在没有变性的 PCR 产物中,存在相当一部分单链,这是由于某些单链在 PCR 扩增过程中没有复性为双链或两个引物发生不对称扩增的缘故。而变性的扩增 DNA 片段,在 SSCP 分析过程中的急速冷却也有一部分互补单链复性成双链,这两条带都会出现在胶上,但不能用于 SSCP 数据收集。理论上讲,对于单拷贝的叶绿体基因组 DNA 来说, DNA 片段只能产生两个单链,所以 SSCP 带最多只有两条。图 1 中所有片段的 SSCP 谱带均没有超过两条。试验分别按同一条件做了两次 PCR 扩增、变性及冷却试验,结果显示两次独立试验所获得的 SSCP 谱带出现的位置非常一致。上述结果表明 SSCP 的产生具有坚实的分子基础和较好的试验重复性。 $Psy_1$  片段应产生两个单链,但在胶上没有分开, $Pst_1$  的两个单链略有分开。 $Psy_2$ 、 $Pst_2$ 、 $Psy_3$  及  $Pca_3$  的两个单链在胶上出现了明显的差别。

$Psy_1$  与  $Pst_1$ 、 $Psy_2$  与  $Pst_2$ 、 $Psy_2$  与  $Aab_2$ 、 $Psy_3$  与  $Pca_3$  各对之间的 SSCP 谱带均检测到



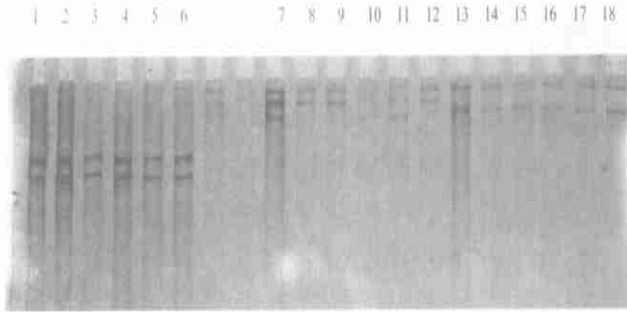
样井 1, 2:  $Psy_3$  和  $Pca_3$ ; 3, 4: 1, 2 的重复; 5: 没有变性的  $Psy_3$  产物; 6 ~ 10:  $Psy_2$  和  $Aab_2$ , 顺序同 1 ~ 5; 11 ~ 15:  $Psy_2$  和  $Pst_2$ , 顺序同 1 ~ 5; 15 ~ 20:  $Psy_1$  和  $Pst_1$ , 顺序同 1 ~ 5

图 1 叶绿体基因组 DNA 片段的 SSCP 谱带

了差异(图 1)。Psy1 与 Pst1 之间有 6 个不同的碱基,相应的 SSCP 谱带就产生了明显的位置差别。Psy2 与 Pst2 有 11 个碱基的差别,Psy2 与 Aab2 出现了更大的差别,Psy3 与 Pca3 之间有 6 个碱基的置换及 4 bp 的缺失,比相应 Psy1 与 Pst1 之间的区别更大,SSCP 谱带的大小差异更加明显(见前页图 1)。说明 SSCP 对 DNA 片段的差异的检测具有较高的灵敏度,且与差异大小有正相关的关系。

### 2.3 SSCP 的遗传稳定性

本研究分别利用欧洲赤松单倍体的胚乳和双倍体的针叶材料,对 SSCP 的遗传性做了鉴定。图 2 为测定结果。用 5F、5R 从 AC1016 扩增出的 PCR 片段 Psy5,在 SSCP 分析中出现了



样井 1~5: Y3088 和 AC3065 及其 4 个杂交子代 Psy4 片段; 7~12: AC1016 及其胚乳的 Psy5 片段; 13~18: AC4210 及其胚乳的 Psy5 片段

图 2 欧洲赤松核基因组 DNA 片段的 SSCP 谱带

4 条带(编号由上至下为 1、2、3、4),中间的 2 条比较接近。1~4 分别对应两个不同基因片段产生的 4 个单链,表明 AC1016 的 Psy5 处于杂合状态。其 5 个单倍体胚乳分为两种类型,3 个为带 1、3,2 个为带 2、4,说明带 1、3 和带 2、4 分别来自同一个 DNA 片段。AC4210 扩增出的 Psy5 为 3 条带,自上而下编为 1、2、3,2 与 3 非常接近。5 个单倍体胚乳中有 4 个出现了有别于 2、3 的一条带,只有一个胚乳与 AC4210 一致,这可能是由于双倍体两个 DNA 片段之间的相互作用所致。出现 1、2、3 谱带的那个胚乳,可能是由于在 DNA 提取时没有彻底排除胚组织的干扰,而导致两个 DNA 片段之间的相互作用。由于 2、3 一直同时出现,可以作为一条谱带处理,不会影响结果分析。

Y3088 与 AC3065 的 4F、4R 扩增片段产生的 SSCP 谱带表明它们为杂合子,因此扩增了其 4 个 F<sub>1</sub> 杂交个体的 Psy4 片段,用于 SSCP 谱带在双倍体材料中的分离特性分析。Y3088 与 AC3065 的谱带一致,分别为 4 条(编号由上至下为 1、2、3、4),1 个 F<sub>1</sub> 个体谱带为 1、3,3 个为 2、4,说明谱带 1、3 和 2、4 分别代表 2 个等位,但序列有差异的 DNA 片段,4 个子代为 1、3 或 2、4 的纯合体。上述结果表明,SSCP 谱带符合孟德尔遗传,子代中没有出现新的谱带类型。同时,依据单倍体胚乳的谱带类型,可以确定亲本的基因型,这对针叶树的群体遗传学分析非常重要。

## 3 结论与讨论

由于一个 DNA 片段在胶上可以产生两条 SSCP 谱带,所以分析叶绿体基因组的单拷贝基因的差异非常简单。本研究利用叶绿体基因组的 3 个片段鉴定了 SSCP 分析的灵敏度及试验

重复性,说明 SSCP 具有坚实的分子基础,并在不同变异水平上检测到了 DNA 样品之间的差别。许多学者利用叶绿体 DNA 序列变异研究物种系统进化关系<sup>[4,6]</sup>,首先需要找到具有变异的基因,以利于筛选出合适的 DNA 序列,本研究的结果为大范围筛选出合适的 DNA 片段提供了方法。

由于双倍体个体有两套染色体,用 SSCP 分析单个个体的一对同源 DNA 片段最多可以出现 4 条不同大小的谱带,如果群体中等位基因的数量不很多,可以通过分析个体的谱带确定哪两条带是来自同一个 DNA 片段,从而进一步确定个体基因型。否则只能采用 SSCP 谱带在子代中的分离来确定<sup>[6,7]</sup>。本研究结果进一步表明,确定个体的基因型可以采用两种方式,一是需要用杂交子代作遗传分析,这只适于具有有杂交子代的林木群体;二是采用单倍体材料如胚乳、花粉。针叶树种由于存在单倍体的胚乳,可以用于确定亲本的基因型。但每一个个体至少需要分析 5 个胚乳才能准确确定个体基因型。采用分析一粒种子的胚乳与胚的 SSCP 谱带的方法可同时确定亲本及其配子的基因型,用于分析群体的遗传结构。目前已建立了从胚中提取 DNA 的方法<sup>[8]</sup>,并已扩增出了相应的 DNA 片段,正用于松树的群体遗传分析。Plomiond 等<sup>[7]</sup>已报道了用 SSCP 标记构建分子标记遗传连锁图,用于辅助选择育种。

总之,PCR-SSCP 与其它分子标记比较,有几个明显的优点:(1)重复性比较高。与 RAPD 标记比较,由于采用特异引物扩增,出现杂带或不确定的带很少,为分析的重复性奠定了基础;(2)SSCP 为共显性标记,适合群体遗传研究。RAPD 和 AFLP 都属于显性分子标记,即不能由带型确定所分析个体为纯合体还是杂合体,因而在分析群体遗传结构时出现困难<sup>[8]</sup>。RFLP 标记虽然为共显性标记,但分析方法复杂、昂贵,不适宜分析大量的样品。因此,PCR-SSCP 较适合于群体遗传分析;(3)数量可以很大。因为 PCR-SSCP 分析的前提条件是知道 DNA 片段的部分序列,以设计出相应的引物。目前已知的林木如杨树、松树的 DNA 序列或 EST(表达序列标签)已经超过 1 万个,因此可以产生大量的 SSCP 分子标记。PCR-SSCP 的主要缺点,一是需要知道 DNA 片段的序列信息,因此在一些分子遗传学研究很少的树种中的应用会有些限制,但由于基因在不同树种中有一定的同源性,只要设计出合适的引物扩增出相应的 DNA 片段,就可以解决这一问题;二是分析多拷贝且变异较大的 DNA 片段时,会产生较多的 SSCP 谱带,使遗传位点分析变得复杂化,必须通过分析多个单倍体样品才能揭示 SSCP 谱带所对应的位点和等位基因。由于针叶树种具有单倍体的胚乳,因此 PCR-SSCP 在针叶树的遗传分析上具有更广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Hayashi K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA[J]. PCR Methods and Applications, 1991, 1: 34 ~ 38.
- [2] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single stranded conformation polymorphisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2766 ~ 2770.
- [3] Bodenes C, Laigret F, Kremer A. Inheritance and molecular variations of PCR-SSCP fragment in Pedunculate oak (*Quercus robur* L.)[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 348 ~ 354.
- [4] Wang X R, Tsumura Y, Yoshimaru H, et al. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer and *trnV* intron sequences[J]. American J Botany, 2000, (in press).
- [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue[J]. Phytochem Bull, 1987,

19: 11 ~ 15.

- [6] Xiang Q Y, Soltis D E, Soltis P S. Phylogenetic relationships of Cornaceae and close relatives inferred from *matK* and *rbcL* sequences[J]. American J Botany, 1998, 85: 285 ~ 297.
- [7] Plomion C, Hurme P, Frigerio J M, et al. Developing SSCP markers in two *Pinus* species[J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 21 ~ 31.
- [8] Lu M Z, Wang X R, Szm idt A E. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* L. [J]. Heredity, 1995, 74: 582 ~ 589.

## Application of PCR-SSCP in Genetic Analysis of Conifers

LU Meng-zhu<sup>1</sup>, WANG Xiao-tu<sup>2</sup>, Alfred E. Szmidt<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China;

2. Department of Forest Genetics, SLU, Umeå 90183, Sweden)

**Abstract:** Five DNA fragments located in chloroplast- and nuclear genome were amplified from DNA extracted from haploid endosperm and diploid needle of *Pinus*, and were further used in the characterization of the PCR-SSCP technique. The results show that the technique has solid molecular basis, high reproducibility and sensitivity. The analysis of the SSCP bands using controlled cross and haploid endosperm has confirmed their Mendelian inheritance. Therefore PCR-SSCP could find many uses in phylogenetic and population genetic analysis in conifers.

**Key words:** PCR-SSCP; conifer; genetic analysis; polymorphic