

# SSCP 技术及在植物中的应用

李媛媛

(潍坊学院 生物工程学院, 山东 潍坊 261061)

**摘 要:** 单链构象多态性(SSCP) 技术是一种简便、灵敏的多态性检测方法, 近年在植物研究中得到了较多应用。现就 SSCP 技术的原理、特点、影响因素以及在植物研究中的应用进行综述。

**关键词:** SSCP; 影响因素; 多样性; 定位

**中图分类号:** Q 94-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0122-03

相同长度的 DNA 片段即使一个碱基不同, 经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 单链迁移率也会不同。这种由于碱基序列的差异表现出的多态现象称作 DNA 单链构象多态性(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)。这一现象最先是由日本学者 Noumi 等<sup>[1]</sup>发现的。1989 年, 日本学者 Orita 等<sup>[2]</sup>将此法用于检测复杂基因组单拷贝 DNA 中的多态现象, 他们认为 SSCP 可以检测任何位点的点突变。同年, Orita 等<sup>[3]</sup>用 SSCP 对 PCR 扩增产物进行了分析, PCR 与 SSCP 的结合使得分析的灵敏度大大增加。但由于将同位素掺入 PCR 扩增产物中, 通过放射自显影显示结果, 使该技术的推广造成了一定困难。1992 年, 日本学者 Hoshino 等<sup>[4]</sup>对 SSCP 分析法作了大胆改进, 用敏感的银染法直接对电泳后的凝胶进行染色, 增强了安全性, 并且简便、快捷。近年来, 研究者又对 SSCP 技术进行了各种改进, 产生了限制性片段 SSCP(PCR-RF-SSCP) 技术、荧光标记 SSCP(F-SSCP)、低离子强度 SSCP(PCR-LIS-SSCP)、毛细管电泳 SSCP 等新技术。目前该技术已成为生物学领域研究的一种常用方法, 在植物研究中也得到了较多应用。

## 1 SSCP 技术的基本原理

PCR 产物经热或化学变性后形成单链, 在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, DNA 单链的迁移率除与 DNA 链的长短有关外, 更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。DNA 单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象, 这种构象由 DNA 单链碱基决定, 其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用(主要为氢键)来维持。相同长度的 DNA 单链其顺序不同, 甚至单个碱基不同, 所形成的构象不同, 电泳迁移率也不同。

## 2 影响 SSCP 检出率的因素

SSCP 分析结果的检出率主要受片段长度、甘油、温度等条件的影响<sup>[5]</sup>。首先, 用于 SSCP 分析的核酸片段越小, 检测的敏感性越高<sup>[6]</sup>, 用小于 200 bp 的片段进行 SSCP 时, 可发现其中 70% 的变异; 对于 300 bp 左右的片段则只能发现其中 50% 的变异; 而大于 500 bp 的片段, 仅能检出 10%~30% 的变异。其次, 凝胶中加入低浓度的变性剂, 如 5%~10% 甘油, 5% 尿素或甲酰胺, 10% 二甲亚砜或蔗糖等有助于提高敏感性<sup>[7]</sup>。这可能是因为这些物质轻微改变了单链 DNA 的构象, 增加分子表面积, 降低了单链 DNA 的泳动率所致。但有些变异序列却只能在没有甘油的凝胶中被检出。再次, 一般认为保持凝胶内温度恒定是 SSCP 分析最关键的因素<sup>[8]</sup>。温度有可能直接影响 DNA 分子内部稳定力的形成及其所决定的单链构象, 从而影响突变的检出。为确保电泳温度相对恒定, 应减少凝胶厚度, 降低电压, 增加有效的空气冷却或循环水冷却等。此外, SSCP 技术还易受凝胶浓度的影响。余桂红等<sup>[9]</sup>研究发现, 凝胶中丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的比例为 29:1, 凝胶浓度为 12% 时, 有利于小麦中 SSCP 的检出。然而, 对同序列只用单一的条件, 检出率一般为 77%~87%。要得到 100% 的检出率, 可能需采用多种条件, 例如可以采用两种以上凝胶浓度以提高 SSCP 的检出率。

## 3 SSCP 技术的优缺点

### 3.1 SSCP 技术的优点

检测多态性的主要方法有琼脂糖凝胶检测、变性聚丙烯酰胺电泳检测以及检测基因单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)等多种方法。用于检测 SNP 的方法较多, 包括直接测序、以构象为基础的方法、变性高压液相色谱法、错配的化学切割及酶学法等。以构象为基础的方法又包括 SSCP、异源双链分析及变性梯度凝胶电泳。尽管测序和质谱分析在 SNP 检测方面被广泛应用, 但是这些技术都需要特殊的设备, 费用高昂。与上述方法相比, SSCP 检测技术具有费用

作者简介: 李媛媛(1979-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事植物遗传育种与生物技术研究工作。E-mail: yylilove@126.com。

基金项目: 山东省中青年科学家科研奖励基金计划资助项目(2007BSA07009)。

收稿日期: 2008-11-16

低、不需特殊仪器等优点。琼脂糖凝胶检测和变性聚丙烯酰胺电泳检测效率不高,对基因间的多态性检测能力非常有限。与这2种方法相比,SSCP检测又具有更高的灵敏度。因此,SSCP检测技术具有高灵敏度、低费用,且不需要特殊仪器等优点,是一种比较合适的检测多态性的方法。

### 3.2 SSCP 技术的缺点

SSCP也具有局限性。首先,通过SSCP虽能检测出扩增DNA片段中是否有突变,但不能直接得到发生突变的具体核苷酸。其次,SSCP技术可能检测不到所有的突变位点。再次,影响SSCP试验结果的因素比较多,电泳条件不好控制。

## 4 SSCP 技术在植物研究中的应用

SSCP技术是新近发展起来的一种分子生物学分析方法,在植物中的应用主要是利用SSCP检测到的多态性进行遗传多样性研究和对功能基因或ESTs序列进行定位、图谱构建。

### 4.1 多样性研究

Dumolin等<sup>[10]</sup>利用PCR-RF-SSCP技术对植物线粒体DNA进行了分析,检测到了橡树线粒体DNA的稀有多态性。1997年,Slabaugh等<sup>[11]</sup>应用SSCP对Cuphea的同源基因多态性进行了研究。卢孟柱等<sup>[12]</sup>研究结果表明,采用分析松树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,可用于分析群体的遗传结构。McCallum等<sup>[13]</sup>利用SSCP检测手段在洋葱31个被检测的序列中,有26个序列在不同材料中表现出多态性。Shirasawa等<sup>[14]</sup>利用PCR-RF-SSCP技术,对水稻品种中随机挑选的基因进行了DNA多态性分析。结果发现,有108个DNA片断在17个水稻品种中检测到多态性,并且在任2个品种中平均有36.9个DNA片断中能检测到多态性。最近,Shirasawa等<sup>[15]</sup>对水稻中的1036个基因进行了PCR-RF-SSCP分析,有134个基因在17个日本品种中表现出多态性。黄建安等<sup>[16]</sup>根据茶树多酚氧化酶(PPO)基因的部分序列设计引物,对40个茶树品种(系)PPO基因的部分序列分段进行SSCP分析,不同品种(系)的PPO基因存在丰富的单链构象多态性。

### 4.2 定位和图谱构建

早在1999年,Schneider等<sup>[17]</sup>就将某些与糖分品质及产量有关的基因利用SSCP技术定位到甜菜图谱中。2000年,Jean等<sup>[18]</sup>利用该技术,将8个与木质化有关的基因定位在尾叶桉和巨桉的连锁图谱上。2002年,Etienne等<sup>[19]</sup>利用SSCP技术对12个与桃子品质性状有关的cDNA定位到桃子图谱中,并对这些基因与桃子品质性状有关的QTL之间的关系进行了评价。Kuhn等<sup>[20]</sup>、Baldi等<sup>[21]</sup>将某些抗病基因发展成SSCP标记,并分别定

位到可可和苹果图谱中。在珍珠粟中,Bertin等<sup>[22]</sup>对299个ESTs进行了引物设计,经过SSCP分析,其中231对引物能扩增,得到了106个多态性位点,提供了102个标记。Aubert等<sup>[23]</sup>将由15个功能基因发展而来的SSCP标记定位到了大豆图谱中。Tondelli等<sup>[24]</sup>把某些与寒冷和干旱胁迫可能有关的转录因子基因发展为SSCP标记并定位到大麦连锁群,以寻找与这些胁迫可能有关的基因。在甘蓝型油菜中,Li等<sup>[25]</sup>将代表111个不同ESTs或者基因的DNA序列发展为可靠的177个SSCP标记,并整合到甘蓝型油菜标准图谱中。随后,Li等<sup>[26]</sup>在该图谱基础上,定位了甘蓝型油菜重要农艺性状的QTLs,结果发现,共有涉及39个不同ESTs或基因的45个SSCP标记和油菜产量及其相关性状有关。利用SSCP技术对功能基因在图谱上的定位,可以对这些基因与相关性状进行连锁分析,找到与性状有关的候选基因。即使不能找到直接相关的候选基因,也可以基于功能基因在各个物种中具有高度保守性的特征进行比较基因组学等研究,正如Muangprom和Osborn<sup>[27]</sup>在白菜中寻找与株高有关的候选基因所作的一系列研究一样,利用比较基因组的结果,发展与性状更紧密相关的功能标记,为克隆控制这些性状的基因奠定基础。

除了利用SSCP技术对功能基因进行定位外,SSCP技术也应用到其它类型标记的多态性检测中。Ujino-Ihara等<sup>[28]</sup>将SSCP技术应用于STS标记的多态性检测,在测序存在差异片断的22个标记中,有19个经SSCP检测能得到多态性,并将这些标记整合到日本柳杉的图谱中。Piggott等<sup>[29]</sup>将SSCP检测手段应用于SSR标记的鉴定研究。结果表明,利用该策略的鉴定效率比常规技术大大提高。Sato等<sup>[30]</sup>将RFLP标记重新设计引物进行SSCP检测,有80%的引物在籼稻和粳稻中显示出多态性。

另外,SSCP技术还应用到植物基因突变位点的检测等方面<sup>[31-32]</sup>。然而,与在动物中的普遍应用相比,SSCP技术在植物中的应用目前还比较有限。随着植物基因序列的不断积累和各种实验条件的优化,SSCP技术在植物各项研究中将会得到更为广泛的应用。

### 参考文献

- [1] Noumi T, Mosher M E, Natori S, et al. A phenylalanine for serine substitution in the B subunit of Escherichia coli F1-ATPase affects dependence of its activity on divalent cation [J]. J Biol Chem, 1984, 259: 10071-10075.
- [2] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2766-2770.
- [3] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. Genomics 1989(5): 874.
- [4] Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, et al. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1

and DPBI genes; a single economical and rapid method for histocompatibility testing [ J ]. Hum Immunol, 1992, 33: 98.

[ 5 ] Hayashi K, Yandell D W. How sensitive is PCR-SSCP [ J ]. Human Mutation, 1993(2): 338-346.

[ 6 ] Sheffield V G, Beck J S, Kwitek A E. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions [ J ]. Genomics, 1993, 16: 325-332.

[ 7 ] Vidal - Puig A, Moller D E. Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) Methods [ J ]. Bio Techniques, 1994, 17: 490-496.

[ 8 ] Hongo T, Buzard G S, Calvert R J. Heterogeneity studies [ J ]. Human Molecular Genetics, 1994(3): 471-476.

[ 9 ] 余桂红,唐克帆,马鸿翔等. 凝胶组成对小麦SSCP技术的影响 [ J ]. 江苏农业学报, 2007, 23(5): 391-395.

[ 10 ] Dumolin L S, Bodenes C, Petit R J. Detection of rare polymorphism in mitochondrial DNA of oaks with PCR-RFLP combined to SSCP analysis [ J ]. Forest Genetics, 1996(3): 227-230.

[ 11 ] Slabaugh M B, Huestis G M, Leonard J, et al. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of Cuphea [ J ]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 400-408.

[ 12 ] 卢孟柱, 王晓茹. PCR-SSCP 用于针叶树种遗传分析的可行性 [ J ]. 林业科学研究, 2000, 13(4): 349-354.

[ 13 ] McCallum J, Leite D, Pither-Joyce M, et al. Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.) [ J ]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 979-991.

[ 14 ] Shirasawa K, Monna L, Kishitani S, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Randomly Selected Genes among japonica Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties identified by PCR-RF-SSCP [ J ]. DNA Research, 2004(11): 275-283.

[ 15 ] Shirasawa K, Maeda H, Monna L, et al. The number of genes having different alleles between rice cultivars estimated by SNP analysis [ J ]. Theor Appl Genet, 2007, 115: 1067-1074.

[ 16 ] 黄建安, 黄意欢, 罗军武, 等. PCR-SSCP-银染法在茶树基因突变分析中的应用 [ J ]. 福建茶叶, 2007(2): 32-34.

[ 17 ] Schneider K, Borchardt D G, Schäfer-Pregl R, et al. PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris* [ J ]. Mol Gen Genet, 1999, 262: 515-524.

[ 18 ] Jean M G, Philippe R, Jacqueline G P. Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes [ J ]. Molecular Breeding, 2000 (6): 441-449.

[ 19 ] Etienne C, Rothan C, Moing A, et al. Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [ *Prunus persica* (L.) Batsch ] [ J ]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 145-159.

[ 20 ] Kuhn D N, Heath M, Wissner R J, et al. Resistance gene homologues in *Theobroma Cacao* as useful genetic maker [ J ]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 191-202.

[ 21 ] Baldi P, Patocchi A, Zini E, et al. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple [ J ]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 231-239.

[ 22 ] Bertin I, Zhu J H, Gale M D. SSCP-SNP in pearl millet-a new marker system for comparative genetics [ J ]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 1467-1472.

[ 23 ] Aubert G, Morin J, Jacquin F, et al. Functional mapping in pea as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula* [ J ]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1024-1041.

[ 24 ] Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, et al. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley [ J ]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 445-454.

[ 25 ] Li Y, Ma C, Fu T, et al. Construction of a molecular functional map of rapeseed (*Brassica napus* L.) using differentially expressed genes between hybrid and its parents [ J ]. Euphytica, 2006, 152: 25-39.

[ 26 ] Li Y, Shen J, Wang T, et al. QTL analysis of yield-related traits and their association with functional markers in *Brassica napus* L [ J ]. Australian Journal of Agricultural Research, 2007, 58: 759-766.

[ 27 ] Muangprom A, Osborn T C. Characterization of a dwarf gene in *Brassica rapa* including the identification of a candidate gene [ J ]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1378-1384.

[ 28 ] Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Iwata H, et al. Single-strand conformation polymorphism of sequence-tagged site markers based on partial sequences of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* [ J ]. Genes and Genetic Systems, 2002, 77: 251-257.

[ 29 ] Piggott M P, Banks S G, Beheregaray L B. Use of SSCP to improve the efficiency of microsatellite identification from microsatellite-enriched libraries [ J ]. Molecular Ecology Notes, 2006(6): 613-615.

[ 30 ] Sato Y, Nishio T. Efficient detection of DNA polymorphism in cabbage and rice cultured by PCR-RF-SSCP (PRS) [ J ]. Plant Cell Rep, 2002, 21: 276-281.

[ 31 ] Sato Y, Nishio T. Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP [ J ]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 560-567.

[ 32 ] 王翠亭, 黄占景, 何聪芬, 等. PCRSSCP 与测序技术相结合检测小麦耐盐突变体 [ J ]. 遗传学报, 2001, 28(9): 852-855.

## Single-Strand Conformation Polymorphism and Its Application in Plant Research

LI Yuan-yuan

(Department of Bio-engineering, Weifang College, Weifang, Shandong 261061, China)

**Abstract:** Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) is a simple and sensitive method to detect polymorphisms. In recent years, this method has been widely used in plant research. In this paper, the principle, methods, characteristics and affected factors of SSCP were simply introduced. And the applications of SSCP in plant research were reviewed.

**Key words:** Single strand conformation polymorphism; Affected factors; Diversity; Mapping