

加工番茄 PCR-SSCP 分子标记体系的建立与优化

马海新, 庞胜群, 闫丽娟, 汪 斌, 魏海滨, 程琳琳

(石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832003)

摘 要:以加工番茄为试验材料, 采用 PCR-SSCP 分子标记技术, 对 DNA 提取方法、PCR 反应程序、聚合酶链式反应-单链构象多态性分子标记体系的电泳条件、变性剂等诸多因素进行了研究, 筛选和建立了多态性检出率高、带型清晰、重复性好的 PCR-SSCP 反应体系和反应程序。结果表明: 采用 CTAB 法提取番茄叶片 DNA 时, 在 CTAB 缓冲液中加入 5 mol/L NaCl, 第一次抽提离心速度和离心时间分别为 8 000 r/min 和 15 min, 可以获得高质量的 DNA, PCR 扩增程序为 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 72℃ 10 min, 29 个循环, 退火温度 52℃, 引物大小 100~300 bp, 98℃ 变性 10 min, 非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度 8%, 电泳 1.5~2.5 h, 聚丙烯酰胺凝胶中不添加甘油为加工番茄 PCR-SSCP 分子标记体系最佳的条件组合。

关键词:加工番茄; PCR-SSCP; 聚丙烯酰胺凝胶; 银染

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0088-06

分子标记技术是植物新品种选育的重要辅助手段之一, 早在基因学说建立之后, 育种学家就希望利用基因型选择代替表型选择, 并提出采用遗传标记在育种中对复杂性状进行辅助选择的设想^[1]。而现代 DNA 标记技术的发展, 为育种者提供了一种快速、准确的选择方法^[2]。番茄基因组大小约 950 Mb, 存在丰富的近缘种质材料, 一直被作为遗传学和分子育种研究的重要模式作物之一。在植物育种中也开始得到运用, MC CALLUM 等^[3]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^[4]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, 结果表明, 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。漆燕等^[5]利用 RGA-SSCP 标记技术对花生进行了多态性检测。目前应用于番茄的遗传标记有 SSR、AFLP、RFLP、RAPD 等^[6]。而关于 PCR-SSCP 分子标记在加工番茄上的应用尚鲜见报道。聚合酶链式反应-单

链构象多态性分析(PCR-SSCP)是近年发展起来的一种基因分析方法, 自 1989 年由日本关谷实验室创立以来, 被广泛应用于生命科学研究领域中, 特别是点突变基因检测^[7]。该技术是以 PCR 为基础, 根据被扩增的单链 DNA 片段在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 含有点突变的基因会发生迁移率的改变, 从而与其正常基因片段区别开来这一方法, 检测发生突变的植株, 因其高度的灵敏性、操作简便、多态性高、产率较好而被得到发展^[8]。

该研究利用 PCR-SSCP 分子标记技术, 以加工番茄为试材, 对经过甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变的植株叶片 DNA 进行突变检测, 优化了提取加工番茄总 DNA 的方法和 PCR-SSCP 反应体系和反应程序, 旨在为加工番茄分子标记辅助选择育种提供更快、更便捷的相关技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用 EMS 诱变加工番茄种子, 获得 375 个 M₂ 代单株, 提取 M₂ 代植株叶片的 DNA 作为模版。

用于试验的 CTAB、EDTA₂Na、NaCl、β-巯基乙醇、PVP-40、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、Tris、2xMIX、丙烯酰胺、二甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、硼酸、甲醛、TEMED 等均购自新疆沃德生物科技有限公司, 硝酸银、冰醋酸及其它银染试剂均为国产分析纯。PCR 仪为德国 Eppendorf 公司生产。DYY-11 型电脑三恒用电泳仪和 DYCZ-30D 型双板夹芯式垂直电泳槽为北京六一仪器厂生产。所用 16 对引物经软件 Primer Premier 5.0 设计而成, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 并按照说明溶

第一作者简介:马海新(1990-), 男, 新疆昌吉人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: 294524958@qq.com.

责任作者:庞胜群(1970-), 女, 安徽萧县人, 硕士, 副教授, 现主要从事蔬菜遗传育种等研究工作。E-mail: pangshqok@shzu.edu.cn.

基金项目:石河子大学资助项目(gxjs2012-yz08); 新疆生产建设兵团科技局资助项目(2014AB004); 科技支疆计划资助项目(2014AB004)。

收稿日期:2015-03-15

表 1 PCR-SSCP 扩增所用引物

Table 1 Primer pairs for PCR-SSCP amplification

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	基础 Bases	预期大小 Expected product size/ bp	提纯方法 Purification methods
Hp-1-1	F:GTCTTTGCTGCCTCCGATAG R:TCGTCTCTTGAATGGCTGAAG	20 20	244	ULTRAPAGE
Hp-1-2	F:CTATGTGCTTTGGGAGATGG R:CGAAGTGTTATGGGCTGTGT	20 20	110	ULTRAPAGE
Hp-1-3	F:TGCGACTACAGATTTCAGATG R:ACCTCCACACCCCTTTATCAC	21 21	158	ULTRAPAGE
Hp-1-4	F:GTCTTTGCTGCCTCCGATAG R:GGGTATTGAACGAATGTGAAGC	20 22	204	ULTRAPAGE
耐盐 1-1	F:TTGATGATTTCCTGCTGAC R:GAGGTGTGTGTGCTGTGGTG	20 20	182	ULTRAPAGE
耐盐 1-2	F:TCAGAGTTCAATTTGGGACTTTC R:GAGGTGTGTGTGCTGTGGTG	22 20	121	ULTRAPAGE
耐盐 1-3	F:TTGATGATTTCCTGCTGAC R:ATTGTGCTTGTGCTGTGTC	20 19	233	ULTRAPAGE
耐盐 1-4	F:CACCACAGCAACAACACCTC R:GCCCTATCTTTCTCTTCTCG	20 21	268	ULTRAPAGE
耐盐 2-1	F:TCAGCCTCAACAGCAAAGG R:TGTAGCCAATCTCCAAATGC	19 20	238	ULTRAPAGE
耐盐 2-2	F:GGAATCTCAGCCTCAACAGC R:TTGCTCTGCTCACCTTAAAC	20 20	128	ULTRAPAGE
耐盐 2-3	F:GGAGATTGGCTACAGGAGAGC R:TCCACCTACATTGGCATCC	21 20	209	ULTRAPAGE
耐盐 2-4	F:GTCTCGTCAGGGTTCTGCTG R:TTCCACCATGCTTTAGACC	20 20	106	ULTRAPAGE
Hp-2-1	F:TGCTTCACTTCTGGTGTTAA R:TTCTTAGTTTCGCCATCTGTG	21 21	110	ULTRAPAGE
Hp-2-2	F:CATGCTTCACTTCTGGTGTT R:TCTTAGTTTCGCCATCTGTG	21 20	111	ULTRAPAGE
Hp-2-3	F:TGAAGCCAGGTACGGACTTT R:TCTTAGTTTCGCCATCTGTG	20 20	149	ULTRAPAGE
Hp-2-4	F:AAATGAAGCCAGGTACGGACT R:TCTTAGTTTCGCCATCTGTG	21 20	152	ULTRAPAGE

解引物(表 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 DNA 提取采用改良的 CTAB 法^[9-11]。选用 2 种不同抽提方式对加工番茄叶片 DNA 进行抽提,方式 1:第一次抽提离心速度和时间设为 12 000 r/min 和 10 min;方式 2:第一次抽提离心速度和时间设为 8 000 r/min 和 15 min。每种方式 4 次重复。

表 2 CTAB 缓冲液配方

Table 2 Different CTAB buffer

药剂 Drug	方法 1 Method 1	方法 2 Method 2
1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	10 mL	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	4 mL	4 mL
NaCl	1.4 mol/L NaCl 28 mL	5 mol/L NaCl 28 mL
CTAB	2 g	2 g
ddH ₂ O	58 mL 定容至 100 mL	58 mL 定容至 100 mL
β-巯基乙醇 β-mercaptoethanol	提取时每个样加入 10 μL	提取时每个样加入 10 μL

1.2.2 引物 根据已发表的番茄耐盐基因的碱基序列(GenBank accession number: EU670751, EU670752, 该基

因全长 1 300 bp 和 1 810 bp^[12]),利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异扩增的 PCR 引物。

1.2.3 PCR 扩增程序 PCR 反应体积为 25 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 正反向引物各 1 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。设计 2 种反应程序, 反应程序 1: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 72℃ 10 min, 共 29 个循环^[13]; 反应程序 2: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 72℃ 10 min, 共 29 个循环^[14], 退火温度梯度设置为 50、52、54℃(耐盐引物 1-1, F: 5'-TTGATGATTTCCTGCTGAC-3'; R: 5'-GAGGT-GTTGTTGCTGTGGTG-3')。

1.2.4 PCR 产物的变性 参照文献[15]。94℃ 高温变性 10 min, 迅速冰浴 10 min。

1.2.5 SSCP 分析 凝胶浓度的选择: 参照文献[10]和[16]并稍作改动, 将丙烯酰胺: 二甲基双丙烯酰胺改为 29: 1, TEMED 加入 50 μL, 10% 过硫酸铵加入 350 μL, PCR 产物在 6%、8% 2 种浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离, 并设置添加甘油与不添加甘油组。AgNO₃ 染色: AgNO₃ 染色是 SSCP 分析成败的关键步骤, 要时刻注意观察, 应根据气温变化调整显色时间与甲醛用量^[17]。具体步骤参照文献[18]、[10]、[19]。条带分析: 将聚丙烯酰胺凝胶胶带置于灯床上观察并记录每个条带的条带数和位点, 以对照为参照, 找出与对照条带有差异(位点移位、缺失或增加 1 个条带)的条带, 经重复验证以确保试验的可靠性。

2 结果与分析

2.1 离心转速对加工番茄 DNA 提取的影响

经核酸仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可知, 方式 1 抽提的 DNA 含量明显少于方式 2(图 1), 方式 1 DNA 含量为 54 ng/L 和 278 ng/L, 而方式 2 DNA 含量为 115 ng/L 和 655 ng/L。这可能是由于方式 1 第一次离心转速过大, 使大量 DNA 混杂于杂质中并被弃除, 而方式 2 第一次抽提离心转速采用 8 000 r/min, 使更多 DNA 留于上清液, 第二次抽提时再延长离心时间, 更好的去除了杂质。

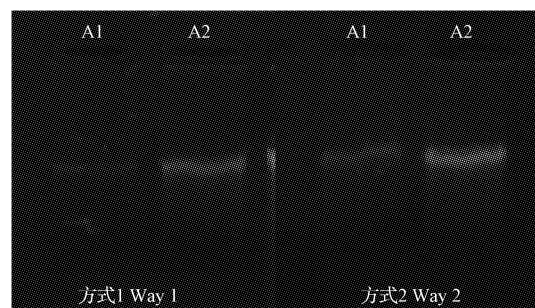


图 1 不同离心速度对加工番茄叶片 DNA 提取的影响

Fig. 1 Effect of different centrifuge speed on DNA extraction of processing tomato leaves

2.2 高盐浓度对加工番茄 DNA 提取的影响

在提取 DNA 时 NaCl 提供一个高盐环境,使 DNA 充分溶解,存在于液相中,在高离子强度的溶液中,CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物。经 1% 琼脂糖凝胶检测发现,1.4 mol/L NaCl CTAB 配方提取加工番茄 DNA 的效果较 5 mol/L NaCl CTAB 配方差(图 2),这可能是由于 DNA 未充分溶解,CTAB 与蛋白质和多聚糖形成的复合物不完全而导致蛋白质较多,拖尾现象严重。

2.3 引物的筛选

用 20 对 SSCP 引物对加工番茄诱变处理材料和对照 DNA 进行引物筛选,大部分引物非变性聚丙烯酰胺电泳结果与对照差异性条带较少,表明该引物不适合该试验点突变的检测,但有 2 对引物在诱变处理与对照间差异条带较多,部分 SSCP 引物筛选如图 3 所示。

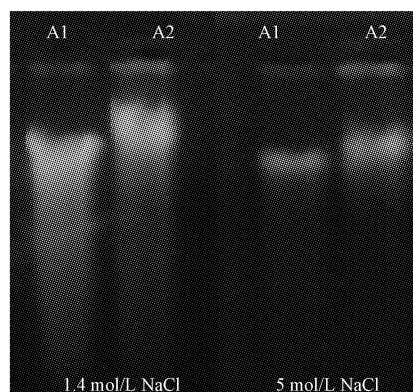
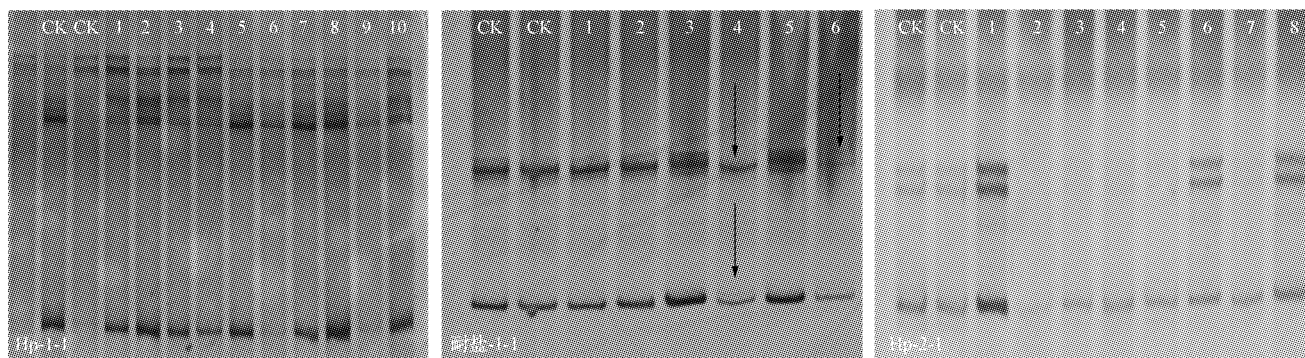


图 2 不同高盐浓度对加工番茄叶片 DNA 提取的影响

Fig. 2 Effect of different salt concentration on DNA extraction of processing tomato leaves



注:CK:对照,下同。

Note:CK:Compare. The same as below.

图 3 部分引物 PCR-SSCP 扩增结果

Fig. 3 Effect of part of the primer on amplification results of PCR-SSCP

2.4 T_m 对加工番茄 DNA 扩增产物的影响

熔解温度(T_m)是引物的一个重要参数,在理想状态下,退火温度足够低,以保证引物同目的序列有效退火,同时还要足够高,以减少非特异性结合,因此筛选合适的 T_m 值对结果的观察至关重要。

经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明,对于引物耐盐 1-1,经紫外透射仪上观察,退火温度为 52℃ 较为合适,条带清晰,非特异性条带较少,条带差异性明显;而 48℃ 退火温度非特异性条带较多,影响观察结果,56℃ 退火温度差异性条带数目较少。

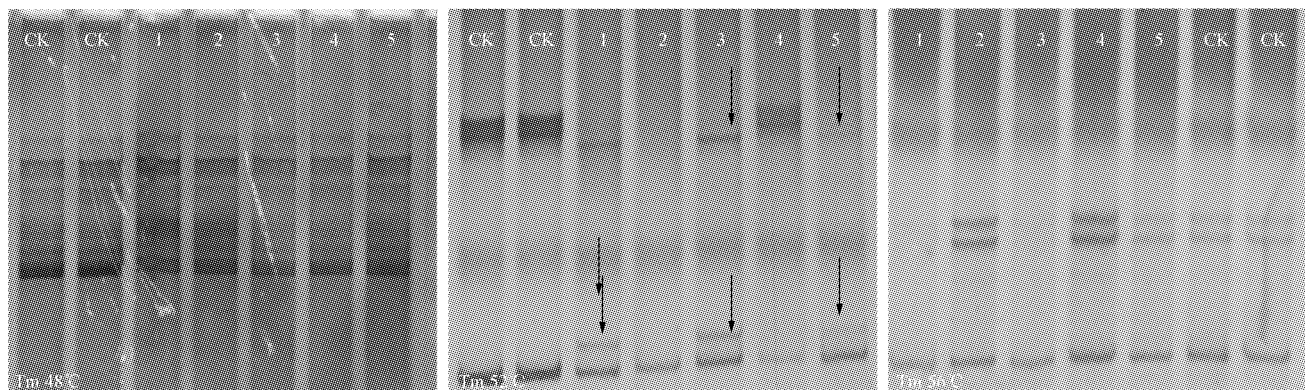


图 4 T_m 对加工番茄 DNA 扩增产物的影响

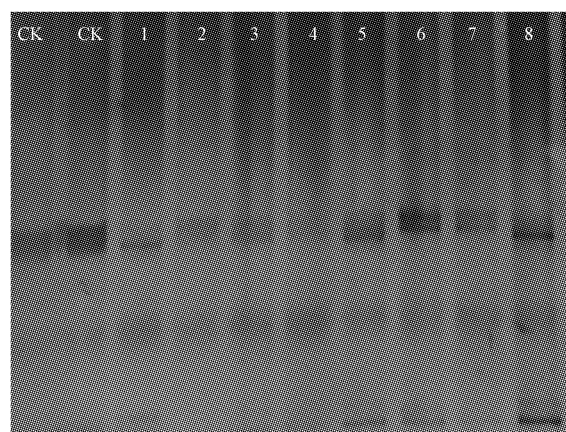
Fig. 4 Effect of different T_m on processing tomato DNA amplification products

2.5 PCR 反应程序的选择

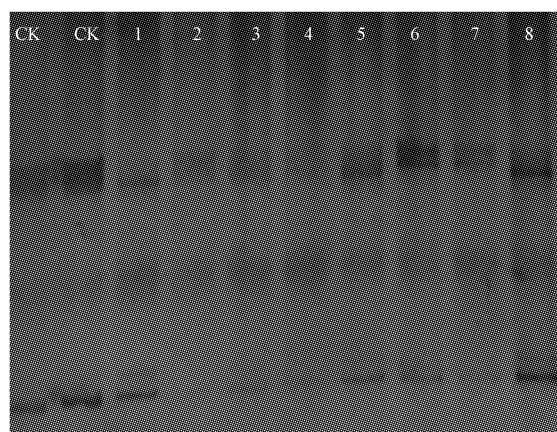
SSCP 引物对 PCR 反应较灵敏,PCR 的反应程序和 PCR 体系中各成分的用量均影响扩增结果,对于新设计的引物,应按照引物合成单给出的最优退火温度和引物设计软件设定退火温度梯度,从而筛选得到一个最

优退火温度,再调整程序和其它成分。

经研究发现,对于该试验,反应程序 1 和反应程序 2 的最终 SSCP 分析结果差异不大(图 5),为节约时间,最终选择反应程序 1 作为该试验的 PCR 反应程序。



第1反应程序 Reaction procedure 1



第2反应程序 Reaction procedure 2

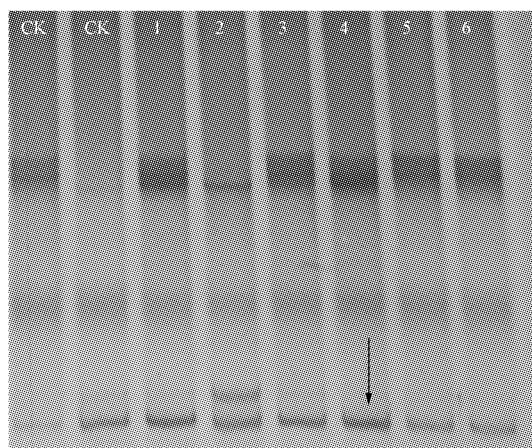
图 5 PCR 反应程序对加工番茄叶片 DNA 的影响

Fig. 5 The effect of different PCR reaction process of processing tomato leaves' DNA

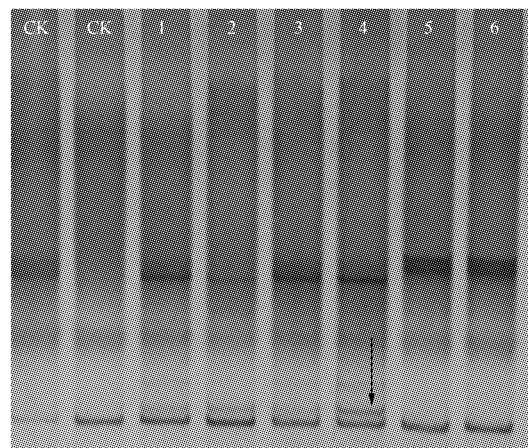
2.6 非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度的选择

凝胶浓度的选择应根据 PCR 扩增片段大小而定^[21],该试验扩增的 DNA 片段在 100~300 bp,根据前人经验可知,6% 和 8% 的凝胶浓度都能检测出

100~300 bp 的点突变,但该试验研究结果表明,用 8%凝胶浓度跑出的条带比 6%凝胶浓度条带更好,泳动速率和分析结果也有所不同,说明凝胶浓度对 SSCP 检出率有影响(图 6)。



6%凝胶浓度 Gel concentration of 6%



8%凝胶浓度 Gel concentration of 8%

图 6 非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度对加工番茄叶片 DNA 的影响

Fig. 6 Effect of non-denaturing polyacrylamide gel concentration on DNA of processing tomato leaves electrophoresis results

2.7 甘油对加工番茄 SSCP 条带的影响

甘油是一种弱变性剂,甘油对 SSCP 条带泳动的影响较为复杂,凝胶中是否添加甘油对不同基因片段的 PCR-SSCP 分析有不同的效果。加工番茄 SSCP 分析结果的检出率也受到甘油的影响^[22],有研究表明,加入低

浓度的变性剂(甘油)可提高灵敏度^[23],也有研究认为,凝胶中不加甘油的效果较好^[24]。该试验结果表明,不添加甘油的 SSCP 分析结果比添加 5%甘油更好,检出率也稍高。加甘油检出率为 20%,不加甘油检出率为 60%。

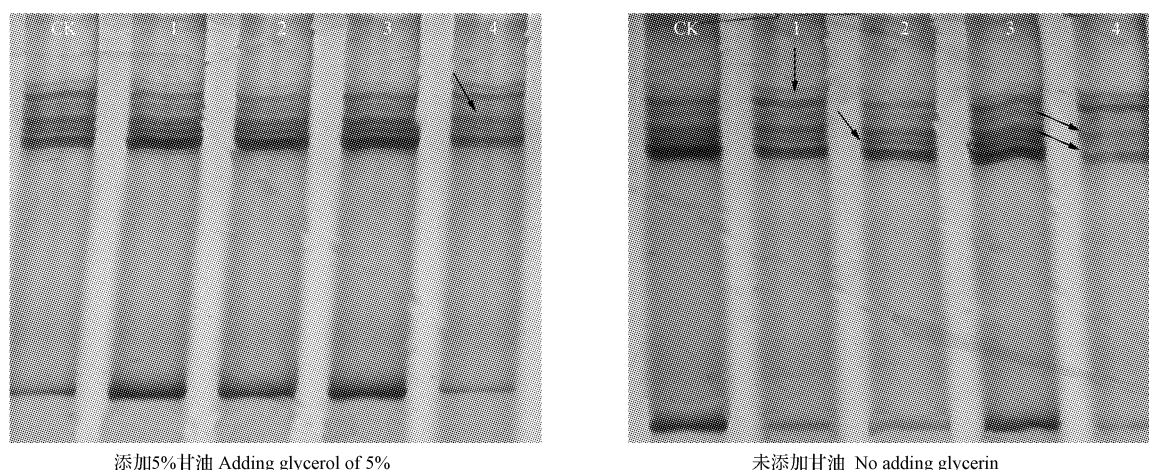


图7 甘油对加工番茄 SSCP 分析结果的影响

Fig.7 The effect of glycerin of processing tomato SSCP analysis results

3 结论与讨论

3.1 CTAB 法的改良

虽然用 CTAB 法提取加工番茄叶片 DNA 技术已经相当成熟,但通过该试验发现对传统的 CTAB 法进行微略调整,更有助于提高 DNA 的质量与含量。CTAB 法提取加工番茄 DNA 时加入 5 mol/L NaCl 的高盐浓度、第 1 次抽提时离心速度为 8 000 r/min、离心 15 min 使得检测效果更好。

3.2 PCR-SSCP 反应体系的优化

PCR 反应体系中的各组分均能影响最终的扩增结果,因此适宜体系的建立对试验非常重要。引物的片段大小也是影响 SSCP 检出率的条件之一,有资料表明用小于 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,则仅能检出 10%~30% 的变异。因此,小于 300 bp,尤其是 150 bp 左右的核酸片段能检出 100% 的变异^[28]。该试验最终筛选出的 2 对引物扩增出的片段大小也在 300 bp 左右,这与前人研究结果一致。用不同的 SSCP 引物检测多态性时,由于不同引物的 T_m 不同,因而采用的最适 T_m 也不同,试验中通过梯度 PCR 仪筛选引物的最佳退火温度,对于引物耐盐 1-1, T_m 值设置为 52℃ 较为合适,这与一般引物退火温度设计原则(比给出的 T_m 值低 5℃ 左右)一致。PCR 反应程序的选择也是影响试验结果的因素之一,该试验研究表明,反应程序对结果影响较小,可能是因为 2 个反应程序都在可适用范围内,为了更好地提高试验效率,选择第一反应程序作为主要程序,既节约了时间,也不影响试验结果。

3.3 非变性聚丙烯酰胺条件的优化

SSCP 分析结果受诸多因素的影响,如非变性聚丙烯酰胺凝胶的浓度、变性剂的添加等^[25]。在进行 SSCP

分析时选用的凝胶浓度与待检测 DNA 片段的长短有关,不同浓度的凝胶有其具体的检测范围,该试验结果表明,8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶较适合,这是由 SSCP 引物片段大小所决定的,在 8% 凝胶情况下,检出率较高。赵爽等^[26]在 PCR-SSCP 的效果分析中用 12% 的凝胶浓度得到了很好的结果。余桂红等^[27]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。该试验与前人研究结果不一致,这可能是由于作物不同、引物片段大小不一样等因素造成的。凝胶中加入低浓度变性剂,如 5%~10% 甘油、尿素或甲胺,10% 二甲基亚砜(DMSO)或蔗糖等有助于提高敏感性^[20,24],可能是因为轻微改变 ssDNA 的构象,增加分子表面积,降低了 ssDNA 的泳动率^[28]。但也有不一致的说法^[24]。该试验结果表明,不添加甘油更有利于 SSCP 结果的分析。有些报道也认为,在进行 SSCP 筛查未知突变时,最好采用不加甘油的非变性聚丙烯酰胺凝胶^[24]。至于是否在凝胶中加入适量甘油,不同研究者的态度不同^[7]。

自 PCR-SSCP 技术建立以来,因其具有快速、简便、灵敏度高、需要样品少和适于大样本筛选等优点。可以检测各种点突变,短核苷酸序列的缺失或插入,该技术在建立后几年,迅速发展、完善,应用范围广泛,在人类癌基因和抑癌基因突变的检测、基因诊断、连锁分析和基因作图等领域取得了很大的成效。SSCP 技术也应用到植物基因突变位点的检测等方面,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,且不同作物通用条件较少,不同的研究者都有自己的最佳试验条件,要把 PCR-SSCP 分子标记应用到加工番茄品种的真实性检测,在更大范围内进行品种甄别,还需加大引物组合,同时从分子鉴定和表型鉴定 2 方面确定品种差异性^[29],关于 PCR-SSCP 分子标记技术

应用到加工番茄上还需进一步优化,该试验所得出的 PCR-SSCP 反应体系优化方案,经验证基本可以得到稳定、可靠的扩增效果,为 PCR-SSCP 技术在加工番茄点突变检测和诱变育种筛选的后续研究奠定基础。

参考文献

- [1] 陈佳,沈火林,杨文才. 番茄分子标记开发进展[J]. 分子植物育种, 2007,5(6s):130-138.
- [2] 李金荣,张薇,张西英,等. 海岛棉纤维品质性状的 QTLs 定位[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2012,30(2):133-137.
- [3] MC CALLUM J, LEITE D, PITHER-JOYCE M, et al. Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2001,13(4):979-991.
- [4] 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.
- [5] 漆燕,李双铃,袁美,等. 花生 RGA-SSCP 实验条件的优化[J]. 山东农业科学, 2010(6):1-4,9.
- [6] 王燕,龚义勤,赵统敏,等. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007,30(1):23-29.
- [7] 汤贤春,路健,李学英. PCR-SSCP 技术在基因多态分析中的应用[J]. 中国西部科技, 2010,9(6):55-56.
- [8] 丁建松,曹毅,童建. PCR-SSCP 研究进展[J]. 辐射防护通讯, 2004,24(5):27-31.
- [9] LIU L, GUO W, ZHU X, et al. Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003,106:461-469.
- [10] 贾俊忠,田丽萍,位江静,等. 快速微量提取番茄 DNA 及 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 北方园艺, 2010(8):113-115.
- [11] 石宝萍,李成亮,都业娟,等. 莴苣黄化病植原体的分子鉴定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013,31(6):669-674.
- [12] 杨荣超,蔡玉静,邓春婷,等. 番茄两个盐胁迫响应基因的 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 植物科学学报, 2011,29(2):178-182.
- [13] 甘尚权,张伟,沈敏,等. 绵羊 X 染色体 59327581 位点在 3 种不同尾型绵羊品种中的多态检测及分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013,31(5):587-591.
- [14] 刘杨,陈火英,魏毓棠,等. 番茄微卫星标记(SSR)反应体系的优化研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005,36(2):155-158.
- [15] 张美杰,李军林,杨星,等. 基因突变检测 PCR-SSCP 实验条件优化研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2014,44(3):439-443.
- [16] 高凌云,陈丽红,李一伟. PCR-SSCP 中聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染法的探讨[J]. 福建医科大学学报, 2001,35(4):413-414.
- [17] 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]. 福建茶业, 2007(2):32-34.
- [18] 王白羽,任丽彤,曹连甫,等. 六倍体小黑麦耐盐相关基因 cDNA-AFLP 技术体系的建立[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2010,28(4):404-408.
- [19] 李西平,钱新华,姚英民,等. DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法的选择[J]. 第一军医大学学报, 2004,24(9):1072-1074.
- [20] 姜运良,李宁,赵兴波,等. 影响 PCR-SSCP 的因素分析[J]. 农业生物技术学报, 2000,8(3):245-247.
- [21] 魏太云,林含新,谢联辉. PCR-SSCP 分析条件的优化[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002,31(1):22-25.
- [22] 李媛媛. SSCP 技术及在植物中的应用[J]. 北方园艺, 2009(5):122-124.
- [23] VIDAL-PUIG A, MOLLER D E. Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) Methods[J]. Bio Techniques, 1994,17:490-496.
- [24] 丁兰,张思仲,周宏远,等. 有和无甘油的聚丙烯酰胺胶在检测突变时的差别[J]. 遗传, 2001,23(3):266-268.
- [25] HAYASHI K, YANDELL D W. How sensitive is PCR-SSCP[J]. Human Mutation, 1993(2):338-346.
- [26] 赵爽,潘秋丽,姜官凌侠. PCR-SSCP 的效果分析[J]. 生物技术通报, 2010(4):132-134.
- [27] 余桂红,唐克轩,马鸿翔,等. 小麦 SSCP 分子标记体系的优化[J]. 核农学报, 2007,21(4):333-338.
- [28] 张宇红. PCR-SSCP 分析技术的研究进展及应用前景[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002,10(5):126-127.
- [29] 赵海艳. 番茄品种 SSR 分子鉴定技术研究[J]. 北京农业, 2014(9):22-25.

Establishment and Optimization of PCR-SSCP Amplification Reaction System in Processing Tomato

MA Haixin, PANG Shengqun, YAN Lijuan, WANG Bin, WEI Haibin, CHENG Linlin
(College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: Taking processing tomato as material, single strand conformation polymorphism (SSCP) technique was used, the effect of many factors such as extraction method of DNA, reaction process of PCR, electrophoretic factors (denaturalization temperature and time, electrophoresis temperature, electrophoresis time, electrophoresis buffer and electrophoresis power), denaturant on SSCP technique was studied. The PCR-SSCP reaction system and reaction process which were high polymorphism detection rate, good repeatability, clear stripe were screened and established. The results showed that adding 5 mol/L NaCl and the first centrifugation speed and centrifugal extraction time was 8 000 r/min, 15 minutes could obtain high quality DNA in CTAB buffer when extracting tomato leaves' DNA using the CTAB method, the amplification program was 94°C pre-denature 5 minutes, 94°C denature 1 minutes, 52°C annealing 30 s, 72°C extension of 1 minutes, a total of 29 cycles, final extension at 72°C 10 minutes. Primer size was 100—300 bp. Denaturalization temperature was 98°C, denaturalization time was 10 minutes, non-denaturing polyacrylamide gel concentration of 8%. Electrophoresis time was 1.5—2.5 hours. No added glycerin, the bands of the single strand DNA were clear and easy to read in processing tomato.

Keywords: processing tomato; PCR-SSCP; polyacrylamide gel electrophoresis; silver-stained