

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测亚麻 SSR 标记

吴建忠, 黄文功, 赵 茜, 康庆华, 吴广文, 关凤芝, 赵东升

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以亚麻为试验材料,提取亚麻基因组 DNA,选择多态性 SSR 标记,并将标记产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,最后硝酸银染色,建立了一套有效、方便的应用于亚麻 SSR 标记的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测方法。

关键词:PAGE; 亚麻; SSR

中图分类号:S563.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2012)09-0018-03

亚麻分子生物学研究近几年发展迅速,分子基础上的研究加速了亚麻重要农艺性状基因的定位、克隆及相关基因的功能分析研究。SSR(简单序列重复, Simple sequence repeat),是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术,也称为微卫星 DNA,均匀分布于整个基因组中,由于 SSR 标记数量丰富,所揭示的多态性高,结果重演性好,呈共显性,便于不同研究合作者的相互交流合作开发引物等优点,已经成功应用于多种大田农作物的研究^[1]。

聚丙烯酰胺凝胶电泳简称为 PAGE(Polyacrylamide gel electrophoresis),是以聚丙烯酰胺凝胶作为介质的一种常用电泳技术,其结合银染法进行标记检测,是分子生物学和基因工程研究上不可缺少的试验技术,其检测灵敏度和分辨率都比较高,特别适合于 SSR 标记扩增产物的检测^[2-3]。在经过不断反复的试验后,建立了一种有效、方便的可用于亚麻 SSR 标记的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试亚麻材料由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。新鲜植物材料用液氮冷冻,贮存备用。引物、DNA Marker、TaqDNA 聚合酶、dNTPs 和琼脂糖等主要生化试剂均购自上海生物工程公司,ddH₂O 为黑龙江省农业科学院经济作物研究所实验室自制,其它常规试剂均为国产

分析纯。

1.2 DNA 提取

亚麻 DNA 的提取依据黑龙江省农业科学院经济作物研究所已经摸索优化的方法^[4],用 TE 缓冲液溶解,-20℃的冰箱内保存。

1.3 引物筛选

引物由加拿大学者 Yong-Bi Fu 提供,选取其中 10 对。引物参数按以下原则:引物长度 18~25 核苷酸,避免引物内部存在互补序列(3 个碱基),引物的 3' 末端最好是 G 或 C,但不要 GC 连排,且 GC 含量 50%~60%为宜等。

1.4 PCR

PCR 反应均在 PTC-100 上进行。10 μL 反应体系中含有 10 mmol·L⁻¹的 0.2 μL dNTP, Taq 酶 1 U, 50 ng DNA, 10×Loading Buffer(含 Mg²⁺)1 μL 和 10 mmol·L⁻¹ Primers 0.2 μL。整个热反应程序是:94℃变性 2 min;94℃变性 45 s, 60℃退火 30 s,72℃延伸 0.5 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

6%聚丙烯酰胺凝胶的配制方法(1 000 mL):57 g 丙烯酰胺与 3 g 甲叉双丙烯酰胺混合,加入 10×TBE 100 mL,尿素 420 g,加 ddH₂O 到大约 900 mL,然后将混合液放置搅拌器上,55℃加热至尿素溶解,混匀后加 ddH₂O 定容 1 000 mL 即可。灌胶前,需对制胶玻璃板进行预处理,背板和面板分别需用剥离硅烷和亲和硅烷擦拭 2 次,将聚丙烯酰胺凝胶加入 10%过硫酸铵(AP)0.5 mL,0.5 mol·L⁻¹ TEMED(四甲基乙二胺)0.05 mL 搅匀后匀速倒入胶床,然后静置待胶样凝固方可装槽,将 PCR 产物与适量的 Loading Buffer 混合均匀后上样。在制胶过程中,可用胶带将胶床玻璃板底部和两侧边缘封贴,防止凝胶

收稿日期:2012-06-15

第一作者简介:吴建忠(1983-),男,内蒙古自治区乌兰察布市人,硕士,研究实习员,从事亚麻生物技术及遗传育种研究。E-mail:wujianzhong176@163.com。

通讯作者:关凤芝(1955-),女,黑龙江省哈尔滨市呼兰区人,研究员,从事亚麻育种研究。E-mail:kj-gfz@163.com。

泄漏,确保在灌注聚丙烯酰胺凝胶时无泄漏现象。垂直电泳槽中加入适量的 $1\times$ TBE 电泳缓冲液,预电泳至玻璃板面发热后上样。采用 220 V, 60 W 恒功率电泳 1.5 h 左右。

1.6 染色

1.6.1 染液的配制 固定液:100 mL 冰乙酸加 ddH₂O 稀释至 1 000 mL;染色液:2 g AgNO₃ 加 ddH₂O 至 1 000 mL;显色液:30 g Na₂CO₃、1.5 mL 37% 甲醛,加蒸馏水至 1 000 mL,用前加 200 mL 1.5% NaOH 溶液,混匀即用。

1.6.2 染色的操作步骤 将固定液在摇床上固

定 10 min,用双蒸水冲洗 2 min 2 次,间隔不超过 10 s,摇床上染色 30 min(染色液),再用双蒸水洗 10 s,直到条带清晰显色即可,一般不超过 15 min,放入终止液漂 30 s,最后用双蒸水洗 2 次,每次 2 min,沥干照相。

2 结果与分析

从大量引物中选取 10 对多态性较好的作为亚麻特异性 SSR 标记(见表 1)。聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测 PCR 扩增产物,最后银染法染色后人工读带,其结果比较理想(见图 1)。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers sequence used in the experiment

编号 No.	引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence	温度/°C Temperature
1	SSR-9	5'TTA CTC TCG CTG GCT CTT CC 3' 5'TGA ATC TGA GCG TTG AGC AG 3'	56
2	SSR-25	5'AGC GAG TTT GGT GAG CTT TC 3' 5'TGG GAA GCA AAG ATC AAT GG 3'	56
3	SSR-44	5'CCA TCG CCA CTA CCT TTT TC 3' 5'CAA CTG CAA TTC CTG GTG AG 3'	54
4	SSR-46	5'GGT TTC ACT TCA TCC GCT TT 3' 5'ACG ACC CAG ATT TCA CTT GG 3'	53
5	SSR-52	5'GGA AAA CAC CCA GCT CCT TA 3' 5'GCT TCC CTG AAG TGA TGA GAG 3'	55
6	SSR-56	5'CTG CTC CTC CAA GAA GAT GG 3' 5'CTT GAA GGT GAC CGA GGA AG 3'	55
7	SSR-58	5'CAC CAC CAC CAC AGT TTC TG 3' 5'AGG AAC TCA GAG AGG CAG CA 3'	56
8	SSR-61	5'CCA GTA AAT TGG GAT GCT CT 3' 5'GAC TCC AAG CAC AGC CTG AT 3'	53
9	SSR-91	5'TGC AAT TCG CGA TAC TGT TC 3' 5'TCC AGA TGC AAT CTT CTC CA 3'	55
10	SSR-106	5'CAC CGT TAA CTT CGC CAT CT 3' 5'AAA TGA TGG ATG GGA TTG GA 3'	56

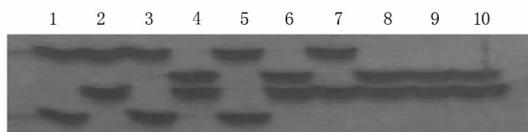


图 1 亚麻 SSR 标记聚丙烯酰胺凝胶电泳银染效果
Fig. 1 The silver staining effect of polyacrylamide gel electrophoresis for flax SSR markers

试验结果表明,采用该方法进行电泳及染色,得到了比较理想的效果。可见,聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染法进行亚麻 SSR 标记检测,其操作简单、条带清晰、凝胶背景浅、染色液容易保存,是一套有效的快速检测方法。

3 结论与讨论

1986 年,SSR 分子标记成功应用于人类基因组的研究^[5],随后该标记在多种植物中被广泛应用。SSR 标记是共显性标记,符合孟德尔遗传规律,其数量丰富,分布均匀,覆盖整个基因组,试验结果重复性好,多态性好、对 DNA 数量及质量要求不高、操作简便、结果可靠性高^[6-10],是亚麻品种进行生物学分析、基因工程研究较理想的分子标记^[11]。目前,大多数实验室 PCR 扩增片段采用的琼脂糖凝胶电泳、EB 染色只可检测出少于 10 ng 的 DNA,且琼脂糖电泳的分辨率较低,对有些试验不太适用,SSR 标记进行聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染法是一套常用且有效的检测方法

法,但是聚丙烯酰胺凝胶结果影响因素较多,不同材料及试验处理对其结果都有影响。该试验结果表明:亚麻 SSR 标记体系在聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 6%、电泳电压为 220 V,功率 60 W 的情况下,扩增产物多态性条带清晰可辨,完全可用于试验分析与交流。

参考文献:

- [1] 汪由,吴禹,李兆波,等. SSR 分子标记及其在农作物育种中的应用[J]. 农业科技与装备,2011,2(2):17-21.
- [2] 宋显军,张伟,曹萍,等. 大豆 SSR 标记 PAGE 银染方法的改进[J]. 安徽农业科学,2006,34(16):3922-3923.
- [3] 张芳,权军利,单卫星. 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测致病疫霉菌 SSR 标记方法改良[J]. 安徽农业科学,2011,39(27):16606-16607.
- [4] 吴建忠. 亚麻全基因组 DNA 的提取及分析[J]. 黑龙江农业科学,2011(7):18-19.
- [5] Ali S, Müller C R. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats [J]. Hum. Genet., 1986(74):239-243.
- [6] Wu Kunsheng, Steven D Tanksley. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. Mol Gen Genet, 1993,241(1-2):225-235.
- [7] Mahinur S Akkaya, Arvind A Bhagwat, Perry B Cregan. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean[J]. Genetics, 1992,132(4):1131-1139.
- [8] Bell C J, Ecken J R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis[J]. Genomics, 1994, 19:137-144.
- [9] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats [J]. Theor. Appl. Genet., 1994, 88(1):1-6.
- [10] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics [J]. The Plant J., 1993, 3:175-182.
- [11] 王斌,张建平,党占海,等. 亚麻 SSR-PCR 优化体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报,2010,4(45):69-73.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis Used in Flax SSR Marker

WU Jian-zhong, HUANG Wen-gong, ZHAO Qian, KANG Qing-hua, WU Guang-wen, GUAN Feng-zhi, ZHAO Dong-sheng

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking flax as the test material, extracting flax genome DNA, selecting the polymorphic SSR markers, PCR products were electrophoresed in the polyacrylamide gel, and finally they were stained with silver nitrate. An effective, simple and quick PAGE silver staining method was built by flax SSR markers.

Key words: PAGE; flax; SSR

全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

欢迎订阅 2013 年《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开,每期 8.00 元,全年 96.00 元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,邮发代号:82-132。全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3.00 元。

欢迎投稿 刊登广告

地址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

传真:010-82105796 网址:www.chinaseedqks.cn

E-mail:chinaseedqks@sina.com