

# 亚麻 SRAP 研究中两种电泳方法的比较

吴建忠<sup>1</sup>,许源媛<sup>2</sup>,王玉苹<sup>2</sup>,袁红梅<sup>1</sup>,于莹<sup>1</sup>,赵茜<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院,黑龙江 哈尔滨 150025)

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是亚麻科亚麻属的一年生自花授粉草本植物,已有千年的栽培历史,栽培种分为3个类型:纤维用亚麻、油用亚麻和油纤两用亚麻,其中纤用亚麻具有重要的经济价值<sup>[1]</sup>,但从形态上不容易区分,分子标记是区分亚麻品种的有效途径。

SRAP是一种以PCR技术为基础的新型分子标记技术,已成功应用于多种动植物的遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图构建以及比较基因组学等研究,与其它分子标记相比,其具有技术简便、

快速高效、费用低、污染小、共显性好及信息量丰富的优点<sup>[2]</sup>。本研究采用琼脂糖凝胶(AGE)和聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)两种电泳方法对亚麻SRAP比较分析,总结了两种电泳方法对亚麻SRAP分析的优缺点,为应用SRAP进行亚麻基因差异分析提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为亚麻DNA。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA提取和浓度测定 采用改良的CTAB法提取亚麻全基因组DNA<sup>[3]</sup>,紫外分光光度计测定DNA的浓度分析纯度后,置于-20℃冰箱备用。

1.2.2 SRAP反应体系 SRAP反应采用已优化好的体系<sup>[4]</sup>,在20 μL反应体系中模板75 ng, 25 ng·L<sup>-1</sup>的上下游引物用量为70 ng, dNTP浓度为0.40 mmol·L<sup>-1</sup>, Mg<sup>2+</sup>浓度为1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 1.5 U Taq DNA聚合酶。

收稿日期:2014-09-021

基金项目:哈尔滨市科技创新工程青年基金(2013RFQYJ010);黑龙江省农科创新青年基金(2012QN009);国家农业部科技支撑计划基金(2013BAD01B03)

第一作者简介:吴建忠(1983-),男,内蒙古乌兰察布市人,在读博士,助理研究员,从事亚麻遗传育种研究。E-mail: wujianzhong176@163.com。

## 2.3 产量表现

2008年和2009年连续2a在哈尔滨市、杜蒙县、兰西县、富锦市和富裕县5个地点进行区域试验,产量测定结果表明农菁10号紫花苜蓿在五点2a平均干草产量12 248.0 kg·hm<sup>-2</sup>,比对照肇东苜蓿增产17.0%。2010年继续在以上5点开展生产试验,产量测定结果表明,农菁10号紫花苜蓿平均产量12 521.8 kg·hm<sup>-2</sup>,比对照增产17.2%。

## 2.4 品质分析

现蕾前期取样,经农业部谷物检验测试中心(哈尔滨)检测结果:粗蛋白质含量21.79%,粗纤维含量28.97%,粗脂肪含量2.07%。

## 2.5 抗病性鉴定

委托黑龙江省农业科学院植保研究所对农菁10号紫花苜蓿进行田间发病情况调查,结果为叶片上未见任何病害的病斑。

## 3 高产栽培关键技术

### 3.1 整地

苜蓿是多年生植物,整地质量直接决定了今后若干年的苜蓿生产。整地务必精细,要做到深耕细耙,上松下实,以利出苗。有灌溉条件的地方,播前应先灌水,以保证出苗整齐。无灌溉条件地区,整地后进行镇压,以利保墒。

### 3.2 播种

黑龙江省一般在4月下旬春播。春播苜蓿根部发育健全,有利于安全越冬,当年还可收割1~2次。播种量为15.0~22.5 kg·hm<sup>-2</sup>。一般以单种为宜,单种时以条播为佳,行距15~30 cm。播种深度1.5~2.0 cm,播后应进行镇压以利出苗。

### 3.3 防除杂草

苜蓿田的杂草成为制约草产品质量和营养价值主要因素之一,须重点管理。采用平播、密植,提高田间覆盖度抑制杂草。播后苗前封闭,90%乙草胺1 350 mL·hm<sup>-2</sup>+水750 kg·hm<sup>-2</sup>,在早晚无风的情况下进行喷施;苗期和刈割后的杂草防除,推荐使用普斯特除草剂,推荐剂量为1 500~1 950 g·hm<sup>-2</sup>,兑水150~450 kg·hm<sup>-2</sup>均匀喷雾。

### 3.4 刈割

苜蓿刈割时期和生产管理水平对苜蓿草产品产量和品质影响很大。黑龙江地区第一茬刈割在6月上中旬,苜蓿处于现蕾期或初花期,刈割留茬高度5~8 cm。两次刈割间隔40 d左右。一般情况下全年可收3茬。

### 3.5 注意事项

苜蓿最忌水涝,一般情况下,苜蓿淹水48 h根部腐烂。排水不畅的地块应利用挖排水沟等措施做好排水防涝措施。

1.2.3 PCR 扩增条件 反应热循环程序为：94℃ 预变 5 min；94℃ 变性 1 min、35℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 1 min，5 次循环；94℃ 变性 1 min、50℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 1 min，35 次循环；72℃ 延伸 10 min；4℃ 恒温保存。

1.2.4 PCR 产物的检测 利用 AGE 和 PAGE 两种电泳方法进行亚麻 SRAP 分子标记后 PCR 产物的分析检测。琼脂糖凝胶电泳采用 1%AGE 胶进行水平电泳(电泳缓冲液1×TAE)，凝胶成像仪扫描、观察并记录。聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 6%PAGE 溶液进行垂直板电泳(电泳缓冲液1×TBE)，经银染和显影后，凝胶观片灯下人工读带并记录。

2 结果与分析

由图 1 可知，琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳均能扩增出清晰条带，但聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率高，带数较多，呈深咖色，背景为淡黄色，主带和副带清晰；而琼脂糖凝胶其分辨率低，分离范围广带数较少，呈亮白色，背景为黑色，主带明显，副带较为模糊。

琼脂糖凝胶电泳虽然步骤少，但也需注意细节。本研究中 1.2%琼脂糖胶比 0.8%琼脂糖胶更加清晰易读(见图 2)；灌胶时，保证胶板上无水，否则点样时琼脂糖胶与胶板分离不易点样；跑胶时，每厘米功率不可超过 5 W，否则条带模糊难读。

由表 2 可知，琼脂糖凝胶电泳操作简单，只需要琼脂糖粉与 TAE 溶液，且耗时短；而聚丙烯酰胺凝胶电泳技术难度大，不仅步骤多，需要 PAGE、AP、TEMED 和 AgNO<sub>3</sub> 溶液来制胶，甲醛等溶液来银染和染色，效率较低，比琼脂糖凝胶

电泳多耗 1 h。从成本上看，聚丙烯酰胺凝胶电泳在制胶、染色和显影等步骤上需要更多的药品，远高于琼脂糖凝胶电泳。

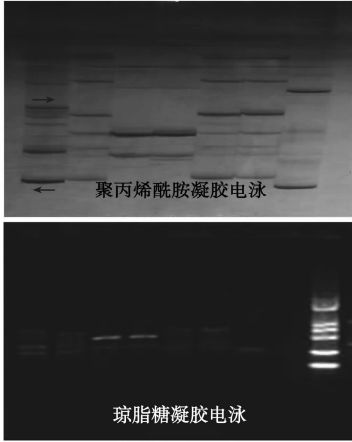


图 1 电泳结果比较

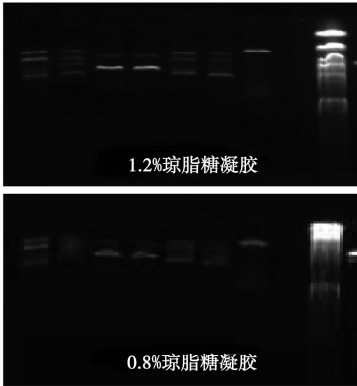


图 2 不同浓度琼脂糖凝胶电泳检测结果

表 2 两种电泳检测比较

电泳	分离片断	分辨率	条带	时间/min	成本/元	步骤
琼脂糖凝胶	较大分子	低	5~12	20~30	20	简便
聚丙烯酰胺凝胶	较小分子	高	15~30	40~100	100	繁琐

3 结论与讨论

两种电泳操作过程不同，其结果相差也较大。聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率高，条带多，能分辨出较为细小的片段，因此对其实验条件更加严格。如配制 PAGE 胶时<sup>[5]</sup>，AP 与 TEMED 的比例一定要为 10:1，AP 需在 20℃ 保存，以免变性；灌胶时，点样孔附近不可有气泡，否则引起 DNA 带变形；剥胶时，需保持胶完好无损；银染前，应把 AgNO<sub>3</sub> 溶液放到摇床上，使 AgNO<sub>3</sub> 充分溶解，否则使其银染不均匀；配显影液时，甲醛最后加入且需摇匀，否则会引起局部变黑。

在 SRAP 分子标记进行亚麻差异显示研究时，可以先考虑用琼脂糖凝胶电泳，确定特异性条带，若能在条带上找到明显的目的差异基因时，可直接进行下一步回收和鉴定，这样可缩短研究的

进程，提高工作效率。当琼脂糖凝胶电泳条带分离不明显，可改用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析，从而获得更明确清晰的差异条带。因此，把琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳有效地结合起来，可以更经济有效的完成相关研究。

参考文献：

[1] 吴建忠,赵东升,黄文功,等. 12 个亚麻品种亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 中国麻业科学,2012(3):153-156,189.

[2] Agarwal M,Shrivastava N,Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plantsciences[J]. Plant Cell Reports,2008,27(4):617-631.

[3] 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.

[4] 吴建忠,黄文功,赵东升,等. 亚麻 SRAP 反应体系的优化和多态性标记筛选[J]. 中国麻业科学,2011(6):281-284.

[5] 刘梦培,田敏,傅大立,等. 一种新的微卫星 PAGE 的 DNA 显带方法[J]. 湖南农业科学,2010(17):145-148.