

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)03-0143-05

马铃薯 SSR 标记聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

王绍鹏, 邱彩玲, 李 勇, 宿飞飞, 刘尚武, 吕典秋*

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江省马铃薯工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 以马铃薯品种早大白、黄麻子、克新 13、荷兰 15、大西洋为试验材料, 提取基因组 DNA, 进行 SSR 标记, 并将标记产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 比较不同电泳参数(聚丙烯酰胺凝胶的浓度、电泳电压、染色方法)对电泳结果的影响。确定了适合马铃薯 SSR 标记的电泳检测体系, 即聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 12%, 电泳电压为 170V, 染色方法为溴化乙锭染色。

关键词: 马铃薯; SSR 标记; 聚丙烯酰胺凝胶; 溴化乙锭

微卫星序列又称简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR), 是广泛分布于真核生物基因组中的高度重复序列。在动植物研究方面, 目前已成为遗传连锁分析、基因定位以及遗传标记图谱构建等领域一个极为重要的研究手段^[1,2]。典型的微卫星 DNA 重复单位的核心序列为 2~6 bp, 重复次数为 10~20 次, 长度一般为 100~300 bp。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)技术由于其检测灵敏和分辨率高的特点, 特别适合于小片段多态性扩增产物条带的检测, 并且分离效果好, 分辨率高。理论上, 不同浓度的凝胶在一定范围内, 凝胶的浓度越大, 分辨率越高, 对长度差异片段区分性越好, 越有利于基因型的判断。扩增片段检测目前主要采用溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)染色与硝酸银染色^[3]。银染由于染色背景较深, 非特异性条带较多, 品种之间的特异性条带不易区分, 不利于进行品种纯度方面的鉴定分析^[4]; 聚丙烯酰胺淬灭 EB 的荧光, 使 EB 染色的灵敏度降低, 但是此方法操作时间短、程序简单、背景颜色浅、成像容易, 使得 SSR 扩增的多态性目的条带带型清晰, 数量也能够满足实验分

析要求。另外, EB 染色结果具有一致性, 重复性好的优点, 成为品种鉴定方法中条带染色的首选方法。

本试验拟通过对聚丙烯酰胺凝胶电泳参数的分析, 确立马铃薯品种纯度鉴定中标记产物的最佳电泳体系, 以满足试验分析的需要, 同时为马铃薯主栽品种 DNA 指纹图谱的构建打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用的马铃薯为黑龙江省主栽品种, 由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供(表 1)。

SSR 标记所用引物序列由加拿大蒙特利尔麦吉大学科研组提供(表 2), 并由上海生工生物技术公司合成; 其它试剂(TaqDNA 聚合酶等)均购自大连宝生物试剂公司。

表 1 试验用马铃薯品种

序号	品种名称	级别
1	早大白	原原种
2	黄麻子	原原种
3	克新 13 号	原原种
4	荷兰 15	原原种
5	大西洋	原原种

收稿日期: 2009-03-03

基金项目: 黑龙江省科技厅国际合作项目资助(WC05B08)。

作者简介: 王绍鹏(1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事马铃薯品种纯度鉴定及分子生物学研究。

* 通讯作者: E-mail: HLJHB2003@yahoo.com.cn。

表2 SSR标记所用引物序列情况

引物编号	序列顺序(5'到3')
SSI-F	TCT CTT GAC ACG TGT CAC TGA AAC
SSI-R	TCA CCG ATT ACA GTA GGC AAG AGA
Patatin-F	CAA CCA ACA AGG TAA ATG GTA CC
Patatin-R	TGG TCT GGT GCA TTA GAA AAA A
STM0014-F	CAG TCT TCA GCC CAT AGG
STM0014-R	TAA ACA ATG GTA GAC AAG ACA AA
UGP-F	GAA ACT GCT GCC GGT GC
UGP-R	TGG GGT TCC ATC AAA C

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯块茎 DNA 提取

采用 Isolation buffer 提取液提取马铃薯 DNA, Isolation buffer 提取液配方如下: 100 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 1.3 M NaCl, 0.2% SDS, 0.5% Triton X-100, 1% PVP, 10 mM DTT, 60 mM β -mercapto ethanol, 其它操作步骤同一般 SDS 提取方法^[5,6], 并用 Alpha Innotech 公司的 December 2006 型紫外凝胶成像仪检测结果。

1.2.2 SSR 标记

PCR 反应体系(20 μ L):

10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, 10 mM dNTPs 0.8 μ L, 25 mM MgCl₂ 2.4 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.15 μ L, 4mM 上游引物 1 μ L, 4mM 下游引物 1 μ L, 灭菌双蒸水 11.65 μ L, 模板 DNA 60 ng。

PCR 扩增程序:

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 48.5 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 在 Biometre 公司 T-Gradient Thermoblock 型号 PCR 扩增仪上扩增, 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, EB 染色, 紫外凝胶成像仪检测结果。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳参数分析

(1) 不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较

分别配制 5%、8%、12%、16% 的聚丙烯酰胺凝胶, 所需各种试剂及用量如表 3, 预电泳 30 min 后, 取 PCR 产物 5 μ L 与 1 μ L 6-Loading Buffer 混匀, 上样, 电泳, EB 染色, 紫外凝胶成像仪检测结果。

(2) 电压变化对电泳结果的影响

设置电压梯度为 330V、250V、170V、90V,

电泳操作如上, 比较不同电压电泳结果的差异。

表3 不同浓度聚丙烯酰胺凝胶的配制

凝胶浓度	5%	8%	12%	16%
30% 丙烯酰胺储液(mL)	1.66	2.66	4	5.2
5 \times TBE(mL)	2	2	2	2
10% 过硫酸胺 (APS)(μ L)	100	100	100	100
四甲基乙二胺(TEMED)(μ L)	10	10	10	10
双蒸水(mL)	6.84	5.84	4	2.8
分离的 DNA 大小(bp)	80~500	60~400	40~200	20~100

(3) 凝胶染色方法比较

① 银染方法:

A. 银染液的配制: 固定液(100 mL 冰乙酸加水稀释至 1 000 mL); 染色液(2g AgNO₃、1.5 mL 37% 甲醛, 加水稀释至 1 000 mL); 显色液(30 g Na₂CO₃、1.5 mL 37% 甲醛、0.2 mL Na₂S₂O₃, 加水稀释至 1 000 mL); 终止液(10% 冰乙酸)。

B 银染法操作: 固定 30 min \rightarrow 去离子水洗涤 5~10 min \rightarrow 染色 30 min \rightarrow 去离子水洗涤 2 次(每次不超过 30 s) \rightarrow 显色至所要程度 \rightarrow 终止显影。

② 溴化乙锭(EB)染色:

将 EB 贮液(10 mg \cdot mL⁻¹)用双蒸水稀释至 0.5 μ g \cdot mL⁻¹, 将电泳后的凝胶放入染色液中 30 min, 染色后的凝胶放入蒸馏水中清洗 5 min, 再将凝胶放入紫外凝胶成像仪观测结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

将 5 个马铃薯品种提取的 DNA, 各取 5 μ L, 与 1 μ L 6-Loading Buffer 混匀, 用 1% 琼脂糖凝胶, 100 V 电压, 电泳 30 min, 结果用紫外凝胶成像仪检测。从电泳结果可以看出, 用 Isolation buffer 提取液提取的马铃薯 DNA, 质量好, 主带唯一, 无拖尾和弥散, 能够满足 SSR 标记的要求(图 1)。

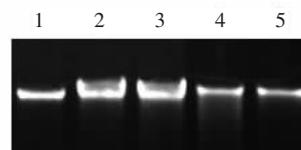


图1 马铃薯 DNA 琼脂糖凝胶电泳
(泳道的马铃薯品种顺序与表 1 相同)

2.2 不同参数电泳结果比较

2.2.1 不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 凝胶的孔径大小、分辨率不同, 分离效果也明显不一样(图 2)。凝胶浓度较低时—5%, 胶的分辨率明显不好, SSR 标记扩增的多态性条带数量少, 带型模糊, 不利于带型区分、品种区分; 12%和 8%浓度的凝胶相比,

多态性条带数量多, 带型清晰, 品种之间的区分更明显; 16%浓度的凝胶电泳, 多态性条带数量并没有较12%浓度的凝胶有明显的增加, 并且由于电泳时间过长, 单一条带反而有些离散, 不如 12%浓度的凝胶条带集中、明亮, 同时配制 16%浓度的凝胶所需要的相关试验试剂的用量也比较大, 试验成本也会相应增加。

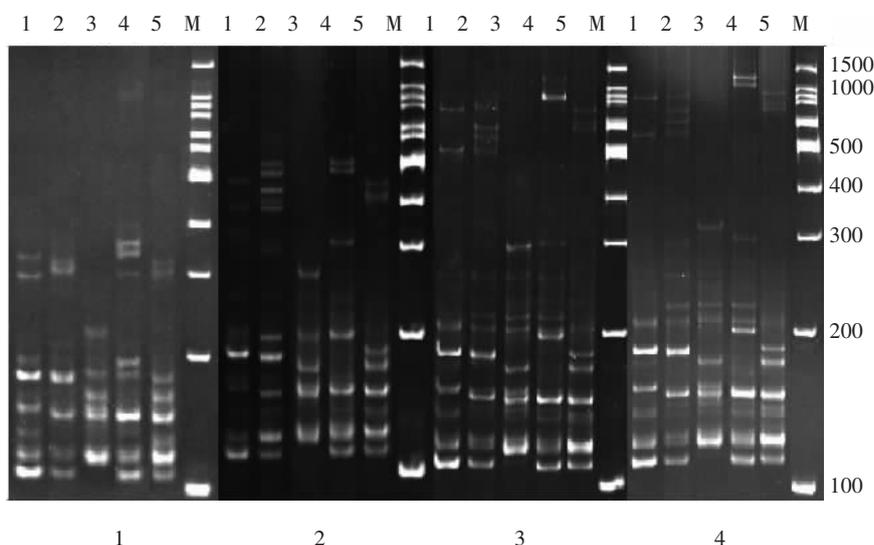


图 2 不同浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

1—5%浓度的 PAGE; 2—8% 浓度的 PAGE;
3—12%浓度的 PAGE; 4—16%浓度的 PAGE。

(泳道对应的马铃薯品种顺序与表 1 对应, M 为标准分子质量)

2.2.2 不同电压下的电泳结果

在实际电泳操作中, 不同电压下的电泳对应的时间、电流参数如表 4。

表 4 不同实际操作电压下的时间、电流参数值

电压(V)	工作参数	
	电流(mA)	时间(min)
330	92	80
250	57	150
170	46	260
90	26	460

在 330V 电压下, 电泳只需要 80 min 就能完成, 但是因为电泳速度过快, 标记的多态性条带不

能完全分离开来, 并且条带不清悉; 90 V 电压下, 电泳结果比较好, 能够满足实验分析的需要, 但是电泳时间太长, 接近 8 个小时; 250 V、170 V 电压均能将泳道中的多态性条带分开, 满足试验分析的需要, 并且, 170 V 电压电泳, 多态性条带更清晰, 可以采用(图 3)。

2.2.3 PCR 标记产物不同染色方法的结果比较

EB 染色, 多态性条带清晰, 背景浅, 并且同一品种多次扩增成像一致, 便于实验结果分析; 银染法随着时间的增长, 背景逐渐加深, 显示的多态性条带数目增多, 目的条带相近的细小条带(俗称影子带)也在增多, 若对目的条带带型不是很了解, 则不利于基因型的判断, 对多态性信息量、简单匹配系数等的试验分析也容易出现错误。比较结果如图 4。

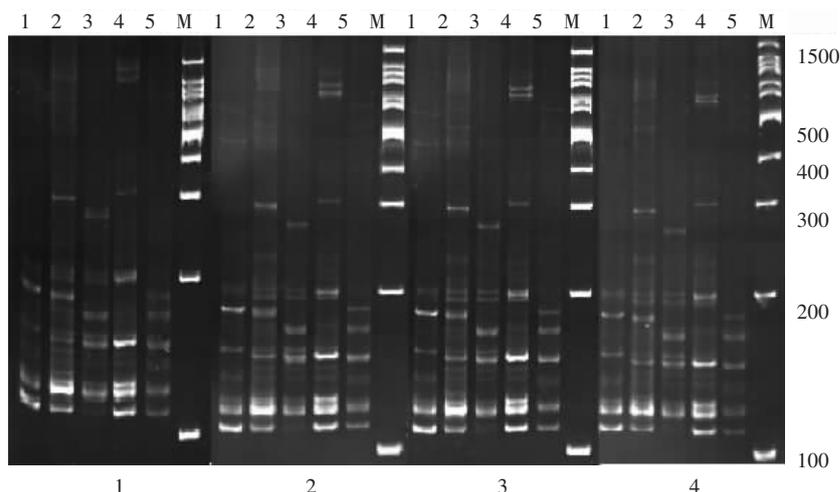


图 3 不同电压下的电泳结果

1—电压为 330 V ; 2—电压为 250 V ;
3—电压为 170 V ; 4—电压为 90 V 。

(泳道对应的马铃薯品种顺序与表 1 对应, M 为标准分子质量)

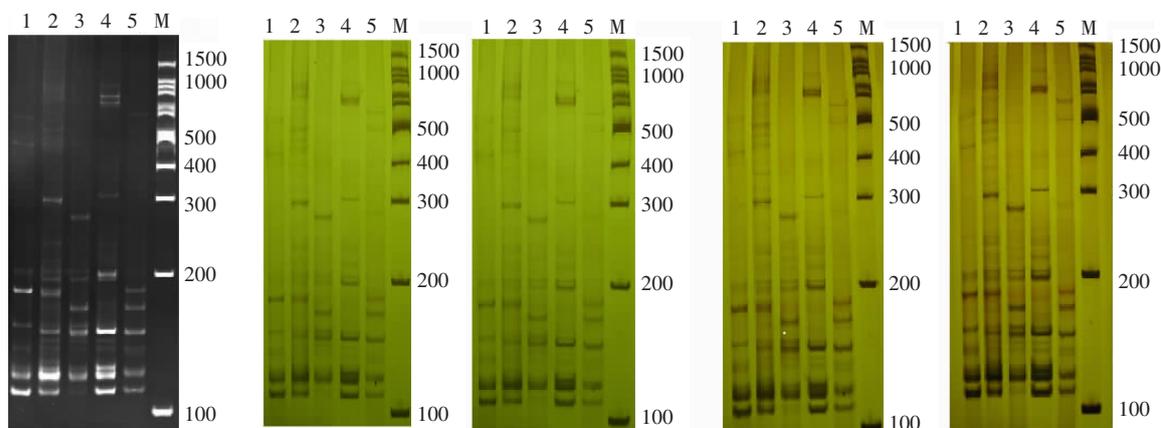


图 4 SSR 标记产物不同染色方法结果比较

1—标记产物 EB 染色结果 ; 2—银染 20 min 结果 ;
3—银染 30 min 结果 ; 4—银染 50 min 结果 ; 5—银染 70 min 结果。

(泳道马铃薯品种顺序与表 1 相同, M 为标准分子质量)

3 结果与讨论

SSR 标记与其它标记方法(RFLP、RAPD、AFLP等)相比,具有共显性遗传,符合孟德尔遗传规律,数量丰富,分布均匀,覆盖整个基因组,试验重复性好,结果可靠性高等优点^[7,8],是马铃薯品种纯度鉴定分析的理想的分子标记。SSR 标记

结合聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种常用的检测方法,聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨力极高,用于测序的聚丙烯酰胺凝胶可分离相差 1 bp 的 DNA 片段,能够将品种特异性的谱带分离出来,进而判定纯度和真实性。但是对凝胶结果影响因素较多,不同的试验处理对成像结果都有影响,影响大的以至于不能进行试验结果的分析,因此,需要对聚丙

烯酰胺凝胶电泳参数进行优化,聚丙烯酰胺凝胶的浓度、电泳时间都是其中重要的参数,试验结果表明:在聚丙烯酰胺凝胶的浓度为12%、电泳电压为170V的情况下,PCR标记产物多态性条带清晰、明亮、稳定,便于试验分析与交流。PCR扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,目标产物的检测主要采取显色法。目前大多采用同位素放射自显影法、荧光染料标记法、EB染色法和银染法,放射自显影法操作过程比较繁琐,且操作者容易遭受同位素照射的危险,在推广应用中有一定的难度;荧光染料标记法操作过程同样繁琐,试验成本较高;银染法其检测的灵敏度接近于同位素检测,但是整个银染检测操作步骤也非常繁琐,染色花费的时间也较长(染色1次约需要2h),同时,使用到的配制试剂较多,试验稳定性也难以控制,不利于品种鉴定^[9];EB染色法方便易行,时间短,全程只需要35min,操作比较简单,只需要配置一种溶液,采用两个步骤,紫外凝胶成像仪成像方便,并且EB染色结果稳定,利于试验分析。但是EB具有致癌性,对人体健康有害,因此,找到一种更好的染色方法,既有利于试验分析,又不危害身体,对SSR标记方面的研究是非常必要的。

[参 考 文 献]

- [1] 乔玉山,章镇,沈志军,等.中国李SSR反应体系的建立[J].植物生理学通讯,2004,40(5):83-86.
- [2] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 328-334.
- [3] Stachel M, Lelley T, Grausgruber H, et al. Application of micro-satellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(2): 242-248.
- [4] 张军,武耀廷,郭旺珍,等.棉花微卫星标记PAGE/银染快速检测[J].棉花学报,2000,12(5):267-269.
- [5] 毛娟,赵长增,赵丽娟,等.扁桃基因组DNA提取及RAPD扩增体系的建立[J].甘肃农业大学学报,2005,40(1):17-21.
- [6] 郭宝生,张辉,耿军义,等.改良SDS法快速提取小样量棉花总DNA及其纯化[J].棉花学报,2005,17(5):320-323.
- [7] 梅德圣,李云昌,胡琼,等.甘蓝型油菜中油杂8号种子纯度的SSR鉴定[J].中国农学通报,2006,22(6):49-52.
- [8] 白秀娟,乔宪凤,李辉,等.VLDL双向选择肉鸡群SSR指纹分析[J].遗传,2002,24(2):149-151.
- [9] 杜传印,王玉军,李斯深,等.烟草 AFLP 银染分析体系的建立[J].山东农业科学,2007,14(5):38-41.

Analysis of Potato with Polyacrylamide Gel Electrophoresis Based on SSR Markers

Wang Shaopeng Qiu Cailing Li Yong Su Feifei Liu Shangwu Lu Dianqiu

(Viruses-free Seedling Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,
Heilongjiang Potato Engineering and Technology Research Center, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: The genomic DNA was extracted from five potato varieties, Zaodabai, Huangmazi, Kexin 13, Favorita and Atlantic. The effects were compared of the electrophoresis parameters of gel concentration, voltage and stain substrate on the outcomes of electrophoresis by polyacrylamide gel. The optimal electrophoresis conditions for potato SSR markers were 12% gel concentration, 170 V voltage and EB as staining reagent.

Key Words: potato; SSR markers; polyacrylamide gel; ethidium bromide staining