

文章编号: 1005-0906(2013)03-0048-04

玉米微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染法的比较分析

王爱听, 李永生, 穆延召, 李 玥,
白 杨, 王 威, 王汉宁

(甘肃农业大学农学院 / 甘肃省干旱生境作物学重点实验室 / 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 兰州 730070)

摘 要: 对变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行比较, 探讨建立简便、快速、安全、可靠、经济、效率高、毒害低的应用于玉米遗传多样性分析的 SSR 标记方法。结果表明, 用 2 对 SSR 引物对 6 份玉米自交系基因组 DNA 进行扩增, 将扩增产物在变性与非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上电泳, 银染后微卫星扩增产物在二者上的电泳结果存在差异。在变性胶中微卫星扩增产物目的条带清晰, 易于鉴定; 在非变性凝胶中表现有较多的非特异性条带, 但目的条带很明亮, 容易看出来, 不影响实验结果。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳带型清晰准确、结果可靠、经济快速, 能真实地揭示玉米自交系间的遗传多样性, 是玉米种质类群划分的有效分子标记方法。

关键词: 玉米; 微卫星; 聚丙烯酰胺; PCR; 银染

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Comparison of Microsatellite Products of Maize Using Denatured and Non-denatured PAGE-Silver-Staining Methods

WANG Ai-ting, LI Yong-sheng, MU Yan-zhao, LI Yue, BAI Yang, WANG Wei, WANG Han-ning
(College of Agronomy, Gansu Agricultural University / Gansu Key Lab of Drought Condition Crop /
Gansu Key Lab of Crop Genetic improvement and Germplasm Creation, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Comparing the denatured PAGE and non-denatured PAGE to establish a simple, rapid, secure, reliable, economic, high efficient and low toxic method of SSR molecular marker, which was applied to genetic diversity analysis of maize. Two microsatellite primer pairs were used to amplify the genomic DNAs of maize. The PCR products were detected by denatured and non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results of silver-staining indicated that there were many distinct differences about products between the two kinds of gel. The targeted bands clearly appeared in denatured gels, which were easy to identify. There were many nonspecific bands in non-denatured gels. However, targeted bands were very bright, easy to see and did't affect experimental results. The non-denatured gel could reveal genetic diversity analysis among maize inbred lines truly, which was an effective molecular marker to divide germplasm groups of maize.

Key words: Maize; Microsatellite; PAGE; PCR; Silver-staining

微卫星标记作为继 RFLP 的第二代分子标记, 是目前广泛使用的遗传标记, 已在玉米自交系类群

划分、遗传图谱构建、个体亲缘关系鉴定、群体相关性研究、动植物的遗传连锁分析、分子遗传多样性研究、玉米纯度鉴定、目标基因定位及 QIL 分析等方面得到了普遍应用^[1~10]。关于玉米种质类群的划分, 一些文献主要采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(浓度分别为 6%、4.5%、8%)和琼脂糖凝胶电泳技术(浓度分别为 3%、4%)^[11~21]。前人通过 SSR 标记对玉米种质类群进行划分, 但成本高、毒害大、耗时耗力、效率低。本研究针对上述薄弱环节, 根据玉米 PCR

收稿日期: 2012-07-05

基金项目: “973”计划前期研究专项(2012CB722902)、科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB2G100484)

作者简介: 王爱听(1985-), 女, 河南周口人, 硕士, 作物遗传育种方向。E-mail: wangaiting1@163.com
王汉宁为本文通讯作者。

扩增目的片段的大小和凝胶(变性和非变性)有效分离 DNA 片段范围的不同,采用变性(6%、8%)与非变性(8%)聚丙烯酰胺凝胶电泳这两种方法检测玉米的微卫星位点,对微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE 银染法进行比较分析,将玉米微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE 中的过程和结果进行比较,为玉米遗传多样性分析提供更简便、快捷、高效的实验方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

6 个国内标准测验种丹 340、B73、黄早四、掖 478、齐 319、Mo17(编号 1~6)由甘肃农业大学平凉玉米育种站提供。采用 75%酒精消毒后播于底部铺有滤纸的培养皿中,于 28℃培养箱里黑暗培养 4~5 d,剪取幼芽用于基因组 DNA 提取。

1.2 DNA 提取

CTAB 法提取玉米基因组 DNA^[2],在 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的完整性后用 HITACHI U-5100 分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,将 DNA 浓度稀释至 20 ng/μL 于 -20℃保存备用。

1.3 SSR 扩增反应体系和扩增程序

PCR 扩增仪采用德国 Biometra 的 PCR 扩增仪。PCR 总反应体系为 10 μL,包括 10 × PCR buffer 1.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 0.6 μL,Primer 共 0.6 μL,2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.1 μL,20 ng/μL DNA 1.0 μL,ddH₂O 6.7 μL。扩增反应程序为,95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,52.5℃/56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共进行 36 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃结束程序并保存。SSR 引物 Phi065 序列:5'-3'F:AGGGACAAATACGTGGAGACACAG,3'-5'R:CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC;引物 Umc1196 序列:5'-3'F:CGTGCTACTACTGCTACAAAGCGA,3'-5'R:

AGTCGTTTCGTGCTTCCGAAACT,引物来自玉米遗传与基因组数据库(<http://www.maizegdb.org/ssr.php>),由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.4 胶的制备及电泳检测

30%变性胶 19:1 配制:丙烯酰胺 142.5 g,甲叉双丙烯酰胺 7.5 g,ddH₂O 定容至 500 mL,尿素 42%;30%非变性胶 29:1 配制:丙烯酰胺 145 g,甲叉双丙烯酰胺 5 g,ddH₂O 定容至 500 mL。将 PCR 扩增产物分别在变性(6%、8%)与非变性(8%)聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。对于变性电泳,在电泳前需要向 10 L PCR 样品中加入 5 L 6 × Loading Buffer,混匀后于 95℃变性 5 min,然后迅速放置在冰上再进行点样,恒压 200 V,1 × TBE 电泳 65 min。电泳仪为 DYY-12 型电泳仪(北京市六一仪器厂);电泳槽为 DYCZ-30 型双板夹芯式垂直槽(105 mm × 185 mm × 1 mm)。

1.5 银染程序

凝胶依次放在 10%冰乙酸溶液中固定 5 min,ddH₂O 水洗 1 次(每次低于 10 s),0.2%硝酸银染色 10 min,ddH₂O 水洗 1 次(每次低于 10 s),然后放进现配的显色液(3%氢氧化钠、0.5%甲醛)中显色至条带清晰,ddH₂O 水洗 1 次(每次低于 10 s),最后 10%冰乙酸定影。

2 结果与分析

由图 1、图 2 可以看出,相同 PCR 产物分别使用变性和非变性胶聚丙烯酰胺凝胶两种电泳方法均能检测出扩增的目的片段,在变性聚丙烯酰胺凝胶中目的条带清晰,易于鉴定,非特异性条带少;非变性聚丙烯酰胺凝胶中,有非特异性条带。同一引物扩增的产物相比,6%变性 PAGE 的图像条带模糊,8%变性和 8%非变性 PAGE 的图像条带清晰。小型双垂直电泳槽的变性胶和非变性胶进行 SSR 分析时的差异见表 1。

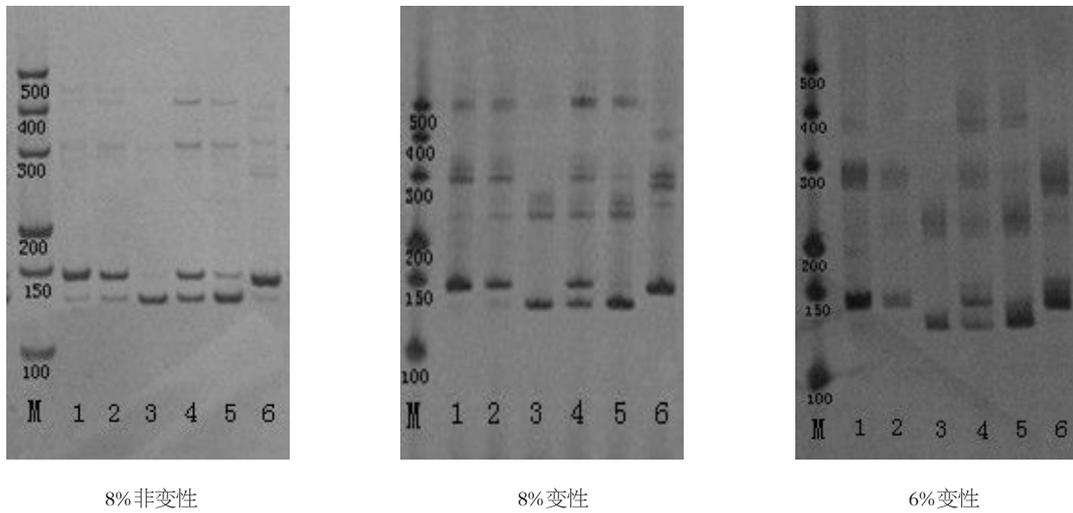
表 1 变性胶和非变性胶进行 SSR 分析时的差异

Table 1 The difference between denatured and non-denatured PAGE in the course of making gel

项目 Item	变性胶(8%、6%) Denatured PAGE	非变性胶(8%) Non-denatured PAGE
是否需要溶解尿素	需要	不需要
碎胶有无	有	无
加 6 × Loading Buffer 后是否需要变性	需要	不需要
是否需要预电泳	需要	不需要
电泳时间	30 min(预电泳)+65 min(电泳)	65 min 电泳
条带是否清晰、稳定	8%:清晰稳定;6%:模糊弥散	清晰稳定
条带是否弥散、拖带	8%:不弥散、不拖带;6%:弥散、不拖带	不弥散、不拖带
统计的难易程度	8%:容易统计;6%:难统计	容易统计
统计结果是否可靠	8%:结果可靠;6%:结果不可靠	结果可靠

在制胶过程中,因为预电泳和室温的变化导致尿素析出,所以变性胶中碎胶很多,需要处理干净,否则会影响点样的效果;变性胶上样之前需要变性 5 min,然后迅速放置在冰上;大型垂直电泳槽变性胶还需要有腐蚀性的亲和硅烷和剥离硅烷涂玻璃

板。本实验采用的小型垂直电泳槽跑变性和非变性胶时均不需要上述二者试剂。从上述二者的差异可以看出,非变性胶简洁方便,省时省力,减少毒害和污染,节约成本,提高效率。



注:1~6 为玉米自交系个体。下图同。
Note: 1-6, Maize inbred lines samples. The same below.

图1 Phi065 PCR 扩增产物在PAGE 上的电泳图结果
Fig.1 PCR productions of Phi065 on PAGE gel

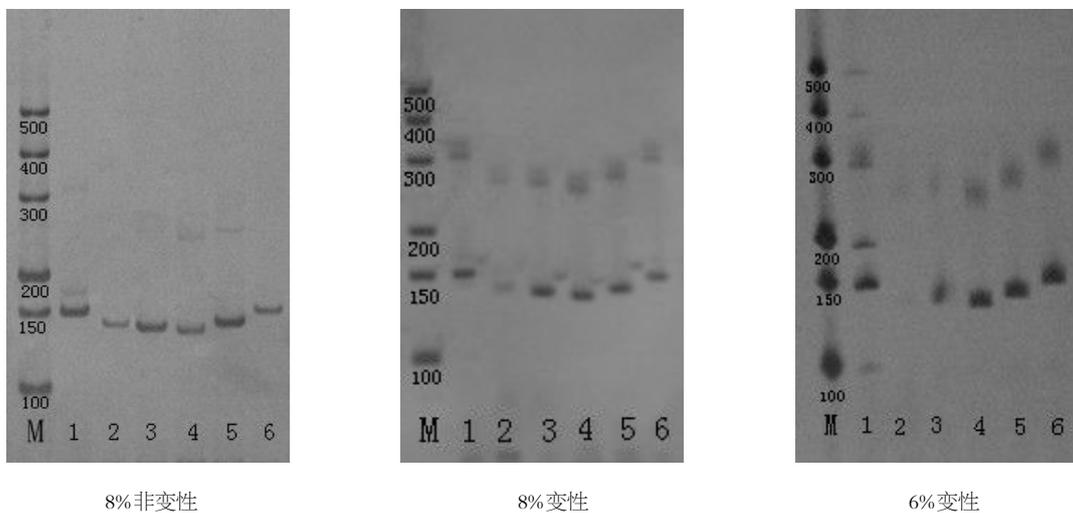


图2 Umc1196 PCR 扩增产物在 PAGE 上的电泳图结果
Fig.2 PCR productions of Umc1196 on PAGE gel

3 结论与讨论

SSR 标记具有多态性高、信息量高、共显性遗传、等位基因形式多、实验程序简单、结果重复性好、成本高等特点。本研究通过对变性与非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行比较,结果表明,非变性聚丙烯酰胺凝胶条带清晰、结果可靠、减少费用、降低工作量

和毒害性,提高效率,广泛适于动植物的遗传标记;变性聚变稀酰胺凝胶电泳过程复杂、成本高、效率低。研究结果和其他研究在检测微卫星 PCR 产物方面变性优于非变性 PAGE 的结论不同^[23,24]。分析二者差异产生的原因有以下几个方面:①由于微卫星的突变率很高,具有丰富的高度多态性,扩增过程中 DNA 复制时新生链和模板链相对滑动,产生错配,

使得一个或者几个重复单位形成环状未能参与配对,这就是非特异性条带,但这种扩增的片段拷贝数远远少于特异性扩增产物的拷贝数,因此,无论是非变性胶还是变性胶在主带前面都会有一条相距很近的非特异性条带;②在非变性胶中,部分可能是单链,部分可能会形成双链进而有突环形成,大大降低其在电泳过程中的速度,因此在非变性胶中有较多的非特异性条带;③在变性胶中,PCR 产物以单链形式存在,不受碱基组成的影响,不形成二级结构,因此条带可以真实地反映出微卫星扩增结果;④PCR 扩增过程中的一些因素也会对电泳结果造成影响,如酶量过多、引物量过多、PCR 循环次数过多、引物的退火温度过低以及变性不充分等因素。

微卫星 DNA 是研究当前种内遗传变异中分辨率最高、揭示力最强的核 DNA 标记,随着微卫星 DNA 研究的不断深入,微卫星标记将为各个领域的研究工作带来新的革命。本实验证明,微卫星 PCR 扩增产物经变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳均能检测出目的片段,但变性聚丙烯酰胺凝胶电泳操作过程繁琐,成本高,耗时耗力,效率低,难以在玉米自交系种质类群划分中广泛应用;非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳带型清晰准确、结果可靠、经济快速,利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳将加速玉米的各方面研究工作。

参考文献:

- [1] 潘兴明,张世煌,谭静,等.根据 SSR 标记划分优质蛋白玉米自交系的杂种优势群[J].作物学报,2003,29(1):105-110.
- [2] Groenen MA M, Cheng H H, Bumstead N, et al. A consensus linkage map of the chicken genome[J]. *Genome Res.*, 2000, 10: 137-147.
- [3] Xie C X, Zhang S H, Li M S, et al. Inferring genome ancestry and estimating molecular relatedness among 187 chinese maize inbred lines[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(8): 738-748.
- [4] 董世瑞,孔杰,张天时,等.中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用[J].水生生物学报,2008,32(1):96-100.
- [5] 王文文,常玉梅,梁利群.微卫星分析四个大黄鱼群体的遗传多样性[J].水产学杂志,2009,22(2):6-11.
- [6] Romanov MN, Weigends S. Genetic chicken populations based on microsatellite markers[J]. *Proceedings of the Conference "From Jay Lush to Genomics: Vidions for Animal Breeding and Genetics"*, Ames, Iowa, USA, 1999.
- [7] Liu K J, Major Goodman, Spencer Muse, et al. Genetic Structure and Diversity Among Maize Inbred Lines as Inferred From DNA Microsatellites[J]. *Genetics Society of America*, 2003, 165:2117-2128.
- [8] 王凤格,赵久然,戴景瑞,等.利用 SSR 标记进行玉米品种一致性检测研究[J].分子植物育种,2007,5(1):95-104.
- [9] 薛艳颖,陈兴奎,樊严,等.SSR 分子标记技术在杂交玉米种子纯度鉴定中的应用[J].杂粮作物,2007,27(1):6-7.
- [10] 李凌雨,刑亚静,闫彩清,等.用 SSR 标记进行玉米功能基因定位及 QTL 分析[J].玉米科学,2005,13(4):16-19.
- [11] 苟才明.5 个玉米合成群体选系的配合力及杂优类群分析[D].成都:四川农业大学硕士学位论文,2008.
- [12] 王利锋,李会勇,唐保军,等.利用表型和 SSR 标记分析河南省玉米地方品种的遗传多样性[J].中国农业科学,2009,42(4):1136-1144.
- [13] 姜敏,刘欣芳,王贺,等.利用 SSR 标记划分辽宁省部分骨干玉米自交系的杂种优势群[J].沈阳农业大学学报,2010,41(1):8-12.
- [14] 袁昊.82 分玉米自交系遗传多样性分析及部分指纹图谱构建[D].成都:四川农业大学硕士学位论文,2010.
- [15] 李明顺.温带和亚热带玉米自交系配合力和杂种优势群的初步研究[D].北京:中国农业科学院硕士学位论文,2000.
- [16] 李新海,袁立行,李晓辉,等.利用 SSR 标记划分 70 份我国玉米自交系的杂种优势群[J].中国农业科学,2003,36(6):622-627.
- [17] 吴永升,黄爱花,谭华,等.利用 SSR 标记分析热带、亚热带玉米自交系的遗传多样性[J].玉米科学,2008,16(1):6-10.
- [18] 许崇香,闵丽,安英辉,等.利用 SSR 标记划分黑龙江省中早熟玉米自交系杂种优势群的研究[J].玉米科学,2011,19(2):45-49.
- [19] 李新海,傅骏骅,张世煌,等.利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异[J].中国农业科学,2000,33(2):1-9.
- [20] 王鹏文,杨勇.利用 SSR 标记划分糯玉米的杂种优势群[J].华北农学报,2007,22(3):35-38.
- [21] Senior ML, Murphy J P, Goodman MM, et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system[J].*Crop Sci.*, 1998, 38: 1088-1098.
- [22] Saghai-Maroo M A, Soliman K, Jorgensen R A, Allard RW. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley Mendelian inheritance, chr-omosomal location and population dynamics[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1984, 81(24): 8014-8018.
- [23] 曲鲁江,李显耀,杜志强,等.微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染检测方法的比较[J].遗传,2004,26(4):522-524.
- [24] 张春雷,佟广香,匡友谊,等.微卫星产物变性与非变性 PAGE-银染检测方法的比较[J].水产学杂志,2010,23(1):11-14.

(责任编辑:朴红梅)