

聚丙烯酰胺凝胶电泳操作注意事项研究

吴建忠¹, 王玉革², 许源媛², 刘岩¹, 赵茜¹

(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)

摘要 [目的] 得到清晰的特异性条带, 更好地分析 SRAP 标记产物。[方法] 对聚丙烯酰胺电泳的上样量、电压条件进行了梯度试验, 同时就灌胶方式、银染时间、显影剂调配等各步骤的操作进行了详细地探讨。[结果] 上样量 7 μl 、电压 1 000 V 最合适, 能得到 DNA 条带清晰、特异性条带区分效果明显的条带。[结论] 为后续电泳操作及分析过程奠定技术基础。

关键词 亚麻; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 银染

中图分类号 S563.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)33-11636-02

Considerations for Study in Polyacrylamide Gel Electrophoresis Process

WU Jian-zhong¹, WANG Yu-ping², XU Yuan-yuan² et al (1. Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. College of Life Sciences of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract [Objective] The aim was to get clear specific bands, in order to better analyze SRAP markers. [Method] Sample amount and voltage condition of polyacrylamide electrophoresis were tested. At the same time, glue, silver dyeing time, the developer deployment and so on were made a detail discussion on the operation of the flash. [Result] 7 μl of sample amount, 1 000 V of voltage was the most appropriate, and could get clear DNA banding and specificity belt to distinguish the effect of belts. [Conclusion] The study laid a solid technical foundation for convenient operation and subsequent analyses process.

Key words Flax; Polyacrylamide gel electrophoresis; Silver staining

聚丙烯酰胺凝胶电泳是由 Raymond 和 Weintraub 于 1959 年利用人工合成的凝胶作为支持介质创建的一种电泳方式, 极大地提高了电泳技术的分辨率, 开创了近代电泳的新时代^[1]。聚丙烯酰胺凝胶电泳在生物化学和分子生物学中对蛋白质、多肽、核酸等生物大分子使用最普遍, 被人们称为是对生物大分子进行分析鉴定的最后、最准确的手段, 即“Last Check”。聚丙烯酰胺凝胶具有可分离不同分子量的生物大分子、灵敏度高、化学惰性好、重复性好、透明度高等优点, 目前尚无更好地支持介质能够取代它^[2], 但其不足之处在于操作过程繁琐^[3]。SRAP 标记在亚麻基因型分析中使用普遍, 该标记方法能产生大量特异性条带^[4], 为了得到清晰的特异性条带, 更好地分析 SRAP 标记产物, 必须注意操纵过程中的每一个细节。笔者在亚麻 SRAP 标记分析中, 对聚丙烯酰胺电泳的上样量、电压条件进行了梯度试验, 同时就灌胶方式、银染时间、显影剂调配等各步骤的操作作了详细地探讨, 为 SRAP 标记后亚麻基因型分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。供试植物材料均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供, 采用改良过的 CTAB 法提取亚麻全基因组 DNA^[5], 紫外分光光度计测定 DNA 浓度分析纯度后, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.1.2 化学试剂。丙烯酰胺、甲叉-丙烯酰胺、硫酸铵、尿素、硼酸、TRIS-base、EDTA、TEMED、75% 乙醇、亲和硅烷、玻璃硅烷、硝酸银、氢氧化钠、无水碳酸钠、甲醛、去离子水, 其

他用试剂纯。

1.2 方法 采用已经建立并优化的 SRAP 标记技术体系进行亚麻 PCR 扩增点样基因型分析^[6-7]。

对面板和背板分别擦板后, 采用适量 6% PAGE 溶液灌胶, 制作胶板。点样前先 80 W 预热 30 min, 60 W 进行正式电泳 80 min。用质量浓度 0.3% 的硝酸银溶液银染 8 min, 取出后用去离子水冲洗 3 遍, 每次 1 min; 再置于显影液(由 2% NaOH、0.06% NaHCO₃、4.4% HCHO 混合而成的)中, 时间约为 5 min, 以 DNA 条带清晰可辨为准, 取出后用去离子水漂洗 3 遍, 每次 3 min, 沥干, 在观察灯下人工读带、记录, 并照相留底。

2 结果与分析

2.1 上样量梯度分析 上样量分别为 4、7、10 μl , 检测不同上样量对电泳结果产生的影响。结果见图 1。

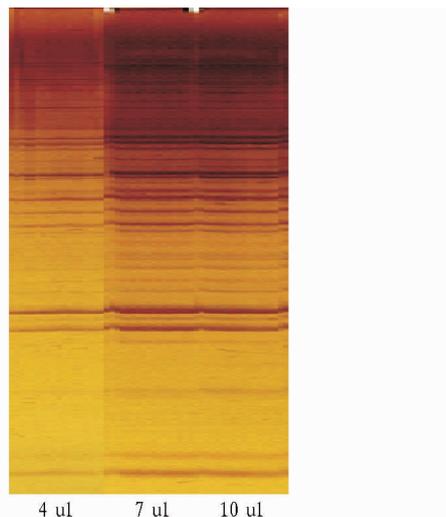


图 1 上样量影响

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

作者简介 吴建忠(1983-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 助理研究员, 在读博士, 从事作物遗传育种方面的研究。

收稿日期 2014-10-20

由图 1 可知,不同上样量对电泳结果产生影响。上样量 $4 \mu\text{l}$ 时, DNA 条带颜色淡, 易缺带, 影响读带; 上样量 $7 \mu\text{l}$ 时, DNA 条带清晰, 颜色深, 易读带; 上样量 $10 \mu\text{l}$ 时, DNA 条带清晰度、颜色深浅与上样量为 $7 \mu\text{l}$ 时基本一致。因此上样量为 $7 \mu\text{l}$ 最合适, 用最少的上样量得到最清晰的电泳结果以避免浪费样品。

点样孔内充满缓冲液, 若上样量为 $4 \mu\text{l}$, 样品体积相对点样孔内缓冲液的体积小, 点样时样品受到缓冲液的阻力大, 易被挡在点样孔外, 样品不易进入点样孔或者全部被缓冲液挡在点样孔外, 结果出现 DNA 条带颜色浅或者缺带现象; 若上样量为 $10 \mu\text{l}$, 样品进入点样孔时所受阻力相对较小, 易进入点样孔。由于阻力依然存在, 一部分样品被留在点样孔外, 污染缓冲液, 这部分样品还易落入相邻点样孔内, 造成窜样, 影响读带; 若上样量为 $7 \mu\text{l}$, 样品可以全部进入点样孔, 不会被留在点样孔外。

2.2 电压梯度分析 设置电压分别为 600、800 和 1 000 V, 检测不同电压值对电泳结果的产生影响, 不同电压条件下的电泳图谱见图 2。

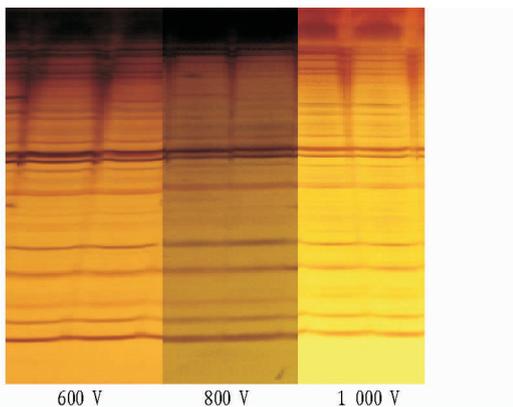


图 2 电压梯度分析

由图 2 可知, 3 种电压条件下所得到的电泳结果基本一致, DNA 条带直, 颜色深, 清晰可辨。虽然 3 种电压对电泳图谱影响不明显, 但 DNA 条带电泳至同一位置所耗时不同。DNA 条带电泳至玻璃板的 $3/4$ 处, 电压 1 000 V 需要 1.5 h, 电压 800 V 需要 2.5 h, 而电压 600 V 则需要 3 h 以上。为了缩短试验时间, 选择电压 1 000 V 最合适。

3 讨论

在聚丙烯酰胺凝胶电泳操作过程中, 电泳结果受到诸多因素的影响。正确的灌胶方式可以避免气泡的产生, 若胶内有气泡, 会使 DNA 带弯曲, 影响成像美观。当气泡位于点样孔内, DNA 所受到的阻力小, 其电泳速度比其他 DNA 快, 导致 DNA 带弯曲。气泡位置及大小不同, DNA 带弯曲程度也不同: 气泡位于 DNA 电泳路径内, 气泡越大, 气泡长度与路径长度的比值越大, DNA 弯带曲程度越大。气泡越小, 气泡长度与路径长度的比值越小, DNA 带弯曲程度越小; 气泡位于 DNA 电泳路径外, DNA 在其电泳路径内所受阻力基本相同, DNA 带不弯曲, 可视其为无影响。点样孔内的气泡, 灌胶时易产生, 插入梳子时也易带入。如果整个聚丙烯酰胺凝胶薄

厚不均或点样孔处的胶发生下移, 会导致整条 DNA 带不再一条水平线上。这是由于胶液下移导致的, 只需灌胶后, 调整玻璃板与水平平台即可。

若 DNA 条带颜色浅或 DNA 条带颜色与背景色差别小, 会影响读带。银染和显影过程中一些细节需要注意。银染液由 5 g 硝酸银、1 500 ml 去离子水调配而成。用摇床摇 15 ~ 30 min 后即可使用。若时间少于 15 min, 硝酸银没有完全溶解, 银染效果不好。银染时间为 8 min 左右, 少于 8 min, 银染不彻底, DNA 条带颜色浅; 多于 15 min, 银离子富集在胶内, 显影时面板会全部变黑, 无法读带。显影液由 0.9 g 无水碳酸钠、30 g 氢氧化钠、6 ml 甲醛、1 500 ml 去离子水配置而成。甲醛现用现加, 加入甲醛后, 在摇床上摇 2 min 后即可使用。如果甲醛没有摇匀, 显影时局部高浓度的甲醛迅速还原银离子, 局部面板变黑, DNA 条带和背景颜色一样深, 无法读带。若提前加入甲醛, 甲醛在空气中易挥发, 实际操作时溶液中甲醛浓度不够, 影响显影效果。若加入甲醛较晚, 依然由于甲醛浓度分布不均引起局部胶面迅速变黑, 无法读带。若不加甲醛, 由于缺少还原银离子的还原剂, DNA 条带不会显现出来。甲醛是具有特殊刺激性气味的液体, 对人体有强烈的致癌和促癌作用, 在嗅觉、过敏、肝、肺、免疫功能等方面也有影响, 显影过程必须在通风橱内进行, 使空气中的甲醛及时排到室外, 减少对人体的危害^[8]。面板染色不均匀, 与银染液和显影液的使用次数有关, 由于重复使用, 银染液中银离子浓度降低, 银染液内残留胶块和 DNA 染色剂, 影响银染效果。为了避免染色不均, 银染液和显影液一般在使用 3 次后重新配制。

若胶面脱落或损坏, 导致数据缺失, 原因有 2 个: 一是亲和硅烷和玻璃硅烷擦得不均匀, 导致面板与背板不易分开, 若用力撬开, 胶面可能脱离面板, 粘到背板上, 也可能从胶中间分开, 粘到 2 个板上。若胶粘到背板上, 由于胶面缺失, 不仅损失部分数据, 也影响成像美观; 若胶粘到 2 个板上, 在面板上的胶由于表面凹凸不平, 银染时就会由于银离子大量进入而导致颜色变深, 显影时不仅会迅速变黑, 而且影响其周围 1 cm 范围内的胶也变黑, 无法读带, 所损失的数据范围比粘掉的胶面面积大; 二是显影后, 去离子水冲洗不彻底。显影液中含有氢氧化钠, 若胶内残留氢氧化钠, 胶面易脱落。因此, 为使胶面完整, 在擦板时, 亲和硅烷和玻璃硅烷可以均擦 2 遍, 显影后, 漂洗时间一定要长, 防止氢氧化钠残留, 腐蚀胶面^[9]。

若同一水平线上的 DNA 条带, 形状颜色都一致, 只有一条 DNA 条带长度是其他 DNA 条带长度的 50%, 很难判断这半条带的准确性, 因为很有可能是窜样造成的, 需要进一步判断。为防止窜样, 点样时, 不同样品要更换枪头。由于用不同引物扩增 DNA, 所以 PCR 产物中 DNA 浓度不同, 若样品内 DNA 浓度高, 会产生一条颜色浅、凝胶状的杂带, DNA 在这里凝聚导致条带无法分开, 影响读带, 上样量为 $7 \mu\text{l}$ 可有效防止杂带的产生。

(下转第 11643 页)

2.6 环境因素与植株性状的相关性分析 从表 6 可以看出,株高与拔节期的积温和降雨量呈显著正相关;穗位高与拔节期的积温、降雨量、日照时数呈正相关,其中与积温呈显著正相关。穗下节间数与积温、降雨量和日照时数呈正相关,但相关性不显著。地上总节间数与积温间极显著正相关,与降雨量和日照时数间正相关,但未达到显著水平。

表 6 拔节期环境因素与植株性状的相关性分析

因素	株高	穗位高	穗上节间数	穗下节间数	地上总节间数
积温	0.93**	0.90*	-0.05	0.82	0.99**
降雨量	0.91*	0.86	0.35	0.64	0.83
日照时数	0.43	0.54	-0.58	0.81	0.64

3 讨论与结论

3.1 植株性状的相关性 玉米的生育期主要体现积温效应,不同类型品种的生育期及不同的生育阶段都需要一定积温^[5]。玉米植株的每一片叶对应一个节,玉米的节间数量与玉米的叶片数相对应,不同品种间的株高、穗位高、穗上节间数、穗下节间数、地上总节间数等植株性状显著不同。春玉米每展开 1 片叶需要的积温为 243~272 °C,夏玉米每展开 1 片叶需要的积温为 213~233 °C^[6-7]。该研究发现,不同品种的生育期与植株的地上总节间数和穗下节间数呈极显著正相关,与拔节期积温呈显著正相关。由于玉米的叶片数具有可遗传性^[8],在品种选择时,选择叶片数较少的品种,有利于缩短玉米的生育期。玉米穗位高与穗下节间数呈极显著正相关,玉米总节间数相对固定,穗上节间数和穗下节间数也相对稳定,由于穗下总节间数中有 4~6 个节被覆盖在土层之下,受降雨、温度等因素影响,有 1~2 个节可伸长至土层之上,最终影响穗下节数的地上部分的数量。此外,降雨和积温直接影响植株节间长度和植株高度,通过田间管理措施调整农田土壤含水量和温度,有利于降低株高,提高抗倒伏能力。

3.2 环境因素对植株性状的影响 玉米的穗上节间数具有遗传稳定性^[8]。该研究发现,3 地点间的穗上节间数变化不

明显,受环境的影响较小,相同地点不同品种间的穗上节间数显著不同。光照、温度、降水、CO₂ 浓度等生态因素决定着玉米的生长发育和产量形成,随着生产条件的改善和产量水平的提高,生态因素特别是气候因素作用将愈发显得重要^[9]。株高、穗位高、穗下节间数和地上总节间数等植株性状受环境影响,不同试点间明显不同。经相关性分析,株高与积温呈极显著正相关,株高与降雨量呈显著正相关,穗位高与积温呈显著正相关,穗位高与降雨量呈一定的正相关。该试验中不同品种和不同试验点的地上部总节间数和穗下节间数显著不同,这可能是由于降雨等环境因素影响贴近表层土壤的 1~2 个节间的长度,导致贴近地表的 1~2 个节间紧缩在地表之下或地表之上,最终影响节间数和节间长度。

植株的穗下节间数和地上总节间数与玉米的生育期呈极显著正相关,选育早熟品种时,减少总节间数具有一定的参考价值。在全株节数相对稳定的情况下,适当增加穗上节间数、减少穗下节间数可以降低穗位高。在试验中发现丰县在苗期至拔节期的光照、温度和降水资源丰富,有利于植株生长,倒伏的风险较大。积温和光照难以实现人工控制,江苏玉米自然降雨丰富,应通过挖“三沟”及时排水,调节土壤含水量。

参考文献

- [1] 付志远,邵可可,陈德芝,等. 穗上节间数与玉米抗倒伏能力的相关性分析[J]. 河南农业大学学报,2011,45(2):149-154.
- [2] 王益军,邓德祥,卞云龙. 多叶型玉米研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(16):129-133.
- [3] 孙本普,王勇,李秀云,等. 春玉米叶片数及其应用[J]. 玉米科学,2005,13(S1):111-112,117.
- [4] 李长文,刘秀荣,杨粤. 多叶型玉米选育进展[J]. 玉米科学,1993,3(1):4-6.
- [5] 曹广才,徐雨昌. 中国玉米新品种图鉴[M]. 北京:中国农业科技出版社,1999:5-13.
- [6] 刘锋,孙本普,李秀云. 春玉米叶片数积温及其在生产中的应用[J]. 浙江农业科学,2012(5):627-630.
- [7] 刘锋,孙本普,李秀云,等. 夏播早熟玉米的叶片数和积温研究[J]. 天津农业科学,2011,17(6):121-125.
- [8] 张丽颖,刘祥久,张善华. 国内部分玉米自交系植株形态性状与产量相关性[J]. 玉米科学,2005,13(1):19-21.
- [9] 郑洪建,董树亭. 生态因素与玉米产量关系的研究[J]. 山东农业大学学报,2000,31(3):315-319.

(上接第 11637 页)

若凝胶时间长,会增加试验耗时。配胶时,10% AP 与 TEMED 用量越多,胶凝固速度越快。在 50 ml PAGE 溶液中分别加 750 μ l 和 75 μ l 的 AP、TEMED,凝胶时间仅需 5 min;若分别加入 450 μ l 和 45 μ l 的 AP、TEMED,凝胶时间需要 30 min 以上,因此,可以根据用时调整两者用量。

4 结论

聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率高,能分辨分子量较小的 DNA 片段,但其操作步骤多,用时长,因此每个操作细节都会影响最终成像结果。只有注意每个操作步骤,才能使 DNA 条带清晰、特异性条带区分效果明显,从而得到准确的试验结果,为研究 DNA 分子标记分析提供基础数据。

参考文献

- [1] RAYMOND S, WEINTRAUB L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis[J]. Science, 1959,130(3377):711.
- [2] 潘尚领,龙桂芳,陈萍,等. DNA 直接银染测序法的建立和优化[J]. 广西医科大学学报,2001,18(3):447-448.
- [3] 李虹业,范树国,刘玉乐,等. 改良聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA[J]. 细胞生物学杂志,1999,21(4):201-203.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 何庆元,吴萍,张晓红. 不同秋眠性苜蓿 SRAP 体系优化及遗传多样性分析[J]. 草业学报,2011,20(2):201-209.
- [8] 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.
- [9] 陈香玲,李杨瑞,杨丽涛,等. cDNA-SCOT 基因差异表达两种电泳方法的比较研究[J]. 生物技术通报,2010(10):93-95.