

大白菜非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术影响因素研究

张红¹, 徐莹莉², 黄志银¹, 李梅¹, 范伟强¹, 王超楠^{1*}

(1. 天津科润蔬菜研究所, 蔬菜种质创新国家重点实验室, 天津市蔬菜遗传育种企业重点实验室, 天津 300381; 2. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387)

摘要 电泳技术是分子标记辅助育种技术的关键步骤, 建立一套高效的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术体系可提高分子标记辅助育种技术的工作效率。以根肿病抗感大白菜作为试材, 以凝胶聚合速度及凝胶条带的清晰度作为衡量标准, 分别对电泳中的凝胶浓度、温度、促凝剂配比 3 个重要因素进行研究。结果发现凝胶浓度、温度、促凝剂配比均与凝胶聚合时间呈现负相关, 但 4 种常用凝胶浓度制胶时间差异不明显, 可主要根据目的产物的大小选择浓度。在凝胶质量方面, 温度、促凝剂配比与凝胶的脆性呈负相关。综合分析, 操作中环境温度为 25~35 °C, 促凝剂配比为 1:10 的条件, 聚合速度适中, 条带清晰, 检测效果最佳。

关键词 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 凝胶浓度; 温度; 促凝剂配比; 大白菜

中图分类号 S332.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)21-0105-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research on Influence Factor of Non Denatured PAGE Technology of Chinese Cabbage

ZHANG Hong¹, XU Ying-li², HUANG Zhi-yin¹ et al (1. Tianjin Kernel Institute of Vegetables, State Key Laboratory of Vegetable Germplasm Innovation, Tianjin Vegetable Genetics and Breeding Enterprise Key Laboratory, Tianjin 300381; 2. Life Science College of Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract The electrophoresis technology is the key step in the molecular marker assisted breeding technology. Establishing a set of effective system of modified polyacrylamide gel electrophoresis technology could improve the working efficiency of the molecular marker assisted breeding technology. Taking Chinese cabbage with resistance to club root as test materials, polymerization time to gel and the definition of the gel strips as standards, the concentrations of the gel temperature and ratio of coagulant were studied. Found that the gel concentration, temperature, ratio of coagulant were negatively correlated with gel time, but the differences of gel time by four kinds of commonly used gel concentration were not obvious, we can choose the concentration mainly according to the size of the objective. In terms of gel quality, the temperature and the ratio of coagulant were negatively correlated with the brittleness of the gel. Therefore, comprehensive analysis showed that the polymerization speed was moderate, the strip was clear, and the detection effect was the best when the environmental temperature was 25~35 °C, the ratio of coagulant promoter was 1:10.

Key words Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis; Gel concentration; Temperature; The ratio of coagulant; Chinese cabbage

随着分子生物学与信息学的快速发展, 分子标记辅助育种技术(marker assisted selection, MAS)应运而生, 它弥补了传统育种周期长、筛选靠经验等不足, 不仅大大缩短了新品种的选育进程, 降低了选育过程中的工作量, 而且从基因水平上确保了筛选的准确性, 该技术已被广泛应用于水稻^[1]、小麦^[2]、白菜^[3]、辣椒^[4]等农作物及经济作物品种的选育中。分子标记辅助选育过程中关键步骤就是对 PCR 扩增产物的检测, 对于操作者来说, 熟练掌握相关检测技术至关重要。目前实验室常用的检测方法主要是琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 琼脂糖凝胶操作过程更为简便, 初学者较易掌握, 但它适用于长度 200 bp 至近 50 kb 的 DNA, 对于小片段 DNA 的检测分辨率差; 聚丙烯酰胺凝胶电泳则适用于高通量的样本检测, 对于分离 5~500 bp 的 DNA 效果更佳, 分辨率更好。黄烈健等^[5]认为在进行近等基因系的差异分析时, SSR 类型的标记比 RAPD 标记更具有优势性。而针对 SSR 类型的分子标记, 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳能够高效地检测出单拷贝的差异, 因此该检测方法在实践应用中选择率更高。但它的操作过程相对更为繁琐, 制胶、跑

胶、染胶过程影响成败的因素也复杂, 国内对此的相关研究主要集中在染胶方法的改进^[6], 对制胶影响因素的关注相对缺乏, 初入实验室的研究者很难自主掌握规律。

该研究拟对制胶、跑胶、染胶过程中各个影响因素如凝胶浓度、促凝剂的配比、电泳电压、上样量等提出优化, 旨在建立一套高效的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术体系, 不仅可以为初学者提供技术指导, 还可以为分子标记辅助育种技术的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 针对根肿病抗性差异, 选取 3 份不同来源的大白菜品种 12G57(抗)、12G83(抗)、H227(感), 在前人试验基础上^[7-9]快速提取 DNA 样品, 缓冲液为 ddH₂O 配制的 0.5×TBE, 电泳仪为北京市六一仪器厂的 DYY-6C。上述材料由天津科润蔬菜研究所提供, 所有试验均在天津科润蔬菜研究所分子实验室进行。

1.2 引物 在研究室前期的试验基础上^[10-11], 选择在 3 个抗感材料中具有多态性条带的分子标记进行基因型检测(表 1)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取方法。 白菜叶片基因组 DNA 的提取, 在碱裂解法 II^[9-10]的基础上加以改良: 采集大白菜真叶叶片 0.2~0.3 g (1 cm×1 cm) 放入标好编号的 1.5 mL 离心管中; 再向管中加入 100 μL 0.4 mol/L NaOH 溶液, 充分研磨; 将样品进行离心, 转速设定 10 000 r/min, 离心 1 min; 移液枪吸取上清

基金项目 青年科研人员创新研究与实验项目(2018013, 2018003, 201913); 天津市现代农业产业技术体系创新团队建设专项计划(ITTVRS2017003)。

作者简介 张红(1990—), 女, 天津人, 研究实习生, 硕士, 从事大白菜分子育种研究。*通信作者, 副研究员, 从事十字花科蔬菜育种研究。

收稿日期 2019-07-25

液 10 μL 至新离心管,加入 300 μL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 混匀备用。

表 1 检测抗根肿病基因的分子标记引物

Table 1 Molecular marker primer for detecting clubroot resistance genes

标记 Marker	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')
BriD10233	TGCTTCTTGATGATGTC	ACCGTGTGTGTGCCACTA
Bra019317	TGCTCAAGTCATTTTCAGGA	GAAAACCTTTTGGCTGAGTC
Bra019235-2	AACCAAACCAAACCAAACCTC	TTCATGTGTGTTTACCCTCC

DNA 提取质量采用 1% 的琼脂糖进行检测,合格样本保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,使用前可根据分光光度仪检测其提取量,稀释至 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 使用。

1.3.2 PCR 扩增体系及程序。

1.3.2.1 PCR 扩增体系。PCR 试验遵循实验室总结整理的扩增体系,即 10 μL 的 PCR 反应体系,各成分具体含量如下: 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 2.00 μL ; 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Forward primer 0.12 μL ; 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Reverse primer 0.12 μL ; 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PCR Mix 5.00 μL ; ddH₂O 2.76 μL 。

1.3.2.2 PCR 反应程序。94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 一般 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。最后将扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 凝胶聚合速度的影响因素

1.4.1 不同温度下各凝胶浓度对凝胶聚合速度的影响。通过向电极槽内加入不同温度的水来调整凝胶的聚合温度,将温度设定为 4、25、35、50 $^{\circ}\text{C}$, 凝胶浓度分别为 5%、8%、12%、15%, 以秒表计时来测定不同温度下各浓度凝胶的聚合速度。凝胶聚合标准如图 1, 无气泡, 胶片晃动非液态。

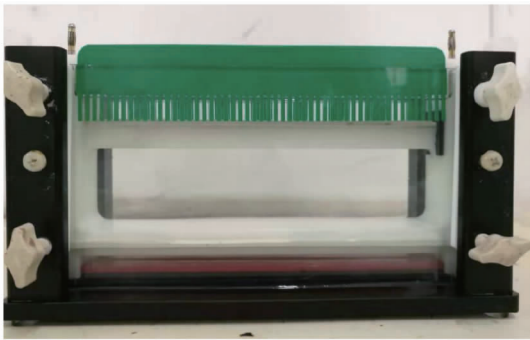


图 1 凝胶聚合标准

Fig. 1 The standard of gel polymerization

1.4.2 不同促凝剂对比对凝胶聚合速度的影响。设置 4 个水平的 APS:TEMED 配比, 分别为 1:5、1:10、1:15、1:20, 凝胶聚合速度以秒表计时来测定。

1.5 凝胶效果的验证 将 12G57 (抗)、12G83 (抗)、H227 (感) 3 份试材的扩增产物在配制好的凝胶上各点样 3 μL , 每份样品重复 3 次, 电泳电压为 160 V, 40 min, 将凝胶完整、条带清晰、分辨力强作为衡量标准。

2 结果与分析

2.1 不同温度下各凝胶浓度对凝胶聚合速度的影响 采用

4 种不同的凝胶温度对实验室常用的 4 种凝胶浓度进行凝胶聚合试验, 其他条件保持一致。由表 2 可知, 在同一凝胶浓度下, 随着温度的升高, 凝胶聚合所需的时间降低。聚丙烯酰胺凝胶聚合是一种化学聚合方式, 聚合时需要一定的能量, 在高温下凝胶可以加速聚合, 但从凝胶效果来看, 高温 (50 $^{\circ}\text{C}$) 时凝胶聚合多易产生小气泡, 影响跑胶效果, 造成弯带; 而低温 (4 $^{\circ}\text{C}$) 聚合凝胶会变得脆而混浊, 因此制胶时建议选择 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 聚合。此外同一温度下, 凝胶聚合所需的时间随凝胶浓度升高而降低, 不同浓度间的差异较小, 约 1 min, 可忽略, 试验设计时操作人员可优先考虑目的片段的大小选择适宜浓度的凝胶。

表 2 不同环境温度对各凝胶浓度聚合速度的影响

Table 2 Effects of different environment temperature on the polymerization speed of different gel concentrations min

凝胶浓度 Gel concentration//%	温度 Temperature// $^{\circ}\text{C}$			
	4	25	35	50
5	13.7	9.3	6.2	5.0
8	12.3	8.4	5.7	4.8
12	10.3	7.5	4.5	3.5
15	9.5	6.5	3.8	3.0

注: APS:TEMED 配比为 10:1

Note: The APS:TEMED ratio was 10:1

2.2 不同促凝剂配比下各凝胶浓度对凝胶聚合速度的影响 APS 是催化剂, TEMED 是加速剂。室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 两者之间的对比对凝胶速度及凝胶效果影响颇大。从表 3 可以看出, 采用实验室常用的 4 种 APS:TEMED 配比分别对 4 种不同的凝胶浓度进行凝胶聚合试验, 其他条件保持一致。由表 3 可知, 同一配比, 同一温度下, 凝胶聚合所需的时间依然随凝胶浓度升高而降低, 两者间呈现负相关。在同一凝胶浓度下, 凝胶聚合所需的时间随促凝剂配比的加大而缩短, 也呈现负相关。

表 3 不同促凝剂对比对各凝胶浓度聚合时间的影响

Table 3 Effects of different coagulant ratios on polymerization time of different gel concentrations min

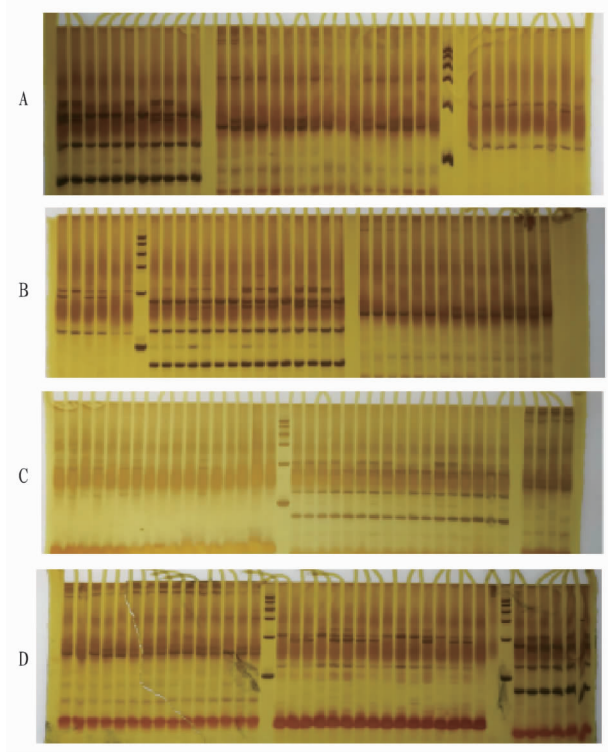
凝胶浓度 Gel concentration//%	APS:TEMED			
	1:5	1:10	1:15	1:20
5	13.2	9.3	6.5	5.3
8	12.3	8.4	5.0	3.7
12	11.2	7.5	4.5	3.3
15	10.0	6.5	3.0	2.3

当选择高促凝剂配比的凝胶, 虽然制胶时间降低, 效率提高, 但银染过程发现, APS 和 TEMED 加入太多时, 制成的凝胶脆性增强, 分离时易破碎 (图 2)。分析可能高促凝剂对比会缩短丙烯酰胺聚合链长度。而促凝剂配比太少, 不仅聚合速度加大, 而且配制的凝胶偏软, 银染时分离困难。分析可能是 O₂ 进入单体溶液中抑制了聚合过程, 导致凝胶孔径扩大, 凝胶支撑力减弱变性。

3 讨论与结论

电泳分离技术是分子标记辅助技术的关键技术, 在分子育种试验中被普遍应用, 但对电泳技术优化的研究相对较少, 常常是由试验操作者花费大量时间和精力自行摸索^[12]。

梁宝萍等^[13]通过模拟四季变化设定了3个水平的温度,结果表明同一凝胶浓度下,温度与凝胶聚合时间成反比,这一规律与该试验结果一致。为进一步深入研究温度对凝胶质量的影响,该试验还对极端温度下的凝胶质量进行了对比,发现高温制胶易产生小气泡,分析可能高温下凝胶聚合反应瞬间完成,导致灌胶时气泡排除不及。而低温制胶,凝胶易混浊且脆性增强,综合分析温度保持在25~35℃时聚合速度适中,凝胶质量最佳。



注:A、B、C、D图分别为APS:TEMED配比1:5、1:10、1:15、1:20
Note: Figures A, B, C and D were APS:TEMED ratio of 1:5, 1:10, 1:15 and 1:20 respectively

图2 不同促凝剂配比的凝胶银染结果

Fig. 2 The results of silver staining in gels under different coagulant ratios

凝胶浓度、操作环境温度、促凝剂配比等都会影响凝胶聚合速度和凝胶检测效果。该试验从凝胶聚合速度和检测效果出发,综合研究了3个主要因素^[14-15]的作用,发现凝胶浓度对聚合时间的影响较小,但它决定着形成分子筛的孔径大小,通过影响目的产物的通过,从而影响检测效果。相比而言,制胶过程中的温度和促凝剂对比对聚合速度及检测效果影响明显,实验室批量操作,建议选择25~35℃,APS:TEMED配比1:10的试验条件,凝胶聚合时间大约在8 min,不仅能有效缩短制胶时间,而且跑胶读带效果清晰。

参考文献

- [1] 张荟,周鹏,涂诗航,等. 利用分子标记辅助选择技术创制抗稻瘟病水稻新恢复系[J]. 分子植物育种,2015,13(9):1918-1922.
- [2] 吕学莲,白海波,惠建,等. 分子标记辅助选择小麦抗白粉病及优质基因聚合体[J]. 分子植物育种,2017,15(4):1378-1384.
- [3] 饶立兵,胡齐赞,余小林,等. 大白菜抽薹性状相关SSR分子标记的筛选[J]. 分子植物育种,2015,13(8):1786-1793.
- [4] 李怡斐,蒋晓英,张世才,等. 加工型辣椒细胞质雄性不育育性基因分子标记及辅助育种[J]. 分子植物育种,2016,14(4):946-952.
- [5] 黄烈健,向道权. 玉米Ht近等基因系的RAPD、SSR分子标记比较研究[J]. 玉米科学,2003,11(3):31-33.
- [6] 李西平,钱新华,姚英民,等. DNA聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法的选择[J]. 第一军医大学学报,2004,24(9):1072-1074.
- [7] 王涛,王超楠,张红,等. 大白菜基因组DNA快速提取方法的研究[J]. 华北农学报,2017,32(6):67-72.
- [8] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 柿属植物基因组DNA提取方法比较[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(4):170-173.
- [9] 李委,戴祖云,夏伟伟,等. 一种快速提取南瓜大群体基因组DNA的方法[J]. 中国蔬菜,2017(9):36-40.
- [10] 张红,张斌,闻凤英,等. 大白菜根肿病的遗传规律及抗病基因定位研究[J]. 华北农学报,2017,32(4):60-66.
- [11] 许丽,李玥莹,邹剑秋,等. 高粱微卫星非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件的优化[J]. 安徽农业科学,2007,35(2):328-329.
- [12] 李霞斌,孙兴旺. 变性聚丙烯酰胺凝胶制备体会[J]. 西南军医,2010,12(3):483.
- [13] 梁宝萍,原玉香,朴凤植,等. 大白菜非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的优化[J]. 河南农业科学,2012,41(5):129-132.
- [14] 张海添,陆云飞,李卫,等. 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化PCR产物的观察[J]. 广西医科大学学报,2003,20(6):894-896.
- [15] 吉家敏,夏志强,邹枚伶,等. 木薯SSR标记非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件的优化[J]. 现代农业科学,2009(6):34-36.