

陈 祥,魏臻武,任海龙,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测南苜蓿 SSR 标记[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):382-384.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.121

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测南苜蓿 SSR 标记

陈 祥,魏臻武,任海龙,乔志宏

(扬州大学动物科学与技术学院/扬州大学草业科学研究所,江苏扬州 225009)

摘要:以南苜蓿(*Medicago polymorpha*)为试验材料,用 CTAB 法提取南苜蓿基因组,选择已开发的蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)引物 100 对,分别在一年生苜蓿 SSR-PCR 反应体系和苜蓿属变种 SSR-PCR 反应体系的基础上进行 PCR 扩增,并将扩增产物进行 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,都得到了位点明显、背景清晰的条带。结果表明,南苜蓿均适合于现有的一年生苜蓿 SSR-PCR 反应体系和苜蓿属变种 SSR-PCR 反应体系,建立了一套有效、成熟的应用于南苜蓿 SSR 标记的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测的方法,该方法可以用于南苜蓿杂交 F_1 代的鉴定以及后期资源的遗传分析。

关键词:南苜蓿;SSR 标记;PAGE

中图分类号:S540.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0382-03

南苜蓿(*Medicago polymorpha*)属于豆科苜蓿属,是一年生或越年生苜蓿,别称秧草、草头、金花菜^[1-2]、多形苜蓿^[3]等。南苜蓿多产于长江中下游地区,如江苏、浙江等地,在安徽、江西、云南等地也有分布。南苜蓿常作为田间绿肥,也可作蔬菜和牧草。目前,随着秧草保健功能的不断彰显,多地已经形成了以秧草为主的产业。南苜蓿实现了牧草功能的延伸,是长三角生态农业新的增长点,成为我国南方草业发展的

新亮点^[4]。

简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR),是重复序列的重要组成部分。SSR 是由 1~6 个核苷酸为重复单位序列组成的串联重复序列。SSR 以 PCR 技术为基础,并均匀分布于整个基因组中。由于 SSR 分子标记具有共显性、涵盖范围广、标记数量丰富、所揭示的多态性高等优点^[5],已经在分子育种、指纹图谱构建、种子纯度鉴定、基因定位等方面得到广泛应用^[6-7]。同样,对于遗传背景缺乏、没有测序信息的植物,SSR 仍然具有极高的利用价值。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE),是一种以聚丙烯酰胺凝胶作为介质的常用电泳技术。由于其检测灵敏度和分辨率都比较高,是分子生物学和基因工程上不可缺少的试验技术,特别适合 SSR 标记扩增产物的检测^[8-9]。本研究在张丽芳等模式植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)SSR 标记的 PCR 反应体系^[10]和 Eujayl 等苜

收稿日期:2014-11-10

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2012340);江苏省普通高校研究生科研创新计划(编号:CXLX_1429)。

作者简介:陈 祥(1990—),男,江苏扬州人,硕士研究生,研究方向为牧草种质资源评价与遗传育种。E-mail: yzdxchenxiang@163.com。

通信作者:魏臻武,博士,教授,主要从事牧草遗传育种与种质资源评价研究。E-mail: zhenwu_wei@hotmail.com。

样品消解试剂用量少,降低了由酸所造成的空白值,是理想的消解方法。采用火焰原子分光光度法测定微量元素含量,该方法准确性高、精密度好,样品的回收率为 95.5%~104.8%,相对标准偏差在 3% 以内。本研究结果表明,午子仙毫、定军茗眉、宁强雀舌 3 种茶叶中,对人体有益的 Mg、Ca、Mn 含量很高,这些微量元素对维护人体免疫功能起着重要作用。其中,午子仙毫中 Mg、Mn、Fe、Cu、Zn 含量较高,茶叶品质优异。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 郑宽明. 汉中茶叶产业的调研分析[J]. 商场现代化,2005,446(23):206-207.
- [3] 周玉珊,张西玲,汪荣斌,等. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定秦艽和麻花秦艽中多种微量元素[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(5):1172-1175.
- [4] 焦 阳,尹海波,张 乐,等. 基于 ICP-MS 对不同产地小根蒜无

机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 药物分析杂志,2011,31(11):2063-2066.

- [5] 庞海霞. 火焰原子吸收法测定苦荞中微量元素[J]. 食品研究与开发,2014,35(12):60-62.
- [6] 付晓陆,汪 钊,叶海云. 氢化物发生原子荧光光谱法同时测定茶叶中的砷、铅和硒[J]. 食品工业科技,2003,24(4):80-81.
- [7] 史 娟. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定千里光中微量元素[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5867-5868.
- [8] 谭惠仁. ICP-AES、ICP-MS、AFS、IC 分析技术在茶叶中微量元素的分析研究[D]. 广州:中山大学,2013.
- [9] 傅 明,陈新焕,杨万彪,等. 微波消解 ICP-AES 法测定茶叶中铅、砷、铜、铁、锌、硒等 12 种元素的含量[J]. 食品科学,2001,22(11):76-78.
- [10] 徐桂香,吴江峰,谢光远. 江西特产中药彭泽贝母 As、Hg 含量的测定研究[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2009,33(1):124-126.
- [11] 陈燕萍,刘 红,贾 娇. 微波辅助消解 ICP-AES 法测定小根蒜不同部位的 18 种元素[J]. 食品工业科技,2013,34(17):320-322,359.

苜蓿属变种 PCR 反应体系^[11]的基础上,建立一种适用于南苜蓿 SSR 标记的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的南苜蓿材料由扬州大学草业科学研究所野外搜集所得(表1),于2014年4月种植于扬州大学扬子津校区实验地,在植株成型后取嫩叶研磨,提取的叶片DNA作为PCR反应的模板。试验所用的MgCl₂、dNTP、*Taq*聚合酶试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,其他常规试剂均为国产分析纯。

表 1 供试材料			
编号	品种类别	来源	形态特征
WL01(♂)	地方品种	浙江温岭	叶片较大、株型较高、分枝数较多
CX01(♀)	地方品种	云南楚雄	叶片较小、株型较矮、分枝数少
F ₁ (WL01×CX01)	待选品系		叶片较大、分枝数较多

1.2 DNA 提取

南苜蓿叶片基因组DNA提取采用魏臻武的CTAB法^[12]。取10~15张叶片在液氮中迅速研磨成粉末,用于后续DNA的提取,提取的DNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量和浓度。样品稀释10倍放入4℃冰箱备用,原液放入-70℃冰箱长期保存。

1.3 引物

引物来源于扬州大学草业科学研究所提供的100对蒺藜苜蓿SSR引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物粉末用超纯水稀释,保证引物的浓度高于10 μmol/L。

待完全溶解后在漩涡混合器中混匀,离心,放入-20℃冰箱中保存待用。

1.4 PCR 反应体系和扩增程序

SSR反应体系^[10]为10 μL(每孔添加量)。10 μL PCR体系含0.24 μL dNTP(10 μmol/L),3 μL Primer(10 μmol/uL),0.16 μL *Taq* polymerase(1 U),1.5 μL 10×buffer(1 μmol/L),3 μL DNA模板(20~90 ng/μL),0.9 μL Mg²⁺(20 mmol/L),1.2 μL ddH₂O。

一年生苜蓿PCR扩增程序^[13]:94℃预变性3 min;95℃变性1 min,55℃退火1.5 min(不同引物退火温度不同),72℃延伸1 min,共循环35次;最后72℃保温8 min,4℃保存。

苜蓿属变种PCR扩增程序^[11]:95℃预变性10 min;95℃变性50 s,55℃退火50 s(不同引物退火温度不同),72℃延伸90 s,共循环40次;最后72℃保温10 min,4℃保存。

1.5 PCR 扩增产物的电泳检测

PCR扩增产物中加入1 L loading buffer(溴酚蓝缓冲液),在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上,于100V电压电泳0.5 h,200 V电压电泳1 h,然后银染检测。

1.6 图片处理

电泳照片用Adobe Photoshop CS2 9.0进行裁剪;引物信息采用Excel 2003整理。

2 结果与分析

用100对蒺藜苜蓿SSR引物进行亲本母本温岭材料和父本楚雄材料及其杂交F₁代多态性分析,筛选出8对多态性较好的作为南苜蓿特异性SSR引物,引物信息如表2所示。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR扩增产物,最后银染上色,其结果见图1、图2。

表 2 SSR 引物相关信息

编号	引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
1	MtB152	AATTTCAAGGAAAACCATCAA	GATGGGACTTGATTTCTTA
2	MtB34	GACGTCGGAGACATGGAGTT	TCTAAGCCTCACCCCAAAGA
3	MtB147	TCAAAATCAAAATCGGCGAC	TTACGGGGACAAAAATTGGA
4	MtB18	ACCTGGGATTGGGTTAGGAC	CCACTGTTGTGTGTGCTGCT
5	MtB21	TACTGGGTTACAGCACAAAA	TTCAACCGTACCGCTCTTCT
6	MtB50	CATGTAACGCTTGAGGCTGA	CAACCCTAACCTCACCAAA
7	MtB16	TTTGTGGAGTATCTGCTTGCT	CAATTGCGCGTTGTTTGCTA
8	MtB8	CCATCCTTTTACGATGACCG	GGCTTACCACCACCATTC

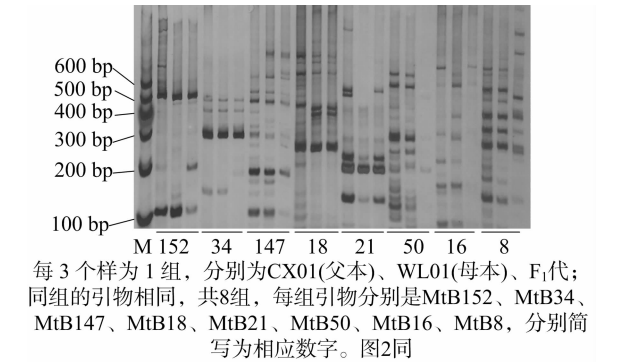


图1 基于蒺藜苜蓿 PCR 反应体系的南苜蓿 SSR 检测结果

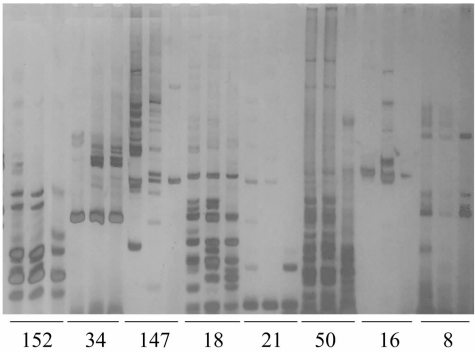


图2 基于苜蓿属变种 PCR 反应体系的南苜蓿 SSR 检测结果

试验结果表明, 蒺藜苜蓿 SSR 引物 MtB152、MtB34、MtB147、MtB18、MtB21、MtB50、MtB16、MtB8 在一年生苜蓿 SSR-PCR 反应体系中和苜蓿属变种 SSR-PCR 反应体系中均能扩增出条带, 但条带质量有差异。具体表现为一年生苜蓿 SSR 反应体系扩增出的产物经电泳检测后得到的谱带要比苜蓿属变种的 SSR 反应体系扩增出的谱带背景更加清晰, 多态性位点更易于辨认, 但扩增出的位点明显少于苜蓿属变种 SSR 的反应体系。在 2 种反应体系中, 引物 MtB18、MtB147、MtB50、MtB8 扩增出的条带数明显多于其他引物, 多态性好于其他引物。

基于一年生苜蓿 SSR 反应体系和苜蓿属变种的 SSR 反应体系, 分别采用聚丙烯酰胺凝胶电泳后对南苜蓿进行 SSR 标记检测, 均能够得到稳定、易辨、背景清晰的谱带, 是一套快速有效的检测方法。

3 结论与讨论

由于 SSR 的诸多优点以及技术的日趋成熟, 已经成为一种比较理想的分子标记技术, 被广泛运用到多个领域。在农作物中, 水稻 (*Oryza sativa*)^[14-15]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[16-17]、玉米 (*Zea mays*)^[18]、大豆 (*Glycine max*)^[19]、大麦 (*Hordeum vulgare*)^[20] 等都已进行了 SSR 标记的研究。

南苜蓿早期作为蔬菜和田间绿肥推广^[4], 在分子生物学研究方面, 还没有相关的文献报导, 导致其遗传背景缺乏, 试验工作无法借鉴, 给遗传育种工作带来了困难。试验证明, 根据南苜蓿的分类学地位, 将其作为一年生苜蓿属植物的属性来研究, 能够开展 SSR 分子标记的研究。根据引物之间的通用性, 已开发的蒺藜苜蓿 SSR 引物, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 在一年生苜蓿 SSR-PCR 反应体系和苜蓿属变种的 SSR-PCR 反应体系的基础之上, 能够扩增出条带清晰、多态性高的谱带, 可以用于南苜蓿试验分析与交流。

要想获得清晰可靠的条带可以改变引物的退火温度、 Mg^{2+} 浓度以及反应的循环数^[21-22]。基于一年生苜蓿 SSR 反应体系的谱带要比苜蓿属变种的 SSR 反应体系的清晰, 但是扩增出的位点数要少于苜蓿属变种的反应体系, 这可能与各自的反应体系的退火温度及循环次数有关, 需要进一步设计试验来摸索证明, 才能最终得到位点数多而且条带清晰可靠的 SSR-PCR 反应体系。

参考文献:

- [1] 王 栋. 牧草学各论[M]. 南京: 畜牧兽医图书出版社, 1956: 170-171.
- [2] 陈默君, 贾慎修. 中国饲用植物[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 579-580.
- [3] 南苜蓿[EB/OL]. [2014-10-02]. <http://www.eflora.cn/sp/Medicago%20polymorpha#map>.
- [4] 曹德明, 魏臻武, 虞珍萍, 等. 扬中金花菜产业发展新模式——南方草业的新亮点[J]. 草原与草坪, 2012(5): 79-82.

- [5] 徐兴, 梁海永, 甄志先, 等. 苹果 SSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 161-164.
- [6] Cook D R. *Medicago truncatula*—a model in the making! [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(4): 301-304.
- [7] 常金华, 夏雪岩, 张 丽, 等. 高粱抗蚜基因的遗传分析和 SSR 标记定位[J]. 草业学报, 2006, 15(2): 113-118.
- [8] 宋显军, 张 伟, 曹 萍, 等. 大豆 SSR 标记 PAGE 银染方法的改进[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16): 3922-3923.
- [9] 张 芳, 权军利, 单卫星. 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测致病疫霉菌 SSR 标记方法改良[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16606-16607.
- [10] 张丽芳, 魏臻武, 杨占花. 蒺藜苜蓿 SSR 反应体系优化及在一年生苜蓿种质鉴定中的应用[J]. 草地学报, 2007, 15(5): 429-436.
- [11] Eujayl I, Sledge M K, Wang L, et al. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(3): 414-422.
- [12] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62-67.
- [13] 屠德鹏, 魏臻武, 武自念, 等. 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 分布特征及标记的开发[J]. 草业科学, 2011, 28(5): 746-752.
- [14] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1993, 241(1/2): 225-235.
- [15] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(7): 1071-1077.
- [16] Ma Z Q, Röder M, Sorrells M E. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat [J]. *Genome*, 1996, 39(1): 123-130.
- [17] Plaschke J, Ganai M W, Röder M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91(6/7): 1001-1007.
- [18] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize[J]. *Genome*, 1996, 39(2): 277-287.
- [19] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 1131-1139.
- [20] Liu Z W, Biyashev R M, Maroof M A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5/6): 869-876.
- [21] Smulders M K. Use of short microsatellites from database sequence to gene rate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lyopersicon* species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 97: 164-272.
- [22] Rychlik W, Spencer W J, Rhoads R E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(21): 6409-6412.