

张 丹, 颜梦秋, 张美彦, 等. 香菇微卫星标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用及正交优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(5): 57–61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.05.010

香菇微卫星标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用及正交优化

张 丹, 颜梦秋, 张美彦, 谭 琦, 宋春艳, 尚晓冬

(上海市农业科学院食用菌研究所/农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室/

国家食用菌工程技术研究中心/上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201403)

摘要:变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种高效鉴定微卫星分子标记的方法, 广泛应用于种质鉴定、遗传连锁图谱构建及分子标记辅助育种等研究中。该方法由于操作繁琐, 目前在食用菌领域的应用尚不广泛。以香菇为研究对象, 建立变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的检测流程, 并利用正交试验对检测流程中涉及的加样缓冲液与 PCR 反应液的体积比、95 ℃ 变性时间、置于冰上冷却时间、银染时间、银染后胶板去离子水洗时间等 5 个操作节点进行优化。结果表明, 加样缓冲液与 PCR 反应液体积比为 1:2, 95 ℃ 变性 2~5 min, 置于冰上冷却 15~20 min, 银染 7 min, 银染后胶板用去离子水洗 5~10 s 是正交试验的较优处理组合。试验建立了香菇微卫星标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测操作规程, 该操作规程具有成本低、效率高、易批量化操作等优点, 对其他食用菌微卫星标记的应用具有重要的参考价值。

关键词:香菇; 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 微卫星标记; 正交试验设计; 银染试验

中图分类号:S646.1+20.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)05-0057-05

微卫星标记别称简单重复序列 (simple

sequence repeat, 简称 SSR) 标记是目前普遍使用的分子遗传学标记, 具有多态性高、共显性、检测重复性好、基因组中广泛分布等优点。近年来, 随着全基因组测序技术的不断发展, SSR 标记已广泛应用于动植物遗传图谱的构建、数量性状座位 (quantitative trait locus, 简称 QTL) 定位、分子遗传多样性等研究^[1-3]。SSR 标记扩增产物的检测方法主要有荧光标记引物测序法、同位素标记引物的聚丙烯

收稿日期: 2020-07-18

基金项目: 上海市食用菌产业技术体系建设专项资金 [编号: 沪农科产字 (2019) 第 9-03 号]; 现代农业产业技术体系建设专项资金 (编号: CARS-20)。

作者简介: 张 丹 (1986—), 男, 江苏泗洪人, 硕士, 助理研究员, 从事食用菌育种研究。E-mail: zdfungi@126.com。

通信作者: 尚晓冬, 博士, 研究员, 从事食用菌遗传育种研究。E-mail: xdshang@163.com。

annuus plants and calli exposed to NaCl: I. Growth rate and osmotic regulation in intact plants and calli [J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 155(6): 769–777.

[64] 郑青松, 刘兆普, 刘友良, 等. 盐和水胁迫对海蓬子、芦荟、向日葵幼苗生长及其离子吸收分配的效应 [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(2): 16–20.

[65] 杨立飞, 朱月林, 胡春梅, 等. NaCl 胁迫对嫁接黄瓜膜脂过氧化、渗透调节物质含量及光合特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1195–1200.

[66] 梁 超. 过量积累甜菜碱改善小麦耐盐性的生理机制研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

[67] 王 伟, 于海峰, 张永虎, 等. 盐胁迫对向日葵幼苗生长和生理特性的影响 [J]. 华北农学报, 2013, 28(1): 176–180.

[68] 曾 华. 植物耐盐碱机制研究进展 [J]. 北方水稻, 2017, 47(2): 58–61.

[69] 李海洋, 李爱学, 王 成, 等. 盐胁迫对苗期向日葵内源激素含量的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(6): 98–103.

[70] 邵秋玲. 两种白刺对黄河三角洲滨海盐碱地的适应性及其应用研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.

[71] 王启龙, 卢 楠, 魏 样. 不同改良措施对定边盐碱地土壤理化性质、黑麦草生长及产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(11): 282–286.

[72] 林学政, 陈靠山, 何培青, 等. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响 [J]. 生态学报, 2005, 26(3): 801–807.

[73] 李瑞利. 两种典型盐生植物耐盐机理及应用耐盐植物改良盐渍土研究 [D]. 天津: 南开大学, 2010.

[74] 宋玉民, 张建锋, 邢尚军, 等. 黄河三角洲重盐碱地植被特征与植被恢复技术 [J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(6): 87–89.

[75] 赵 娜. 甜瓜、向日葵间作系统的资源利用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.

[76] 邓 丞. 天津滨海盐碱地沿海防护林配置模式及构建技术的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.

[77] 黄生林. 滨海盐碱地景观绿化植物研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

烯酰胺凝胶电泳法、琼脂糖凝胶电泳法、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法等,其中变性聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染检测法被认为是精度最好的鉴定方法^[4-5]。

在香菇分子遗传学研究中,SSR 标记已应用于菌种真实性鉴定、遗传图谱构建以及遗传多样性分析等研究中。已有的文献报道表明,目前香菇中 SSR 标记的检测多采用琼脂糖凝胶电泳法或是非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法,有关变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法的报道较少^[6-9]。为进一步推动该方法在食用菌领域的应用,本研究拟采用正交设计对现有变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测流程进行优化,以期建立一套高效、低成本、易批量化实践的香菇 SSR 标记操作规程,同时为其他食用菌 SSR 标记的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2019 年 3 月在上海市农业科学院食用菌研究所开展,供试香菇菌株为国内常用栽培品种,共 24 株(表 1),由上海市农业科学院食用菌研

究所育种室提供。通过十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide,简称 CTAB)法^[10]提取香菇菌丝体的全基因组 DNA。

表 1 供试香菇品种来源

编号	菌株	品种来源	编号	菌株	品种来源
1	Shen-8	上海	13	Jindi	四川省
2	Shen-10	上海	14	Senyuan-1	湖北省
3	Shen-12	上海	15	Senyuan-10	湖北省
4	Cr02	福建省	16	Xiang-9	广东省
5	L135	福建省	17	Xiangza-26	广东省
6	Minfeng-1	福建省	18	Guangxiang	广东省
7	Cr62	福建省	19	Huaxiang-8	湖北省
8	Cr04	福建省	20	Huaxiang-5	湖北省
9	Qingyuan9015	浙江省	21	L952	湖北省
10	241-4	浙江省	22	Junxing-8	浙江省
11	Wuxiang-1	浙江省	23	L9319	浙江省
12	Ganxiang-1	江西省	24	L808	浙江省

1.2 PCR 扩增体系和程序

选用的 SSR 引物根据香菇 L135 菌株的全基因组序列设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表 2。

表 2 试验选用的 6 对 SSR 标记引物信息

标记名称	重复序列	正向/反向引物 (5'→3')	退火温度 (℃)
Le01	(CT) ₇	ACGCGTATCCTCCCCTAAGT/AAGCGATATGGATTTGACGC	60
Le02	(CGAC) ₆	GGCGCAAACAATTTCAGGTA/ATGCCATCGTAAGGAAC TCG	60
Le03	(CT) ₉	ATTGTGACTCGACCACCTCC/TCATAATGCATCCCGTGAGA	60
Le04	(AGGT) ₅	CCCAAAAAGGATTTTCAGCAA/AACCGGAGTGGTGTAAAGTGC	60
Le05	(TCA) ₆	CATGGGAGAGATTCCGAAAA/CGAGACCGACGACTTTGACT	60
Le06	(CTC) ₆	CATTGCTCGGATCCTTCATT/TACCTCGTGCGGACTTTGAT	60

PCR 反应使用 Mycycler Thermal Cycler (Bio-Rad,USA) PCR 仪,反应体系为 20 μL,包括 2 μL 10×Reaction buffer (Promega, without Mg²⁺), 2 μL MgCl₂ (Promega, 25 mmol/L), 0.4 μL dNTP (10 mmol/L), 0.2 μL Taq 聚合酶 (5 U/μL, Promega 公司产品), 2 μL 模板 DNA (50 ng/μL), 正向和反向引物各 1 μL (10 μmol/L), 以及 11.4 μL ddH₂O。

PCR 扩增程序:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保存。

1.3 电泳

电泳仪型号为 DYY-12(北京六一仪器厂),电

泳槽型号为 DYCZ-20E(北京六一仪器厂),玻璃胶板尺寸为 48 cm×32 cm,采用体积浓度为 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增片段,采用稳压为 1 000 V,电泳时间为 50 min。DNA Marker 为 DL500 (TaKaRa 公司,日本)。

1.4 样品的变性处理

在电泳前须将 PCR 扩增产物进行变性处理,具体方法为将扩增产物与点样缓冲液按照一定比例进行混合[100 mL 点样缓冲液的配制方法为溴酚蓝和二甲苯青各 0.025 g,与 98 mL 甲酰胺和 2 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液混匀]。采用 95℃高温处理打开 DNA 双链,之后迅速置于冰上冷却,使 DNA 保持单链状态。

1.5 银染及显色

试验采用银染及强碱法显色,具体流程为(1)电泳结束后切断电源,取下胶板,将附着凝胶的玻璃板放入装有去离子水的塑料盘中,快速用去离子水漂洗 1 次。(2)银染:将胶板放入 1 000 mL 质量浓度为 0.1% 的 AgNO₃ 银染液中浸泡适当时间,之后用去离子水漂洗 1 次。(3)显色:将银染后的胶板放入 1 000 mL 的显色液(质量浓度为 1.6% 的无水 NaOH 和体积浓度为 0.5% 的甲醛)中进行显色。

1.6 正交试验设计

经反复实践,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳流程有 5 个操作节点需优化改良,其中 PCR 扩增产物的变性有 3 个节点,即点样缓冲液添加量、高温(95 ℃)处理时间、变性产物在冰上冷却时间;银染和显色过程中有 2 个节点,即银染时间和银染后胶板去离子水漂洗时间。因此,试验采用 L₁₆(4⁵)正交设计对上述 5 个节点进行优化改良,试验的因子设置为加样缓冲液与 PCR 反应液的体积比、95 ℃ 变性时间

(min)、变性产物冰上冷却时间(min)、银染时间(min)、银染后去离子水漂洗时间(s)。具体试验设计见表 3。

1.7 拍照统计与胶板质量评价

将银染显色后的玻璃胶板晾干后置于白炽灯箱上,对不同处理的胶板进行比较评价,使用数码相机拍照保存。

采用 3 个评价指标对各处理的胶板质量进行评价。3 个指标分别为胶板整体清晰度、胶板背景色、产物条带和 DNA marker 的清晰度,胶板整体清晰度可分为模糊、一般、清晰等 3 个等级;胶板背景色分为深、一般、浅 3 个等级;产物条带和 DNA marker 的清晰度分为 3 个等级,即模糊、一般、清晰。上述 3 个指标各等级依次赋予 1、2、3 分的得分,得分越高效果越好。评价以白炽灯箱为唯一背景光源,采用人眼观测投票打分的方式进行,参与测评共 34 人,以出现次数最多的得分为该处理胶板质量指标的最终评分。各处理的胶板质量评分情况见表 3。

表 3 正交试验设计表及胶板质量评分

试验处理	试验因素及水平					胶板质量得分(分)		
	缓冲液与反应液的体积比	95 ℃ 高温变性时间(min)	冰上冷却时间(min)	银染时间(min)	银染后漂洗时间(s)	胶板整体清晰度	胶板背景色	条带清晰度
1	1 : 3	2	5	2	0	1	2	1
2	1 : 3	5	10	7	5	3	1	2
3	1 : 3	8	15	12	10	3	2	3
4	1 : 3	11	20	17	15	3	3	3
5	1 : 2	2	10	12	15	3	1	3
6	1 : 2	5	5	17	10	3	1	3
7	1 : 2	8	20	2	5	1	2	2
8	1 : 2	11	15	7	0	3	1	3
9	1 : 1	2	15	17	5	3	3	3
10	1 : 1	5	20	12	0	3	1	2
11	1 : 1	8	5	7	15	2	2	1
12	1 : 1	11	10	2	10	1	3	1
13	2 : 1	2	20	7	10	2	2	2
14	2 : 1	5	15	2	15	1	3	1
15	2 : 1	8	10	17	0	3	1	3
16	2 : 1	11	5	12	5	2	2	2

2 结果与分析

2.1 正交试验各处理电泳及银染显色效果的比较

正交试验的极差分析结果可以阐明各因素不同水平对胶板质量的影响,同时也可以挖掘出重要的影响因子。表 4 中 *k* 表示表 3 中各因素同一水平

对应胶板质量评分的平均值。极差(*R*)是各水平的平均值中最大值与最小值的差值。极差大说明此因素的不同水平产生的评分差异较大,重要性也越高。由表 4 可知,对胶板整体清晰度指标而言,最重要的影响因子为银染时间,其极差为 2。胶板整体清晰度的平均值随着银染时间的增加呈增大趋势,

说明银染时间与胶板整体清晰度成正比。

胶板背景色评分的极差分析结果表明,银染时间越短,银染后漂洗的时间越长,胶板背景颜色越浅。扩增产物条带和 DNA marker 条带清晰度评分

的极差分析结果表明,银染时间和反应液与缓冲液的体积比对条带清晰度有较大影响,银染时间越长条带的清晰度越高;缓冲液与反应液的体积比为 1 : 2 时条带清晰度最好。

表 4 正交试验胶板质量评分的极差分析

因素	整体清晰度评分(分)					胶板背景色评分(分)					条带清晰度评分(分)				
	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>k</i> ₃	<i>k</i> ₄	<i>R</i>	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>k</i> ₃	<i>k</i> ₄	<i>R</i>	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>k</i> ₃	<i>k</i> ₄	<i>R</i>
缓冲液与反应液的体积比	2.50	2.50	2.25	2.00	0.50	2.00	1.25	2.25	2.00	1.00	2.25	2.75	1.75	2.00	1.00
95 ℃ 高温变性时间	2.25	2.50	2.25	2.25	0.25	2.00	1.50	1.75	2.25	0.75	2.25	2.00	2.25	2.25	0.25
冰上冷却时间	2.00	2.50	2.50	2.25	0.50	1.75	1.50	2.25	2.00	0.75	1.75	2.25	2.50	2.25	0.75
银染时间	1.00	2.50	2.75	3.00	2.00	2.50	1.50	1.50	2.00	1.00	1.25	2.00	2.50	3.00	1.75
银染后漂洗时间	2.50	2.25	2.25	2.25	0.25	1.25	2.00	2.00	2.25	1.00	2.25	2.25	2.25	2.00	0.25

2.2 正交试验各处理的时效性分析

正交试验中有 4 个涉及时效性的因素,其中高温(95 ℃)变性时间设置 2、5、8、11 min 等 4 个水平。试验结果表明,变性时间在 2 ~ 11 min 的范围内均可检测出目标条带,从提高试验效率以及节能降耗的角度考虑,变性时间设置为 2 ~ 5 min 较为合理。

冰上冷却时间设置 5、10、15、20 min 等 4 个水平,结果表明,冷却时间在 5 ~ 20 min 的范围内均可检测出目标条带,并没有出现随着时间的延长扩增产物复性现象(单链 DNA 变为双链状态)。在实际操作中,扩增产物的变性可在胶板预电泳(将胶板接通电源进行预热)之前进行,预电泳 10 ~ 15 min 后再进行上样有利于提高扩增产物在胶板中的整齐度,因此冰上冷却时间较为合适的选择为 15 ~ 20 min。

银染时间设置 2、7、12、17 min 等 4 个水平。正交分析的结果表明,银染时间与胶板的整体清晰度以及扩增条带的清晰度呈正比,但与胶板背景色成反比。比较银染时间各水平的胶板整体清晰度得分可以发现,2 min 处理的平均得分为 1.00 分,7 min 处理的平均得分为 2.50 分,12 min 处理的平均得分为 2.75 分,17 min 处理的平均得分为 3.00 分。综合胶板清晰度得分和时间成本,银染 7 min 较为合理。

银染后用去离子水漂洗时间设置 0、5、10、15 s 等 4 个水平,极差分析结果表明,银染后使用去离子水漂洗胶板可降低背景颜色深度。在实际操作中,没有经去离子水漂洗的胶板放入显色液中时,胶板表面残留的 AgNO₃ 在显色液中会产生大量黑色沉淀物,其附着在胶板上使胶片背景色加深。同

时较多的黑色沉淀物也会影响显色液的使用效率(1 d 内进行多次银染时,显色液可重复使用)。而用去离子水漂洗时间过久(超过 15 s),容易导致胶体在强碱显色液中从玻璃板上脱落,致使整个试验失败。综合考虑,银染后用去离子水浸泡胶板 5 ~ 10 s 效果较好。

综上所述,95 ℃ 变性 2 ~ 5 min,置于冰上冷却 15 ~ 20 min,银染 7 min,银染后胶板用去离子水洗 5 ~ 10 s,是试验的较优处理组合。

3 结论与讨论

SSR 标记稳定性好、多态性高且广泛分布于基因组,目前已应用于遗传多样性分析、连锁图谱构建以及分子标记辅助育种等研究^[11]。食用菌中 SSR 标记的应用较晚,肖扬等最早在香菇上建立了 SSR - PCR 技术体系,并对种质资源进行了遗传多样性分析,该研究采用琼脂糖凝胶电泳法检测了 SSR 标记的扩增产物^[7]。由于 SSR 标记的扩增产物分子量小,常规的琼脂糖电泳并不能完全检测出 SSR 标记的多态性,大规模应用 SSR 标记仍需使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测。

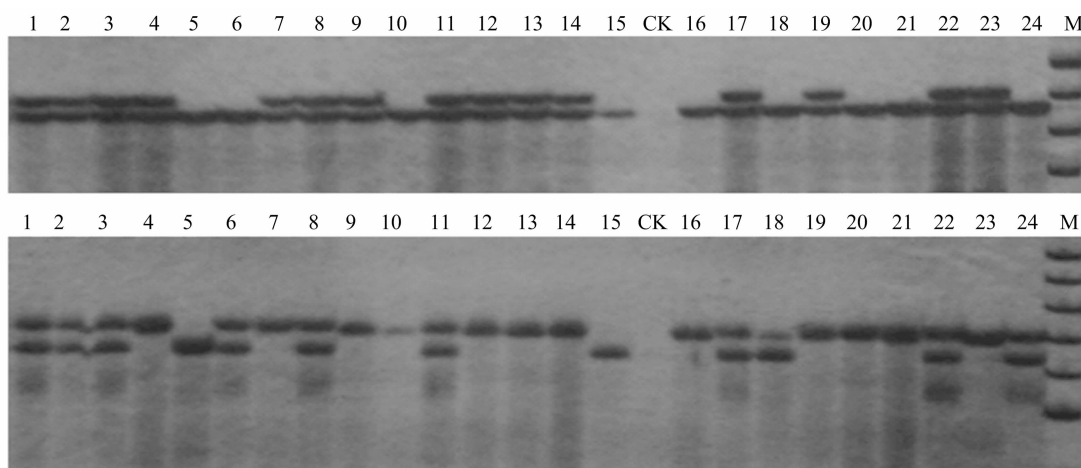
关于聚丙烯酰胺凝胶电泳及其染色方法的应用及改良在动植物中有较多报道,曲鲁江等比较了鸡基因组中 SSR - PCR 产物的变性与非变性聚丙烯酰胺 - 银染检测方法,发现变性聚丙烯酰胺凝胶及银染方法检测的条带较清晰、易于鉴定^[4]。李建武等通过对不同染色方法的比较,在马铃薯上建立了 SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶的快速银染方法^[12]。王爱听等在玉米上对变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行比较,认为卫星扩增产物在二者上的电泳结果存在差异^[13]。在变性

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。李立群等在小麦上对 SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行了改进,提高了大规模 SSR 分子标记分析的工作效率^[14]。王伟等对玉米 SSR 标记检测体系进行了优化,检测了贵州 51 份玉米杂交种的遗传多样性,并建立了玉米 SSR 标记技术操作规程^[15]。

本研究在参考动植物中前人研究的基础上,建立香菇 SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶检测流程,同时结合香菇 SSR-PCR 产物检测的自身特点,采用正交试验对检测流程中涉及的加样缓冲液与 PCR 反应液的体积比、95 °C 变性时间、置于冰上冷却时

间、银染时间、银染后胶板去离子水洗时间等 5 个操作节点进行优化,结果表明,加样缓冲液与 PCR 反应液的体积比为 1:2,95 °C 变性时间 2~5 min,置于冰上冷却 15~20 min,银染 7 min,银染后胶板用去离子水洗 5~10 s,是正交试验的较优处理组合。

利用改良后的香菇 SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳操作流程,笔者进一步选取 6 对 SSR 标记引物检测了 24 份常用香菇菌种的扩增产物。结果表明,该流程可以高效地检测出香菇基因组的 SSR 标记(图 1),可应用于香菇遗传研究领域。优化后的操作流程可为其他大型真菌 SSR 标记的应用提供参考。



CK 为空白对照, M 为 DNA marker; 1~24 为 24 份香菇材料

图1 24 份香菇菌种的部分 SSR 标记电泳

参考文献:

- [1] 洪彦彬,梁炫强,陈小平,等. 花生栽培种 SSR 遗传图谱的构建[J]. 作物学报,2009,35(3):395-402.
- [2] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(1):20-27.
- [3] 邢 冰,董诚明,魏 硕,等. 怀菊转录组中 SSR 位点信息分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):57-60.
- [4] 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.
- [5] 张春雷,佟广香,匡友谊,等. 微卫星产物变性与非变性 PAGE-银染方法比较[J]. 水产学杂志,2010,23(1):11-14.
- [6] 巫 萍,章炉军,张 丹,等. 利用 SSR 标记鉴定香菇单核体及杂交后代[J]. 微生物学通报,2016,43(2):444-455.
- [7] 肖 扬,李 黎,吴 茜,等. 香菇 SSR-PCR 技术体系的优化及其在遗传多样性分析中的初步应用[J]. 中国农学通报,2009,25(2):20-24.

- [8] 叶 翔,黄晨阳,陈 强,等. 中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(6):1067-1072.
- [9] 张 丹,巫 萍,章炉军,等. 基于香菇全基因组序列开发的部分 SSR 标记多态性分析与品种鉴定初探[J]. 食用菌学报,2012,19(4):1-10.
- [10] Kuhad R C, Kapoor R K, Lal R. Improving the yield and quality of DNA isolated from white-rot fungi[J]. Folia Microbiologica, 2004,49(2):112-116.
- [11] 杨亚桐,董安忆,刘松涛,等. 基于 SSR 分子标记的糯玉米遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):83-86.
- [12] 李建武,李 宁. SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶快速银染方法的建立[J]. 中国马铃薯,2015,29(3):136-140.
- [13] 王爱听,李永生,穆延召,等. 玉米微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染法的比较分析[J]. 玉米科学,2013,21(3):48-51.
- [14] 李立群,王 培,王小利,等. SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法改进[J]. 安徽农业科学,2012,40(34):16541-16544.
- [15] 王 伟,杨文鹏,关 琦,等. 玉米 SSR 分子标记技术操作规程的优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(11):4459-4464,4493.