

大白菜非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的优化

梁宝萍¹, 原玉香², 朴凤植¹, 张晓伟^{2*}, 蒋武生², 梁爽³,
姚秋菊², 张强², 赵艳艳²

(1. 河南农业大学 园艺学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450008;
3. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450000)

摘要: 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的检测效果受到凝胶聚合速度、片段迁移率等多种因素影响。以大白菜为供试材料, 研究比较了凝胶聚合速度及 PCR 产物在不同浓度凝胶上的检测效果。不同浓度的凝胶是由 2 种 [40% (19 : 1) 和 30% (29 : 1)] 贮存液分别配制的 4 种浓度 (5%, 7%, 9%, 11%)。结果表明, 在 4~30 °C, 凝胶聚合速度随温度的升高而加快; APS 保持不变, 不同温度下 TEMED : APS 合适配比也不同; 4 °C (冬季) 时, TEMED/APS 的合适配比是 1 : 10, 25 °C (春秋)、30 °C (夏季), 选择 1 : 20 的配比为宜; 2 种不同贮存液配制的相同浓度凝胶检测效果不同, 30% (29 : 1) 优于 40% (19 : 1), 由前者配制 7% 的凝胶上 DNA 片段分离效果好, 带型清晰, 分辨率高。

关键词: 非变性聚丙烯酰胺; 聚合速度; 贮存液; TEMED 与 APS 配比

中图分类号: Q784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0129-04

The Optimization of Technique of Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE)

LIANG Bao-ping¹, YUAN Yu-xiang², PIAO Feng-zhi¹, ZHANG Xiao-wei^{2*}, JIANG Wu-sheng²,
LIANG Shuang³, YAO Qiu-ju², ZHANG Qiang², ZHAO Yan-yan²

(1. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Institute of Horticulture of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, 450008, China;
3. Department of Biology Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Many factors including gel's polymerization rate and fragments' migration ratio affect detection effect of native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE). The gel's polymerization rate and the detection effect of PCR products by two kinds of gel stock solution (40% Acr-Bis (19 : 1) and 30% Acr-Bis (29 : 1) prepared in four concentrations (5%, 7%, 9%, 11%) were studied in this paper. The results showed that the gel's polymerization rate accelerated with increasing temperature in the range of 4—30 °C, APS remains the same at different temperatures and TEMED : APS suitable ratio was different: at 4 °C (winter), the ratio was 1 : 10, at 25 °C or 30 °C (spring and Autumn) (summer), the ratio of 1 : 20 was better. Detection of the effect was different in gel by two different stock solution prepared same gel concentrations; 30% Acr-Bis (29 : 1) is better than 40% Acr-Bis (19 : 1), and DNA fragment separation revealed clear band type, high resolution in the gel that was prepared using 7% stock solution.

Key words: Native-PAGE; the polymerization rate; storage solution; TEMED and APS ratio

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 河南省创新杰出人才计划 (094200510016); 国家大宗蔬菜产业技术体系 (CARS-25-G-27)

作者简介: 梁宝萍 (1987-), 女, 青海互助县人, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子遗传育种。E-mail: liangbaoping888@163.com

* 通讯作者: 张晓伟 (1965-), 男, 河南平舆人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜生物技术及遗传育种研究。

E-mail: xiaowei5737@163.com

PCR 扩增产物检测通常采用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 种检测体系^[1]。琼脂糖凝胶电泳与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比快速简单,但分辨率不是很高;后者比前者分辨率高,能检测出较多的条带,且通量高,可以对大批量样品检测,所需样品量少^[2]。另外,聚丙烯酰胺凝胶电泳还使操作者远离 EB 的污染^[3]。常用的聚丙烯酰胺凝胶有 2 种,一种是变性聚丙烯酰胺凝胶,另外一种是非变性聚丙烯酰胺凝胶,前者用于分离和纯化单链 DNA 片段,后者用于分离和纯化双链 DNA 片段。但非变性聚丙烯酰胺凝胶更具有制胶简便快捷、点样迅速、电泳条带整齐、易判读等优点,因此在具体实践中更高效可行^[4]。

但是,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在制胶的过程中也存在一些问题,很少有人对制胶方法提出改进^[5]。主要的问题是:第一,由于凝胶浓度不合适造成 DNA 片段不通过,即使通过但条带不分离或者分离效果不好,影响试验结果准确度;第二,若凝胶速度太快,则灌胶时胶已凝固;若凝胶速度太慢,则易漏胶,再补胶时由于胶浓度前后不一致,造成凝胶浓度不均匀,不仅影响凝胶结果美观度,而且影响点样和试验结果的准确性。

本试验旨在筛选检测效果较佳的凝胶浓度和有效控制凝胶聚合的速度。目前大多学者采用 40% (19:1) 和 30% (29:1) 的贮存液。据此采用 40% (19:1) 凝胶贮存液和 30% (29:1) 凝胶贮存液配制 5%、7%、9%、11% 的凝胶,根据凝胶聚合构成因素(温度,TEMED:APS),改变温度和 TEMED:APS 比例,测定凝胶聚合速度;PCR 扩增产物分别在 5%、7%、9%、11% [40% (19:1) 和 30% (29:1)] 的凝胶上检测,筛选出可使 DNA 片段充分分离,易判读的凝胶浓度。以此对制胶方法提出改进措施,为提高聚丙烯酰胺凝胶检测效果提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选取农艺性状差异较大的 6 份不同来源的大白菜 DH 系材料,代号分别为:58-10(a),63-5(b),66-83(c),R16-11(d),Y152-3(p1),Y231-330(p2)。上述材料由河南省农业科学院园艺研究所提供,所有试验均在河南省农科院园艺所分子生物学实验室进行。

1.2 DNA 提取方法

基因组 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法^[6],利用 1% 的琼脂糖检测其质量和均匀度,保存于

-20℃ 冰箱中备用。

1.3 PCR 扩增体系和条件

PCR 体系为 20 μ L,其中 dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L,上下游引物为 0.25 μ mol/L,模板 DNA 5 μ L (10 ng/ μ L), ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 扩增程序参数为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min,4℃ 下保存产物。

1.4 凝胶聚合速度比较

设置 2 种不同配比的凝胶贮存液分别为 40% (19:1) (100 mL H₂O 中 38g 丙烯酰胺和 2 g N,N-甲叉双丙烯酰胺) 和 30% (29:1) (100 mL H₂O 中 29 g 丙烯酰胺和 1 g N,N-甲叉双丙烯酰胺)。用秒表分别计时测定由上述 2 种贮存液配制的 5%、7%、9%、11% 工作液的凝胶聚合时间,凝胶配制方法见表 1。测定时根据季节的变化,温度利用冰箱和恒温箱设置成 4℃ (冬)、25℃ (春秋)、30℃ (夏) 3 个水平。40% (19:1) 的各工作液中设置 2 个水平的 TEMED 和 APS (10%) 配比,分别是 1:10, 1:20 (APS 量不变);30% (29:1) 设置 3 个水平的 TEMED 和 APS (10%) 配比,分别为 1:5, 1:10 和 1:20。对凝胶浓度、温度、TEMED 与 APS 配比 3 个因素设置正交试验。

表 1 40% (19:1) 与 30% (29:1) 贮存液配制各浓度工作液的配制方法

贮存液浓度	凝胶浓度/%	ddH ₂ O/ mL	10 \times TBE/ mL	贮存液 体积/mL	总体 积/mL
40% (19:1)	5	47.5	6	7.7	60
	7	43.5	6	10.5	60
	9	40.5	6	13.5	60
	11	37.5	6	16.5	60
30% (29:1)	5	44	6	10	60
	7	40	6	14	60
	9	36	6	18	60
	11	32	6	22	60

1.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用北京六一仪器厂生产的 DY CZ-30 型双板夹心式垂直电泳槽电泳。采用 40% (19:1) 与 30% (29:1) 贮存液配制不同浓度的工作液,各工作液中依次加入 TEMED 60 μ L, APS (10%) 600 μ L,混匀后立即灌胶,插上梳子,待胶完全聚合(约 40 min)后,在电泳槽中各加入适量 0.5 \times TBE 电泳缓冲液,小心拔出梳子,迅速用电泳缓冲液把上样孔中的气泡驱逐干净,然后取 1 μ L PCR 扩增产物与 2 μ L 6 \times Loading Buffer 混匀后上样,室温,200 V 恒压电泳。由于不同浓度的凝胶筛孔大小不同,DNA 片段迁移

速度不同,电泳时间也不同,5%、7%、9%、11%凝胶电泳的时间分别是45 min,60 min,90 min,120 min。电泳结束后用银染法染色^[7],然后用数码相机对凝胶进行拍照。

2 结果与分析

2.1 温度对凝胶聚合速度的影响

从表2可以看出,由贮存液30%(29:1)、40%(19:1)配制的同一浓度的凝胶在不同温度下凝胶聚合速度存在一定的变化规律,随着温度的升高,凝胶聚合所需的时间越短,即凝胶聚合速度随温度的升高而加快。以30%(29:1)贮存液配制的5%的凝胶为例,在4℃、25℃、30℃时,凝胶聚合时间分别是12.4 min、8.6 min、6.7 min,时间相差较大,因此,温度的高低很大程度上影响凝胶的聚合时间。40%(19:1)与30%(29:1)的凝胶变化规律相一致。

表2 不同温度对凝胶聚合时间的影响 min

凝胶浓度/%	30%(29:1)			40%(19:1)		
	4℃	25℃	30℃	4℃	25℃	30℃
5	12.4	8.6	6.7	8.5	3.8	3.0
7	11.5	7.5	5.0	8.0	3	2.6
9	10.3	6.5	4.2	7.5	2.6	2.3
11	9.5	5.5	3.5	7.0	2.5	2.0

注:TEMED与APS的配比是1:10(APS不变)。

2.2 TEMED与APS比对凝胶聚合时间的影响

APS是催化剂,TEMED是加速剂,在工作液中加入不同比例的TEMED和APS凝胶聚合时间不同(表3)。从表3可以看出,在不同温度和凝胶浓度下,TEMED与APS的配比是1:5时,凝胶聚合时间之间相差不大,都在2 min左右。在25℃时,以30%(29:1)贮存液配制的7%的工作液为例,当TEMED与APS的配比是1:10和1:20时,凝胶聚合时间分别是7.5 min,13.5 min,且后者聚合所需时间明显比前者长。同一温度下,其他工作液中加入1:10和1:20的TEMED和APS配比时,凝胶聚合时间与25℃下30%(29:1)贮存液配制的7%凝胶聚合时间变化规律一致。

有效控制凝胶聚合速度对非变性聚丙烯酰胺凝胶技术有重要意义,大部分初学者来说,由于季节的变化,对很难在不同温度下快速做出高质量的凝胶。经过此次试验,由表3显示,4℃(冬)时TEMED与APS的比例为1:10较宜,在25℃(春秋),30℃(夏)时可以采用1:20的比例。根据季节的变化,室内温度也随之变化,在冬季凝胶速度慢,相反夏季凝胶聚合速度较快。由于不同实验室存在条件差异,所用的TEMED和APS比例可以略做调整。

表3 不同TEMED和APS配比时凝胶聚合的时间 min

TEMED/APS	浓度/%	凝胶聚合的时间 min		
		4℃	25℃	30℃
1:5	5	3.0	2.6	2.5
	7	2.2	2.1	2.2
	9	2.0	2.0	1.8
	11	1.9	1.8	1.5
1:10	5	12.4	8.6	6.7
	7	11.5	7.5	5.0
	9	10.3	6.5	4.2
	11	7.5	5.5	2.0
1:20	5	25.0	15.3	12.3
	7	24.0	13.7	10.8
	9	22.7	13.3	7.8
	11	21.5	12.3	6.3

注:贮存液浓度是30%(29:1),TEMED变,APS不变。

2.3 PCR扩增产物结果检测

选取农艺性状差异较大的4份不同来源的大白菜DH系,代号分别是58-10(a),63-5(b),66-83(c)和R16-11(d),进行PCR扩增。PCR扩增产物经2%琼脂糖电泳检测(图1),从琼脂糖电泳检测的结果可以看出,PCR扩增产物带型单一,具有多态性。

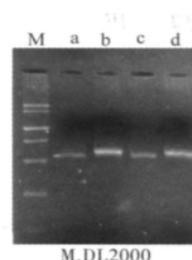
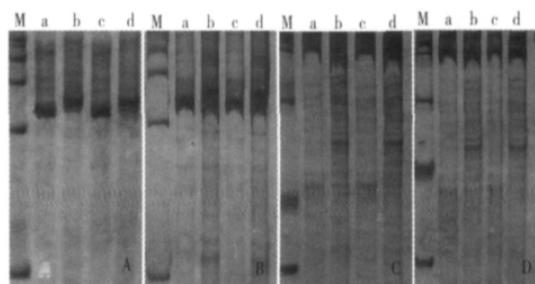


图1 琼脂糖电泳检测结果

2.4 40%(19:1)与30%(29:1)各浓度凝胶检测结果的比较

将上述PCR产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶检测,凝胶浓度为5%、7%、9%、11%,分别由40%(19:1)(图2)和30%(29:1)(图3)贮存液配制。从图2可以看出,只有5%的凝胶上DNA片段带型整齐,分离程度较强,易于分辨。从图3可以看出,各浓度凝胶上的DNA片段带型整齐,但是5%和7%凝胶



A-D. 非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度分别是5%、7%、9%、11%;M. DL2000

图2 40%(19:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

上的条带不仅整齐,而且分离程度较好,易于分辨,可以有效地进行品种间差异鉴定。虽然由 30%(29:1)和 40%(19:1)贮存液配制的 5%的凝胶上条带很清晰,但胶太软,在染色时难于操作,所以选择浓度为 7%(29:1)聚丙烯酰胺凝胶最为合适。

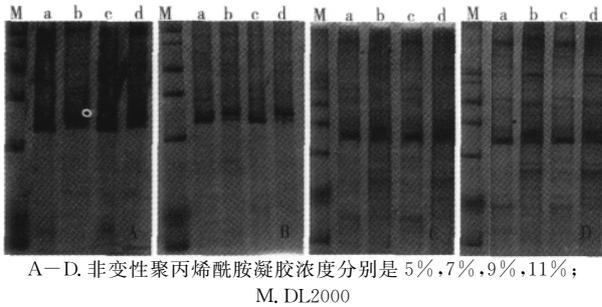


图 3 30%(29:1)贮存液配制的 7%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

2.5 30%(29:1)贮存液配制的 7%聚丙烯酰胺凝胶的应用

为检验 30%(29:1)贮存液配制的 7%聚丙烯酰胺凝胶的应用效果,以 Y152-3(p1),Y231-330(p2)基因组 DNA 为试材,进行 SSR 扩增。将 SSR 扩增产物在由 30%(29:1)贮存液配制的 7%凝胶上检测(图 4)。从图中看出条带清晰,带型准确,结果可靠,分离度强。此种浓度的凝胶筛孔大小合适,节省电泳时间,DNA 片段范围在 100~600 bp 时都能得到清晰的条带,带型特征亦明显。

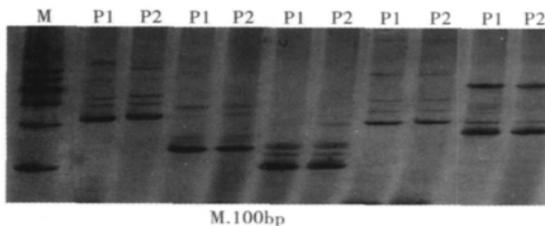


图 4 30%(29:1)贮存液配制的 7%聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

3 结论与讨论

理想的电泳分离技术应具备分离性能强、图谱分辨率高、重复性好、操作简便快捷等特征^[8]。其中,凝胶贮存液配比浓度、工作浓度以及 TEMED/APS 的比例等制胶技术是影响凝胶聚合速度和分辨率的关键因素,同时还受温度的影响。本试验通过研究凝胶聚合时间和凝胶浓度等,从而提高了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的试验效率。

在温度和 TEMED/APS 配比对凝胶聚合速度研究方面,以往报道很少,张明等^[3]研究认为,凝胶聚合速度随温度的升高而加快,本研究的结果与其保持

一致。TEMED/APS 配比是决定聚合速度的主要内在因素之一,本试验综合研究了凝胶聚合所需的温度和 TEMED:APS 这 2 个因素,结果表明,在 4℃(冬)选择 TEMED/APS 的配比是 1:10,25℃(春秋)、30℃(夏)选择 1:20 的配比,有利于灌胶。但张明等的研究表明,20~25℃下 TEMED/APS 配比是 1:10 较宜^[3]。造成结果差异的原因是凝胶浓度不一致所致,在他的研究中凝胶贮存液的浓度是 40%(19:1)。根据实验室温度适当调整 TEMED 和 APS 的比例从而来调整凝胶聚合速度。一般凝胶聚合的有利时间是 10 min 左右。此外,未凝固的胶在灌制过程中不断搅拌,会有效减慢凝胶聚合速度,有利于灌胶。凝胶聚合的速度快与慢直接影响试验进度和工作效率。凝胶聚合速度过慢,聚合反应时间过长,漏胶很难避免,会造成梳齿不齐,操作较难掌握,影响点样,致使检测结果不佳;凝胶速度过快,聚合反应时间太短,胶还没灌完已凝固,或者来不及插梳子胶已凝固,造成无法点样。

不同浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶对相同 PCR 产物进行电泳产生不同的检测效果,这是因为凝胶的性能,尤其是分子筛效应,决定了电泳分离性能和图谱分辨率^[9]。浓度高分子筛孔小,反之亦然。在非变性聚丙烯酰胺凝胶检测效果研究中,对丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺(Acr:Bis)不同配比(19:1 和 29:1)的报道很少,本研究比较了 30%(29:1)和 40%(19:1)2 种配比的贮存液,结果表明,前者检测效果优于后者。此外,2 种贮存液配制的 5%凝胶上虽凝胶条带分离度强,分辨率高,但凝胶较软,银染检测时胶易碎,影响试验结果。30%(29:1)配制的 7%浓度的凝胶上不仅条带分离程度强,分辨率高,而且凝胶容易掌握,省时,此浓度最为合适。艾鹏飞等^[4]和吉家敏等^[10]对 SSR 标记非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件的优化研究中采用 30%(29:1)配制的 6%的凝胶检测得到理想的效果,与本研究结果相似。

参考文献:

- [1] 司军,李成琼,宋洪元,等.甘蓝 SSR-PCR 技术体系的优化[J].西南师范大学学报,2009,34(3):166-169.
- [2] 宋显军,谢甫锦,张伟,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.
- [3] 张明,李延龙,乔保建,等.PAGE 技术对韭菜 ISSR-PCR 产物指纹检测效果的影响[J].生物学通报,2011,45(1):46-48.
- [4] 艾鹏飞,放闪闪,吴学敏,等.仁用杏微卫星非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳体系的优化[J].安徽农业科学,2011,39(1):63-65.

(下转第 136 页)

生长最慢。山桐子属于速生油料树种,1年生苗木苗高可达 100 cm 以上,开发潜力大。元坝、朝天位于四川北部,采自这 2 个地方的山桐子均能在浙江生长,且长势较好,这给山桐子异地引种和资源保存提供了很大的空间。目前山桐子多采用种子繁殖,由于山桐子自然种子繁殖能力低,所以可行的无性繁殖将是繁育山桐子的主要手段。本试验结果表明,其他各省份的山桐子苗木亦能在浙江省富阳市正常生长,本课题组对山桐子良种选育工作已做过一些相关研究,下一步将通过嫁接或扦插的方式来加快繁育进程,这也是推进山桐子育种进程的重要手段。

12 个产地间山桐子苗木苗高生长差异达到显著水平,而区组间苗高、产地间和区组间地径生长差异均未达到显著水平。综合分析得出,山桐子苗木生长量在各产地间存在着较大的差异。由此表明,山桐子的生长习性与其他植物一样,受环境因素影响较大。根据各个产地山桐子苗木在富阳地区生长情况的差异性分析结果,下一步将对这些苗木在多省进行多点示范栽植,为地区选育合适物种提供理论参考和实践依据。山桐子是一种优良的木本油料植物,具有可再生性,耐旱、耐贫瘠,适合山地和丘陵地区生长,可在荒山荒地栽培,不与粮食争土地,具有一次种植,多年受益的特点^[6-7]。同时山桐子又是一种“环境”资源,它除了提供能源外,还具有绿化荒山,防止水土流失,改善生态环境和农林牧生产条件,维护生态平衡等作用。此外,它还可以增加农民收入,促进区域经济发展,可以在缓解能源压力、稳

定经济发展方面发挥积极作用^[8-11]。因此,有必要进一步对山桐子苗木生长性状及规律进行深入研究,以加快山桐子良种选育及育种进程。

参考文献:

- [1] 刘根林,梁珍海,蒋泽平. 山桐子研究综述[J]. 江苏林业科技,2005,32(5):46-49.
 - [2] 李秀全,徐有明. 我国主要木本油料树种资源开发与林业生物能源林建设的探讨[J]. 生物质化学工程,2006(1):229-234.
 - [3] 李大伟,龚榜初,白杰健,等. 山桐子自然群体表型遗传多样性研究[J]. 湖南农业科学,2010(11):7-9,10.
 - [4] 祝志勇,王强,阮晓,等. 不同地理居群山桐子的果实含油率与脂肪酸含量[J]. 林业科学,2010,46(5):176-180.
 - [5] 陈福民. 山桐子脂肪酸提取与成分分析[D]. 陕西:陕西师范大学,2009.
 - [6] 王金锡,吴宗兴. 山桐子开发与利用研究[J]. 四川林业科技,2010,31(1):26-29.
 - [7] 张小平,邓东周,鄢武先,等. 山桐子作为木本油料资源的开发潜力[J]. 四川林业科技,2011,32(2):80-83.
 - [8] 莫开林,张正香,罗小龙,等. 山桐子油的开发利用[J]. 粮油食品科技,2009,17(6):23-25.
 - [9] 吴志文,谢双喜,刘青. 山桐子的研究进展及应用前景[J]. 贵州农业科学,2010,38(1):161-164.
 - [10] 戴国富,谢世友,万腾,等. 山桐子开发利用前景与展望[J]. 重庆三峡学院学报,2011,27(3):105-109.
 - [11] 齐孝连,潘祖全. 山桐子的综合利用价值及育苗造林技术[J]. 现代农业科技,2010(21):247.
-
- (上接第 132 页)
- [5] 韩启霞. AFLP 技术的及在三倍体银鲫 DNA 指纹图谱的应用[J]. 水产学杂志,2010,23(3):16-20.
 - [6] 曲世松,刘宪华,黄宝勇,等. CTAB 法提取大蒜、白菜基因组 DNA[J]. 山东农业大学学报,2000,31(4):427-429.
 - [7] 牛楠. 高粱微卫星两种 PAGE 银染方法的比较[J]. 沈阳师范大学学报,2010,28(2):259-261.
 - [8] 赵爽,潘秋丽,姜公凌霞. PCR-SSCP 的效果分析[J]. 生物技术通报,2010(4):132-134.
 - [9] 邵锦震. 大麦醇溶蛋白酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件的探索[J]. 湖北师范学院学报,2004,24(4):22-26.
 - [10] 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,2009,16(6):34-36.