

柑橘 SSR 分子标记操作方法

余慧文, 程运江, 徐强, 邓秀新*

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: xxdeng@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 余慧文, 程运江, 徐强, 邓秀新. (2018). 柑橘 SSR 分子标记操作方法. *Bio-101* e1010214.
Doi: 10.21769/BioProtoc.1010214.

实验原理: 聚丙烯酰胺凝胶具有分子筛效应, 且分辨率极高。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 可以区分所扩增 SSR 片段间的差异, 通过银染显色可以确认核酸中特异 SSR 的多态性。

实验目的: 分析柑橘中 SSR 位点的多态性。

关键词: 柑橘, SSR 分子标记, PAGE, 银染

材料与试剂

1. 丙烯酰胺
2. N,N-甲叉双丙烯酰胺
3. 脲
4. Tris-Base
5. 硼酸
6. EDTA (乙二胺四乙酸二钠)
7. 过硫酸铵(APS)
8. TEMED (四甲基乙二胺)
9. 冰醋酸
10. 95%乙醇
11. 反硅化剂 (3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate) (4 °C 保存)
12. 硅化剂 (Acryl-Glide)
13. 硝酸银
14. 无水碳酸钠

15. 氢氧化钠
16. 甲醛溶液
17. 二甲苯青
18. 溴酚蓝
19. 甲酰胺
20. 用于检测的 PCR 产物
21. 5x TBE (见溶液配方)
22. 丙烯酰胺母液 (见溶液配方)
23. 10% APS (见溶液配方)
24. 反硅化液 (见溶液配方)
25. 银染液 (见溶液配方)
26. 显色液 (见溶液配方)
27. 上样缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 电泳仪
2. 制胶用的长、短玻璃板，塑料边条
3. 电泳梳子
4. 涡旋仪
5. 移液器
6. 燕尾夹
7. PCR 仪

实验步骤

1. 用自来水将长、短玻璃板分别洗干净，晾干水分后，用纸巾沾取 95%乙醇擦洗两遍，在长玻璃板上均匀涂抹约 1.5 ml 的反硅化液，在短玻璃板上均匀涂抹 4-5 滴的硅化剂，晾干后使用。

注：清洗长、短玻璃板使用不同的清洁棉，以免影响硅化液与反硅化剂的效果；涂抹短玻璃板时因反硅化剂量较少，可先用 95%乙醇湿润纸巾后涂抹。

2. 将塑料边条洗净后放置于长玻璃板两侧边缘，然后将短玻璃板小心扣于长玻璃板上，对齐后使用 3 对燕尾夹将玻璃板固定，对称地夹在放有塑料边条处。
3. 取 50 ml 丙烯酰胺凝胶母液，加入 250 μ l 10%的 APS 和 25 μ l TEMED，混匀后配成工作液。
4. 将工作液倒入长、短玻璃板中间的隔缝里，然后将梳子平滑的一面插入短玻璃板的凹槽处，聚合 1-1.5 h 后即可进行电泳。
注：此步骤操作时容易产生气泡，应均匀倒工作液，如果产生气泡须及时除去。
5. 小心取出梳子，将梳子清洗干净备用，同时将玻璃板外部及短玻璃板凹槽处的碎胶清洗干净，也可用滤纸进行清除。
6. 上、下电泳槽分别加入约 500 ml 和 400 ml 的 0.5 倍 TBE 电泳液，以 80 W 的功率预电泳 20-30 min，用 1 ml 移液器将点样槽中的杂质冲洗掉，插上梳子。
7. 预电泳时可将 PCR 产物进行变性处理，即在产物中加入上样缓冲液（一般 10 μ l 产物中加入 5 μ l 的上样缓冲液），95°C 变性 5 min 后冰浴 3-5 min，上样量为 3.0-3.5 μ l，以 80 W 的功率电泳约 1 h，即二甲苯青示踪条带距底部 1/4 处即可停止电泳。
注：变性后的产物不能存放太久，上样前再进行变性。
8. 分离两块玻璃板，用双蒸水漂洗长玻璃板 1 次，取出后稍沥水，置于银染液中 10-12 min。
9. 从银染液中取出玻璃板，在双蒸水中迅速漂洗一遍（不超过 10 s），取出后置于显色液中，直至条带清晰，取出后用双蒸水漂洗 1-2 min。
10. 晾干玻璃板，拍照保存后读取条带进行相应分析（如图 1）。

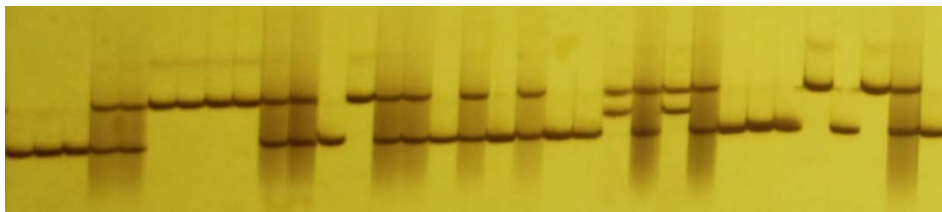


图 1. 柑橘中 SSR 的 PAGE 结果示例

溶液配方

1. 5x TBE

	Tris-Base	108 g	
	硼酸	55 g	
	0.5 M-EDTA(pH 8.0-8.5)	40 ml	
	ddH ₂ O	to 2 L	
2.	丙烯酰胺母液(过滤后于 4°C 保存)		
	丙烯酰胺	114 g	
	N,N-甲叉双丙烯酰胺	6 g	
	脲	840 g	
	5x TBE	200 ml	
	ddH ₂ O	to 2 L	
3.	10% APS(4°C 保存, 可使用一周)		
	过硫酸铵	1 g	
	ddH ₂ O	to 10 ml	
4.	反硅化液		
	0.5%冰醋酸+95%乙醇		1.5 ml
	反硅化剂(3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate)		3.5 μl
5.	银染液		
	硝酸银	3 g	
	ddH ₂ O	2 L	
6.	显色液(使用不超过 6 次)		
	无水碳酸钠	1 g	
	氢氧化钠	33.3 g	
	甲醛溶液	10 ml	
	ddH ₂ O	to 2 L	
7.	上样缓冲液		
	二甲苯青	0.1 g	
	溴酚蓝	0.1 g	
	0.5 M-EDTA (pH 8.0-8.5)	1 ml	
	甲酰胺	100 ml	