

农作物种子检测中常用电泳方法的比较分析

郑戈文

(山西省农业种子总站,太原 030006)

摘要:种子质量是农业生产的重要因素,质量检测是其中的关键环节,随着种子检测技术的发展,电泳方法越来越多地应用到种子质量检测中。目前在农作物种子质量检测中常用的电泳方法有4种,不同电泳方法的要求和适合的检测项目不同,针对各种电泳方法的优缺点,讨论其适用范围,从而为农作物种子质量检测技术平台提供参考。

关键词:农作物种子检测;电泳方法;比较分析

种子是农业生产的基本资料,种子质量的优劣关系到国计民生,种子质量检测是把好种子质量关的重要手段。随着检测技术的不断发展,电泳技术在种子质量检测中发挥着越来越大的作用。电泳是指在电场作用下,带电颗粒向与其电性相反电极移动的现象。电泳技术是利用带电颗粒在电场作用下移动速度不同而实现分离的技术。在农作物种子质量检测中常会用到4种不同的电泳方法:琼脂糖凝胶电泳、小板聚丙烯酰胺凝胶电泳、大板聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳。不同的电泳方法适合不同的检测项目,各方法对实验仪器、检测技术水平、实验室条件和操作人员的要求也不同。

1 四种不同的电泳方法

1.1 琼脂糖凝胶电泳 琼脂糖凝胶电泳是分子检测中常用的检测方法,不同浓度的琼脂糖凝胶(0.3%~1.5%)可以将200bp~50kb的DNA片段分离。当用溴化乙啶(EB,荧光嵌入染料)染色,通过凝胶成像系统,能观察到发出荧光的DNA条带,确定DNA片段在凝胶中的位置及质量,或与参照DNA比较,判定被检基因的有无。琼脂糖凝胶电泳可以检出1~10ng的DNA的存在^[1]。通常实验室多用电泳仪和水平槽装置进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2 小板聚丙烯酰胺凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶为支持物的一种电泳。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺和交联剂N,N'-甲叉双丙烯酰胺(简称Bis)聚合成三维网状结构的凝胶。由于电荷效应和分子筛效应,聚丙烯酰胺凝胶电泳可以将分子大小相同而带不同数量电荷或者带相同数量电荷而分子大小不同的蛋白质、酶或者

DNA片段分离开^[2]。小板聚丙烯酰胺凝胶通常用电泳仪和小板电泳槽进行电泳。

1.3 大板聚丙烯酰胺凝胶电泳 大板聚丙烯酰胺凝胶电泳原理同小板聚丙烯酰胺凝胶电泳,只是单体和交联剂的比例不同,形成大小不同的立体网状结构,胶更薄、移动距离长,能将小片段DNA(5~500bp)分离开,甚至相差2~5bp的DNA片段也能区分开。根据Marker或者参照样品的DNA谱带的位置,可以估测出被检样品DNA片段的大小。大板聚丙烯酰胺凝胶电泳需要高压电泳仪和大板垂直电泳槽进行电泳。

1.4 毛细管荧光电泳 毛细管荧光电泳是将胶灌在一种空芯的微细毛细管中,利用电泳和电渗流的电动力学原理,把PCR产物高效分离,利用荧光检测到产物信号,通过软件分析系统转化成峰值图导出结果电泳技术。毛细管电泳检测方法可以将相差1bp的DNA片段分离开,通过不同的峰值图展示出来,经过参照样品的和基准物质的矫正,获得相对精确的数据。在引物上标记不同的荧光信号,可以将若干组不同的PCR产物放在同一个反应孔中电泳,根据荧光信号颜色的不同和PCR产物大小的不同,分析出一个样品在不同位点的特性值^[3]。毛细管荧光电泳通常在基因分析仪上进行。

2 不同电泳方法适合不同的检测项目

琼脂糖凝胶电泳在农作物种子质量检测中多用于转基因检测和DNA质量检测。在转基因检测中通过分析样品中目标DNA片段的有无与阳性对照基因比较,确定检测样品是阳性还是阴性;在分子检测中用于检测DNA的质量,观察DNA谱带的位置、整

齐度和亮度来判断 DNA 质量的好坏。图 1 是一个棉花种子样品 CaMV35S 启动子基因的检测结果图。

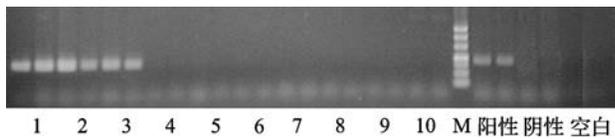


图 1 棉花种子 CaMV35S 基因检测结果

棉花种子样品 1、2、3 检测出 CaMV35S 基因,与阳性参照结果相同,其余样品均未检出该基因,试验中阳性参照样品和 Marker 条带清晰,阴性参照和空白对照样品均无条带,试验结果可靠。

小板聚丙烯酰胺凝胶电泳主要用于种子样品的纯度检测。在电泳图谱中观察分析各个泳道电泳谱带的差异,判定样品的纯度,或根据参照样品的信息估测 DNA 片段的大小。图 2 是一个玉米种子样品盐溶蛋白电泳的结果图,该图显示,此样品种子一致性较好,无异品种。

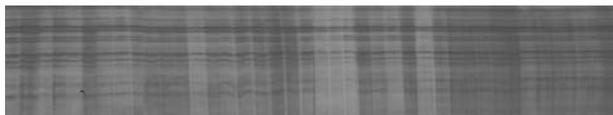


图 2 玉米种子样品盐溶蛋白电泳检测

大板聚丙烯酰胺凝胶电泳主要用于种子样品 SSR 分子标记真实性检测和一致性检测。根据不同品种在各个位点的典型特异谱带,进行样品之间比较或者与 DNA 指纹数据库比对,判断分析种子样品的一致性和真实性。图 3 是一个玉米种子样品 SSR 分子标记方法检测引物 bnlg2291k4 大板聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果图,该图显示,这个位点出现 4 种不同的特异型谱带,将 20 个不同的玉米杂交种分成 4 种不同的类型。

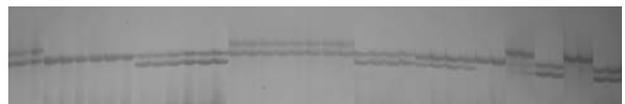


图 3 玉米种子样品大板聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

毛细管电泳荧光检测方法主要用于农作物种子的真实性检测和一致性检测。分析软件导出的峰值图,进行合并与整理,比对指纹数据库的指纹,判定被检种子样品的身份信息。图 4 是 20 份玉米种子样品 SSR 分子标记引物 bnlg1671y17 毛细管电泳荧光检测结果图,在这个位点出现 5 种不同大小的特异峰,把 20 个不同的玉米品种分成 5 种不同的类型。

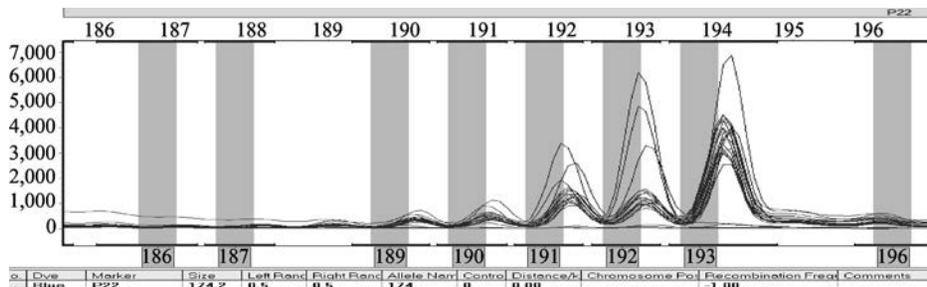


图 4 20 份玉米种子样品毛细管电泳检测

3 不同电泳方法的优缺点比较

琼脂糖凝胶电泳检测可以分离的 DNA 片段范围较广,且能较好地分离长度相差较大的 DNA 片段,操作简单,对实验室条件和操作人员的要求低;但是该方法需要用到 EB,即一种高致癌性的强诱变剂,对操作人员和环境的污染较严重,虽然可以用 EB 替代物(GoldView、GelRed 和 GelGreen、SYBR Green I),但易受到替代物的染色效果和稳定性的影响;另外这种方法的精确度较低,要区分大

小相近的 DNA 片段比较困难。

小板聚丙烯酰胺凝胶电泳检测操作过程中灌胶、点样、电泳、染色等程序操作相对简单,对实验室条件、仪器设备和技术人员要求不高,但是该方法的检测分辨率较低,不能清晰地区分大小相近的 DNA 片段。

大板聚丙烯酰胺凝胶电泳检测精确度比小板聚丙烯酰胺凝胶电泳高,成本相对较低,但凝胶制备与电泳、染色等操作程序比较费时费力,对操作人员

江苏省常州市种业发展现状调查与对策研究

张娜¹ 冯碧云² 季美娣¹ 季平¹ 陈文洁³ 潘俊华⁴

(¹江苏省常州市农业技术推广中心,常州 213001;²江苏省常州市园艺技术推广站,常州 213001;

³江苏省常州市农业委员会科技教育处,常州 213001;⁴江苏省常州市溧阳市种子管理站,溧阳 213300)

摘要:详细阐述了江苏省常州市现代种植业种业的发展现状和基本特点,指出常州市种业发展存在科研院所成果与种业发展需求脱节、中小型种子企业发展困难、蔬菜种业健康发展受限等问题。通过综合分析,提出推进常州市种植业种业发展的对策与建议:要多方调研,加快制定出台现代种业发展意见;强化项目引领,推进品种创新;加大基地建设和完善良种补贴制度,提升种业发展水平;完善种子监管体系,营造良好种业发展环境。

关键词:种植业种业;常州;发展

种业是国家战略性、基础性核心产业。2018年以来,农业农村部发布《关于大力实施乡村振兴战略加快推进农业转型升级的意见》,提出要加快推进现代种业提档升级。江苏省委省政府印发《江苏省乡村振兴十项重点工程实施方案(2018-2022年)》精神,提出实施现代农业提质增效工程,将现代种业作为八大千亿级优势特色产业之一重点打造。全面深入了解常州市种植业种业发展现状,科学制定本市现代种业发展规划,对推动种子种苗产业发展,促

进农业供给侧结构性改革,促进农业增效、农民增收具有重要的意义。

1 全市种植业发展情况简介

截至2016年末,全市农作物总播种面积20.92万hm²,市区11.82万hm²,其中金坛区5.42万hm²、武进区2.94万hm²、新北区2.72万hm²、天宁区0.44万hm²、钟楼区0.3万hm²;溧阳市9.1万hm²[1]。各辖市区按农作物播种面积从大到小排序,依次为溧阳市、金坛区、武进区、新北区、天宁区、钟楼区。从

技术要求较高,仍无法读出谱带的精确数据,只能与参照样品比较,估测它的大小,实验室间结果的比对误差较大。

毛细管电泳荧光检测方法结果精确度高,操作简单,通量高,省时省力,但是仪器购置、维护、荧光引物、耗材等试验成本较高;并要求仪器处于适合的温度条件下,供给稳定的电源,实验室有一定的洁净度以及有经验的技术人员,以保证仪器的正常运行,确保检测数据的结果准确。

4 小结

在种子质量检测中,不同的检测项目选择不同的电泳方法。琼脂糖凝胶电泳是一种理想的检测被检基因有无和检测DNA质量的方法;小板聚丙烯酰胺凝胶电泳能区分亲缘关系较远的品种,但由于近年来品种间亲缘关系越来越接近,该方法的应用率在逐年降低;大板聚丙烯酰胺凝胶电泳是目前种子

样品纯度检测和真实性检测中较常用的检测方法,成本相对较低;毛细管电泳荧光检测是种子检测中精确度较高的一种技术,但检测成本较高,推荐有一定经济实力的实验室使用。随着检测技术的发展,试验成本的降低,毛细管电泳荧光检测方法是一种自动化程度较高、试验结果准确可靠、人们较信赖的检测方法。

参考文献

- [1] 叶正祥,琼脂糖凝胶电泳技术. 遗传工程,1984(3): 95-105
- [2] 夏春兰,卫泽,张雪钰,文香丹,王沛政. 改良测序聚丙烯酰胺凝胶和普通聚丙烯酰胺凝胶技术在玉米分子标记中的应用研究. 海南热带海洋学院学报,2014,21(5): 64-68
- [3] 易红梅,王凤格,赵久然,王璐,郭景伦,原亚萍. 玉米品种SSR标记毛细管电泳荧光检测法与变性PAGE银染检测法的比较研究. 华北农学报,2006,21(5): 64-67

(收稿日期:2018-08-30)