

SSR 标记荧光毛细管电泳在种子检测中 常见问题分析

李巧英

(山西省种业发展中心,太原 030006)

摘要: SSR 分子标记荧光毛细管电泳在农作物种子质量检测中常用于种子真实性检测、种子纯度鉴定和指纹数据库的构建。试验过程中模板 DNA 浓度、特异峰型的统计分析以及仪器设备运行和维护、试验结果与指纹数据库的比对等关键环节都直接影响待测样品的结果判定。就检测中遇到的问题进行分析,并提出相应的解决方法,以期为农作物种子质量检测荧光毛细管电泳技术平台提供参考。

关键词: SSR 标记;荧光毛细管电泳;种子检测;问题;分析

分子标记技术是近年来发展较快的基因检测技术,随着新标记方法的开发和试验技术的改进,在基因水平上检测农作物种子信息逐渐成为监控种子质量的一个重要手段。由于分子标记法不受自然条件和表现性状的约束,实现了种子品种遗传信息室内快速检测,受到大家的青睐。SSR 作为第 2 代分子标记方法,是一种共显性标记,具有重复性好、等位变异多、数据分析简便、易操作等优点,在农作物种子质量检测中被广泛使用。

荧光毛细管电泳技术将荧光检测的高灵敏度和毛细管电泳的高效性结合,利用电泳和电渗流的电动力学原理,在毛细管中灌满胶分离 PCR 产物,

检测荧光信号,数据软件分析系统将其转化成峰图,显示试验结果。该技术自动化程度高,检测通量高,试验操作简单,数据统计程序化,避免人为估算的主观性,结果精确到 1bp^[1],直接显示扩增产物片段的大小,实现了指纹图谱与碱基序列长短之间的对应转换,易于实验室间结果比对,常用 GeneMapper 和 GeneMarker 分析 SSR 扩增片段^[2]。本文就试验中遇到的荧光信号强度、特异峰型的统计分析以及毛细管电泳仪运行和维护、试验结果与数据库比对等问题进行分析,为 SSR 分子标记荧光毛细管电泳检测农作物种子质量试验技术标准化提供参考。

拟,为所有专业方提供可控管、无破坏性、性价比高、低风险并允许反复运用的可行性方法。BIM 技术可以有效地提高施工技术水准,预防施工事故,减少施工成本浪费并缩短时程,强化施工过程中决策、控管能力。

BIM 目前已发展成为一个完整的体系,并应用于多种行业及技术整合^[4]。在现代化种子加工厂的规划中,应用三维设计及 Navisworks 等 BIM 软件技术,能够优化工艺流程布局,纠正设计中的漏洞和错误,并能够加快设计流程,在项目建设过程中进行可视化审阅,对项目建设过程进行数字化管理,实现在项目全生命周期中进行精细化管理,为工程项

目建设增值,对促进种子加工行业进步具有重大的意义。

参考文献

- [1] 冯志琴,孙文浩,陈海军,李永磊. 谈玉米种子加工中心项目总图设计. 中国种业,2012(10): 23-25
- [2] 孙斌. BIM 技术的现状和发展趋势. 水利规划与设计,2017(3): 13-14
- [3] 赵璐,翟世鸿,陈富强,姬付全. 大型建筑施工企业 BIM 应用规划与实施要点探析. 工程管理年刊,2015(5): 126-137
- [4] 王朔,李建成. BIM 在建筑工程项目应用中的若干问题的探讨. 南方建筑,2014(4): 19-25

(收稿日期: 2022-04-22)

1 均一荧光信号采集的保证

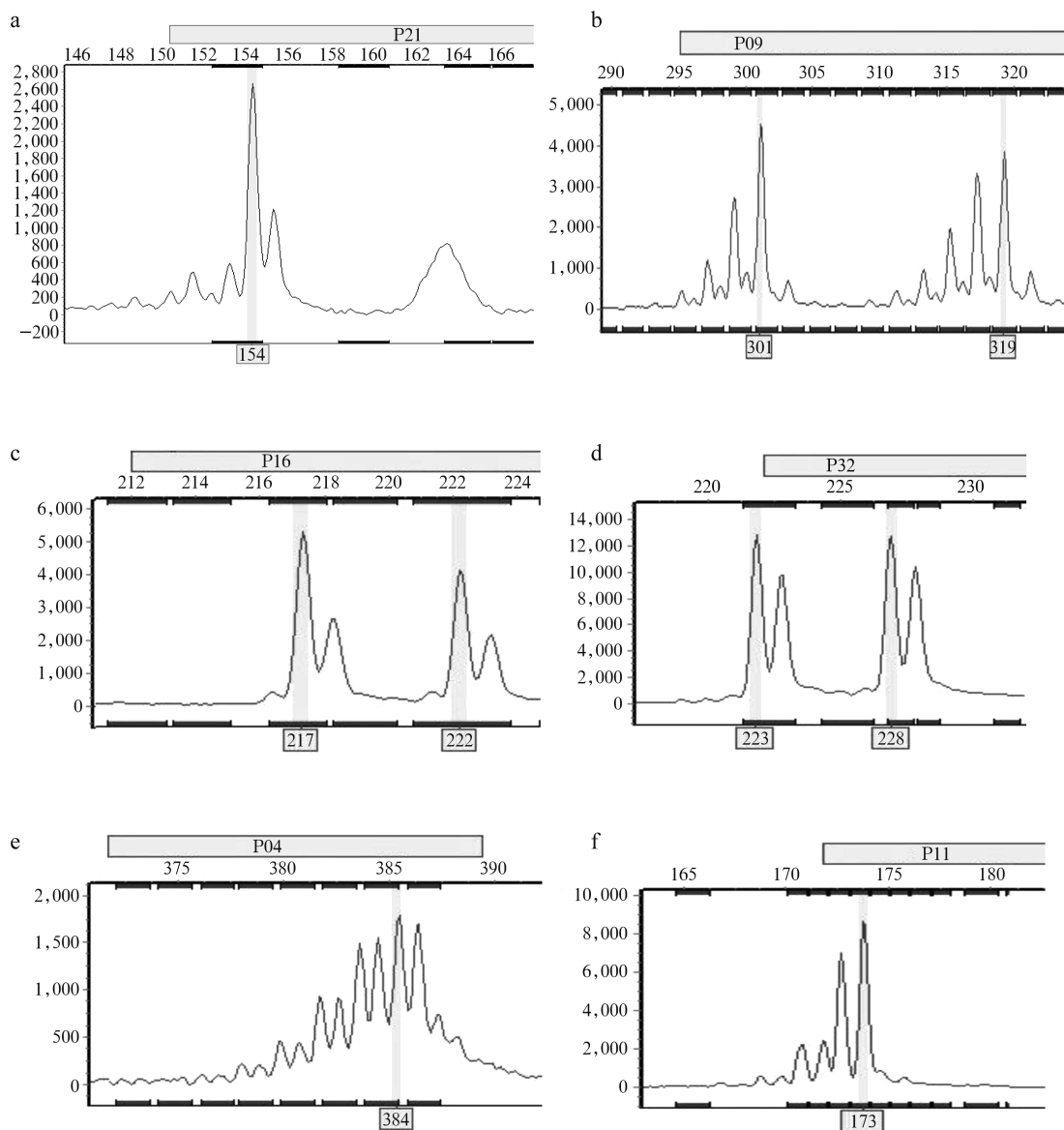
SSR 分子标记荧光毛细管电泳采集荧光信号作为试验数据的基础,严格要求模板 DNA 浓度和扩增体系的配置比例,避免不同样品孔间荧光信号强弱差异大带来干扰。扩增前将模板 DNA 原液稀释至浓度一致;扩增体系按照引物、模板、酶最佳配比设置。优质的 DNA 和完美的扩增体系结合可以打造一套高质量的品种信息指纹图谱,获得准确可靠的试验数据。

电泳过程中,为确保采集到的荧光信号真实可信,要求扩增板每个样品孔内 PCR 产物独立有效,封口的膜和封膜技术是关键。封板膜要求均匀透光,

有一定的韧性,电泳仪能清晰获取荧光信号,且膜将样品孔密封,形成互不干扰的 PCR 微循环环境。通常采用热封或激光封膜,防止 PCR 产物蒸发损失和样品间的交叉污染,保证 PCR 产物的独特属性和检测结果准确有效。

2 特异峰型的统计分析规律

电泳结束,分析软件将检测结果绘制成峰图展示出来,统计分析各位点的特异峰,自动过滤非特异峰。理想的特异峰(图 1a 左)为独立的单峰,峰型尖锐锋利,周围有若干小峰;非特异峰(图 1a 右)偏矮胖,峰较低,不作统计。实际检测中会遇到不同的峰型,有连续峰(图 1b)、高低峰(图 1c)、n+1 峰



a: 特异峰及非特异峰; b: 连续峰; c: 高低峰; d: n+1 峰; e: 多峰; f: 多峰

图 1 荧光毛细管电泳峰图类型

(图 1d)、多峰(图 1e,f)、pull-up 峰^[2-3]等情况。连续峰(图 1b)多由几个相差 2bp 的峰群组成,以较高的峰或最右边的峰大小为试验结果,统计为单峰,避免识别为多峰;遇到高低峰(图 1c)时,通常读取较高峰的数值,或比对数据库中参照样品峰型的统计规律; $n+1$ 峰(图 1d)在试验中比较常见,即同一位置出现 2 个峰,相差 1bp,作为单峰计算,识别较高峰的数值;多峰(图 1e,f)在混样检测时出现,首先要确定是由于样品混杂引起的多峰,还是此品种在该位点的特异属性,需要采用单粒提取 DNA,重新扩增,证实多峰的属性,当多峰为特异峰时识别最高的峰。pull-up 峰是一种干扰峰,在多重荧光电泳时,由于某色荧光引物的特异峰在某个位置较高,把这个位置其他色荧光引物的峰连带升高而产生,统计分析时剔除。

3 数据统计与指纹数据库比对

数据统计时,先分析分子量内标(LIZ)、参照样品和空白对照的峰型,LIZ 峰型准确,参照样品数据与指纹数据库一致,空白对照中无明显的特异峰,则表明试验准确,数据可采纳。试验中可选择合适的 LIZ,用 LIZ 校正等位基因峰值,SSR 分子标记属于短串联重复,DNA 片段较短,如玉米种子真实性检测 SSR 分子标记等位基因位于 100~430bp 之间^[4],可选用 LIZ500 作为分子量对照。参照样品一般选择常见的指纹稳定且具有特异峰型的品种,设置参照样品用于校正不同试验批次的指纹数据,提取有效峰值并将数据整合标准化。空白对照用于检测试剂耗材和试验环境是否被污染,以确定试验结果的可靠性。

试验数据与指纹数据库比对时,需要比较特异峰的位置及峰型。参照样品的峰图与指纹数据库中的数据吻合,待测样品与参照样品采用统一的读数规则计数,数据整理后,上传指纹数据库比对^[5]。同名品种比较,确认待测样品品种的真实性;与全库品种比较,识别待测样品的身份,比对过程中,个别差异位点需要人工确认。

4 毛细管电泳仪的运行与维护

毛细管电泳仪的运行环境温度适宜保持在

24±2℃,室温太高毛细管内温度升高,会使溶液黏度下降,电泳速度增大;室温太低,加温炉升温慢,影响电泳速率和分离效果,适宜的检测温度可保证试验结果的准确性。电极槽倒入缓冲液,两极插入缓冲液中,电泳通路保持湿润,如果干燥,会导致毛细管堵塞,影响电泳。仪器运行时各级连接口密封,避免进入空气,气泡会阻断电流,产生放电,损坏密闭的电泳通路,如有气泡,用凝胶把系统中的气泡排出。进样前经专用洗液清洗毛细管和连接管路,保证电泳通道畅通。正式电泳时,毛细管进口端连接凝胶,用新胶灌注毛细管,暂时不用时可以用清洗液浸没凝胶入口。

5 小结

SSR 分子标记荧光毛细管电泳检测方法在农作物种子质量检测中的应用实现了快速高效检测,数据统计标准化、规范化,解放了人力,减少了人员误差,并且试验结果准确,精确度高^[6],可以单独检测待测样品,结果与数据库比对。综上所述,解决好试验中遇到的问题,能够大大提高检测效率,适应当前种子市场管理的需要,为农作物种子质量监测提供一个可靠的检测平台。

参考文献

- [1] 李巧英. 农作物种子检测中 SSR 与 SNP 分子标记方法的比较分析. 中国种业, 2021 (12): 48-50
- [2] 王蕊, 田红丽, 王凤格, 赵久然, 易红梅, 王璐, 李楠, 霍永学. 玉米 DNA 指纹鉴定中两种 SSR 数据分析软件 GeneMapper 和 GeneMarker 的应用比较. 分子植物育种, 2012, 10 (24): 1171-1178
- [3] 王凤格, 易红梅, 赵久然, 王璐. 毛细管电泳荧光检测中的异常电泳类型及原因分析. 分子植物育种, 2007, 5 (6): 890-894
- [4] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 39914—2021 主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子标记检测 玉米. 北京: 中国标准出版社, 2021
- [5] 王凤格, 杨扬, 易红梅, 赵久然, 任洁, 王璐, 葛建镨, 江彬, 张宪晨, 田红丽, 侯振华. 中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建. 中国农业科学, 2017, 50 (1): 1-14
- [6] 李巧英, 郑戈文, 任路路, 张华. SSR 分子标记两种电泳方法快速区分玉米种子杂交种. 农业科技通讯, 2021 (5): 46-49

(收稿日期: 2022-04-12)

苏北地区高粱品种比较试验

周培士¹ 沈新莲² 李春宏³ 李伟¹ 徐鹏² 薛燕军¹ 徐军¹

(¹ 江苏省淮安市涟水县高沟镇农村工作局, 淮安 223411; ² 江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014;

³ 江苏省农业科学院成果处, 南京 210014)

摘要:为筛选出适合苏北地区酿酒用优质高粱品种, 引进 15 个粒用高粱新品种, 调查株高、穗长、节数、生育期、穗型、抗倒性、千粒重等农艺性状与产量, 测定容重、蛋白质含量、淀粉含量、支链淀粉含量、单宁含量等品质性状, 并进行综合评价。综合性状较佳的品种有晋糯 3 号、红糯 9 号、红糯 16 号、机糯梁 1 号、两糯 1 号、川糯梁 2 号, 这 6 个品种表现为中秆、抗倒、丰产、糯性等特点, 适宜苏北地区选择性种植。

关键词:高粱; 品种; 产量; 酿酒

高粱是我国酿造白酒的主要原料^[1-2], 近年来为打造高标准原料、提升核心品系竞争力、解决品牌质量支撑问题, 国内一些名酒企业如茅台、泸州老窖、汾酒、五粮液等纷纷涉足酿酒原粮种植产业, 因地制宜建立酿酒专用粮基地, 生产优质酿酒原料^[3-5]。江苏白酒产业发达, 是高粱消费大省^[6], 酿酒基地主要在苏北的宿迁、淮安、连云港等市。近几年, 随着江苏白酒高端品牌的打造以及产能的扩大, 酿酒原粮本地化生产和基地建设已纳入今世缘、洋河、汤沟、五醍浆等江苏知名酒企发展战略规划, 江苏苏北地区部分乡镇开始恢复发展酿酒高粱种植, 面积达数十万亩^[7]。然而江苏种植高粱品种较杂, 存在盲目引进种植现象, 缺乏对高粱品种综合性状的评价与鉴定。从其他省份引进 15 份粒用高粱品种进行农艺性状、产量与品质性状的鉴定, 旨在为高粱品种在江苏的推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料共有 15 个高粱品种, 其中红缨子作为对照品种, 参试品种信息详见表 1。

1.2 试验设计 试验地点选择在苏北涟水县四安庄村, 土质黄壤, 肥力中等、均匀, 地势平坦, 光照充足, 排灌方便。2021 年 6 月 27 日小麦收获旋耕后进行人工播种, 小区为长方形畦面, 宽 3.2m、长 10m, 面积 32m²。畦沟 40cm, 大小行种植, 大行距

表 1 参试高粱品种名称及来源

品种	供种单位
茅高 8 号	贵州粒粒丰种业有限公司
凤杂 48 号	吉林省农业科学院作物育种研究所
红糯 16 号	黑龙江讷河市惠龙农业科技开发有限公司
红糯 9 号	黑龙江讷河市惠龙农业科技开发有限公司
红茅 6 号	黑龙江讷河市惠龙农业科技开发有限公司
辽糯 11 号	辽宁省农业科学院作物研究所
辽杂 19 号	辽宁省农业科学院作物研究所
机糯梁 1 号	四川省农业科学院水稻高粱研究所
川糯梁 2 号	四川省农业科学院水稻高粱研究所
晋糯 3 号	山西农业大学农学院高粱研究所
茅湘糯	湖南隆平粮社中际高粱专业合作社
两糯 1 号	长沙新万农种业有限公司
冀酿 2 号	河北省农林科学院谷子研究所
冀酿 4 号	河北省农林科学院谷子研究所
红缨子 (CK)	贵州红缨子农业科技发展有限公司

80cm、小行距 40cm, 第一行距沟边 20cm, 一畦种植 6 行, 株距 15cm, 留 1.5m 走道, 每穴播种 3 粒左右, 4 叶期定苗, 每穴 1 株, 采用随机区组设计, 3 次重复, 四周设保护行。播种时每 hm² 撒施三元复合肥 450kg, 拔节期追施尿素 300kg^[7]。其他管理措施同大田生产。

1.3 性状调查 田间调查性状包括生育期、株高、穗型、穗长、节数、倒伏性、颖壳包被度、千粒重, 取小区中间 2 行测籽粒产量等, 观测记载标准参照《高粱种质资源描述规范和数据标准》^[8]。测定容重和

基金项目:涟水县 2021 年基层农技推广体系与建设项目 (2018K-01); 2021 年亚夫科技服务项目 (KF (21) 3001)

通信作者:李春宏