

毛细管电泳在玉米品种真实性鉴定中的应用

高素伟 张连海 赵新宇

(北京市通州区种子管理站,北京 101117)

摘要:为了打击套牌侵权行为,利用毛细管电泳荧光标记检测技术,选用 20 对 SSR 核心引物对从辖区门店抽检的 6 个玉米样品进行真实性鉴定,结果表明:1、2、3、4 号样品 20 个位点均不存在差异,5、6 号样品存在 1 个差异位点,为相似品种,这与所抽检样品不符,进一步确认可提交有资质的机构做进一步检测。说明在没有标准品的情况下,利用毛细管电泳荧光标记检测技术可以初步对抽检样品进行真实性鉴定,初步判断门店销售的种子是否存在套牌侵权的行为。

关键词:玉米; SSR 标记;毛细管电泳;真实性

目前,北京市各区县种子管理站通过田间小区种植来鉴定品种的真实性和纯度,时效性较差,也无法提前避免农民遭受损失。SSR 分子标记技术能够对抽检的样品进行快速而准确的检测,保证品种的真实性^[1]。毛细管电泳主要应用于肽类、蛋白、核酸、离子和药物等的分离和测定,是以高压电场为动力,以毛细管为通道,依据样品中分子量或碱基逐一分开^[2],可以同时多个样品、多个标记进行检测,大大提高了检测效率。因此,在现有条件下,利用 SSR 标记并结合毛细管电泳检测技术对抽检样品进行品种真实性鉴定是提高各区县种子站业务工作能力,确保种子市场安全的有效方法。

本文利用毛细管电泳荧光标记法对本辖区不同门店内抽取的 6 个玉米样品进行检测,初步判断品种的真实性,对有疑问的样品提交有资质的检验机构做进一步检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为 2017 年 3 月份从辖区门店抽取的 6 份玉米样品,1:金博士郑单 958; 2:金娃娃郑单 958; 3:中宇牌郑单 958; 4:德农郑单 958; 5:纪元 1 号; 6:纪元 1 号。

1.2 基因组 DNA 的提取 将抽检的 6 个玉米样品进行田间种植,在 3 叶期进行取样,每个样品取 10 个单株叶片,利用 TIANGEN 的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒,按照操作规程提取 DNA,并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 引物设计 参照 NY/T 1432-2014《玉米品种

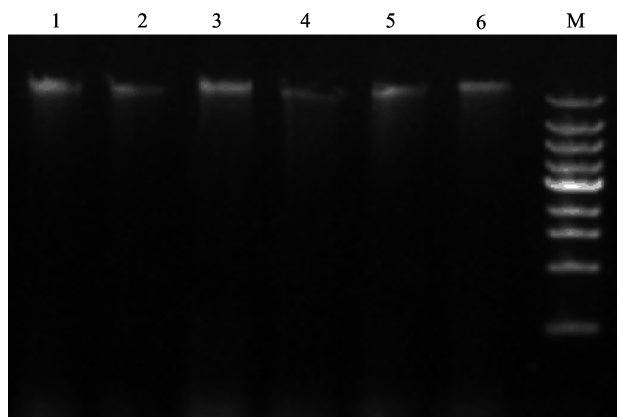
鉴定技术规程 SSR 标记法》推荐的普通玉米真实性检测基本核心引物 P01~P20,分别为 bnlg439w1、umc1335y5、umc2007y4、bnlg1940k7、umc2105k3、phi053k2、phi072k4、bnlg2291k4、umc1705w1、bnlg2305k4、bnlg161k8、bnlg1702k1、umc1545y2、umc1125y3、bnlg240k1、phi080k15、phi065k9、umc1492y13、umc1432y6、umc1506k12,引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。其中,P14、P18、P11、P15、P20 加 ROX 标记;P19、P02、P03、P13、P16 加 TAMRA 标记;P09、P05、P01、P12、P10 加 HEX 标记;P08、P17、P07、P06、P04 加 FAM 标记。

1.3 荧光引物 PCR 扩增 荧光引物 PCR 扩增体系: 2 × Mix 5 μL, 10 μmol/L 的 F/R 0.1 μL, DNA 原液 1 μL, 加 ddH₂O 补足 10 μL。荧光引物 PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, T_m 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 30 min, 4 °C 保存。根据引物退火温度,判断 T_m 值,其中 P12 和 P13 引物 T_m 值为 55 °C,其余 18 对引物 T_m 值为 58 °C。

1.4 毛细管电泳上机检测 取 PCR 产物 0.3 μL、分子量内标(LIZ500) 0.5 μL 和去离子甲酰胺 9.5 μL 混合加入 PCR 板中,95 °C 变性 5 min, 4 °C 冷却后离心,1 × Buffer 缓冲液上机检测,使用 DNA 分析仪 3500XL 的片段分析软件 GeneMapper 编写 panel,读出每个样品每个位点的等位基因扩增片段大小。当样品间差异位点数 ≥ 2 时,判定为不同;当样品间差异位点数 = 1 时,判定为近似;当样品间差异位点数 = 0 时,判定极近似或相同。

2 结果与分析

2.1 DNA 完整性检测结果 利用琼脂糖凝胶电泳检测 6 个玉米样品的基因组 DNA (图 1), 结果显示所有条带均为单一亮带, 并且完整、整齐、清楚, 而且点样孔清晰可见, 没有拖尾现象, 表明 6 个样品的基因组 DNA 质量较高, 没有降解, 可以继续下一步试验。



1~6: 样品编号; M: Marker

图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 6 个玉米样品基因组 DNA 完整性的结果

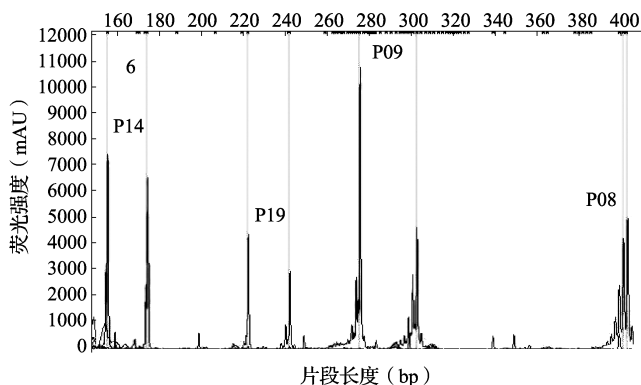
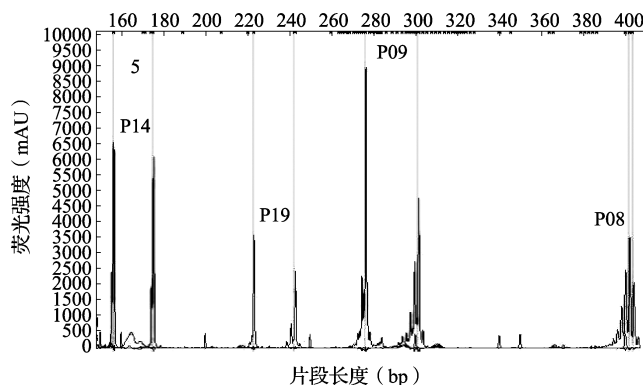
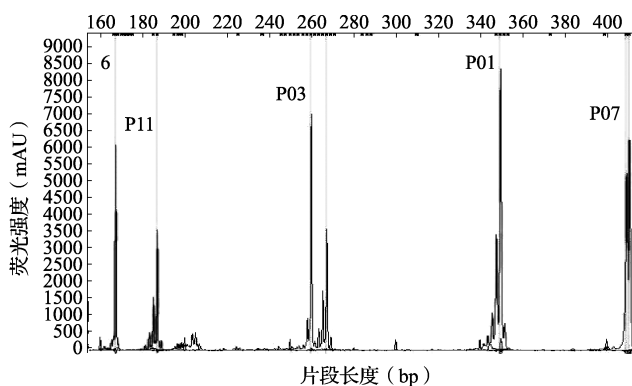
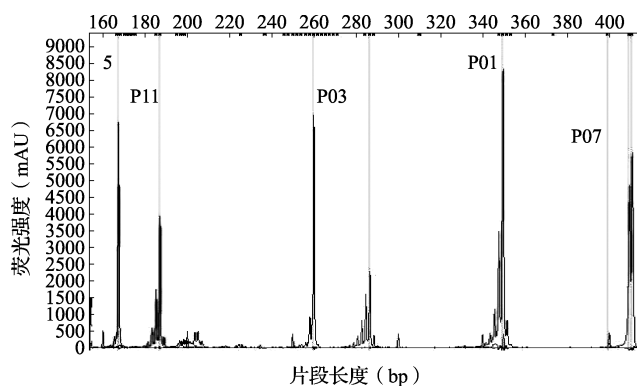
2.2 DNA 纯度检测 通常用 OD_{260}/OD_{280} 比值来衡量样品 DNA 纯度, 质量高的 DNA, 其 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8~2.0 之间; OD_{260}/OD_{280} 比值 <1.8 , 表明有蛋白质、酚污染; OD_{260}/OD_{280} 比值 >2.0 , 表明有

RNA 污染^[3]。由表 1 可以看出, 6 个玉米样品基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 在 2.0~2.2 之间, 有少量 RNA 污染, 但毛细管电泳的标记是针对 DNA 设计的, 特异性很高, 而且 RNA 很容易降解, 对 PCR 扩增结果不会有影响, 因此可以对扩增产物稀释后进行毛细管电泳上机检测。

表 1 6 个玉米样品基因组 DNA 纯度检测结果

样品编号	材料名称	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	浓度 (ng/ μ L)
1	金博士郑单 958	0.251	0.116	2.162	251.45
2	金娃娃郑单 958	0.096	0.047	2.059	96.35
3	中字牌郑单 958	0.34	0.158	2.153	339.55
4	德农郑单 958	0.253	0.122	2.082	252.95
5	纪元 1 号	0.248	0.118	2.107	247.75
6	纪元 1 号	0.197	0.093	2.118	196.95

2.3 毛细管电泳上机检测结果 1、2、3、4 号样品 20 个位点差异位点数 = 0, 不存在差异, 说明这 4 个样品为同一个品种, 不存在套牌。由图 2 可知, 5、6 号样品的 19 对核心引物 (P05 引物没有扩增产物) 扩增出来的电泳峰主峰明显、杂峰较少、峰形整齐, 分离效果较好, 但在 P03 位点处存在差异, 由此判断这 2 个样品为相似品种, 但不能完全确定是否存在套牌^[4]。



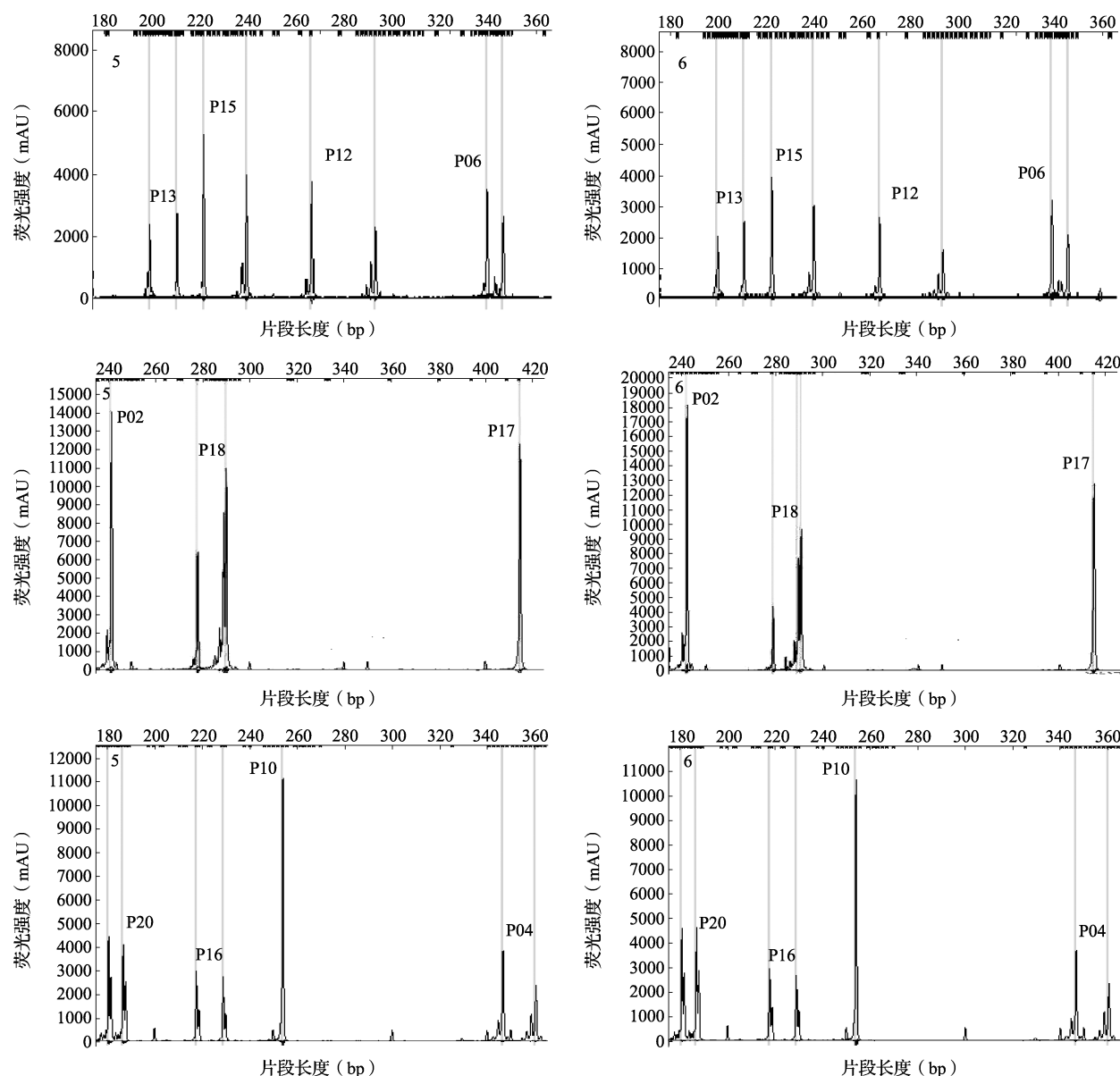


图2 毛细管电泳检测20对荧光引物在5、6号样品基因组的扩增产物

3 讨论

本试验利用毛细管电泳荧光标记检测技术,对从辖区门店抽检的6个玉米样品进行真实性鉴定,试验结果显示1、2、3、4号样品在20个位点上不存在差异,说明从不同门店抽检的样品不存在套牌,为相同品种郑单958,5号和6号样品均为纪元1号,但在20个位点上存在1个差异位点,该检测结果与所抽检样品不符,但不能完全确定是否存在套牌,为进一步确认可提交有资质的机构做进一步检测^[5]。这可能是同一个品种在长期栽培过程中存在自然变异,因此对育种者来说,保持亲本的纯度非常重要,在保存亲本的过程中除了要从形态特征上鉴定外还要从分子水平进行鉴定,以确保生产的杂交种的真

实性,保护育种者、生产者及农民的合法权益。

参考文献

- [1] 周岚,陈殿元. SSR分子标记技术及其在玉米种子鉴定上的应用. 中国种业, 2006(3): 21-22
- [2] 易红梅. 基于毛细管电泳荧光标记的玉米品种SSR高通量检测体系的建立研究. 北京:首都师范大学, 2006
- [3] 杨婷婷,徐俊,曾国浩. 常用分子标记技术在玉米种子鉴定方面的比较与分析. 云南农业, 2013(10): 34-36
- [4] 岳静,朱志成,申雅娟,张卉,王汝宝. 利用SSR标记技术鉴定玉米品种真实性的研究. 中国农学通报, 2011, 27(12): 201-204
- [5] 尹祥佳,焦珍珍,赵慧军,李艳玫,贾国军,郝楠,南铭,李世风,张东峰. 利用SSR荧光标记鉴定玉米杂交种纯度的研究. 中国种业, 2018(9): 56-63

(收稿日期: 2018-12-27)