

## · 基础理论 ·

# 一种高效省本的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法的建立——以水稻为例

王运斌, 江良荣, 黄荣裕, 黄育民, 郑景生\*

(厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361102)

**摘要:** 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染技术已广泛用于 DNA 片段检测。介绍一种本实验室改进的高效省本的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法, 该法将固定和染色两步骤合并, 整个银染过程只需 16 min 即可完成。同时, 该法无需使用无水乙醇和冰乙酸, 减少了硝酸银、氢氧化钠及甲醛的使用量。

**关键词:** 非变性聚丙烯酰胺凝胶; 电泳; 银染

中图分类号: Q93-333 文献标识码: A 文章编号: 1008-9799(2015)03-0004-05

## A High-efficiency and Low Cost Method of DNA Silver Staining in Non-denaturant Polyacrylamide Gel Electrophoresis An Example Based on Rice

WANG Yun-bin, JIANG Liang-rong, HUANG Rong-yu, HUANG Yu-min, ZHENG Jing-sheng\*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102)

**Abstract:** A method of silver staining in non-denaturant polyacrylamide gel electrophoresis has widely been used to detect DNA fragments. Here we developed a high-efficiency and low cost method of DNA silver staining in non-denaturant polyacrylamide gel electrophoresis. The whole new procedure of silver staining has combined two steps of fixation and staining into one step and can be completed within 16 min. Furthermore, the new procedure eliminates the use of ethanol and acetic acid and reduces the use amount of silver nitrate, sodium hydroxide and formaldehyde in silver steps.

**Key words:** non-denaturant polyacrylamide gel; electrophoresis; silver staining

随着分子标记技术的快速发展, 聚合酶链反应 (PCR) 结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染技术已广泛应用于水稻遗传连锁图谱构建、基因定位克隆、分子标记辅助育种、遗传多样性分析等研究领域, 但非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳常规银染法比较复杂、耗时费力、成本高、效率低, 不利于进行大规模批量样品材料分析或育种材料选择。因此, 许多研究者根据大规模分子标记分析工作的实验需要, 从减少操作步骤、减少显带时间、降低药品成本、提高分辨率等方面对常规银染法进行了改进<sup>[1-9]</sup>。研究基于本实验室长期应用的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳常规银染法<sup>[10]</sup>的基础上进行改进和简化银染步骤, 建立了一种高效节本的批量快速银染法, 能极大提高遗传图谱构建、基因定位、分子标记辅助育种等大规模样品分子标记分析检测的效率, 大幅度减少检测成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为随机选取的水稻“航2号”与“象牙香占”杂交建立的 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 分离群体部分单株分蘖期叶片。引物为王丰等<sup>[11]</sup>设计开发的 InDel 功能标记 GRFM04。DNA 提取参考王兰等<sup>[12]</sup>的基因组 DNA 快速制备方法。

### 1.2 PCR 反应体系和程序

收稿日期: 2015-07-10

基金项目: 福建省自然科学基金计划项目 (2012J01153), 福建省高校产学研合作重大科技计划项目 (2011N5013), 福建省科技重大专项 (2013NZ0002-2)

作者简介: 王运斌 (1987-), 男, 硕士生, 研究方向: 水稻遗传育种

\* 通讯作者: 郑景生 (1969-), 男, 副教授, 研究方向: 水稻遗传育种

PCR 反应体系总体积为 11  $\mu\text{L}$ , 其中 10 $\times$  buffer 1.1  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 0.8  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq 酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 正反引物各 0.05  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.9  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应在 Biometra Tprofessional Thermocycler PCR 仪上进行, 反应程序为: 94 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 55 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72 延伸 5 min, 4 保存。

### 1.3 PCR 产物的电泳分离

PCR 产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 具体参考郑景生等<sup>[10]</sup>的方法, 采用垂直电泳槽电泳, 每块凝胶的大小约为长 12.5 cm、高 18 cm、厚 1.0 mm, 电泳条件为电压 340V 电泳 2 h 左右, 然后采用常规银染法和改进银染法进行染胶并照相保存。

### 1.4 银染方法

电泳结束后取下胶板, 分别按下述银染方法各染 1 块凝胶, 染色液各为 100 mL, 所用染胶盘的规格为长 20 cm、宽 30 cm、高 5.5 cm 的搪瓷盘, 记录染色时间 (不包括剥胶时间)。

#### 1.4.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶常规银染方法

固定: 90 mL 蒸馏水加入 10 mL 乙醇, 放入凝胶, 加 500  $\mu\text{L}$  冰乙酸, 摇动 3 min; 染色: 加入 1 mL 20% 的硝酸银溶液, 摇动 5 ~ 8 min; 漂洗: 倒掉染色液, 蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次, 洗净后, 倒掉蒸馏水; 显影: 在染胶盘中加入 100 mL 3% NaOH 溶液 (100 mL 蒸馏水 + 3 g NaOH) 和 500  $\mu\text{L}$  甲醛, 迅速震荡, 使显影液均匀作用, 放入凝胶显影 3 ~ 5 min; 洗涤: 显影后, 倒掉显影液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影后的凝胶平置于玻璃板上, 记录 PCR 产物带型; 晾干后可进行拍照, 亦可覆盖保鲜膜长久保存。

#### 1.4.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶银染方法改进一

固定染色: 染胶盘中加入 100 mL 蒸馏水和 500  $\mu\text{L}$  20% 硝酸银溶液, 放入凝胶, 摇动 8 ~ 10 min; 漂洗: 倒掉染色液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影: 在染胶盘中加入 100 mL 0.5% NaOH 溶液 (100 mL 蒸馏水 + 0.5 g NaOH) 0.019 g 四硼酸钠和 400  $\mu\text{L}$  甲醛, 迅速震荡, 使显影液充分作用, 摇动 3 ~ 5 min; 洗涤: 显影后, 倒掉显影液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影后的凝胶平置于玻璃板上, 记录 PCR 产物带型; 晾干后可进行拍照, 亦可覆盖保鲜膜长久保存。

#### 1.4.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶银染方法改进二

固定染色: 染胶盘中加入 100 mL 蒸馏水和 500  $\mu\text{L}$  20% 硝酸银溶液, 放入凝胶, 摇动 8 ~ 10 min;

显影: 加入 0.5 g NaOH、0.019 g 四硼酸钠以及 400  $\mu\text{L}$  甲醛溶液, 摇动 3 ~ 5 min; 洗涤: 显影后, 倒掉显影液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影后的凝胶平置于玻璃板上, 记录 PCR 产物带型; 晾干后可进行拍照, 亦可覆盖保鲜膜长久保存。

#### 1.4.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶银染方法改进三

固定染色: 染胶盘中加入 100 mL 蒸馏水和 500  $\mu\text{L}$  20% 硝酸银溶液, 放入凝胶, 摇动 8 ~ 10 min;

显影: 加入 0.5 g NaOH 以及 400  $\mu\text{L}$  甲醛溶液, 摇动 3 ~ 5 min; 洗涤: 显影后, 倒掉显影液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影后的凝胶平置于玻璃板上, 记录 PCR 产物带型; 晾干后可进行拍照, 亦可覆盖保鲜膜长久保存。

#### 1.4.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶银染方法改进四

固定染色: 染胶盘中加入 100 mL 蒸馏水和 500  $\mu\text{L}$  20% 的硝酸银溶液, 放入凝胶, 摇动 8 ~ 10 min; 漂洗: 倒掉染色液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次;

显影: 在染胶盘中加入 100 mL 0.5% NaOH 溶液 (100 mL 蒸馏水 + 0.5 g NaOH) 和 400  $\mu\text{L}$  甲醛, 迅速震荡, 使显影液充分作用, 摇动 3 ~ 5 min; 洗涤: 显影后, 倒掉显影液, 用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次; 显影后的凝胶平置于玻璃板上, 记录 PCR 产物带型; 晾干后可进行拍照, 亦可覆盖保鲜膜长久保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同银染方法的染色效果

不同非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法的染色效果见图 1 ~ 5, 看出: 常规银染法 (图 1) 与改进银染法一 (图 2)、改进银染法四 (图 5) 的胶片背景比较清晰, 分辨率高, 条带容易分辨, 能准确判断带型; 改进银染法二 (图 3) 与改进银染法三 (图 4) 的胶片背景比较模糊, 分辨率较低, 表面存在成片的白色物质, 较难准确判断带型。

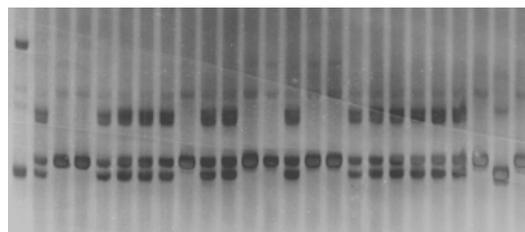


图 1 常规银染方法的染色效果

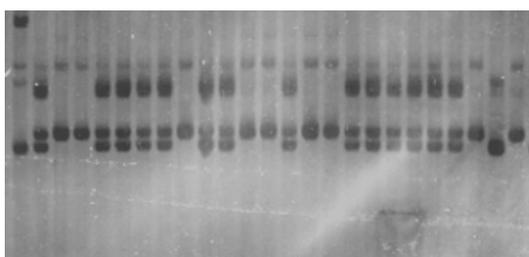


图2 银染改进方法一的染色效果

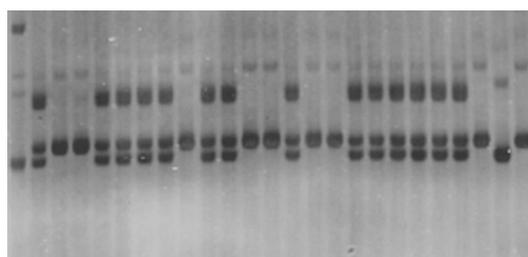


图5 银染改进方法四的染色效果

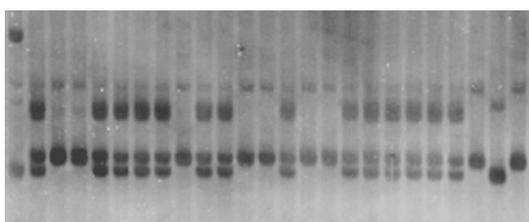


图3 银染改进方法二的染色效果

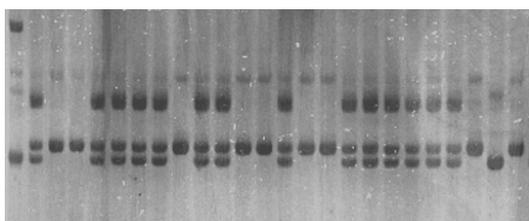


图4 银染改进方法三的染色效果

## 2.2 不同银染方法的优缺点

不同非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法染1块凝胶的染色液用量均为100 mL, 染色时间基本相近(表1), 但操作步骤、试剂用量有所不同(表2)。

从表1看出, 常规银染方法的操作繁琐、染色时间较长, 全程约需16.5 min。银染改进方法一与银染改进方法四简化步骤, 将固定和染色两步骤合并, 简化操作, 染色时间约需16 min。银染改进方法二与银染改进方法三的银染步骤更加简化, 除将固定和染色两步骤合并外, 还省去了漂洗步骤, 操作更加简便, 染色时间最短, 约需15 min。可见, 银染改进方法简化了操作步骤、缩短了染色时间, 有利于提高工作效率。

表1 不同银染方法的染色时间

步骤	常规方法 (min)	改进方法一 (min)	改进方法二 (min)	改进方法三 (min)	改进方法四 (min)
固定	3	8 ~ 10	8 ~ 10	8 ~ 10	8 ~ 10
染色	5 ~ 8	8 ~ 10	8 ~ 10	8 ~ 10	8 ~ 10
漂洗	1	1	3 ~ 5	3 ~ 5	1
显影	3 ~ 5	3 ~ 5	3 ~ 5	3 ~ 5	3 ~ 5
洗涤	1	1	1	1	1
拍照	1	1	1	1	1
合计	14 ~ 19	14 ~ 18	13 ~ 17	13 ~ 17	14 ~ 18
平均	16.5	16	15	15	16

表2显示, 常规银染方法所消耗的试剂最多, 银染改进方法的各种试剂用量大幅度减少。与常规银染方法相比, 银染改进方法省去了无水乙醇与冰乙酸的使用, 硝酸银、氢氧化钠和甲醛的用量分别减少1/2、5/6、1/5, 实验成本大幅度降低,

减少醋酸、甲醛等刺鼻气味对人体健康的影响, 减少废弃液对环境的污染。但银染改进方法一和银染方法二又增加了四硼酸钠的使用, 也相应增加了实验成本。

如在染色过程中, 硝酸银是最重要的试剂, 其

价格昂贵, 一瓶规格为 25 g 的硝酸银 (上海生工) 价格为 226 元, 配制成 20% 硝酸银溶液为 125 mL, 若按表 2 的硝酸银使用剂量来计算, 常规银染方法只能染胶 125 块, 每块胶的硝酸银成本约 1.8 元, 但银染改进方法均可染胶 250 块, 每块胶的硝酸银成本约 0.9 元, 为常规银染方法的一半。此外, 银

染改进方法不再需要无水乙醇和冰乙酸, 同时减少了氢氧化钠和甲醛的使用量。

由此可见, 银染改进方法不仅节省大量成本, 而且减少了对人体和环境的影响。综合以上结果分析, 认为银染改进方法四是本研究中最优的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法。

表 2 不同银染方法的试剂使用量

试剂	常规方法	改进方法一	改进方法二	改进方法三	改进方法四
冰乙酸 (μL)	500	0	0	0	0
无水乙醇 (mL)	10	0	0	0	0
20% 硝酸银 (μL)	1000	500	500	500	500
氢氧化钠 (g)	3	0.5	0.5	0.5	0.5
四硼酸钠 (g)	0	0.019	0.019	0	0
甲醛 (μL)	500	400	400	400	400

### 3 讨论

目前大多数的分子标记遗传连锁图谱构建、基因定位克隆、分子标记辅助育种、DNA 指纹分析等研究涉及的 PCR 扩增产物多数采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染确定, 其染色胶片的质量对条带的准确统计、结果分析非常重要。若胶片背景模糊、条带不易辨别判断, 很容易导致统计结果错误, 进而影响分析结果的准确性。此外, 传统的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法操作繁琐、耗时费力、成本高、效率低, 难以大批量操作, 不利于进行大规模批量样品材料分析或育种材料选择, 影响实验进展。因此, 实验室对非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳常规银染方法进行改进, 筛选出在不影响染胶效果的基础上可进行大批量银染、大幅度降低实验成本的银染方法。

研究结果表明, 5 种非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法中银染改进方法二和银染改进方法三的染色胶片背景较为模糊、带型不易辨别, 不宜采用。常规银染方法、银染改进方法一和银染改进方法四的染色胶片背景清晰、条带清楚易于辨别, 但常规银染方法的操作繁琐、消耗试剂多、成本高, 而银染改进方法一比银染改进方法四有增加了四硼酸钠的使用。因而, 研究认为, 银染改进方法四是最佳的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法, 具有操作简便、实验成本低、胶片背景清晰、条带清楚等特点,

值得推广。

为加快实验进程、提高工作效率, 在实际操作过程中, 实验室习惯采用批量银染方法, 即每批次可染胶 2 ~ 20 块, 可大幅度提高染胶效率。本实验室常用的批量银染方法是, 采用上述的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染改进方法四, 当染胶数量为 10 ~ 20 块时, 试剂和染色液的用量均减半, 即只需按染胶数量的一半来配制染色液数量。如要染胶 10 块, 则只需配制 5 块胶的染色液数量 500 mL 即可满足需要, 而染胶效果基本不受影响。因此, 批量银染可大幅度节约试剂、降低成本、缩短时间、加快实验进度, 提高实验效率, 取得事半功倍的效果。

### 参考文献

- [1] 王凤格, 赵久然, 郭景伦, 等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12 (5): 606-607.
- [2] 宋显军, 张伟, 曹萍, 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] 关海涛, 徐世昌, 郭玉华. 两种聚丙烯酰胺凝胶银染方法的比较 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37 (1): 86-87.
- [4] 梁宏伟, 王长忠, 李忠, 等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立 [J]. 遗传, 2008, 30 (10): 1379-1382.
- [5] 胡建斌, 李静, 袁鸣, 等. PAGE 凝胶制备方法和银染

## · 栽培技术 ·

## 特优 107 高产栽培模式及其应用效果

赵建文<sup>1</sup>, 李丰<sup>1</sup>, 陈国平<sup>2</sup>, 陈志彬<sup>1</sup>, 郭福泰<sup>1</sup>

(1. 福建省漳州市农科所, 福建漳州 363005 ; 2. 漳州市农业局, 福建漳州 363000)

摘要: 主要阐述了特优 107 的高产栽培模式及其在龙海、漳浦两县(市)的应用效果, 并介绍其主要栽培技术。

关键词: 特优 107 ; 栽培模式 ; 应用

中图分类号: S511.048 文献标识码: A 文章编号: 1008 - 9799 (2015) 03 - 0008 - 03

## Introduction and Popularization of Teyou107 with High Yield Cultivation Model in the Demonstration Plots

ZHAO Jian-wen<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, CHEN Guo-ping<sup>2</sup>, CHEN Zhi-bin<sup>1</sup>, GUO Fu-tai<sup>1</sup>

(1. Institute of Zhangzhou Agricultural Sciences, Zhangzhou, 363005;

2. Zhangzhou Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, 363000)

Abstract: The introduction and popularization of Teyou 107 in the demonstration plots in Longhai and Zhangpu, which gained high yield and good economic benefit. In this paper, we introduced planting performance and high-yielding cultivation techniques of Teyou107.

Key words: Teyou107; cultivation model; application

杂交水稻要获得较高的产量和效益, 是根据每个品种特定的高产目标制定相应的配套栽培技术措施。好的品种其栽培技术不配套, 就会影响优良种性的显现, 要实现与良种良法相配套, 其重点在于抓好栽培技术的推广与应用<sup>[1]</sup>。它的目的是发挥优势、扬长避短, 提高产量和品质。俗话说“三分种七分管”, 良种良法, 由于各地农业生态条件和生产条件以及品种类型、熟期均不同, 因此各个品种必须要有相应的栽培技术。创新栽培技术就是为水稻杂种优势的发挥提供有利的技术支撑, 才能发挥出生产潜能。

杂交水稻新品种特优 107 是漳州市农科所选育, 于 2012 年通过福建省农作物品种审定委员会审定的优质、高产、稳产杂交水稻新品种。为了更好地加速科技成果转化, 发挥特优 107 的增产优势, 2013 年笔者承担了漳州市科技计划专项“优质杂交稻特优 107 高产栽培模式研究与推广”项目 (ZZ2013040), 通过多因子栽培技术研究, 摸索

收稿日期: 2015 - 04 - 02

基金项目: 漳州市科技计划专项 (ZZ2013040)

作者简介: 赵建文 (1965 -), 男, 高级农艺师, 研究方向: 水稻育种及栽培

方法的改进 [J]. 江西农业大学学报. 2009, 31 (4): 742-745.

[6] 高东, 杜飞, 朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法 [J]. 遗传, 2009, 31 (6): 668-673.

[7] 蔡辉儒, 李忆, 蒲志刚, 等. 一种简易银染程序的确定与优化 [J]. 湖南农业科学, 2009 (1): 46-48.

[8] 王竹林, 杨睿, 刘联正, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染的影响因素 [J]. 实验室研究与探索, 2011, 30 (9): 15-17.

[9] 靳容, 后猛, 马代夫, 等. 甘薯 AFLP 扩增产物的

PAGE 胶快速银染法 [J]. 江苏农业科学 2013, 41 (2): 30-32.

[10] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法 [J]. 分子植物育种, 2003, 1 (3): 381-394.

[11] 王丰, 李金华, 柳武革, 等. 一种水稻香味基因功能标记的开发 [J]. 中国水稻科学, 2008, 22 (4): 347-352.

[12] 王兰, 龙云铭, 刘耀光. 一种用于 PCR 的植物基因组 DNA 快速制备方法 [J]. 分子植物育种 2009, 7 (2): 425-428.