

满天星基因组 DNA 提取及 RAPD 扩增条件优化

曹天旭, 吴松权, 廉美兰, 朴炫春

(吉林省延边大学农学院园艺系, 龙井 133400)

摘要:以满天星试管苗叶片为材料, 进行满天星基因组 DNA 提取及 RAPD 扩增条件优化。结果表明, 采用 CTAB 法提取的 DNA 质量较高, 适宜于 RAPD 分析; RAPD 扩增最佳反应体系为 $25\mu\text{L}$: $14.17\mu\text{L}$ ddH₂O, $150\mu\text{mol/L}$ dNTP, $1.5\mu\text{mol/L}$ MgCl₂, $2.5\mu\text{L}$ Buffer, $0.3\mu\text{mol/L}$ 引物, 10ng DNA 模板, 1U TaqDNA 聚合酶。扩增反应程序为: 94°C 预变性 5min , 94°C 变性 1min , 36°C 退火 1min , 72°C 延伸 1.5min ; 45 个循环; 最后 72°C 延伸 7min 。

关键词:基因组 DNA; 优化; 扩增产物; 条带

中图分类号: S681.903.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2007)02-0146-04

满天星(*Gypsophila elegans* L.), 又名霞草, 是石竹科石竹属的植物^[1]。原产小亚细亚一带。满天星茎部直立, 散状分枝, 叶似披针, 叶色粉绿, 花呈圆锥状聚伞花序, 花朵小而繁多, 白色, 略带清香, 盛开时细如豆粒的白花, 宛如天空繁星点点, 具有素雅、圣洁、朦胧的美感, 是著名的切花种类, 在世界切花市场上占有重要地位。

目前虽然该花的研究较多, 但主要集中在快速繁殖和组织培养方面, 从分子微观方面的研究尚未见报道。RAPD 技术是由 Williams^[2] 等于 1990 年创立的一种 DNA 分子标记技术, 它可直接反应染色体组 DNA 多态性, 能从遗传本质上揭示品种间多态性及亲缘关系, 不受环境限制, 具有操作简单快捷、成本低、通用性好、灵敏度高, 且不需预先了解基因组的相关分子生物学信息等优点而广泛应用于种质资源分析^[3]、生物种群划分、遗传相关分析、遗传图谱构建、基因定位^[4] 等方面。在利用 RAPD 技术对满天星进行遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系, 以保证 RAPD 结果的可靠性、重复性。为此, 该试验就满天星 RAPD 反应中的模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq 酶用量等因素进行了试验, 建立了稳定性好、重复性高的满天星 RAPD

反应体系, 为进一步分析满天星遗传多样性提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的满天星材料, 是由本实验室通过组织培养得到的无菌试管苗。

1.2 主要试剂及仪器

RNase、TaqDNA 聚合酶 3unit/ μL 、100 个随机引物(Operon 公司) $10\times$ Buffer、MgCl₂、 2.5mM dNTP、200bp DNA Ladder Marker、琼脂糖(西班牙分装)、CTAB、PVP、EDTA、Tris 碱。2%CTAB 提取缓冲液: 称取 10g CTAB 与 2gPVP 分别溶于 500mL (20mM EDTA, 100mM Tris-HCL (pH 8.0), 1.4M NaCl) 混合液中。TE(pH8.0) 缓冲液: 10mM Tris-HCL(pH8.0), 1mM EDTA(pH8.0)。

仪器: 新加坡产的 PCRsystem 9700, 凝胶成像系统(GDS-8000 型), 台式低温冷冻离心机(HERMLE2383 型), NU-6621W34 型超低温冰箱, 电泳仪(DYY-12 型)及各种规格电泳槽。

1.3 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取采用 CTAB 法^[5]: (1) 从培养基上取出满天星试管苗, 称取 $1\sim 2\text{g}$ 叶片放在预冷的研钵中加液氮研成粉末, 迅速装入 50mL 的离心管中, 加入 10mL 65°C 预热的 CTAB, 再加入 $200\mu\text{L}$ 的 β -巯基乙醇, 使之混匀。(2) 放在 65°C 的水浴锅中温浴 $0.5\sim 1\text{h}$ 。(3) 取出待其冷却至室温后加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 轻轻将其混匀。(4) 在 8000r/min 下离心 15min , 将上清液抽出。(5) 重复(3)、(4)的步骤一次。(6) 在上清液中加入 0.6 倍体积 -20°C 下预冷的异丙醇, 放入 -20°C 的冰箱中

第一作者简介: 曹天旭, 1980 年生, 在读硕士, 主要从事植物组织培养与生物技术方面研究。

通讯作者: 朴炫春, 1963 年生, 博士, 教授, 主要从事植物组织培养、生物技术方法的研究。

基金项目: 国家自然科学基金委资助项目, 编号: 30560094; 国家教育部重点项目, 编号: 205035。

收稿日期: 2006-08-11

30min。(7)从冰箱中取出离心管,用移液枪挑出DNA,转入1.5mL的小离心管中,用70%的乙醇漂洗3次,自然晾干DNA。(8)根据所提DNA的多少,分别在小离心管中加入不同体积的TE,放在水浴锅中溶解DNA。(9)根据所加TE的量,在小离心管中分别加入2~3 μ L的RNase,放到37 $^{\circ}$ C水浴锅中过夜,然后贮存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

1.4 电泳检测提取DNA的质量

采用DYY-12型稳压稳流电泳仪,缓冲液为TBE(p=0.7%)的琼脂糖凝胶电泳检测,电压50V(5V/cm),电泳2h。电泳结束后在凝胶成像仪下照相,并记录结果。

1.5 PCR扩增条件优化

1.5.1 DNA扩增反应程序 反应程序设置为:(1)94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性1min,36 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1.5min,45个循环最后72 $^{\circ}$ C延伸7min。反应体系为

(25 μ L):14.17 μ L ddH₂O,150 μ mol/L dNTP,1.5 μ mol/L MgCl₂,2.5 μ L 10 \times Buffer,0.3 μ mol/L 引物,10ng DNA模板,1U TaqDNA聚合酶。

1.5.2 PCR扩增体系 采用25 μ L反应体系,包括ddH₂O、dNTP、10 \times Buffer、Mgcl₂、引物、模板、Taq酶。设置DNA模板2.5、5、10、15、20、25、30、35ng 8个处理,引物浓度0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μ mol/L 6个处理,dNTP设置为50、100、150、200、250、300 μ mol/L 6个梯度、MgCl₂为0.5、1、1.5、2、2.5、3 μ mol/L 6个梯度,TaqDNA聚合酶0.25、0.5、1、1.5、2、2.5u(1u为0.33 μ L)6个梯度,退火温度设为34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 $^{\circ}$ C 10个处理。每次PCR扩增除比较因素按上述浓度梯度变动外,其他反应因子相同。通过反复对比试验找出最佳反应体系,并且每个因素3次重复进行优化条件的检验。



图1 满天星基因组总DNA电泳图谱

1.5.3 电泳检测 PCR扩增反应结束后,采用0.5 \times TBE电泳缓冲液,1.4%的琼脂糖凝胶(含0.5%EB)电泳。取10 μ L扩增产物与2 μ L电泳载体缓冲液混匀,电压为80V,电泳产物在GDS-8000型凝胶成像仪下观察,拍照。

2 结果与分析

2.1 满天星试管苗基因组DNA琼脂糖凝胶电泳分析

凝胶电泳检测如图1所示,满天星试管苗基因组DNA电泳条带较整齐、清晰,无弥散、拖尾现象,说明提取的DNA样品较纯,基本无降解和RNA污染,可用于RAPD扩增。

2.2 模板DNA含量对RAPD扩增的影响

模板DNA含量是PCR扩增的重要影响因素,含量过高会出现非特异性扩增条带甚至抑制扩增,过低则得不到所需的扩增产物。根据试验显示,只要提供足够的PCR扩增所需的模板含量,一般会得到稳定的扩增条带。如图2所示当模板DNA含量为5ng、10ng、15ng时,均能得到扩增产物,而10ng时条带更为清晰,当模板DNA含量小于5ng时,扩增的产物少,条带弱;模板DNA含量超过20ng时,出现非特异性扩增,并有弥散状背景,模板DNA含量为35ng时,没能得到扩增产物。可见,模板DNA的用

量影响RAPD的扩增,该试验中,适合满天星RAPD扩增的适宜模板含量为10ng。

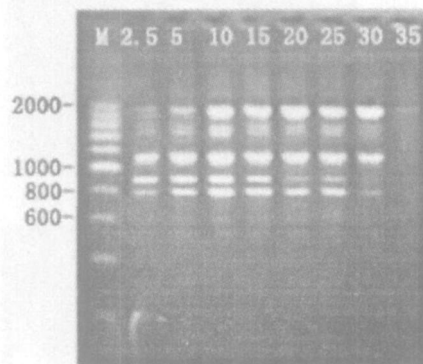


图2 模板DNA含量对RAPD扩增的影响

2.3 引物浓度对RAPD扩增的影响

RAPD反应开始时,首先必须使双链DNA解离为单链并使之与引物相结合,在TaqDNA聚合酶的催化下以引物为复制起点进行DNA链的延伸。引物浓度过低时,与模板的结合机率降低,出现扩增不足的现象;引物浓度过高时,引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体或多聚体的机会。由图3可见随着引物浓度增加,扩增得到的条带数随着增加,当引物浓度为0.3 μ mol/L时,扩增条带数比较多,且清晰,随着浓度的升高条带变得模糊,非特

异性扩增增多。

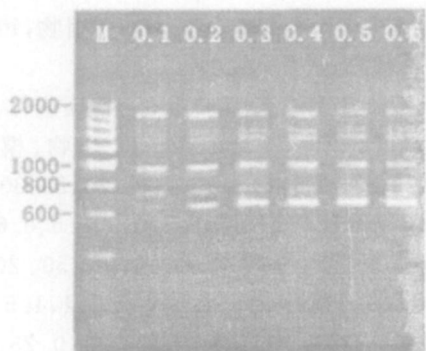


图3 引物浓度对 RAPD 扩增的影响

2.4 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响

dNTP 是 PCR 的原料, 浓度太高产生错误掺入, 浓度太低产率太低^[6]。该试验采取 6 种不同浓度的 dNTP, 由图 4 可以看出, 当 dNTP 小于 $100\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增信号明显减弱; 当 dNTP 为 $250\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增产物较少且条带较弱; 而 dNTP 用量为 $300\mu\text{mol/L}$ 时, 未扩增出条带; 只有用量为 $150\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增产物条带多而且清晰, 因此, 试验采用的 dNTP 浓度为 $150\mu\text{mol/L}$, 作为 PCR 扩增的最佳浓度。

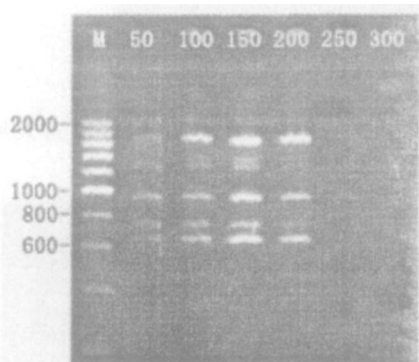


图4 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响

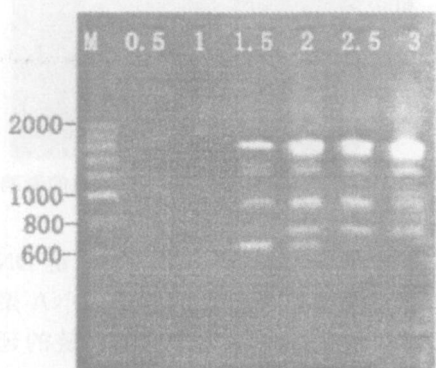


图5 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增的影响

2.5 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增的影响

Mg^{2+} 影响引物和模板的双链杂交体的解链和退火温度, 确定扩增体系的最佳 Mg^{2+} 的浓度对 PCR 至关重要^[7]。试验设置了 6 个不同浓度水平。由图

5 可见, 当 Mg^{2+} 浓度小于 $1\mu\text{mol/L}$ 大于 $2\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增出来的条带数少, 模糊且亮度不够; Mg^{2+} 浓度在 $1\sim 2\mu\text{mol/L}$ 时扩增效果较好, 而扩增条带的明亮度、清晰度和稳定性都以 $1.5\mu\text{mol/L}$ 最佳, 故最终选择的 Mg^{2+} 浓度为 $1.5\mu\text{mol/L}$ 。

2.6 Taq DNA 聚合酶用量对 RAPD 扩增的影响

在 PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶用量受到反应体积、酶活性、酶的耐热性及反应程序等因素的影响^[8-11]。为了确定满天星 RAPD 反应中 Taq DNA 聚合酶的适宜用量, 试验选择 6 个酶梯度, 结果表明 (图 6) Taq DNA 聚合酶用量在 $0.5\sim 2\text{U}$ /反应范围内扩增结果差异不大, 经多次重复比较试验确定 1U /反应为满天星 RAPD 扩增的最适用量。

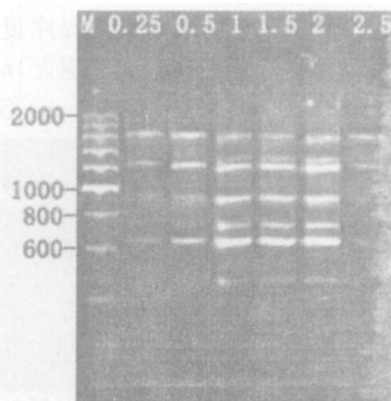


图6 TaqDNA 聚合酶用量对 RAPD 扩增的影响

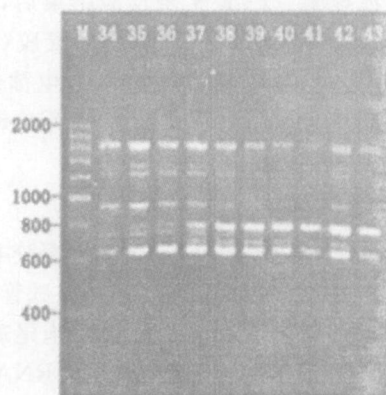


图7 退火温度对 RAPD 扩增的影响

2.7 退火温度对 PCR 扩增体系的影响

退火温度是影响 RAPD 反应最重要的条件之一, 同时它也具有相对的灵活性, 是优化 RAPD 反应的重要控制措施^[12]。在上述试验因子的最适条件下, 对退火温度作单因子试验。设置了 10 个梯度温度, 依次为 34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 $^{\circ}\text{C}$, 结果如图 6。从图 6 结果分析, 试验的退火温度在 $35^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ 较为适宜, 谱带清晰且数目较多。退火温度较低, 能保证引物与模板的稳定配对, 同时允许适当的错配, 以扩大引物在基因组 DNA 中配对的随机性。温度过高 (40°C), 扩增条带减少、变弱, 扩增效率低。

在保证扩增效率的同时又要达到增强特异性的目的,我们认为 36℃较适宜。

3 讨论

3.1 满天星基因组 DNA 的提取

DNA 提取质量往往是 RAPD 扩增成功与否的关键,试验采用的满天星材料是无菌的试管苗,叶片新鲜,积累的次生物质少,同时又在提取液中加入抗氧化剂如 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、 β -巯基乙醇,从而有效地避免了酚类物质氧化,蛋白质污染,糖类、色素等物质干扰,提取的 DNA 质量较高。

3.2 PCR 体系的优化

RAPD 反应涉及诸多因子,任何一种因子不适宜都会明显影响整个扩增反应的结果。首先,模板 DNA 的纯度及数量对反应有重要影响,模板的纯度不高,残留在模板中的蛋白质、酚类等成分都会使 DNA 与引物的结合效率降低,造成非特异性扩增或无扩增条带,或扩增产物不稳定,造成扩增产物电泳过程中的弥散现象^[13,14]。其他几个因子对 PCR 的作用也是非常重要的,只有在所有因素都适合时,才能扩增出较好的产物。

通过对比优化试验,建立了满天星的 RAPD-PCR 最佳反应体系,即反应体系为(25 μ L): 14.17 μ L ddH₂O, 150 μ mol/L dNTP, 1.5 μ mol/L MgCl₂, 2.5 μ L Buffer, 0.3 μ mol/L 引物, 10ng DNA 模板, 1U TaqDNA 聚合酶。反应程序为: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 36℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min; 45 个循环; 最后 72℃延伸 7 min。为进一步进行满天星种质资源的 RAPD 分析及其亲缘关系、

遗传多样性研究提供了可靠的试验依据。

参考文献:

- [1] 沈宁东. 满天星试管正常苗与玻璃苗叶片解剖结构的比较[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2003, 3: 45-47.
- [2] 陈桂信, 潘东明, 吕柳新. 果树 DNA 分子标记及基因工程若干研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1): 44-50.
- [3] 陈桂信, 潘东明, 吕柳新. 果树 DNA 分子标记及基因工程若干研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1): 44-50.
- [4] 赵妹华, 王富德, 杨立国, 等. 不同玉米品种 RAPD 检测初报[J]. 国外农学: 杂粮作物, 1998, 18(14): 6-8.
- [5] 林加涵, 魏文玲, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 100-102.
- [6] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 40.
- [7] 黄永芳, 杨懋勋, 柳军, 等. 广东野百合 DNA 提取和 RAPD 条件的优化[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(3): 251-255.
- [8] Kaya Z. Utility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Mapping in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* Ten.)[J]. Silvae Genetica, 1995, 44: 110-116.
- [9] 汪小全, 邹喻萍, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学(c辑), 1996, 26(5): 436-441.
- [10] 李宽钰, 黄敏仁, 杨自湘, 等. 青杨的遗传分析[J]. 植物学报, 1997, 39(8): 753-758.
- [11] Wei J.Z. Genetic variability in Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1994, 44: 117-125.
- [12] 盛丽, 王蒂, 司怀军. 当归 RAPD 反应条件的优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 591-595.
- [13] 陈桂信, 潘东明, 吕柳新, 等. 果树核 DNA 提取, 目的基因分离与克隆技术研究进展[J]. 福建农林大学学报, 2002, 31(3): 44-49.
- [14] 张娟, 张道远, 尹林克. 刚毛桂基因组提取和 RAPD 反应条件探索[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 253-256.

Genomic DNA Extraction and Optimization of RAPD Amplifying Conditions of *Gypsophila elegans* L.

CAO Tian xu, WU Song quan, LIAN Mei lan, PIAO Xuan chun

(Department of Horticulture, Agriculture College of Yanbian University, Longjing 133400)

Abstract Used fresh leaves of *Gypsophila elegans* L. as materials. The method of genomic DNA extraction and the optimization of RAPD analytic conditions were studied in *Gypsophila elegans* L. The result showed that the high quality genomic DNA was obtained by the CTAB method. The optimal PCR system for RAPD analysis was as follows: 14.17 μ L dd H₂O, 150 μ mol/L dNTP, 1.5 μ mol/L Mg²⁺, 2.5 μ L Buffer, 0.3 μ mol/L random primer, 10ng template, 1U Taq polymerase in 25 μ L reaction system. The program of amplifying reaction was as follows: After pre denaturing at 94℃ for 5 min, under the condition of denaturing at 94℃ for 1 min, annealing at 36℃ for 1 min, extension at 72℃ for 1.5 min, amplifying for 45 cycles, and extension at 72℃ for 7 min at last.

Key words: Genomic DNA; Optimization; Amplification products; Bands