

李属植物 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化

陈 蕾, 曹后男, 宗成文, 朴日子, 肖佳丽

(延边大学 农学院园艺系, 吉林 龙井 133400)

摘要:以 1 号李, 6 号李和公主红为试材, 对李属植物 DNA 提取方法进行改良并进行 RAPD 反应体系的优化。结果表明:改良 CTAB (3%)法提取的 DNA 产量高, 可满足 RAPD 扩增的需要。25 μ L 反应体系中, DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA 和 dNTPs 5 种主要成分的适宜浓度或用量分别是: 1.0 U、2.0 mmol/L、10 pmol/L、20 ng 和 1.0 mmol/L。

关键词:李; DNA 提取; RAPD; 优化

中图分类号:S 662.3; Q 523 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)08-0172-04

李, 蔷薇科李属 (*Prunus* L.) 植物, 是一类具有重要经济价值的果木, 在全世界都有广泛的栽培。该属大约有 30 余种, 分布于北半球气候温和的地带, 其中我国有 8 种和 4 个变种, 中国是李属植物的起源中心和分布中心之一。

分子标记技术以其简单、快捷、实用等优势而成为植物遗传育种领域研究的有力工具之一, 提取到适用于扩增的 DNA 样品是该技术成功运用的前提。不同植物或同种植物的不同组织, DNA 的提取存在差异, 从富含多糖、多酚和其他次生物质的果树叶片中提取 DNA 的难度大于大多数的禾谷类及蔬菜作物, 原因是在提取 DNA 过程中这些次生物质与 DNA 共沉淀, 形成黏稠的胶状物而难以溶解或产生褐变, 而且次生物质会严重抑制 Taq DNA 聚合酶的活性而影响扩增的效果^[1]。李属植物叶片基因组 DNA 的提取已有一些研究^[2,3], 最初参照这些方法提取李属植物叶片基因组 DNA, 但提取的效果均不甚理想。后通过改良乔玉山^[4]等人的方法, 筛选出获取高质量 DNA, 可用于 RAPD 反映的 DNA 提取方法, 并建立李属植物 RAPD 反应体系。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为 1 号李、6 号李和公主红均取自珲春特产局, 于 6 月上旬采集完全展开的幼嫩叶片, 装入保鲜袋封口, 置于样品贮藏箱(由超低温冰袋维持冷藏条件)中带回实验室, -70°C 保存待用。

第一作者简介: 陈蕾(1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为园艺植物组织培养与生物技术。E-mail: chenleisofia@yahoo.com.cn.

通讯作者: 曹后男。E-mail: hncao@ybu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560091); 延边大学教育基金会及延边大学农学院研究生创新基金资助项目。

收稿日期: 2008-02-23

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 DNA 的提取采用 CTAB 法^[5]、改良 CTAB 法和 SDS 法。①称取 0.2~0.3 g 叶片放在预冷的研钵中加液氮研成粉末, 研磨过程中取 1 g 迅速装入 1.5 mL 的离心管中, 放入提取缓冲液(0.4 mmol/L 葡萄糖), 充分混匀后在 4°C 下 10 000 r/min 离心 10 min 移去上清液, 在叶片中加入 700 μ L 65°C 预热的裂解缓冲液。A: CTAB (2%), B: SDS, C: 改良 CTAB (CTAB 的浓度增至 3%)之后再加入 20 μ L 的 β -巯基乙醇, 轻轻颠倒混匀。②放在 65°C 的水浴锅中温浴 0.5~1 h。每 10 min 轻轻颠倒 1 次, 使叶片充分和缓冲液反应。③取出待其冷却至室温后 10 000 r/min 离心 10 min。④将上清液移入新的离心管中, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 轻轻将其混匀。⑤8 000 r/min 离心 15 min 后, 抽取上清液。⑥重复④、⑤的步骤 1 次。⑦在上清液中加入 0.7 倍体积 -20°C 预冷的异丙醇放入 -20°C 的冰箱中 30 min。⑧从冰箱中取出离心管, 用移液枪挑出 DNA, 转入 1.5 mL 的离心管中, 用 70% 的乙醇漂洗 3 次, 自然晾干 DNA。⑨根据所提 DNA 的多少, 分别在小离心管中加入不同体积的 TE, 置于 37°C 水浴锅中溶解 DNA。⑩取 DNA 溶液 4 μ L, 在 0.7% 的琼脂糖上电泳, 检测 DNA 浓度及纯度。检测后的 DNA 置于 -20°C 长期保存。此外, 还对比较珍惜的材料进行 DNA 残留叶片进行第二次提取, 即在步骤②之后, 在残余的叶片样品中再次加入裂解缓冲液。重复步骤②~⑩。

1.2.2 DNA 浓度和纯度的检测 采用紫外吸收检测和凝胶电泳检测。在 752 型紫外分光光度计上测定在波长为 260 nm 和 280 nm 处吸光光度值, 根据 OD260/OD280 光吸收比值和通过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以 HindIII 为 maker, 推算 DNA 分子的大小。

1.2.3 RAPD 反应成分用量 首先确立基本反应条件, 即 PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中含模板 DNA 20 ng, 引

物 20 μmol , dNTP 1.50 mmol/L, MgCl_2 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 unit, $10\times$ 反应缓冲液 2.5 μL , 其余以重蒸馏水补充至 25 μL 。以此为基本反应条件, S_{118} 、 S_{17} 、 S_{125} 为引物对反应体系中的模板 DNA、引物、dNTPs、 MgCl_2 、TaqDNA 聚合酶分别设置不同浓度梯度进行优化并确定最适用量。

表 1 RAPD 反应体系中 5 种成分的用量

| 浓度 梯度 | MgCl_2 /mmol \cdot L $^{-1}$ | Taq DNA 聚合酶 U | 引物 / μmol | 模板 DNA / ng | dNTPs /mmol \cdot L $^{-1}$ |
|----------|--|---|-------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0.5 | 0.5 | 5 | 10 | 0.5 |
| 2 | 1.0 | 1.0 | 10 | 20 | 1.0 |
| 3 | 1.5 | 1.5 | 20 | 30 | 1.5 |
| 4 | 2.0 | 2.0 </td <td>30</td> <td>40</td> <td>2.0</td> | 30 | 40 | 2.0 |
| 5 | 2.5 | 2.5 | 40 | 50 | 2.5 |

1.3 PCR 程序与参数

PCR 反应在 Eppendorf PCR 仪上进行, 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 共循环 40 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.4 PCR 产物检测

PCR 扩增反应结束后, 采用 0.5 \times TBE (pH=8.2) 电泳缓冲液, 1.4% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5% EB) 电泳。取 10 μL 扩增产物与 2 μL 电泳载体缓冲液混匀, 5 V/cm 恒压下电泳 2 h, 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 不同提取方法的 DNA 检测结果

DNA 样液琼脂糖凝胶电泳分析图谱见图 1, 从中可以看出, 3 种提取方法均提出了较完整的基因组 DNA。从图 1 还可以看出, 虽然加样量均为 4 μL , 但 DNA 主带的亮度明显不同, 改良 CTAB 法 (3%) 和 CTAB 法较 SDS 法的条带的亮度明显亮, 这也说明前 2 种方法产率较高。另外, 以第 1 次提取后的残叶做为试验材料进行 DNA 的 2 次提取。结果表明, 改良 CTAB 法 (3%) 和 CTAB 法残叶提取的 DNA 质量和第 1 次的叶片提取的 DNA 相比产率无明显差异或是更高, 此方法可以用来提取材料较少的样品的基因组总 DNA。从 DNA 纯度和产率两方面综合考虑, 改良 CTAB 法 (3%) 是该试验筛选出的李叶片基因组 DNA 提取的适宜方法, 用该方法提取其他李品种叶片基因组的 DNA, 经检测 OD260/OD280 值均在 1.7~1.9 之间, 说明提取的 DNA 纯度高、完整性好, 完全满足扩增对 DNA 质量的要求。

2.2 模板浓度的筛选

试验所设定的模板 DNA 用量对 RAPD 反应影响不大 (如图 2), 引物为 S_{17} DNA 用量在 10~50 ng 范围内均能扩增出比较清晰的条带, 且效果没有太大的差别, 扩增条带基本一致, 综合考虑, 选用 20 ng 为试验筛选出的适宜模板 DNA 的用量。

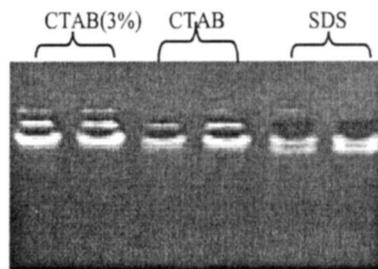


图 1 3 种提取方法 DNA 电泳图谱的表现

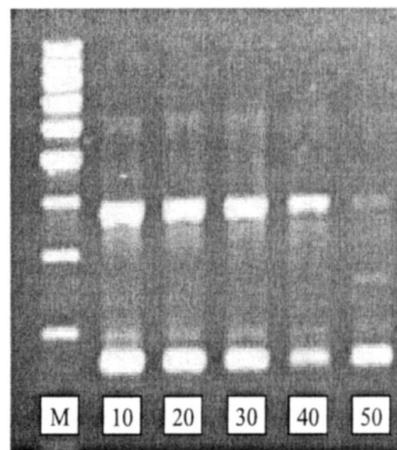


图 2 模板 DNA 浓度对 1 号李 RAPD 扩增效果的影响 (引物 S_{17})

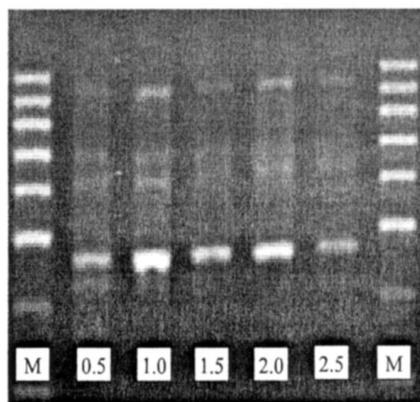


图 3 dNTP 浓度对 1 号李 (引物 S_{125}) RAPD 扩增效果的影响

2.3 dNTPs 浓度筛选

以 1 号李 DNA 为模板, S_{125} 为引物, 将 5 个浓度梯度的处理进行扩增。dNTPs 作为 PCR 反应的原料参与新链 DNA 的合成过程, 对循环数、产物扩增的量均有较大的影响。浓度过低, 偶然性大, 无扩增产物或扩增产物不稳; 浓度过高则会导致聚合酶错误掺入, 影响扩增的特异性和精确性。试验结果表明, dNTPs 浓度为 0.5 mmol/L 时扩增的条带不清晰, 当浓度达到 1.0~2.0 mmol/L 时扩增条带清晰, 2.5 时缺失部分条带, 为了节约成本, 选择 dNTPs 1.0 mmol/L 为最适宜。

2.4 TaqDNA 聚合酶浓度筛选

以 1 号李 DNA 为模板, S_{118} 为引物进行 5 个处理的扩增。Taq DNA 聚合酶浓度对 RAPD 反应影响很大。当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 时扩增的部分小片段条带缺失, 当用量为 1.0 U 和 1.5 U 时扩增出的条带清晰, 且二者之间无明显差异。用量为 2.0 U 和 2.5 U 时带型变得模糊, 综合考虑扩增结果和成本, 该试验选用 1.0 U 为适宜的 Taq DNA 聚合酶用量。

2.5 $MgCl_2$ 浓度筛选

$MgCl_2$ 是 PCR 反应的一个重要影响因子, 它不仅影

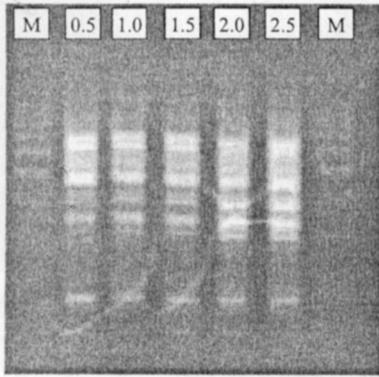


图 4 Taq DNA 聚合酶浓度对 1 号李(引物 S_{118}) RAPD 扩增效果的影响

响扩增的真实性及产物的特异性, 而且可能影响酶活性、酶准确性、引物的退火温度、引物二聚体的形成等诸多方面, 确定 Mg^{2+} 最佳浓度至关重要。 Mg^{2+} 浓度过低时, Taq DNA 聚合酶有所失活; 过高时, 则会使引物的错配频率增加。以 1 号李 DNA 为模板, S_{125} 为引物进行扩增。由试验结果可以看出, Mg^{2+} 的浓度为 0.5 mmol/L 到 1.5 mmol/L 时不产生扩增条带或缺失条带, 随浓度的增大, 扩增条带明显增加, 当 Mg^{2+} 的浓度为 2.0 mmol/L 时条带清晰, 故为该试验筛选出的适宜的用量。

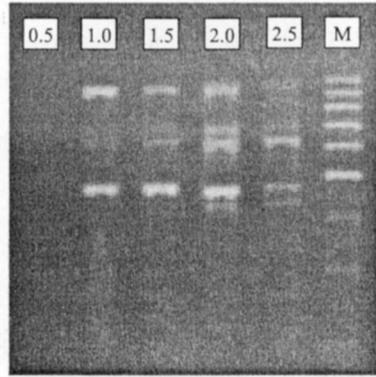


图 5 $MgCl_2$ 浓度对 1 号李(引物 S_{125}) RAPD 扩增效果的影响

2.6 引物浓度筛选

引物的浓度主要影响 RAPD 扩增条带的出现和强度, 当模板 DNA 浓度一定时, 引物浓度决定着扩增效率与扩增片段的大小。引物浓度过高, 就会过量扩增小片段 (< 500 bp); 而浓度太低, 大的片段很容易被

反复扩增。以 DNA 1 号李为模板, S_{125} 为引物进行扩增。引物浓度为 5 μ mol 时扩增条带少, 10 μ mol 时扩增的条带清晰, 当浓度达到 20 μ mol 和 30 μ mol 时部分大分子量的带缺失。因此, 该试验以 10 μ mol 的引物量为最适值。

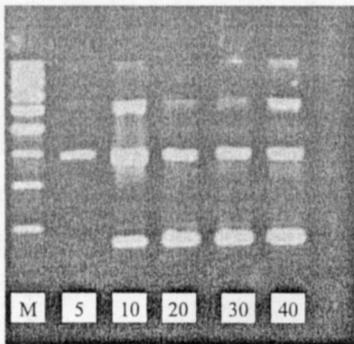


图 6 引物浓度对 1 号李(引物 S_{17}) RAPD 扩增效果的影响

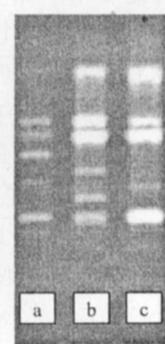


图 7 优化后的反应体系对 1 号李(a), 6 号李(b), 公主红(c) 扩增效果的影响(引物 OPE20)

2.7 优化后反应体系的扩增效果

采用优化后的反应体系, 用引物 OPE20 对 1 号李、6 号李和公主红进行扩增。可以看出, 扩增谱带清晰, 重复性好, 这说明优化后的反应体系适于李属植物的 RAPD 反应。

RAPD 分析的稳定性和重复性一直是国内外研究者关注的问题, 建立相对稳定的 RAPD 反应体系是该技术应用的基础。关于 RAPD 优化反应体系的建立在许多物种上均有报道, 但不同物种之间反应体系存在一定差异。Taq DNA 聚合酶用量是重要的因子, 它直接影响多态性的检出率和扩增结果的重复性及忠实性。该试

3 讨论与结论

验的结果同样呈现出上述特点。Mg²⁺ 度是影响 DNA 聚合酶活性的主要因子, 不同物种对 Mg²⁺ 浓度的要求不同, 从已有的报道看, Mg²⁺ 浓度范围大多在 1.5~3.0 mmol/L 之间, 也有高达 7.5 mmol/L 的报道。该试验结果是 2.0 mmol/L 时扩增产物较清晰。一般认为模板 DNA、引物和 dNTPs 等 3 种因素适宜用量的范围较宽, 该试验结果也印证了这一点。

综上所述, 影响 RAPD 反应的因素很多, 每个环节的操作不当均可影响扩增结果的不可重复。通过建立优化的反应体系, 可获得稳定的结果。改良 CTAB 法 (3%) DNA 提取效果较好, 残叶提取 DNA 的产率较好于第一次叶片或无明显差异, 此方法可用于珍惜材料 DNA 提取。

该试验所筛选出的李属植物 RAPD 反应体系为模

板 DNA 的用量 20 ng, dNTPs 1.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶用量 1.0 U, Mg²⁺ 的浓度为 2.0 mmol/L, 引物量 10 pmol 时条带清晰, 扩增结果稳定。

参考文献

- [1] 邹喻苹, 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: 68-107.
- [2] 张俊卫, 包满珠, 陈龙清, 梅, 桃, 李, 杏, 樱的 RAPD 分析[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 12-15.
- [3] 沈向, 郑学勤, 任小林, 等. 核果类基因组 DNA 提取和 RAPD 条件的优选[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(2): 154-160.
- [4] 乔玉山, 章镇. 中国李基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2004, 22(2): 138-142.
- [5] 姜玲, 蔡礼鸿. 一种提取银杏中 DNA 的方法[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 340-342.

DNA Extraction on *Prunus* and Optimal Reaction System of RAPD

CHEN Lei, CAO Hou-nan, ZONG Chen-wen, PIAO Ri-zi, XIAO Jia-li

(Agricultural College of Yanbian University, Horticulture Department, Longjing, Jilin 133400, China)

Abstract: Used Number 1 plum, Number 6 plum and Gongzhuhong as the materials, improved DNA extraction on *Prunus* plant and optimal reaction system of RAPD. The results showed that: modified CTAB (3%) method was the better way based on quantity of genomic, could be used for RAPD analysis. The optimum concentration of five important components i.e. Taq DNA polymerase, Mg²⁺, primer, template DNA and dNTPs in 25 μL RAPD reaction system were 1.0U, 2.0 mmol/L, 10 pmol/L, 20 ng and 1.0 mmol/L.

Key words: Plum; DNA extraction; RAPD; Optimal

转基因食品安全吗?

基因是控制生物性状的最基本单位, 记录着生物生殖繁衍的遗传信息。通过修改基因能改变一个有机体的部分或全部特征。转基因食品就是移动动植物的基因并加以改变, 制造出具备新特征的食品种类。譬如利用生物技术将某些动物的基因转移到其它物种上去, 通过改造生物的遗传组织, 使其出现原物种原来并不具备的特征, 这些转变可以按照人类所需要的目标来完成。

转基因食品是从实验室中走出来的, 是人工制造出来的。在讲究自然、生态、健康消费热潮的今天, 转基因食品被不少人视为“异类”, 把它打入“冷宫”, 可以说转基因食品的安全性倍受人们的质疑。

目前美国 60% 以上的加工食品都是以转基因农作物为原料。美国公众接受转基因食品的程度也最高, 民意测验显示, 大多数美国人接受并采用利用生物技术生产的粮食和食品。66% 的法国人认为转基因食品对人体健康有害, 在英国也只有 14% 的人接受转基因食品, 大多数消费者对转基因食品的安全性持怀疑态度。从

目前的情况看, 转基因产品确实有些方面还说不清楚。比如, 食品安全方面有一些让人怀疑的地方。虽然自从美国第一批转基因西红柿上市以来, 全球约有 2 亿多人食用过数千种转基因食品, 5 年多来尚未报道过一例食品安全事件; 我国进口转基因大豆较多, 据估计约有一半的大豆色拉油中含有转基因成分, 没有出现任何问题, 但国外的有些报道仍然值得关注。据英国媒体报道, 英国一位研究人员在电视节目中公布了他的实验成果: 用转基因马铃薯饲养大鼠, 引起了大鼠器官的生长异常, 体重减轻, 免疫系统遭到破坏。这件事情, 虽然后来被英国皇家学会组织的专门评审中定调为共有 6 项缺陷, 但仍然引起了人们对转基因食品的怀疑。其实根据国际通行的生物安全评价办法, 按照转基因生物对人类、动植物、微生物和生态环境的危害程度, 农业转基因生物可分为 4 个等级。即安全等级 I (尚不存在危险); 安全等级 II (具有低度危险); 安全等级 III (具有中度危险); 安全等级 IV (具有高度危险)。可见, 对转基因食品的安全措施是有的, 只要坚持“预先防范”的原则, 是完全可以确保转基因食品安全的。