

辣椒基因组 DNA 提取及 RAPD-PCR 体系的优化

宗宪春^{1,3}, 谢立波², 郭亚华², 李景富³, 张永乐¹

(1. 牡丹江师范学院 生物系, 黑龙江 牡丹江 157012; 2. 黑龙江省农业科学院 园艺分院 哈尔滨 150069; 3. 东北农业大学 园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要:以改良的 SDS 法提取辣椒基因组 DNA, 利用正交设计优化辣椒 RAPD-PCR 反应体系中几个重要成分的浓度, 建立了辣椒基因组适用的简单、稳定和重复性较好的 RAPD-PCR 反应体系。

关键词:辣椒; DNA 提取; RAPD; 体系
中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)07-0053-03

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 技术是由 Williams 和 Welsh 等于 1990 年同时创立的一种 DNA 分子标记技术^[1,2], 因其成本低廉, 操作简单, 但能直接反映 DNA 水平上的差异, 而且不受季节和环境条件的限制, 植物的各个器官、组织和发育时期均可用于检测等优点^[3], 已在番茄、西瓜、甘蓝等作物品种鉴定与杂种纯度检验得到广泛应用, 并逐步成为探索与改良作物的主要手段之一。现以改良的 SDS 法提取辣椒基因组 DNA, 利用正交设计优化 PCR 反应体系, 取得了稳定和重复性较好的 RAPD-PCR 反应体系。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料辣椒由黑龙江省农科院园艺分院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取 总 DNA 的提取参照《植物基因工程》^[4] SDS 法并加以修改进行。具体步骤: ①称取新鲜的辣椒叶片(3~4 片真叶期)100~200 mg 用无菌水冲洗 2~3 次用灭菌滤纸吸干水分在液氮中快速研磨成粉末转入 1.5 mL EP 管中。②迅速加 700 μ L 经 65℃预热的提取缓冲液摇动使粉末充分散开加入 78 μ L 20%的 SDS 在 65℃水浴中 1 h 间隔晃动 2~3 次。③取出冷却至室温加入 160 μ L 5 mol/L 的 KAC 于-20℃冰浴 30 min。④12 000 rpm 离心 5 min 小心吸取上清液(注意不要吸起位于中间的蛋白质层必要时可适当弃去部分上清液)。⑤将上清液转入新的 EP 管中加入等体积的酚:氯仿(1:1)轻轻颠倒数次放置片刻 12 000 rpm

离心 10 min 此步骤重复 2 次。⑥吸取上清液加入等体积的氯仿:异戊醇(23:1)12 000 rpm 离心 10 min(轻轻颠倒静止 5 min 再离心)。⑦吸取上清液加入上清液 1/5 体积的 3 mol/L NaAC(pH 5.2)充分混匀加入 2.5 倍上清液体积的无水乙醇轻轻摇匀, 观察 DNA 沉淀的生成, 室温放置 10 min 10 000 rpm 离心 5 min 倾上清。⑧用 80%乙醇洗 2~3 次吹干或室温晾干, 加 20~40 μ L ddH₂O。⑨加入 3~5 μ L RNaseA 混匀并在 37℃下保温 30 min, 然后置-20℃下保存备用。

1.2.2 PCR 条件的确立 RAPD 反应条件要求严格涉及到的因素较多。试验根据正交法对 DNA 模板浓度、dNTPs、Mg²⁺ 浓度、引物浓度、TaqDNA 聚合酶浓度 5 个因素设置浓度梯度, 每个因素选定 4 个浓度水平, 设计因素水平表见表 1。选用正交试验表 L₁₆(4⁵) 安排试验, 见表 2。按表 2 加样共有 16 个处理。在美国 PE 公司生产的 PE-480 型 PCR 扩增仪上进行扩增, 反应体系为 20 μ L, 除表中所列因素外, 每管还有 10 \times PCR Buffer 2 μ L。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors level table of orthogonal design

水平 Level (终浓度 Final concentration)	因素 Factors				
	引物 Primer	dNTPs	Mg ²⁺	Taq 酶 Pb lymerase	DNA 模板 Template
	/ μ mol \cdot L ⁻¹	L ⁻¹	L ⁻¹	/U \cdot (20 μ L) ⁻¹	/ng \cdot (20L) ⁻¹
1	0.1	160	0.5	1	60
2	0.2	120	1	0.5	20
3	0.3	200	1.5	2	40
4	0.4	80	2	1.5	80

1.2.3 RAPD 扩增条件 PCR 扩增反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 36℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。

1.2.4 RAPD 产物电泳 扩增产物在 1.2%的琼脂糖凝胶上电泳分离, 溴化乙锭染色后, 在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。

第一作者简介: 宗宪春(1966-), 女, 在读博士, 副教授, 现主要从事遗传学及园林植物遗传育种学的教学和科研工作。E-mail: zongxianchun@163.com.
基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(10553101)。
收稿日期: 2009-02-15

表 2 L₁₆(4⁵) 正交试验表

Table 2 The table of L₁₆(4⁵) orthogonal design

试验号 No.	引物 Primer	因素 Factors			DNA 模板 Template
		dNTPs	Mg ²⁺	Taq 酶 Polymerase	
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

2 结果与分析

2.1 辣椒基因组 DNA 的提取

各样品的基因组 DNA 采用改良的 SDS 抽提法提取,用 0.8%的琼脂糖电泳检测(见图 1)。从图中可见 DNA 呈一条带,说明所提 DNA 具有良好的完整性,且纯度较高,可以作为 RAPD 的模板使用。

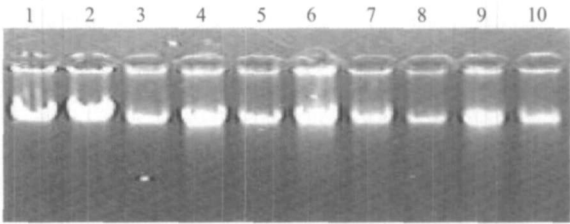


图 1 利用 SDS 法提取的 DNA (1~10 为所提取的辣椒叶片 DNA)
Fig. 1 Extracted DNA of using SDS method
(1~10 were genomic DNA of different pepper leaves)

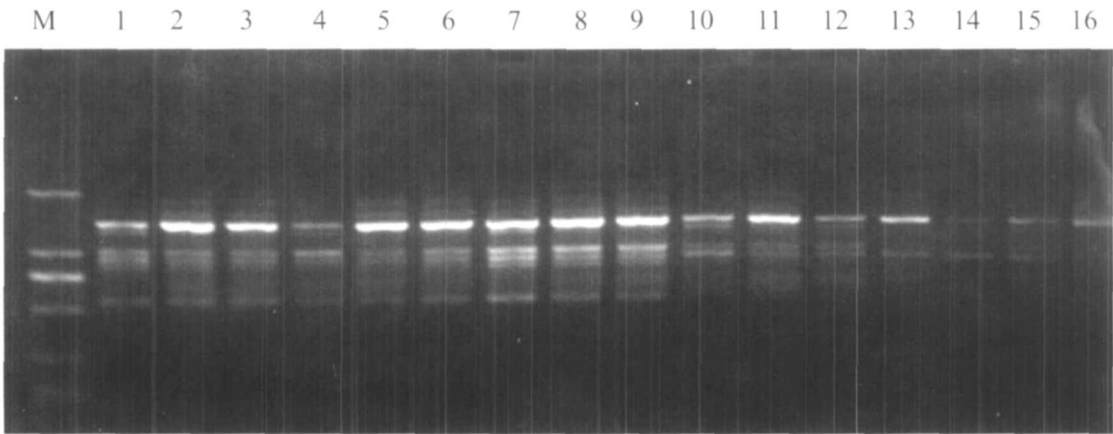


图 2 辣椒基因组 DNA RAPD-PCR 正交试验扩增结果
Fig. 2 The orthogonal design results of pepper genomic DNA RAPD-PCR

2.2 辣椒 RAPD-PCR 扩增反应体系的确立

该试验为 5 因素,4 水平试验,16 个组合,试验结果见图 2。从电泳图谱可见 16 种可能的组合中,有 13 种组合(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13)扩增出的条带非常清晰,而有的组合扩增出的条带数少,且不清晰。同时注意到,从 13 个能扩出清晰条带的组合看出,有 7 个组合扩出的 RAPD 图谱一致,但各片段的亮度在各组合中不一样。即不同组合的优势扩增片段不同。组合 2、3、5、6、7、8、9、11 的大片段(1 500 bp)呈优势扩增,而组合 7 在小片段(550 bp)有清晰条带,重复性好,该组合用于辣椒 RAPD 鉴别。该试验所采用的优化体系见表 3。

3 讨论

DNA 提取常用的方法有 SDS 法、CTAB 法、高盐低 pH 法等多种^[9]。它们的产率、DNA 纯度和降解状态均

不相同。为了保障试验结果的稳定与可靠要确保样品 DNA 的质量。在 DNA 提取的过程中,要防止 DNA 降解。如果在提取过程中 DNA 降解的多,可能会导致一些随机的扩增结果,从而对结果产生影响。辣椒 DNA 的提取以幼嫩的叶片为好,容易研磨,杂质少,产量高。

表 3 试验扩增反应体系

Table 3 Optimized extend system

成分 Component	加入量 Addition amount/ μ L
ddH ₂ O	12
10 \times Buffer 缓冲液	2
MgCl ₂	2
dNTP	0.8
引物	1
TaqDNA 聚合酶	0.2
模板 DNA	2
总体积	20

该研究采用改良 SDS 法得到的 DNA 纯度较高, 片段较大, 符合 RAPD 的要求。

已有的进行 RAPD-PCR 体系优化的报道很多, 但大多是采用简单的梯度试验的方法, 对每个因素的最佳水平进行摸索, 需要进行多次的梯度试验, 过程繁琐且不能兼顾到各因素间的交互作用。该试验采用正交法设计, 充分考虑 RAPD-PCR 反应中每个因素同时变化对反

应的影响, 通过 1 次试验就得到了最佳反应体系, 大大简化了试验过程, 节省了时间, 降低了试验成本。为今后将 RAPD 技术进一步应用于辣椒研究奠定了基础。

在辣椒种质资源亲缘关系的分析中, 选择了该试验优化的 DNA 提取方法以及 PCR 反应体系, 部分辣椒种质资源的 PCR 产物扩增电泳结果如图 3 所示。

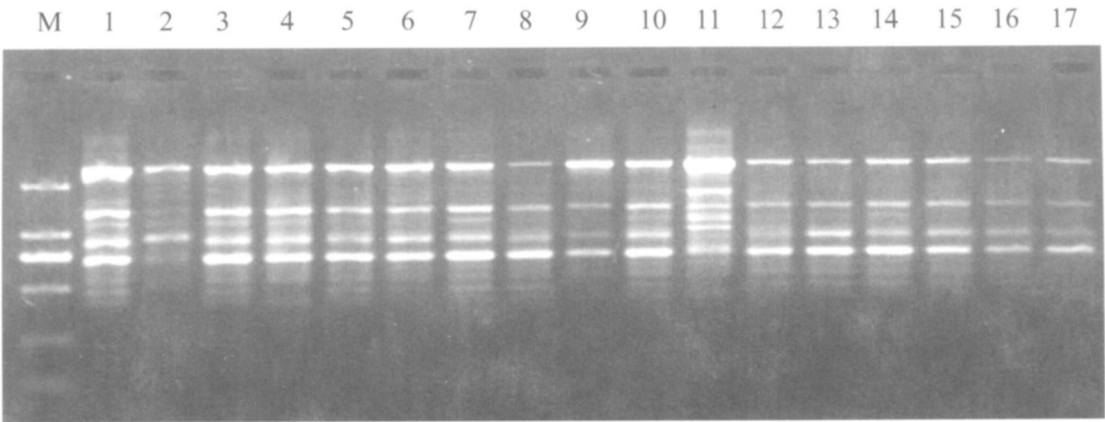


图 3 RAPD-PCR 反应体系在不同辣椒品种上的应用效果
Fig. 3 The application effect of RAPD-PCR reaction system in different pepper variety

参考文献

[1] Willimas J C K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J] . Nucleic Acids Research, 1990 22(18): 6531-6535.

[2] Welsh J . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J] . Nucleic Acids Research, 1990 22(18): 7213-7218.

[3] 刘富中. 利用 RAPD 快速鉴定甜瓜杂交种的遗传纯度[J] . 中国蔬菜, 2002(5): 7-9.

[4] 王关林 方宏筠. 植物基因工程 [M] . 2 版. 北京: 科学出版社 2002: 742-749.

[5] 曲延英, 张强 孔祥祯, 等. 4 种快速提取棉花总 DNA 方法的比较 [J] . 新疆农业大学学报 1999 22(4): 320-322.

Genomic DNA Extraction and RAPD-PCR System Optimization of Hot Pepper

ZONG Xian-chun^{1,3}, XIE Li-bo², GUO Ya-hua², LI Jing-fu³, ZHANG Yong-le¹

(1. Department of Biology, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin Heilongjiang 150069, China; 3. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Hot pepper were used to extract genomic DNA by using the improved SDS method, concentrations of several important components in RAPD-PCR conditions were optimized through the orthogonal method. RAPD-PCR system of stability and reproducibility were established.

Key words: Hot pepper; DNA extraction; RAPD; System