

硅胶干燥胡杨叶片 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立

吕 杰¹, 马 媛², 金 湘¹, 毛培宏¹, 吕光辉²

(1. 新疆大学 物理科学与技术学院 离子束生物技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆大学 资源与环境科学学院, 绿洲生态教育部重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要:以塔里木河流域胡杨(*Populus euphratica*)硅胶干燥叶片为材料,采用改进 CTAB 法提取胡杨基因组 DNA,得到满足 RAPD(Random amplified polymorphic DNA),随机扩增多态性 DNA 分析的胡杨基因组 DNA。通过单因素优化试验,得到胡杨 RAPD 分析的最佳反应体系为:40 ng 模板 DNA,0.8 U *rTaq* DNA 聚合酶,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,0.3 mmol/L dNTPs,0.5 μ mol/L 随机引物,1 \times buffer 缓冲液,ddH₂O 补足至 10 μ L。扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,38 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

关键词:塔里木河流域;胡杨;DNA 提取;RAPD 反应体系

中图分类号:Q 94-336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)14-0131-04

胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)属杨柳科(Salicaceae)胡杨亚属的木本植物,是上白垩纪—古第三纪的残遗物种。可以与具有“植物活化石”之称的银杏相媲美。它曾经广泛分布于中国西部温带、暖温带地区,而如今除柴达木盆地、河西走廊、内蒙古阿拉善一些流入沙漠的河流两岸还可见到少量的胡杨外,其余占中国胡杨林总面积近 95%的胡杨林都集中于新疆境内,其中大部分又集中于新疆南部的塔里木河流域^[1]。胡杨是我国干旱荒漠地区天然分布的唯一乔木树种,能依托自然水过程形成模型型植被,因此,是干旱荒漠区河岸林的建群种和优势种。它耐盐碱、水湿,抗干旱、风沙,具有维护分布区内的生态平衡,保障绿洲农牧业生产和为居民生活提供用材等作用,具有较高的生态、经济和社会效益,对于新疆干旱区生态系统的维持具有重要意义^[2]。

1972 年,塔里木河(以下简称塔河)下游大西海子水库建成后,上游来水基本为其所拦蓄,英苏村以下的河道近三十年无水通过,河道两侧的植被严重退化。从 2000 年 5 月开始共对下游进行了多次应急输水,这才使以胡杨为主要建群种的河岸植被逐渐恢复^[3]。目前,国内外对胡杨的研究工作多集中于其种群生态学、人工林

培育、生长特性、抗盐碱基因克隆等方面,以及胡杨响应生态输水后的生理生态指标变化监测等方面的报道^[4-9],对胡杨不同居群遗传多样性的研究较少。此外对塔河下游受到水分干扰的胡杨幼苗是否发生遗传多样性变化的研究未见报道。优化硅胶干燥胡杨叶片 DNA 提取的方法,并以此为基础建立胡杨 RAPD 反应体系,为采用 RAPD 技术分析胡杨不同居群遗传多样性差异研究,以及塔河下游水分干扰过程中萌发胡杨幼苗遗传多样性是否发生变化等研究提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料于 2009 年 4 月采自塔里木河下游阿拉干地区。取胡杨植株刚展开、生长旺盛的幼嫩鲜叶变色硅胶完全干燥后,置 20 $^{\circ}$ C 长期保存备用。

试验试剂:*rTaq* DNA 聚合酶、 λ -EcoT14 I digest DNA Marker(大连宝),RNA 酶、引物、dNTPs、DL 2000 Marker(上海生工),CTAB、Tris、氯仿、异戊醇、无水乙醇、EDTA、 β -巯基乙醇等均均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 胡杨基因组 DNA 提取 对 CTAB 法^[7]稍作改进。硅胶干燥的胡杨叶片液氮研磨后采用 CTAB 法对其基因组 DNA 进行提取,将 CTAB 法得到的 DNA 沉淀再次溶于适量 TE 缓冲液,加入 1 μ L 10 mg/mL RNA 酶 A 37 $^{\circ}$ C 保温 60 min 降解 RNA 酶,再分别用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)进行抽提,加入 1/5 体积 0.3 mol/L NaAc(pH 6.0)和 2 倍体积的冰冷乙醇—20 $^{\circ}$ C 胡杨 DNA,70%乙醇洗沉淀 2 次,室温干燥,加入适量 0.1 \times TE 缓冲液溶解沉淀,—20 $^{\circ}$ C 储存备用^[8,9]。

第一作者简介:吕杰(1978),男,新疆乌鲁木齐人,博士,讲师,现主要从事微生物基因工程制药及分子生物学和离子束生物技术相关领域的研究工作。E-mail:lvjie@xju.edu.cn。

基金项目:新疆高校科研计划青年基金资助项目(XJEDU2008S02);新疆绿洲生态重点实验室开放基金资助项目(XJDX0206-2009-06)。

收稿日期:2011-04-13

1.2.2 基因组 DNA 质量和浓度检测 琼脂糖凝胶电泳取 0.5 μL DNA 样品在 1.0 % 琼脂糖凝胶上电泳, 以 λ -EcoT14 I digest DNA Marker 为分子量标准, 100 V 恒压电泳后, 溴化乙锭染色, 于凝胶成像仪上照相。所得 DNA 稀释 400 倍后, 测定总 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 根据 A_{260}/A_{280} 值估计 DNA 纯度。

1.2.3 RAPD 反应条件优化 以 RAPD 反应体系(在 10 μL 反应体系中, 含 40 ng 模板 DNA、1.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.3 mmol/L dNTPs、0.8 U *rTaq* DNA 聚合酶、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物)及程序(94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存)为基础对 RAPD 反应体系中的随机引物浓度、 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度影响因素设置浓度梯度进行试验。

1.2.4 RAPD 扩增产物检测 将扩增产物在浓度为 1.0 % 琼脂糖胶上, 于 1 \times TAE 缓冲液中, 以 DL 2000 DNA Ladder 为分子量标准, 120 V 恒压电泳后, 溴化乙锭染色, 在凝胶成像仪上照相。

2 结果与分析

2.1 胡杨基因组 DNA 提取

胡杨叶片次生代谢产物丰富, 多糖含量很高, 这些物质往往与 DNA 共沉淀, 形成粘稠带有色素的混合物, 所以未加改进的 CTAB 法提取的胡杨总 DNA 很难适用于 RAPD 分析。采用改进的 CTAB 法提取硅胶干燥胡杨叶片基因组 DNA, 得到胡杨基因组 DNA 电泳图谱(图 1)。从电泳检测结果来看, 该方法提取的胡杨基因组总 DNA 质量较高, 在 1.0 % 的琼脂糖胶电泳上为清晰的一条带, 降解不明显, 分子量在 20 kb 左右, RNA 去除较为干净。选择降解现象不明显的胡杨基因组总 DNA 进行分光光度计检测, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值均在 1.8~2.0, 符合 RAPD 反应对模板 DNA 的要求。

2.2 RAPD 反应体系的优化

2.2.1 引物浓度对 RAPD 反应的影响 RAPD 反应体系中使用的是 10 bp 的随机引物, 又因为 RAPD 反

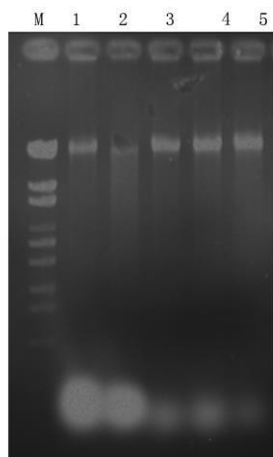


图 1 胡杨部分样品基因组总 DNA 电泳图谱

注: M 为 λ -EcoT14 I digest DNA Marker 1~5 为不同样品 DNA。

应的退火温度较低, 这样造成引物与模板 DNA 结合位点较多。引物浓度过低时, 与模板结合几率降低, 扩增受到影响; 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^[10]。设置 5 个浓度梯度, 分别为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 $\mu\text{mol/L}$ 。从图 2 可看出, 随机引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时, 未扩增出条带; 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增出的条带不清晰; 浓度为 0.5、0.6、0.7 $\mu\text{mol/L}$ 时, 均可扩增出清晰的条带。故选择随机引物浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

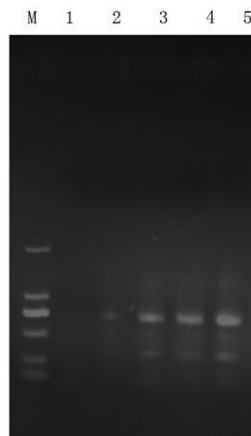


图 2 不同引物浓度的 RAPD-PCR 扩增结果

注: M 为 DL 2000 1~5 为不同引物浓度。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 反应的影响 Mg^{2+} 是热稳定 DNA 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 不足会使 *Taq* 聚合酶效率降低, 导致扩增产物减少; Mg^{2+} 浓度过高对扩增效果也不利, 会引起引物错配机率的增加。试验所用 *rTaq* DNA 聚合酶的 Mg^{2+} 工作浓度为 1.5 mmol/L, 根据相关文献报道结果^[11], 设置 4 个浓度梯度, 分别为 1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L。当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 和 2.0 mmol/L 时, 扩增条带一致清晰; 当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 和 3.0 mmol/L 时, 扩增出比低 Mg^{2+} 浓度更多的清晰条带(图 3)。经反复试验 4 种 Mg^{2+} 浓度, 在 1.5 和 2.5 mmol/L Mg^{2+} 浓度下, 扩增条带的清晰度、稳定性和重复性均较好; 2.0 和 3.0 mmol/L Mg^{2+} 浓度下, 扩增条带的重复性不好。所以最终确定 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L。

2.2.3 dNTPs 浓度对 RAPD 反应的影响 dNTPs 是作为 RAPD 反应的原料参与新链 DNA 的合成过程。试验设置 5 个 dNTPs 浓度梯度, 分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L。从图 4 可看出, dNTPs 浓度为 0.1、0.2 和 0.3 mmol/L 时, 均可扩增出条带, 但浓度为 0.1 mmol/L 时, 扩增条带边界模糊; 浓度为 0.4 和 0.5 mmol/L 时, 均扩增不出条带。故选择 dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L。

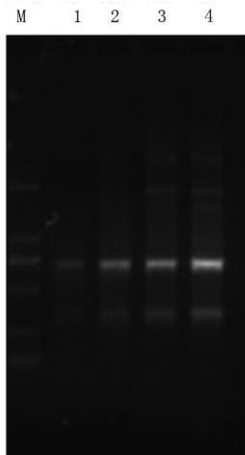


图3 不同 Mg^{2+} 浓度的 RAPD-PCR 扩增结果
注: M 为 DL 2 000, 1~4 为不同 Mg^{2+} 浓度。

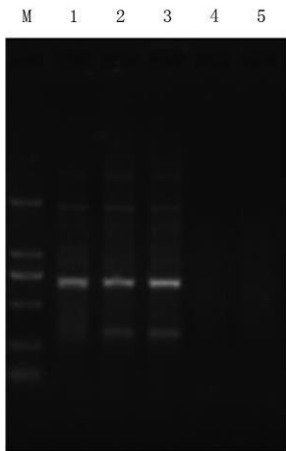


图4 不同 dNTPs 浓度的 RAPD-PCR 扩增结果
注: M 为 DL 2 000, 1~5 为不同 dNTPs 浓度。

3 结论与讨论

植物 RAPD 多态性研究中,提取基因组 DNA 多采用新鲜或冷冻的材料,但这不适用于像胡杨这种生长在高温、干燥的环境,交通十分不便的野生植物。有研究表明,用硅胶干燥植物叶片可用于基因组 DNA 的提取并可进行 RAPD 分析^[12-13]。该研究证明,硅胶彻底干燥的胡杨样品可用于基因组 DNA 的提取,并且符合 RAPD 扩增的要求。

RAPD 扩增成功与否很大程度上取决于基因组 DNA 的提取质量, RAPD 扩增的效果与模板 DNA 的纯度和完整性有着密切的关系^[14]。该试验采用改进的 CTAB 法,在提取液中加入 β -巯基乙醇抗氧化剂,可防止提取物的褐化;通过加入 1/10 体积的 10% CTAB 有效除去与基因组 DNA 结合的多糖类物质;最后将胡杨基因组 DNA 重新溶解,通过苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)和氯仿/异戊醇 (24 : 1)抽提,充分除去 RNA 酶 A 以及可能混入的 DNA 酶等物质,防止样品长时间保存而发生降解。按该方法试验所提取的胡杨基因组 DNA

纯度和完整性都适合 RAPD 分析。

对于不同材料与不同试验药品建立的 RAPD 反应体系,反应条件也不尽相同。为了能进行 RAPD 反应体系优化试验,该试验前期依据其它类似的研究结果进行了大量不同条件的 RAPD 扩增试验,得到了基本的 RAPD 反应条件及程序,并以此为基础进行 RAPD 反应体系优化试验。RAPD 反应体系中包括模板 DNA、随机引物、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 及反应缓冲液,故影响结果的因素很多。而模板 DNA 浓度和 DNA 聚合酶用量不是影响 RAPD 的反应条件的主要因素,因此该试验只选取随机引物浓度、 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度 3 个影响因素,设计不同浓度梯度进行反应体系优化。通过优化试验得出胡杨 RAPD 反应体系为,在 10 μ L 反应体系中,含 40 ng 模板 DNA、0.8 U r *Taq* DNA 聚合酶、2.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.3 mmol/L dNTPs 和 0.5 μ mol/L 随机引物。

影响 RAPD 反应的因素很多,每个因素的变化可能都会影响扩增结果的不可重复。通过建立优化的反应体系,可获得较为稳定的扩增结果。用该优化反应体系进行扩增,均可扩增出清晰条带,为进一步 RAPD 分子标记技术应用于胡杨遗传多态性研究中提供了必要的技术保障。

参考文献

[1] Wang S, Cheit B, Li L. Euphrates Poplar Forest[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1996.
[2] 黄培佑. 荒漠河岸胡杨林的生活周期对生境水条件的动态适应的研究[J]. 新疆环境保护, 1991, 13(2): 5-10.
[3] 杨鹏年, 李霞, 董新光. 塔里木河下游生态输水后胡杨林恢复效应与预测研究[J]. 干旱区资源与环境, 2007, 21(4): 52-55.
[4] 韩路, 王海珍, 彭杰, 等. 塔里木河上游天然胡杨林种群空间分布格局与动态研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1668-1673.
[5] 朱馨馨, 马艳, 张富春. 盐胁迫下胡杨 cDNA 文库的构建及其 nhx 基因的克隆[J]. 植物研究, 2007, 27(1): 82-88.
[6] 王建刚, 李霞, 陈敬峰. 塔里木河下游应急输水前后胡杨生长量分析—以喀尔达依断面为例[J]. 资源科学, 2007, 29(3): 74-79.
[7] 邵鹏柱, 曹晖. 中药分子鉴定[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 49-71.
[8] 张海燕, 焦培培, 李志军, 等. 不同保存方法对胡杨、灰叶胡杨叶片总 DNA 质量的影响[J]. 塔里木大学学报, 2008, 20(2): 47-52.
[9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
[10] 马翎健, 曹丽华, 周济铭, 等. 小麦雄性不育材料 RAPD 扩增体系研究[J]. 西北农业学报, 2003, 12(4): 60-63.
[11] Saito Y, Shiraish S, Tamoton T, et al. Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis[J]. New Forests, 2002, 23: 97-103.
[12] Chase M W, Hill H H. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies[J]. Taxon, 1991, 40: 215-220.
[13] 谢中稳, 葛颂, 洪德元. 从普通野生稻硅胶干燥的小量叶片中制备 DNA 用于 RAPD 分析和总 DNA 库的建立[J]. 植物学报, 1999, 41(8): 807-812.
[14] 范惠玲, 孙万仓, 孟亚雄. 芸芥 (*Eruca sativa* Mill) 总 DNA 提取方法及 RAPD 扩增体系研究[J]. 西北农业大学学报, 2007, 16(1): 17-21.

油菜角野螟发生规律及防治对策研究

杨秀玲^{1,2}, 冯纪年¹

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100 2. 西宁市农业技术推广站, 青海 西宁 810008)

摘要:近年来油菜角野螟对西宁油菜为害加重, 成为油菜生产主要害虫之一。该试验调查了油菜角野螟田间发生规律、为害特性、生物学特性, 并进行了各种防治技术的试验示范。结果表明: 油菜角野螟在西宁地区 1 a 发生 1 代, 零星有 2 代出现; 油菜角野螟成虫在 7 月油菜角果期为盛发期; 菜角野螟在西宁地区普遍发生, 浅山地区发生较重, 川水地区中度发生, 脑山地区零星发生; 适当早播可减轻角野螟的为害; 依据“以防为主, 综合防治”的原则, 当油菜花期至角果初期百株卵块累计达 40 块以上时即可进行化学防治。防治适期以角果初期为主, 卵块较多油菜田块可连防 2 次, 间隔 7 d。

关键词: 油菜; 角野螟; 危害; 对策

中图分类号: S 436.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0134-05

油菜角野螟属鳞翅目螟蛾科, 学名为茴香薄翅野螟(*Evergestis extimalis* Scopoli)。以幼虫蛀入油菜角果, 蛀食油菜籽粒, 造成产量损失。于 2007~2009 年, 主要调查研究了油菜角野螟田间发生规律、为害特性、生物学特性, 并进行了各种防治技术的试验示范, 总结出综合防治技术。现将调查内容总结如下。

1 西宁地区油菜角野螟分布及为害调查

2008、2009 连续 2 a 调查了西宁市 1 区 3 县 13 个乡镇、镇 16 个村油菜角野螟分布和为害情况^[1]。调查结果见表 1。调查发现, 油菜角野螟在西宁地区普遍发生, 但发生程度有明显的区域差别, 浅山地区发生较重,

川水地区中度发生, 脑山地区零星发生。2008 年在湟源县东峡镇调查, 平均单株角果为害率为 18.97%, 受害严重地块达 43.2%。2008 年在彭家寨张家湾村调查, 为害严重地块平均单株角果为害率为 31.4%。

表 1 油菜角野螟发生程度调查

地 点	2008 年平均单株角果为害率/%	2009 年平均单株角果为害率/%
彭家寨镇	12	2.0
二十里铺镇	13.3	3.4
大堡子镇	4.89	2.39
大通长宁	6.57	2.86
大通塔尔	4.21	3.04
大通斜沟	1.0	0.2
大通青林	0.8	0
大通极乐	5.06	0.46
大通青山	2.31	0.32
湟中西堡	11.4	5.5
湟中共和	12.5	5.6
湟源东峡	14.97	9.80
湟源巴燕	3.9	1.32

第一作者简介: 杨秀玲(1971-), 女, 青海西宁人, 在读硕士, 高级农艺师, 现从事农业技术推广工作。E-mail: xnnj1971@163.com。

基金项目: 西宁市科技攻关计划资助项目(2007-k-01)。

收稿日期: 2011-04-28

Study on DNA Extraction from Silica Gel Dried Leaves of and Establishment of RAPD Reaction System

LV Jie¹, MA Yuan², JIN Xiang¹, MAO Pei-hong¹, LV Guang-hui²

(1. The Center of Ion Beam Biotechnology, College of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830008; 2. Key Laboratory of Oasis Ecology of the Ministry of Education, College of Resources and Environmental Science, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: The authors describe an improved CTAB method for preparation of DNA from the silica-gel-dried leaves of which taken from Tarim River valley. The purity genetic DNA had been obtained and could be used for RAPD PCR. After the optimization of RAPD reactions, the optimized reaction system and program of RAPD were as follows. The 10 μ L PCR reactions contained 40 ng DNA template, 0.8 U *rTaq* DNA polymerase, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L random primer and 1 \times buffer solution. The amplification program started with 5 min at 94 $^{\circ}C$, followed by 35 cycles for 30 s at 94 $^{\circ}C$, 30 s at 38 $^{\circ}C$, and 120 s at 72 $^{\circ}C$ and finally by 1 extension step for 10 min at 72 $^{\circ}C$.

Key words: Tarim River valley; ; DNA extraction; RAPD reaction system