

适于宁夏枸杞 RAPD 分析的 DNA 高效提取方法

贝 盍 临, 任 贤, 雷 茜, 赵 会 伟, 伏 培 云

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 采用优化的 CTAB 法提取枸杞叶片基因组 DNA。利用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测所得 DNA 的浓度和纯度, 并进行了 RAPD 初步扩增分析。DNA 浓度在 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$, 可达 $400 \mu\text{g}/\text{g}$ (叶片鲜重)。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.44~1.6 (理想值为 1.8)。结果表明: 优化 CTAB 法所提取枸杞总 DNA 的纯度高、完整、量大, 能满足 RAPD 扩增, 条带清晰、稳定, 并且提取操作的程序快速、简便, 试验成本低、效率高。优化的 CTAB 法高效提取的枸杞基因组 DNA 不需经氯化铯梯度离心或柱层析纯化, 可以直接用于 RAPD 分析。

关键词: 枸杞; RAPD; DNA 高效提取

中图分类号: Q 946-33 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)09-0080-03

RAPD(随机引物扩增多态性 DNA)是一种应用广泛的 DNA 分子标记技术, 因这种技术具备成本低廉、分析速度快、无放射性污染、需要极微量的 DNA 以及产生丰富的多态性等优点, 而广泛应用于检测遗传多样性、构建遗传图谱、品种识别、种质资源的分析与收集、物种起源进化以及遗传稳定性检测等方面的研究^[1]。由于 RAPD 分析要求供试 DNA 完整和纯度相对较高, 要用于 RAPD 分析, DNA 提取步骤越少越好, 能减少对 DNA 的破坏; 多步骤、多种试剂容易引起 DNA 的破坏和污染, 从而影响 PCR 反应及 PCR 扩增产物的结果分析^[2]。所以, 在运用该技术进行分析时, 提取完整、量大、纯度高的 DNA 是 RAPD 分析成功的关键之一, 最快、最有效提取 DNA 有利于提高工作效率。

通常用于枸杞叶片 RAPD 的 DNA 制备的常规方法操作繁琐, 步骤多, 用时较长, 而且由于提取液需多次转移, 易引起交叉污染和 DNA 丢失^[2,6,9]。

该试验采用优化的 CTAB 法提取枸杞叶片全基因组 DNA, 在试验中逐步摸索, 对全基因组 DNA 的提取条件作了较大改进, 所得到的 DNA 完整性好, 电泳检测精确性高, 具有重复性好的迁移泳带, 纯度能够满足后续操作的要求, 并且产量高, 提取操作的程序快速、简便, 成本低、效率高。用此方法提取的枸杞叶片 DNA 能直接用于 RAPD 分子生物学研究, 且取得良好效果。

1 材料与方法

1.1 材料

宁夏枸杞叶片取自北方民族大学实验基地。

1.2 仪器与试剂

仪器: 研钵、液氮罐、离心管(50 mL)、Eppendorf 管(1.5 mL、500 μL 、HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、Eppendorf 5415D 离心机、PCR 仪(CG 1-96; Gene Company limited)、紫外分光光度计(UV754N; 棱光)、电泳仪(DYY-12 型; 北京六一仪器厂)、电泳槽(DYCP-31 型; 北京六一仪器厂)、UVP GDS-8000 凝胶成像系统、移液枪。

试剂: CTAB, Taq 酶(天根生化科技有限公司), 随机引物(北京奥科生物技术有限公司), RNA 酶(华美公司), 液氮, Buffer, Taq DNA 聚合酶, dNTPs, 1 kb DNA ladder 购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取(优化 CTAB 法) 取宁夏枸杞干净叶片 4 g, 置研钵中, 加液氮足量, 迅速用力研磨, 研成极细粉末(研磨时间 20 min 以上), 移入 50 mL 加盖离心管中, 加入 15 mL 预热至 65℃的 CTAB 提取缓冲液(2%CTAB、20 mmol/L EDTA、1.5 mol/L NaCl、0.4% β -巯基乙醇、4% PVP 40、100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 65℃水浴振荡 30 min(每 5 min 轻摇 1 次, 避免剧烈震荡), 降温离心, 取上清液至 50 mL 加盖离心管中(吸取上清液时, 将 1 mL 枪头剪掉 0.2 cm, 以免打断 DNA), 加等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)混匀, 离心 8 min(12 000 rpm), 取上清液至 50 mL 加盖离心管中, 加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 离心 8 min(12 000 rpm), 取上清液 0.4 mL 缓慢滴入 0.8 mL 无水乙醇(-20℃预冷 30 min), 冰浴中静置约 2~5 min, 可见絮状沉淀, 用自制钩状灭菌铁丝将沉淀迅速贴壁勾出, 加 70%

第一作者简介: 贝盍临(1975-), 男, 讲师, 现主要从事植物生物学方向研究工作。E-mail: realpal00147@163.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0842)。

收稿日期: 2009-04-15

酒精冲洗,离心 3 min (10 000 rpm),弃上清,置空气中室温干燥,溶于 200 μ L TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 或无菌水,放于-20 $^{\circ}$ C 备用^[3]。

1.3.2 DNA 的检测 分别用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法,检测所得 DNA 的含量及纯度。利用紫外分光光度计测量,计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。测量 OD₂₆₀ 值,计算 DNA 浓度。用 5 μ L DNA 与 2 μ L 6 \times 加样缓冲液混合,点于加溴化乙锭(EB)的 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,电压 75~80 V,电泳 1 h,在 UVP GDS-8000 凝胶成像系统上观察照相。

1.3.3 RAPD 初步扩增反应 DNA 扩增反应:扩增体系为 25 μ L,其中含 ddH₂O (18 μ L)、10 \times PCR loading buffer (2.5 μ L)、dNTP Mix ture (2.5 mM、2 μ L)、引物 (10 Mm, 1 μ L)、模板 DNA 25 ng、Taq 酶 1.25 U。反应程序^[4]:预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min;预扩增程序:94 $^{\circ}$ C 20 s, 36 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 4 个循环;扩增程序:94 $^{\circ}$ C 20 s, 40 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 38 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,最后 30 $^{\circ}$ C 保存 30 min。扩增产物经含有 0.5 μ g/mL EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,75~80 V 电场下电泳 1.5 h,电泳结束后在 UVP GDS-8000 凝胶成像系统上观察照相。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度计法检测

经紫外分光光度计对优化提取方法所提取的样品 DNA 纯度和浓度测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.44~1.6 (理想值为 1.8)。DNA 浓度在 300 μ g/mL,可达 400 μ g/g (叶片鲜重)。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

经琼脂糖凝胶电泳检测^[3],优化提取方法所提取的样品 DNA 普遍都在点样孔附近呈现一条亮带,谱带整齐,无弥散现象,表明基因组 DNA 完整,无降解;点样孔较干净,无明显发亮现象,说明酚类、多糖类、色素等物质含量相对较低;前沿处无明显团块或拖带出现, DNA 纯度较好且无降解(见图 1,1、2、3 为样品 DNA,4、5、6 样品经过 RNA 酶处理)。

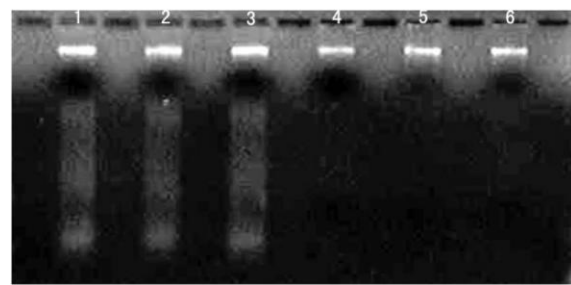


图 1 DNA 图谱

2.3 RAPD 初步扩增反应分析

经优化方法提取的 DNA (未经 RNA 酶处理)经 PCR 扩增(如图 2),在扩增效果上能获得相对稳定清晰的条带,重复性较好,表明高效提取方法所提取 DNA 完全可以满足 RAPD 分析的需要。

通过扩增出的条带也可进一步表明不用 RNA 酶也可以达到较好扩增效果,这是由于 RNA 相对于 DNA 来说,更容易降解,少量的 RNA 并不影响扩增。

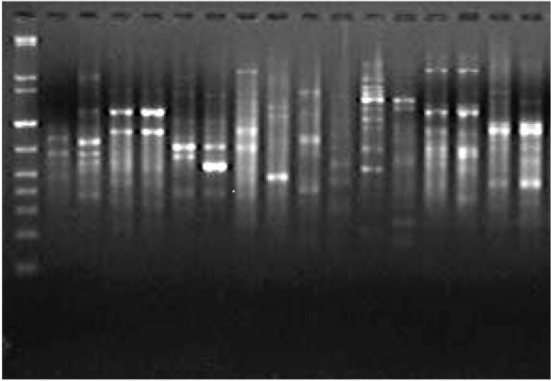


图 2 PCR 扩增

3 讨论

采用优化 CTAB 法提取枸杞基因组 DNA,该试验量化了枸杞样品研磨时间,充分破碎叶片有利于 DNA 更多的释放到缓冲液中;针对枸杞叶片中多糖、多酚、醌类及色素等物质含量较高的特点,在基本提取液中添加适宜浓度的 PVP 40、 β -巯基乙醇(经过试验摸索)消除多糖、色素等杂质的干扰;混合使用酚与氯仿,酚变性蛋白质能力很强,但有残留,经酚第 1 次抽提后的水相中有残留的酚,可用氯仿第 2 次变性蛋白质时一起将酚带走,效果最好;用预冷无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C, 30 min)沉淀 DNA,将上清液缓慢倒滴入 2 倍体积无水乙醇中,冰浴中放 2~5 min 可见絮状沉淀,沉淀条件达到最佳组合(未见报道),DNA 沉淀迅速且纯度好;最后,用自制钩状灭菌铁丝将沉淀迅速贴壁勾出,加 70% 酒精冲洗或直接用无菌水溶,快速、简便,有利于保持基因组的完整性。

从结果来看,该方法提取枸杞叶片 DNA 的优点在于整个过程方法简单、快捷,可操作性较强,提取条件适宜,所需的药品和仪器常规,一般在 1.5~2 h 即可获得纯度较高的植物全基因组 DNA,提取的 DNA 产量高达 400 μ g/g (叶片鲜重),可直接用于 PCR 扩增试验,适合分子生态学的 RAPD 分析研究, RAPD 结果稳定。

参考文献

[1] 华国栋,郭兰萍,罗斌. RAPD 在生药研究中的应用[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报) 2005, 20: 305-307.

- [2] 严奉坤, 许兴, 魏玉清. 枸杞基因组 DNA 提取及指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 46-48.
- [3] 杨瑞, 赵福宽, 林成, 等. 一种适于番茄 RAPD 分析的 DNA 快速提取方法[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(4): 278-280.
- [4] 魏玉清, 许兴, 王璞. 不同地区主要栽培宁夏枸杞品种的 RAPD 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(1): 91-95.
- [5] 周俊宜. 分子生物学基本技能和策略[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 90-95.
- [6] 王得元, 邓义才, 李乃坚. RAPD 标记检测蔬菜种子纯度中 DNA 提

- 取方法研究[J]. 广东农业科学, 1999(3): 13-14.
- [7] 文传浩, 段昌群, 郭涛, 等. 一种简单、快捷植物 RAPD 分析 DNA 提取方法[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(5): 392-393.
- [8] Porebski S, Grant B L, Bernard R B. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol-Components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
- [9] 孙晓东, 李军, 施京红. 枸杞基因组 DNA 的提取与分析[J]. 陕西中医, 2003, 24(12): 1129-1130.

Method Suitable for the RAPD Analysis of *Ningxia Lycium barbarum* with DNA Highly Effective Extraction

BEI Zhan-lin, REN Xian, LEI Qian, ZHAO Hui-wei, FU Pei-yun

(Department of Biological Science and Engineering, North Nationality University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Optimize the use of the CTAB method to extract *barbarum* leaf genomic DNA. By UV spectrophotometer, agarose gel electrophoresis detection of DNA derived from the concentration and purity, and conducted a preliminary amplification RAPD analysis. DNA concentration 300 $\mu\text{g/mL}$, up to 400 $\mu\text{g/g}$ (leaf fresh weight). $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio was 1.44~1.6 (the ideal value was 1.8). The results showed that CTAB method by optimizing the total DNA extract of wolfberry high purity, integrity, and volume was very large, to meet the RAPD amplified bands were clear and stable, and extraction procedures for the operation of fast, easy, the experimental's cost was lower and efficiency was higher. Optimize the CTAB method and efficient extract *Lycium barbarum* genomic DNA without CsCl gradient centrifugation or column chromatography purification, can be directly used for RAPD analysis.

Key words: *Lycium barbarum*; RAPD; DNA highly effective extraction

全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

《中国种业》征订启事

《中国种业》是由农业部主管, 中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。该刊系全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊。

刊物目标定位: 以行业导刊的面目出现, 并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围: 大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等, 信息量大, 技术实用。

读者对象: 各级种子管理、经营企业的领导和技术人员, 各级农业科研、推广部门人员, 大中专农业院校师生, 农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊, 大 16 开本, 每期 5.80 元, 全年 69.60 元。国内统一刊号: CN 11-4413/S, 国际标准刊号: ISSN 1671-895X, 全国各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至编辑部订阅, 挂号需每期另加 3 元。邮发代号: 82-132

欢迎投稿、刊登广告

地址: (100081) 北京市中关村南大街 12 号中国农业科学院
电话: 010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)
传真: 010-82105796
E-mail: chinaseedqks@sina.com; chinaseedqks@163.com