

苜蓿基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应组成优化探讨^{*}

蒿若超¹, 曲春礼², 张月学¹, 唐凤兰¹

(1. 黑龙江省农科院草业研究所, 哈尔滨 150086; 2. 宾县农业技术推广中心, 宾县 150400)

摘要:比较了 CTAB 法和 SDS 法提取苜蓿基因组总 DNA 的效果, 这两种方法得到的全基因 DNA 具有较好的完整性, 但从 DNA 的提取纯度可以看出, CTAB 法优于 SDS 法。实验对苜蓿 RAPD 反应条件进行了优化: 在 25 μ L 反应体系中, 含 10 \times Buffer(20mM MgCl₂), 1U Taq 酶, 25ng 的模板 DNA, 150 mol/L 的 dNTPs, 0.2 mol/L 引物。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。

关键词: 苜蓿; 基因组 DNA 提取; RAPD 反应

中图分类号: S 551.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2006)05-0089-04

^{*} 收稿日期: 2006-04-05

第一作者简介: 蒿若超(1977-), 男, 内蒙古乌海市人, 硕士, 实研, 从事牧草资源的收集整理及分子育种研究。

通讯作者: 张月学, E-mail: zyxnyk@163.com; Tel: 0451-86665761。

报纸等宣传手段, 通过各类新闻媒体进行广泛的宣传引导, 在全社会形成了解、认识、掌握农业标准化的氛围。要让农民知道, 生产讲标准、产品讲品牌, 实施标准化是提高产品收入的前提。

3.6 领导重视, 狠抓落实

各级政府、各有关部门要切实加强领导, 狠抓落实。一是要尽快建立健全相应的标准化管理机构, 充实农业标准化工作人员; 二是要建立农业标准化推广体系, 稳定充实农业科技推广队伍; 三是要发挥各方面的作用, 广泛吸收有关企业、行业协会、检测机构、科研机构和学术团体人员, 充实完善农业标准化技术委员会, 充分发挥科技人员在标准制定、修订中的作用。

3.7 采用标准化示范, 强化农民标准化意识

如何提高农业标准化意识, 最有效的方法就是加强农业标准的实施与示范。围绕标准组织生产, 发挥比较优势, 用标准规范农产品的生产行为和评价农产品的质量优势, 引导产业结构调整。采用标准化示范的方式, 促进先进农业技术的应用与普及。用标准培训农民, 使农民从标准中学到独特的技术、技能、技巧、诀窍等, 提高生产者的素质。农业生产者要面向市场, 提高产品竞争能力, 重要的问题是树立正确的农业标准化意识, 从标准中了解市场——国际市场和本地市场及现实需求市场和潜在需求市场。要善于用标准来保护自身的利益, 把农业标准

化与整个生产经营活动紧密地联系起来。

我国农产品无论在品种上还是在数量上都很丰富, 部分农产品的价格在国际市场上也有较大的竞争优势, 但我国农产品却始终因在一些质量指标上达不到国际要求, 不符合国际标准或区域标准问题而难以打入国际市场。农产品质量标准 and 规范是世界各国实行农产品市场保护而采取的一项重要的贸易技术壁垒措施。实践表明, 我们只有顺应经济全球化、农业国际化趋势, 按照具有国际水准的农产品质量标准和规范来组织生产、加工, 才能有效增强农产品的市场竞争力, 农业标准化建设是我国农业由追求量变转向质变的跨越, 是我国农业应对入世挑战、提升农产品竞争力的重要举措。

参考文献:

- [1] 朱谦. 林木种子标准化和质量控制[J]. 安徽林业, 1994, (2): 19.
- [2] 秦春秋. 试论标准化在发展“三高”农业中的应用[J]. 现代农业, 1994, (4): 4-6.
- [3] 程广亿. 农业标准化是加速“三高”农业建设的有效途径[J]. 标准化报道, 1994, (6): 40-43.
- [4] 李应中. 农业标准化生产的内涵及其发展动向[J]. 中国农业信息, 2003, (3): 6-7.
- [5] 荣晓东, 郑育洪. 植物检验检疫与农产品的标准化生产[J]. 植物检疫, 2003, (3): 177-178.
- [6] 武拉平, 张东军. 加入 WTO 后我国农业发展的对策[J]. 河北学刊, 2001, (3): 68-71.

Study on the Methods of Extraction and Purification for Alfalfa DNA and the Establishment and Optimization for RAPD Reaction System

HAO Ruo chao¹, QU Chun li², ZHANG Yue xue¹, TANG Fen lan¹

(1. Grassland science insititute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086;

2. The centre of popularizing agricultural technology, Bin County, 150400)

Abstract: Two methods (SDS method and CTAB method) for DNA extracting were compared, and whole DNA could be got by two methods. But took purity of DNA into account, CTAB method was better than SDS method. Meantime, PCR amplified procedure was established and PCR amplified conditions were defined on the factors of Taq DNA polymerase, DNA density, dNTPs density, primer density, and pre denaturing temperature.

Key words: alfalfa; DNA extraction; RAPD reaction

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), 即随机扩增多态性 DNA。它是以人工合成的、由 9~10 个核苷酸组成的随机寡聚核苷酸序列为引物, 以基因组总 DNA 为模板, 利用 PCR 技术随机扩增得到一系列长度多态性 DNA 片段, 并通过凝胶电泳将长短不同的 DNA 片段分开^[1]。其操作简便快速、所需 DNA 量少(15~25 ng), 因此在各种作物的种质进化、遗传图谱构建、分子标记辅助育种等方面有非常广泛的应用前景。本文以研究苜蓿为实验材料, 摸索一种方便、快捷、适合苜蓿基因组 DNA 提取的方法, 并探讨了适合苜蓿 RAPD 反应的 Taq 酶浓度、dNTPs 浓度、引物浓度及退火温度。

1 材料和方法

1.1 材料

材料取自黑龙江省农业科学院草业研究所, 品种为法国苜蓿、亮苜 350、龙牧 801、图牧 1 号、草原 2 号。

1.2 方法

1.2.1 苜蓿总 DNA 提取与检测 总 DNA 提取采用 CTAB 法和 SDS 法。CTAB 法^[1]: (1) 称取 100 mg 嫩叶, 置于冷冻的灭菌研钵中, 加液氮, 研磨至粉末后迅速移至 1.5 mL 离心管中。(2) 加入 900 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的 2 \times CTAB 缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 水浴 20 min(每隔 2 min 摇匀一次), 取出放凉。(3) 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。(4) 加入 500 μ L 等体积的酚、氯仿摇匀, 在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 rpm 离心 10 min。(5) 取上清液置新的 1.5 mL 离心管中, 重复第三步。(6) 取上清液, 再

加入 500 μ L 氯仿-异戊醇混合液(24:1), 轻轻混匀后, 在 4 $^{\circ}$ C 下 7 500 r/min 离心 10 min。(7) 取出上清液, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和等体积的异丙醇, 轻摇至出现絮状沉淀。置于 -20 $^{\circ}$ C 1 h(此步可过夜)。(8) 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min。弃去上清液后, 用 75%乙醇(100 μ L)清洗两次, 室温下干燥 1 h, 溶于 45 μ L TE 缓冲液(pH 8.0); SDS 法^[2]: 在离心管内加入 SDS 提取缓冲液, 于 65 $^{\circ}$ C 保温 15~30 min 加入 1/10 体积的酚, 保温之后加入等体积氯仿, 轻摇, 离心(10 000~12 000 r/min), 取上清液加入等体积氯仿, 轻摇、离心, 此过程可重复几次直至界面清晰为止。取上清液转至新的离心管中, 加 2/3 体积的冷异丙醇沉淀 DNA。12 000~15 000 r/min 离心之后, 沉淀用 75%乙醇冲洗 2~3 次, 吹干溶于 TE 之中。

向上述方法提取的 DNA 中加入纯的 RNA 酶, 37 $^{\circ}$ C 下保温 30 min, 加入酚、氯仿-异戊醇(24:1)抽提。取上清液, 加 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠, 2 倍体积的无水乙醇-20 $^{\circ}$ C 沉淀 60 min 或过夜, 12 000~15 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 75%乙醇冲洗, 干燥之后, TE 溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存。

提取的苜蓿基因组用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳初检, 再用紫外分光光度计测定 DNA 样品浓度。DNA 的质量浓度(mg/mL) = OD₂₆₀ \times 50 \times 稀释倍数。

1.2.2 RAPD 反应条件 RAPD 反应体积为 25 μ L, RAPD 反应物组成为: 模板 DNA、dNTPs、随机引物、Mg²⁺、Taq 酶。其中 Taq 酶、buffer 及

dNTPs 购自大连 TaKaRa 公司(大连),引物由上海生工生物工程技术有限公司和上海申能博彩生物科技有限公司合成。

为确定最佳的 PCR 反应体系^[3],设置 4 个 Tag 酶浓度:0.5、1、1.5、2U。4 个 dNTP 浓度:100、150、200、250 μmol/L。选用 OPB08 引物,其浓度设置 3 个:0.1、0.15、0.2 μmol/L。退火温度设置 6 个:35、36、37、38、39、40 ℃。最后根据扩增结果,选择出最佳的 PCR 反应体系。

PCR 扩增程序为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 15 s,35 ~ 40 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min;最后 4 ℃ 保存。PCR 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶在 1×TBE 缓冲液中电泳,电压为 3V/cm,稳压 2.5 h,溴化乙锭染色检测。

2 结果与分析

2.1 苜蓿基因组提取

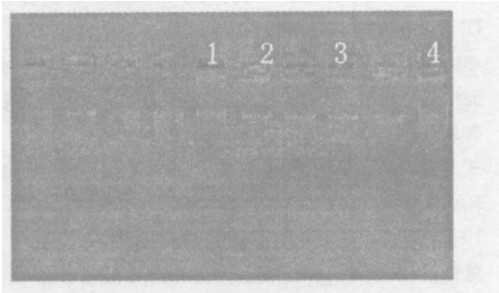


图 1 SDS 法和 CTAB 法对苜蓿基因组 DNA 提取效果

SDS 法(1~5 泳道)、CTAB 法(6~10 泳道)

核酸的嘌呤、嘧啶中都有共轭双键,对紫外光有强烈的吸收^[4]。天然双链 DNA 在 260nm 处的吸收值与 280nm 处的吸收值比值(OD_{260}/OD_{280})应在 1.8 左右,低则说明制剂中蛋白质可能未除尽,高则说明制剂中还有 RNA^[5]。用两种方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。5 份材料两种方法的提取物均是一条带,基本无降解现象。通过紫外分光光度计测定 DNA 样品纯度(见表)。从表可以看出,通过 CTAB 法提取的 DNA, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.7~1.9 之间。SDS 法提取的 DNA 纯度, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.5~1.6 之间。因此 CTAB 法提取的 DNA 纯度高于 SDS 法。

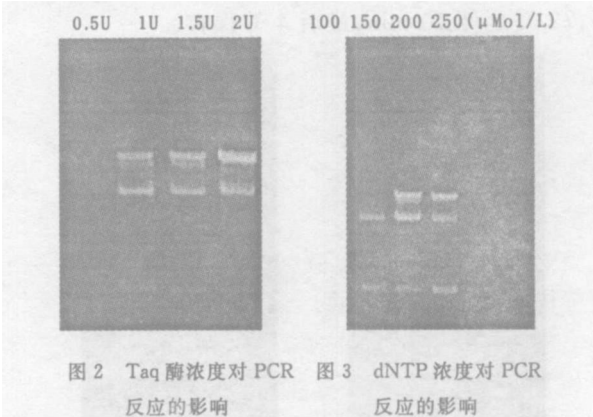
表 两种方法提取 DNA 的纯度比较

材料	方法	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
法国苜蓿	CTAB 法	0.0192	0.0102	1.8824
亮苜 350	CTAB 法	0.1148	0.0627	1.8309
龙牧 801	CTAB 法	0.0358	0.0203	1.7635

图牧 1 号	CTAB 法	0.2864	0.165	1.744
草原 2 号	CTAB 法	0.0042	0.0023	1.826
法国苜蓿	SDS 法	0.064	0.0365	1.546
亮苜 350	SDS 法	0.0149	0.0083	1.683
龙牧 801	SDS 法	0.0132	0.0073	1.594
图牧 1 号	SDS 法	0.1552	0.0884	1.685
草原 2 号	SDS 法	0.0073	0.004	1.574

2.2 PCR 反应优化

2.2.1 不同 Tag 酶浓度对扩增结果的影响 Taq 酶的活性高低是整个 PCR 反应成败的关键,见图 2,Taq 酶浓度为 0.5U 时,未扩增出任何 DNA 片段。当 Taq 酶浓度为 1、1.5、2.0U 时,扩增结果相同。由于 Taq 酶已经商品化,价格较为昂贵,因此,对于 25μL 的反应体系 1~1.5U 的用量较为恰当,本实验选择 1U 为最佳浓度。



2.2.2 不同 dNTPs 浓度对扩增结果的影响 见图 3,当 dNTPs 浓度为 100 μmol/L 时,不能满足 Taq 酶的需求,因此大分子量的片段没有扩增出来。当浓度为 150 μmol/L 和 200 μmol/L 时,扩增效果好。当 dNTPs 浓度为 250 μmol/L 时,高浓度 dNTPs 与模板的随机碰撞增加,同时与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} ,从而干扰了 Taq 酶功能的正常发挥,扩增效果最差。因此选择 150 μmol/L 为最佳浓度。

2.2.3 不同引物浓度对扩增结果的影响 由图 4 可见,当引物浓度低时,严重影响 PCR 反应效率。本研究选择 3 个引物浓度,根据扩增结果,选择 0.2 μmol/L 为最佳浓度。

2.2.4 不同退火温度对扩增结果的影响 当退火温度过低时,非特异性条带扩增增多。而退火温度过高,特异性的扩增条带数明显减少。图 5 所示,根据扩增效果,退火温度为 37 ℃时,扩增出的条带清晰,因此选择 37 ℃为最佳退火温度。

2.3 优化后苜蓿最佳 RAPD 反应条件及 PCR 程序

苜蓿最佳 RAPD 反应条件: $10\times$ Buffer(20mM MgCl₂), 1U Taq 酶, 25ng 的模板 DNA, $150\mu\text{mol/L}$ 的 dNTPs, $0.2\mu\text{mol/L}$ 引物。

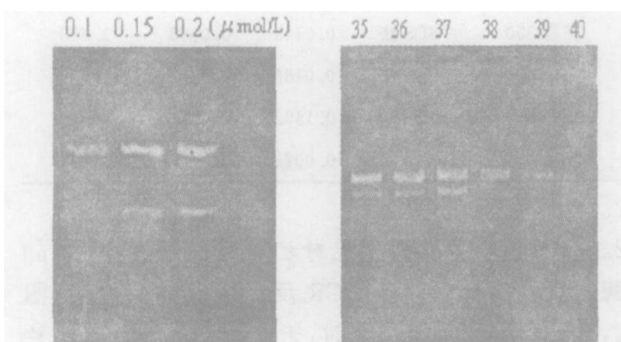


图4 引物浓度对 PCR 反应的影响

图5 退火温度对 RAPD 反应的影响

PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 最后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

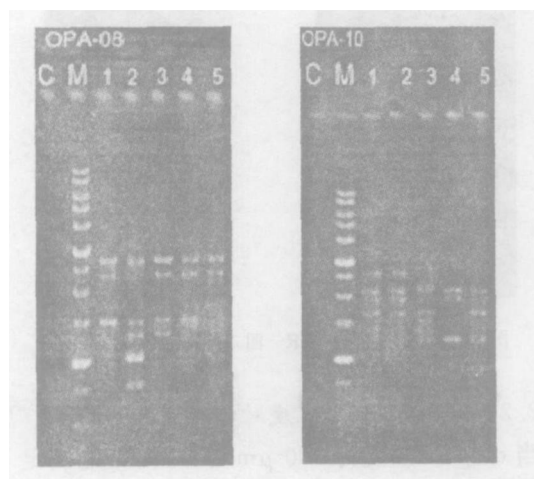


图6 OPA-08 和 OPA-10 引物对 5 个苜蓿品种的 RAPD 扩增电泳

如图 6 所示, 利用优化 RAPD 反应条件和 PCR 扩增程序, 随即挑选了 OPA-08 和 OPA-10 2 条 RAPD 引物对 5 个苜蓿品种进行扩增, 扩增条带清晰, 说明利用 CTAB 法提取的苜蓿基因组 DNA 能够满足 RAPD 分析。

3 讨论

本实验采用 CTAB 法和 SDS 法提取苜蓿全基因组 DNA。在这两种方法里, CTAB 试剂和 SDS 试剂的作用都是破坏植物细胞膜, 使细胞内含物释放出来。不同的是: CTAB 是与 DNA 结合形成复合物, 有利于 DNA 与变性蛋白及多糖分开。而 SDS 是与蛋白质和多糖形成复合物, 经离心后与 DNA 分开^[5]。因此利用 SDS 法提取 DNA 时, 易含有蛋白质和多糖等杂质。在本试验中, SDS 法提取

的 DNA 通过紫外分光光度计的测定, OD_{260}/OD_{280} 比值偏低, 证明含有较多的蛋白质等杂质。而 CTAB 法提取的 DNA, 其 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 左右, 纯度高, 可以满足分子生物学的要求。

另外, 本文通过不同 Taq 酶用量、不同 dNTPs 浓度、不同引物浓度及退火温度对 PCR 反应体系进行优化, 认为苜蓿基因组 DNA 最佳 RAPD 反应条件为: 在反应总体积为 $25\mu\text{L}$ 中, 含 $10\times$ Buffer (20mM MgCl₂), 1U Taq 酶, 25ng 的模板 DNA, $150\mu\text{mol/L}$ 的 dNTPs, $0.2\mu\text{mol/L}$ 引物。PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 最后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

参考文献:

- [1] 向育君, 梁辉, 张正. 稗草 DNA 的快速提取研究[J]. 生物学杂志, 2004, (2): 31-34.
- [2] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS CTAB 结合法提取棉花总 DNA[J]. 生物技术通报, 2004, (5): 45-47.
- [3] 李向峰, 隋正红, 张学成. RAPD 技术在龙须菜遗传多样性研究中的应用 I 总 DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(2): 293-298.
- [4] 王月莹, 赵姝华, 刘世强. 高粱 DNA 提取纯化方法的比较及 RAPD 反应条件的建立与优化[J]. 杂粮作物, 2001, 21(2): 12-15.
- [5] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.

我国第一家遗尿症医院 院长 刘兴禹

主治: 遗尿症、尿失禁、尿崩症、糖尿病、小儿神经性尿频。

地址: 山东省嘉祥县迎风路 3 号遗尿症医院

邮编: 272400

电话: 0537-6824392 6805999

网址: <http://www.cnynz.com>

(www.cnynz.com.cn)