

砂生槐单粒种子 DNA 的快速提取及 RAPD 检测

石梦菲¹, 拉 多¹, 张勇群^{1,2}

(1. 西藏大学 理学院, 西藏 拉萨 850000; 2. 西藏自治区高等学校重点实验室 生物技术实验室, 西藏 拉萨 850000)

摘要:为探讨快速提取种子 DNA 的有效方法,以砂生槐单粒种子为试验材料,在传统 CTAB 法基础上建立一种快速提取 DNA 的方法,并通过紫外分光光度法、凝胶电泳和 RAPD-PCR 检测所提基因组 DNA。结果表明:快速法提取得到了质量较好、浓度及纯度较高的 DNA,可以满足分子生物学实验的要求。此方法操作方便、快捷,是一种有效的砂生槐种子的 DNA 提取方法。

关键词:砂生槐;单粒种子;DNA 快速提取;RAPD 检测

中图分类号: **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2014)08-0035-04

砂生槐(*Sophora moorcroftiana*)又名西藏狼牙刺,豆科槐属,多年生矮灌木。砂生槐产于西藏波密、林芝和拉萨等地,生于海拔 2 800~4 400m 的山坡灌丛中,河漫滩砂质地,在雅鲁藏布江河谷常成大片群落^[1]。藏医药记载^[2],砂生槐多以种子入药,味苦性凉,消炎解毒,主治湿热黄疸、白喉、痢疾和消化不良等,是一种极为宝贵的植物药用资源。有研究表明,砂生槐种子水提物可通过提高荷瘤小鼠免疫功能而发挥抗肿瘤作用,具有明显的抑菌活性^[3]。同时,从砂生槐种子中提取得到的生物碱不仅能够体外杀灭原头蚴^[4],也对人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖有明显的抑制作用^[5]。对其研究多集中在种子的药用价值上^[6],而分子生物学方面的研究较少,该文旨在探讨出一种快速实用的方法对砂生槐种子 DNA 进行提取。

种子 DNA 的提取通常采用 CTAB 法与 SDS 法,CTAB 和 SDS 都是一类离子去污剂,能够裂解细胞释放 DNA,并与提取液中的 EDTA 共同保护 DNA 免受内源核酸酶的降解^[7]。Yoshihashi 等^[8]用磨碎的谷粒提取了水稻基因组 DNA。田苗苗等^[9]将 SDS 与 CTAB 法相结合提取了单粒大豆种子基因组 DNA。郭景伦等^[10]探索了从玉米单粒种子提取 DNA 的新方法。该文采用砂生槐单粒种子为试验材料,并针对砂生槐

种子富含蛋白质成分这一特性,得出一种快速有效的 DNA 提取方法,为后续更进一步的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

该试验在西藏自治区高等学校重点实验室生物技术实验室中进行。砂生槐种子采于西藏自治区拉萨市,置于一 80℃ 保存。所用试剂有琼脂糖、CTAB、SDS、DTT、PVP、苯酚、Tris、10×Taq 酶配套缓冲液、dNTP、MgCl₂、Taq 酶、引物等购自上海生工生物有限公司,其余试剂为国产分析纯。仪器有凝胶成像系统(北京六一仪器)、核酸蛋白测定仪(Eppendorf BioPhotometer plus)、移液器(Eppendorf)、电泳仪(Bio-Rad)、琼脂糖水平电泳槽(北京六一仪器)、超速冷冻离心机(Eppendorf)和 PCR 仪(Bio-Rad)等。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 (1)传统方法提取砂生槐种子 DNA:取一粒砂生槐种子,用镊子剥去种皮后置于干净的研钵中,加入 500 μL 65℃ 预热的提取缓冲液^[11] (0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.025 mol·L⁻¹ EDTA, 1 mol·L⁻¹ NaCl, 2% CTAB, 3% PVP, 2% DTT)进行研磨,转移至 1.5 mL 离心管中 65℃ 水浴 40 min,期间不时颠倒混匀;稍冷却后,加入 500 μL 氯仿/异戊醇(24:1),震荡混匀,于 4℃ 环境 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;取上清,加等体积一 20℃ 预冷的异丙醇,于一 20℃ 静置 30 min;4℃, 14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,倒掉上清,用 70% 乙醇洗涤 2 次,风

收稿日期:2014-03-26

第一作者简介:石梦菲(1988-),女,山西省运城市人,在读硕士,从事植物学研究。E-mail:dreamgirlsmf@163.com。

通讯作者:张勇群(1976-),女,博士,副教授,从事生物多样性与分子生态研究。E-mail:yongqunzhang@yahoo.com。

干后溶于 50 μL TE (0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0, 0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH8.0)。平行提取 3 次。

(2)快速提取砂生槐单粒种子 DNA:取一粒砂生槐种子,用镊子剥去种皮后置于干净的研钵中,加入 250 μL 氯仿快速研磨,转移至 1.5 mL 离心管中,加 750 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的提取缓冲液(0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1.5% SDS, 3% PVP, 2% DTT),颠倒混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,稍冷却后,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 min;取上清,加等体积的无水乙醇(-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷),轻轻颠倒混匀,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后,弃上清,沉淀用 70%乙醇洗涤,风干后溶于 50 μL TE。平行提取 3 次。

1.2.2 基因组 DNA 提取结果检测 (1)紫外分光光度法检测:取 2 μL DNA 提取液稀释 100 倍,以 TE 作为空白对照,利用核酸蛋白测定仪测得 DNA 样品的浓度,以及在波长 260 和 280 nm 处的吸光值,通过其比率可以判断 DNA 的纯度及提取效果,同时可根据浓度计算出 DNA 提取的得率。(2)琼脂糖凝胶电泳检测:配制 0.8%的琼脂糖凝胶,在 TBE 缓冲液中以 80 V 的电压电泳 1.5 h,并用凝胶成像系统进行拍照。(3)RAPD-PCR 扩增检测:10 \times Taq Buffer、2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Mg $^{2+}$ 、0.2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1.0 U Taq 酶、30 ng快速方法提取的砂生槐种子 DNA 模板、0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RAPD 随机引物(引物序列见表 1)的 25 μL 反应体系,进行 3 次平行 PCR 扩增。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,36.9 $^{\circ}\text{C}$ /41 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增结果用 1.6%的琼脂糖凝胶在 TBE 缓冲液中以 110 V 的电压电泳 45 min,并用凝胶成像系统进行拍照。

表 1 用于 RAPD-PCR 扩增的引物信息

Table 1 Primer information used for RAPD-PCR amplification

引物名称	引物序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
Primers	Primer sequence	Annealing temperature
RAPD1	AAT CGG GCT C	36.9
RAPD2	CAA TCG CCG T	36.9
RAPD3	GGT GAC GCA G	41.0

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度和纯度

从表 2 及图 1 均可以看出,用传统方法提取得到的种子 DNA 浓度及得率普遍大于快速提取法,但是纯度相对较低,OD $_{260}$ /OD $_{280}$ 为 1.04~1.17。而用改进方法提取得到的 DNA 质量得到提高,OD $_{260}$ /OD $_{280}$ 为 1.34~1.56。同时,从图 1 也能得知,传统方法由于耗时长、提取液中成分单一,使得一些糖类等物质仍有大量残留,部分 DNA 因粘连而滞留在点样孔,同时提取所得 DNA 有部分降解,呈现弥散条带;而快速提取法由于提取液的配方有所改进,并且各个步骤操作快捷,即使 DNA 浓度略低于传统方法,但降解少,能够完整地保存 DNA 样品。

表 2 不同方法提取砂生槐种子

DNA 的浓度和纯度

Table 2 DNA concentration and purity extracted by different methods from single seed of *Sophora moorcroftiana*

样品编号	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD $_{260}$ /OD $_{280}$	得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
No.	Concentration		Yield
传统方法 1	490	1.04	0.88
2	720	1.06	1.29
3	416	1.17	0.74
快速提取 1	350	1.34	0.63
2	150	1.49	0.27
3	310	1.56	0.55

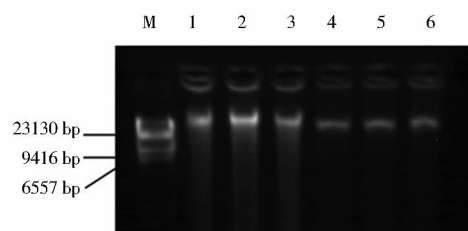


图 1 两种方法提取砂生槐种子 DNA 的凝胶电泳图谱

M: λ Marker;泳道 1,2,3:传统方法提取所得砂生槐种子 DNA;泳道 4,5,6:快速提取法所得砂生槐种子 DNA

Fig. 1 Gel electrophoretogram of DNA by two methods from single seed of *Sophora moorcroftiana*

M: λ Marker;1,2,3:DNA extracted by traditional method from single seed of *Sophora moorcroftiana*;4,5,6:DNA extracted by rapid method from single seed of *Sophora moorcroftiana*

2.2 快速法提取 DNA 的 RAPD 检测结果

从图 2 看出,快速法提取的砂生槐种子 DNA 使用 3 种 RAPD 引物均可进行 PCR 扩增,且每

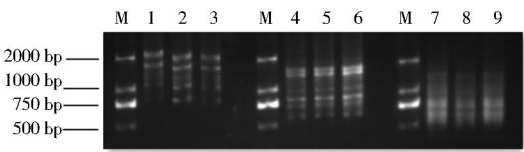


图 2 快速提取砂生槐种子 DNA 的 RAPD-PCR 电泳图谱
M:λ Marker;泳道 1,2,3;使用引物 RAPD1 得到的 3 次平行扩增结果;泳道 4,5,6;使用引物 RAPD2 得到的 3 次平行扩增结果;泳道 7,8,9;使用引物 RAPD3 得到的 3 次平行扩增结果

Fig. 2 Gel electrophoretogram of RAPD-PCR amplification by rapid method

M:λ Marker;1,2,3:RAPD-PCR amplification of DNA with primer RAPD1;4,5,6:RAPD-PCR amplification of DNA with primer RAPD2;7,8,9:RAPD-PCR amplification of DNA with primer RAPD3.

个引物进行 3 次平行扩增的电泳图谱基本一致,条带清晰明亮。此外,每粒砂生槐种子的质量只有 25~30 mg,就可以得到明显的检测结果,说明改进方法具有高效的优点,并且所得 DNA 浓度适中,质量可靠,具有较高的重复性,适于后续操作。

2.3 提取时间

表 3 列出了两种不同的提取方法在各阶段所用的时间,能够很明显地看出,改进的快速提取方法不仅在耗时最多的水浴保温过程中省去了大量的时间,并且操作便捷,在各个操作过程中都较传统方法省时,节约大量时间。虽然各个反应步骤的简化使得 DNA 的浓度及得率略低,但仍能满足需要,并且在短时间内提取到更加纯净的 DNA。就实际操作而言,传统方法提取 DNA 需要近 2 h,而用快速提取方法得到 DNA 在 20 min 内即可完成,大大提高了 DNA 的提取效率。该方法便于操作,适用于大量材料的提取。

表 3 两种方法提取时间的比较

Table 3 The comparison of the time with two methods

提取步骤 Extraction steps	所用时间/min Time	
	传统提取方法 Traditional method	快速提取方法 Rapid method
氯仿处理 Chloroform treatment	—	3
65℃水浴加热 Bath heating with 65℃ water	40	5
氯仿/异戊醇处理 Chloroform/isoamyl alcohol treatment	2	—
沉淀核酸 Precipitation nucleic acid	30	1
所有的离心 All centrifugal	30	7
总计 Total	102	16

3 结论与讨论

试验证明,改进方法较传统提取方法更加快捷,且能得到更加纯净的 DNA,便于进行大量砂生槐种子 DNA 的同时提取。

改进的提取方法中,在研磨种子时提前加入了氯仿,使得蛋白质和 DNA 酶在加入提取液之前就变性失活,尽可能地减少 DNA 降解,同时增加提取缓冲液的用量及 EDTA 的浓度,可以大量地螯合 Ca²⁺ 和 Mg²⁺,使残余的 DNA 酶失活。此时,即使减少与缓冲液混合的保温时间和后续

的离心时间,也可以尽快地使 DNA 解离出来而不被降解,这也是改进后的提取方法与传统方法相比最大的优势。该提取方法操作简便,节约时间,并且可以得到高质量的 DNA,可做为大量提取砂生槐种子 DNA 非常实用的方法。

有研究表明,砂生槐种子蛋白质含量高达 30.06%^[12],针对这种蛋白质含量较高的实验材料,改进方法中提前加入了氯仿,所以在提取缓冲液保温后没有再次使用氯仿/异戊醇进行抽提,若要更加彻底地除去蛋白质类杂质,可在提取缓冲液保温后进行一个等体积氯仿/异戊醇(24:1)的

抽提处理,这样,残留的蛋白质也会更彻底地除去,可为后续试验提供更优质的 DNA 模板。

高质量的基因组 DNA 提取是进行药用植物分子生物学研究的重要环节^[13]。严奉坤等^[14]采用改良的 CTAB 法对枸杞的冷藏幼叶进行基因组 DNA 提取,并成功利用 RAPD 进行了指纹图谱分析。侯静等^[15]将不同方法提取得到的甜菜基因组 DNA 应用于 Southern 杂交分析,发现不同的 DNA 质量对杂交信号有非常大的影响,并且 SDS 法提取得到的甜菜基因组 DNA 适于 Southern 杂交分析。所以,对于后续分子生物学实验,如利用分子标记进行基因克隆、分子鉴定、基因库的构建、物种亲缘关系的鉴别等方面,优质的 DNA 模板能够保证其顺利进行,并可以尽快得到最可靠的结果。

参考文献:

- [1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志[M]. 北京:科学出版社,1985:717.
- [2] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书·藏医学[M]. 上海科技出版社,1999:204.
- [3] 郭军,马兴铭,安方玉,等. 砂生槐种子水提物对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药,2008(4):3-4.
- [4] 马兴铭,李红玉,尹少甫,等. 砂生槐种子生物碱杀灭原头蚴及抗炎作用[J]. 中国寄生虫病防治杂志,2004,17(4):217-219.
- [5] 马兴铭,李红玉,尹少甫,等. 砂生槐种子生物碱诱导 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究[J]. 中成药,2004,8(26):654-656.
- [6] 张胜,赵垦田,向瑞. 西藏砂生槐研究综述[J]. 内蒙古林业科技,2009,35(1):57-59.
- [7] 孔红,闫训友,孟凡萍. 蒿种子基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 北方园艺,2007(12):197-198.
- [8] Yoshihashi T, Nakamura S, Fujii T. Identification of domestic rice cultivars by RAPD analysis using one grain of milled rice as a sample [J]. Nippon-Shokuhin-Kogaku-Kaishi, 1999,46(4):250-254.
- [9] 田苗苗,周延清,牛敬媛,等. 单粒干燥大豆种子基因组 DNA 提取的有效方法[J]. 生物学通报,2005,40(10):38-40.
- [10] 郭景伦,赵久然,尉德铭,等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学,1997,15(2):1-2.
- [11] 汤洁,刘连生,许娜娜,等. 绞股蓝叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(3):445-448.
- [12] 李玉祥. 西藏砂生槐的生物学特性及综合利用[J]. 自然资源学报,1993,8(5):75-79.
- [13] 徐鹏,吴耀生,黄瑞松,等. 3 种广西钩藤属药用植物的 RAPD 多态性分析[J]. 时珍国医国药,2012,23(3):703-705.
- [14] 严奉坤,许兴,魏玉清,等. 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.
- [15] 侯静,马凤鸣,陈胜勇,等. 甜菜基因组 DNA 的提取及 Southern 杂交分析[J]. 东北农业大学学报,2008,39(12):14-18.

Rapid DNA Isolation and RAPD Detection of Single Seed from *Sophora moorcroftiana*

SHI Meng-fei¹, LA-Duo¹, ZHANG Yong-qun^{1,2}

(1. School of Science, Tibet University, Lhasa, Tibet 850000; 2. Key Laboratory of High School in Tibet Autonomous Region, Biotechnology Laboratory, Lhasa, Tibet 850000)

Abstract: In order to explore the effective extraction of seeds DNA rapidly, taking single seed of *Sophora moorcroftiana* as materials, a method for rapid isolation of genomic DNA from single seed of *Sophora moorcroftiana* was established based on the traditional CTAB method. The extracted DNA was assessed by ultraviolet photometer, agarose gel electrophoresis and RAPD-PCR, respectively. The results showed that the DNA extracted by rapid method was high output and purity, the quality of genomic DNA could extensively meet the requirements for many molecular biology experiments. It is a rapid, simple and effective method for extracting genomic DNA from single seed of *Sophora moorcroftiana*.

Key words: *Sophora moorcroftiana*; single seed; rapid DNA isolation; RAPD detection