

巨龙竹基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化

普晓兰^{1,2}, 李鹏², 杜凡²

(1. 南京林业大学, 江苏 南京 210037; 2. 西南林学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 用改良 CTAB 法从巨龙竹硅胶干燥的叶片中提取基因组 DNA, 成功地进行 RAPD 扩增. 通过正交法对 RAPD 反应条件优化, 6 个试验因子的最适条件为: 模板 DNA 1 ~ 1.5 ng/ μ l, 引物 0.8 ~ 1.0 μ mol/L, dNTPs 0.1 ~ 0.15 mmol/L, Mg^{2+} 2.0 ~ 2.5 mmol/L, Taq 酶 0.5 ~ 1.0 U, 退火温度 35 ~ 36 $^{\circ}$ C.

关键词: 巨龙竹; 基因组 DNA; RAPD

中图分类号: Q34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2003)01-0127-05

Extraction of Genomic DNA and Optimization of RAPD Condition for *Dendrocalamus sinicus* Chia et J.L.Su.

PU Xiao-lan^{1,2}, LI Peng², DU Fan²

(1. Nanjing Forestry University, Jiangsu Nanjing 210037, China; 2. Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

Abstract: An improved CTAB method of DNA extraction is applied to obtaining genomic DNA from silica gel dried leaves of *Dendrocalamus sinicus* Chia et J.L.Su. The DNA is successfully used for RAPD analysis. In this paper, six essential factors that might affect the result of RAPD are compared and optimized by applying orthogonal experiment. The result shows that the optimal conditions of six factors in RAPD-PCR reaction system are DNA 1 ~ 1.5ng/ μ l; random primer 0.8 ~ 1.0 μ mol/L; dNTPs 0.1 ~ 0.15mmol/L; Mg^{2+} 2.0 ~ 2.5mmol/L; Taq polymerase 0.5 ~ 1.0U; annealing 36 ~ 37 $^{\circ}$ C.

Key words: *dendrocalamus sinicus* chia et J.L.Su; genomic DNA; RAPD

0 引言

巨龙竹(*Dendrocalamus sinicus* Chia et J.L.Su)是世界上已知最粗大的巨型丛生竹种,分布在云南省沧源、西盟和西双版纳等地,具有极高的开发利用价值.它在形态上具有两个明显不同的变异类型:秆形通直和竹秆下部弯曲、歪扭.根据两种变异类型分布区的环境因子及引种实验的研究分析,认为变异是由其内部遗传因素决定的^[7].因此,应用分子遗传标记技术,从 DNA 分子水平上揭示这两种变异类型的相关性及遗传本质,对巨龙竹的研究和利用至关重要.

RAPD(random amplified polymorphic DNA)即随机扩增 DNA 的多态性分析是 20 世纪 90 年代发展起来的第二代分子标记方法,已被证明是检测种一级水平基因多态性的有效分子标记方法,已广泛应用于种质资源分析、种间亲缘关系探讨、品种及杂种后代鉴定、基因定位等研究领域^[1,6].RAPD 技术快速、灵敏,分辨率高,但稳定性、重复性不太令人满意,反应体系中的模板浓度与纯度、聚合酶种类与用量、引物与 dNTPs 的浓度、 Mg^{2+} 浓度、缓冲系统的种类与 pH、退火温度、扩增程序等因素都与扩增式样有关^[2,3,4,9].因此,优化并统一反应条件,是 RAPD 成功的基础.

本文通过大量试验,筛选出巨龙竹基因组 DNA 提取的最佳方案,并通过正交试验设计优化 RAPD 反应系统,最终建立重复性好、适合巨龙竹进行 PCR 反应的最佳体系,为应用 RAPD 对巨龙竹的遗传多样性进行研究打下基础.

收稿日期:2002-10-28; 基金项目:国家教委资助项目.

第一作者简介:普晓兰(1956~),女,博士,副教授;主要研究方向:植物学.

1 材料和方法

1.1 材料及其保存

巨龙竹分布在交通不便的边远地区,要采用大量新鲜植物材料提取 DNA 十分困难.为了保证材料的可靠性,我们采用硅胶干燥和冷冻两种方法保存材料.

供试材料于 2002 年 3 月~10 月采自云南西双版纳(勐伦、打洛),临沧地区沧源县(班洪、班老)以及思茅地区孟连县(勐啊、勐马)等地.将巨龙竹的新鲜幼叶,用硅胶在 9h 内使其干燥.同时另外采集幼叶放入冷藏箱中,用冰块保持低温,然后放入 -20°C 冰箱暂时保存.两种材料带回实验室后,放入 -76°C 冰箱中保存^[5].与此同时,采集少量活体植株种植于温室中以供对比试验.

1.2 基因组 DNA 提取

对比了十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)和十二烷基磺酸钠(SDS)等方法^[6,11,12],并改进试剂浓度和处理方法(试验过程略),最终通过改良的 CTAB 法提取植物 DNA,其产率和纯度都可满足 RAPD 分析,方法如下:

(1) 将硅胶干燥、冷冻、及新鲜的巨龙竹叶片用液氮研磨成粉末状,取 0.2 g 干粉装入离心管,加入 4ml $2\times$ CTAB 提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 1.5% β -巯基乙醇), 65°C 水浴 1 h,不断轻轻摇动,使之充分混匀.

(2) 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),摇匀后离心(4 500 g, 4°C).取上清液,加入 2/3 体积的冰冷的异丙醇,在 -20°C 冰箱中过夜.

(3) 取出样品,在 4°C 、10 000g 离心 10 min.弃上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,在室温下风干,溶于 200~300 μl 0.1TE(1mmol/L Tris-HCl pH = 8.0, 0.1 mmol/L EDTA pH = 8.0)中.

(4) 加入 2 μl RNAase, 37°C 水浴 40 min.

(5) 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),摇匀.然后在 4°C 、10 000 g 条件下离心 10 min.取上清液,重复本步骤,直至两液相之间不再有乳白色物质存在.

(6) 取上清液,加入 1/10 体积 3mol/L NaCl,再加 2 倍体积冰冷的无水乙醇,摇匀,在 -20°C 条件下 2 h 或过夜.

(7) 取出样品, 4°C 、10 000g 离心 10 min.弃上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,在室温下风干,溶于 200~300 μl 0.1TE, 4°C 保存或 -20°C 长时间保存.

1.3 DNA 的检测

1.3.1 凝胶电泳

将待测样品在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳.以 $0.5\times$ TBE(0.045 mol/L Tris-硼酸, 0.001 mol/L EDTA) 为缓冲液,溴化乙锭(ethidium bromide, 简称 EB)染色,溴酚兰作为指示,48kb λ DNA 作为标准并分为 10ng, 20ng, 50ng 三个等级.将待测样品 3 μl 与上样缓冲液同时上样,在 4~5V/cm 电压下进行电泳.1 h 后,在凝胶成像仪下观察并照相.通过 UVP(Cambridge)软件包进行定量分析,计算出样品中的 DNA 含量.

1.3.2 分光光度法

以 TE 为空白,将待测的 DNA 应用 ULTROSPEC2000 紫外分光光度计测定波长为 260、280 下的光吸收值,并计算 A260/A280 比值.

1.4 RAPD 扩增及最佳反应体系的建立

本试验在参考同类工作^[11,12]并充分考虑缓冲体系、扩增程序等因子的基础上,选取了反应成分中模板浓度、Taq 酶用量、引物浓度、dNTP 的浓度、 Mg^{2+} 浓度等 5 个重要因子进行正交试验^[8],设计正交试验因素水平表(表 1).

根据因素水平表查正交表 $L_{16}(4^5)$, 确定正交实验方案(方案表略). PCR 反应总体积为 $20\mu\text{L}$: 模板 DNA $0.1 \sim 1.5\text{ng}/\mu\text{l}$; 随机引物 $0.4 \sim 1.0\mu\text{mol}/\text{L}$ (购自上海生工), dNTPs $0.1 \sim 0.25\text{mmol}/\text{L}$ 、Taq 酶 $0.5 \sim 2.0\text{U}$ (购自 TaKaRa 公司); MgCl_2 $1.0 \sim 2.5\text{mmol}/\text{L}$; Tris - HCl $10\text{mmol}/\text{L}$; KCl $50\text{mmol}/\text{L}$, 加 ddH_2O 至 $20\mu\text{L}$, 于 Biometra Tgradient 96 型基因扩

增仪中扩增. 其热循环参数设为: 94°C 预变性 2min , 之后进行 40 个循环 (94°C 30sec , 36°C 1min , 72°C 90sec), 最后 72°C 延伸 7min 后在 4°C 终止反应. 扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 $1 \times \text{TBE}$ ($0.09\text{mol}/\text{L}$ Tris - 硼酸, $0.002\text{mol}/\text{L}$ EDTA), 溴化乙锭染色, 溴酚兰及二甲苯青 FF 为指示剂, 1kb ladder DAN(购自上海生工)为分子量标准, 电压为 $4 \sim 5\text{V}/\text{cm}$, 电泳 $3 \sim 4\text{h}$ 后在紫外检测仪上观察结果并照相、记录、分析.

退火温度对 RAPD 扩增结果是至关重要的, 根据以上所做实验结果, 选取最佳反应组合, 设置退火温度梯度继续进行 RAPD 反应条件优化.

2 结果与讨论

2.1 不同方法保存的材料对基因组 DNA 提取的影响

通过改良的 CTAB 法分别从硅胶干燥、冷冻保存及新鲜叶片提取基因组 DNA, 通过电泳检测, 结果如图 1.

从图中可以看出, 从新鲜叶片中提取 DNA 和从硅胶干燥叶片中提取 DNA 含量相近, 分子量接近标准 λDNA . 而从直接冷冻保存的叶片中提取的 DNA 含量低, 电泳条带模糊不清, 质量明显不如前两种. 说明野外冷藏、冷冻保存的材料并不能保证 DNA 不受损伤, 且方法更复杂. 因此, 巨龙竹分子生物学研究以硅胶干燥保存代替新鲜材料为佳.

2.2 DNA 含量检测结果

2.2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

将从干燥叶片中提取的 DNA 电泳结果见图 2. 从图 2 中可看出, 每个样品的基因组 DNA 均只有一条带, 分子量与标准 λDNA (48kb) 相近. 利用 UVP (Cambridge) 软件包分析计算得出 DNA 平均含量为 1.051ng , 平均浓度约为 $350\text{ng}/\mu\text{l}$. 根据材料的重量 (0.2g) 及 DAN 样品体积 ($300\mu\text{l}$), 可计算出其提取率 ($\mu\text{g}/\text{g}$) = $350 \times 300 \times 10^{-3} / 0.2 = 525$, 其产率是比较高的^[13].

2.2.2 分光光度计检测结果

应用 ULTROSPEC 2000 紫外分光光度计, 测定 A_{260}/A_{280} 比值, 上述 201 ~ 213 九个样品的比值在 $1.66 \sim 1.75$ 之间, 平均为 1.72 . 该比值在 $1.7 \sim 1.8$ 之间, 表明 DNA 纯度符合要求.

表 1 因素水平表

水 平	因 素				
	A	B	C	D	E
	模板浓度 $/\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	引物浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTPs 浓度 $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	MgCl_2 浓度 $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Taq 酶用量 $/\text{U}$
1	0.1	0.4	0.1	1.0	0.5
2	0.5	0.6	0.15	1.5	1.0
3	1.0	0.8	0.20	2.0	1.5
4	1.5	1.0	0.25	2.5	2.0

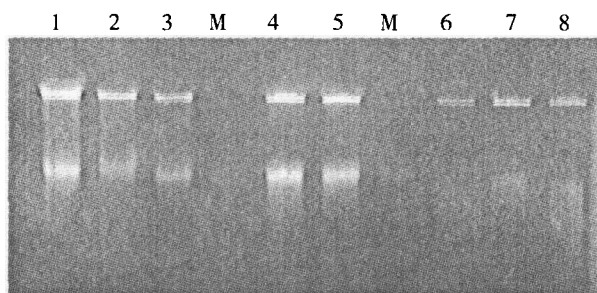


图 1 从硅胶干燥叶片中提取的 DNA 与新鲜叶片中提取 DNA 的比较图

line 1, 2, 3, 依次为 78, 98, 108 样品, 材料为硅胶干燥;
line 4, 5, 为 219, 220 号样品, 材料为新鲜叶片;
line 6, 7, 8 为 39, 44, 46 号样品, 材料为冷冻保存的。
M 为标准 λDNA 。

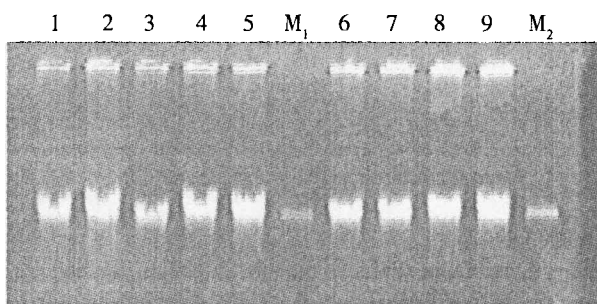


图 2 干燥叶片提取 DNA 电泳图

line 1 ~ 5 分别为样品 201, 203, 204, 205, 206;
line 6 ~ 9 分别为样品 208, 209, 212, 213;
 M_1 为 0ng λDNA 标准, M_2 为 50ng λDNA 标准。
上样体积均为 $3\mu\text{l}$, 电压为 $5\text{V}/\text{cm}$, 溴酚兰为指示剂。

一般认为,质量好的 DNA 分子量大约在 50kb, A260/A280 比值在 1.7~1.8 之间,具有清晰的和强的 PCR 扩增式样^[6]. 竹类植物材料中的蛋白质、多糖及酚、酯等次生物质给 DNA 的提取和纯化造成很大困难. 根据毛燕等人的研究,九种竹叶中蛋白质平均含量为 13.16%,多糖平均含量为 14.89%^[10]. 此外,竹叶中还含有黄酮、多酚、硅等次生物质均影响提取 DNA 的质量. 作者采用的改良 CTAB 法,所提取的 DNA,根据上述检测结果,其产率和纯度都可满足 RAPD 分析的需要.

2.3 最佳 RAPD 反应体系的建立

2.3.1 正交试验结果及分析

以 201 号样品作为模板 DNA, S₂₁ 作为引物(序列: CAGGCCCTTC). 按上述 L₁₆(4⁵) 正交表作 PCR 扩增试验,结果见图 3.

根据电泳的条带进行正交试验表中各组的结果统计^[8], 计算各因素列中相同水平所对应的指标 (K)、平均值(k)及级差(R),见表 2.

R 值的大小反映了该因素对结果影响的大小,从表 2 中看出,在试验范围内,5 个因子中以模板浓度影响最大,其余依次为引物浓度和 Mg²⁺ 浓度, Taq 酶用量,但这几项因子效应相差不大, dNTPs 的浓度影响最小. 电泳结果显示,第 1~13 号试验虽能扩增,但条带少,不清晰且重复性差,尤其以 1, 2, 5, 6 号效果差,第 14 号无扩增,第 15, 16 号产生的条带多、清晰、重复性好. 从反应体系来看,第 1, 2, 5, 6 组试验的各因素水平都比较低,尤其是主要因子模板浓度、引物浓度的水平都在 1 或 2. Mg²⁺ 浓度也对试验结果产生较大的影响, MgCl₂ 浓度为低水平的试验组扩增效果都不好,有的甚至不能扩增. 第 15, 16 号模板浓度、引物浓度和 Mg²⁺ 浓度等主要因子的水平都为 3 或 4. 因此可以认为,本实验中所设计的 5 因子、4 水平的试验中,模板浓度、引物浓度和 Mg²⁺ 浓度为主要因子,而且,在其高水平上有利于获得较满意的 RAPD 结果. Taq 酶用量和 dNTPs 的浓度在低水平就可满足需要,高浓度并不能提高试验效果,反而造成浪费. 在 20 μ l 总反应体系中,各项试验因子最适浓度为:模板 DNA 1~1.5ng/ μ l, 引物 0.8~1.0 μ mol/L, dNTPs 0.1~0.15mmol/L, Mg²⁺ 2.0~2.5ng/ μ l, Taq 酶 0.5~1.0U.

2.3.2 退火温度对扩增的影响

在上述试验因子的最适条件下,同样以 201 号样品作为模板 DNA, S₂₁ 作为引物,对退火温度作单因子试验. 设置温度梯度范围为 10 $^{\circ}$ C, 12 个梯度温度依次为 35 $^{\circ}$ C, 35.2 $^{\circ}$ C, 35.9 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 38.2 $^{\circ}$ C, 39.4 $^{\circ}$ C, 40.6 $^{\circ}$ C, 41.8 $^{\circ}$ C, 43 $^{\circ}$ C, 44.1 $^{\circ}$ C, 44.8 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 结果如图 4.

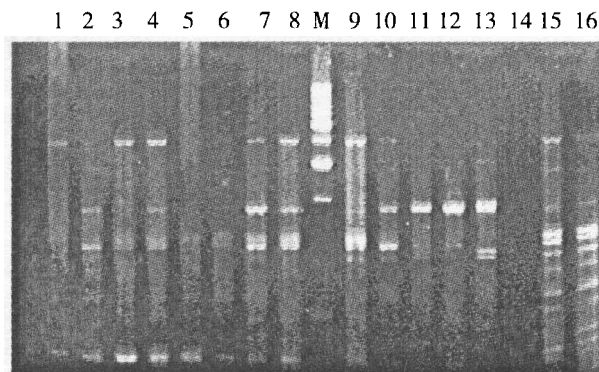


图 3 201 号样品 DNA 扩增产物电泳图
从左至右试验号数依次为 1~16, 中间一道为 1kb Ladder DNA 分子量标准.

表 2 正交试验结果表

水 平	因 素				
	A	B	C	D	E
	模板浓度 /ng· μ l ⁻¹	引物浓度 / μ mol·L ⁻¹	dNTPs 浓度 /mmol·L ⁻¹	MgCl ₂ 浓度 /mmol·L ⁻¹	Taq 酶用量 /U
K ₁	14	13	22	11	23
K ₂	16	11	21	20	27
K ₃	19	25	16	24	18
K ₄	21	26	22	26	13
k ₁	3.5	3.25	5.25	2.75	5.75
K ₂	4	2.75	4	5	6.75
K ₃	5.25	6.5	4	6	4.5
K ₄	7.5	6	5.5	6.5	3.25
R	4	3.75	1.5	3.75	3.5

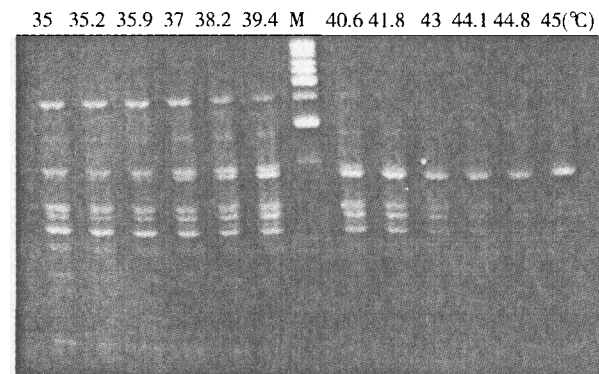


图 4 退火温度对 RAPD 扩增的影响

退火温度是影响 RAPD 反应最重要的条件之一,同时它也具有相对的灵活性,是优化 RAPD 反应的重要控制措施.从图 4 中可以看出,在 35℃~45℃的范围内,温度越低,扩增带越多、越强,扩增效率高,但特异性差;温度越高,扩增带减少、变弱,扩增效率降低.退火温度在 40℃以上就会抑制扩增产物^[5].在保证扩增效率的同时,又要达到增强特异性的目的,我们认为 35~36℃较为适宜.退火温度较低,能保证引物与模板的稳定配对,同时允许适当的错配,以扩大引物在基因组 DNA 中配对的随机性.

3 结论

(1) 试验证明,巨龙竹的基因组 DNA 的提取中,用硅胶干燥的材料可以代替新鲜样品,为远距离采集样品提供了方便;

(2) 本实验采用的改良 CTAB 法所提取的 DNA 样品纯度较高,抑制 Taq 酶活性的杂质较少,完全可满足 RAPD 分析的需要;

(3) RAPD 反应的结果受到诸多因素的影响,本试验在充分考虑缓冲体系、扩增程序等因子的基础上,选取了反应成分中模板浓度、Taq 酶用量、引物浓度、dNTPs 的浓度、Mg²⁺ 浓度等 5 个重要因子,通过正交试验所设计的 16 组试验在 Biometra Tgradient 96 型基因扩增仪上一次完成扩增,并在筛选出的最适条件下进行退火温度的梯度试验.结果表明,在 20μl 的 RAPD-PCR 反应体系中,各项因子最适条件为:模板 DNA 1~1.5ng/μl,随机引物 0.8~1.0μmol/L, dNTPs 0.1~0.15mmol/L, Mg²⁺ 2.0~2.5mmol/L, Taq 酶 0.5~1.0U,退火温度 35~36℃; Tris-HCl 10 mmol/L; KCl 50 mmol/L,加 ddH₂O 至 20μL.其热循环参数为:94℃预变性 2min,之后进行 40 个循环(94℃ 30sec, 36℃ 60sec, 72℃ 90sec),最后 72℃延伸 7min 后在 4℃终止反应.该体系可有效应用于巨龙竹的遗传多样性研究中,重复性好,可靠性高.为进一步进行分子生物学研究奠定基础.

参考文献:

- [1] Doyle J J, Dogle J L. Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue[J]. Focus, 1990, 2: 13~15.
- [2] Williams J G K, Kublik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nuclear Acids Research, 1990, 18(22): 6531~6535.
- [3] Lanham P G, Fennel S, Moss J P, et al. Detection of polymorphic loci in arachis germplasm using random amplified polymorphic DNAs[J]. Genome, 1992, 35: 885~889.
- [4] Soren Brauner, Daniel J, Crawford. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae[J]. American Journal of botany, 1992, 79(12): 1436~1439.
- [5] XIE Zhong - Wen, GE Song, Hong De - Yuan. Prepration of DNA From Silica Gel Dried Mini - amount of Leaves of Oryza rufipogon for RAPD Study and Total DNA Bank Constrution[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(8): 807~812.
- [6] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.9~51.
- [7] 杜凡,赵晓惠,杨宇明,辉朝茂.巨龙竹的变异类型及其引种区划研究[J].竹子研究汇刊,2001,20(1):19~26.
- [8] 贵州农学院.生物统计[M].北京:农业出版社,1981.164~233.
- [9] 汪小全,邹喻苹,张大明,张志宪,洪德元. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1996,38(12):954~962.
- [10] 毛燕,王学利.毛竹等九种竹叶中蛋白质和总糖含量的测定[J].竹子研究汇刊,1998,17(2):18~20.
- [11] 吴益民,黄纯农,王君晖.四种竹子的 RAPD 指纹图谱的初步研究[J].竹子研究汇刊,1998,17(3):10~13.
- [12] 师丽华,杨光耀,林新春,郭起荣.毛竹种下等级的 RAPD 研究[J].南京林业大学学报,2002,26(3):65~68.
- [13] 赵妹华,王富德,张世苹,林凤.提取、纯化植物 DNA 方法的比较[J].国外农学—杂粮作物,1998,18(2):35~38.