

RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法

胡春根 郝 玉 邓秀新 史永忠

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

DNA Extraction Method for RAPD Analysis in Pears

HU Chungeng HAO Yu DENG Xiuxin SHI Yongzhong

(State Key Laboratory in Genetic Improvements of Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

不受地理环境、季节和气候影响的 DNA 分子标记技术是 90 年代发展起来的检测遗传差异的一种新技术, 特别是 RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增的多态性 DNA) 技术近年来发展很快, 因其位点多, 灵敏度高且操作简便, 无须放射性探针, 也不必预先知道模板 DNA 的碱基顺序, 而广泛应用于种质资源分析、杂种后代鉴定和性状早期预选⁽¹⁾。在柑桔、苹果、葡萄、桃和李等多种果树上已有多篇报道⁽²⁾。然而却未见一篇关于梨 RAPD 方面的报道。实际上, RAPD 技术并非如人们想像的那样简便易行, 在某些植物中由于体内的特殊内含物(如单宁类物质、酚类及色素物质)会影响 DNA 的质量, 导致扩增失败⁽³⁾。我们前期试图进行梨 RAPD 分析也多次失败, 就是因为以 SDS 法提取的梨 DNA 质量不高, 褐变严重, 无法扩增。Sayuri Teramoto 等(1994)以 CTAB 法提取梨 DNA, 然后过柱纯化作 RFLP 用⁽⁴⁾, 虽然能够成功, 但药品成本较高, 操作复杂, 对微量提取难于做到。因此, 本试验试图对 DNA 的微量快速提取法——SDS 法作一些改进, 使之能够适合 RAPD 分析的要求。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

本研究所用材料均取自华中农业大学果树标本园, 供提取方法比较用的材料为黄花梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai), 其它供扩增检查用的梨品种分别为: 长十郎 (*P. pyrifolia* Nakai)、金盖酥 (*P. bretschneideri* Rehd)、湘菊 (*P. pyrifolia* Nakai)、克菲(*P. communis* L.)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 最初以肖顺元(1995)的方法⁽⁵⁾稍作修改。取 1~2 个嫩梢尖或刚展开的幼叶(0.1g 左右或更少), 置灭过菌的 1.5ml 离心管中, 用自制的玻璃棒将组织捣碎, 加入 700 μ l 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L Na₂EDTA, pH 8.0, 500mmol/L NaCl, 100mmol/L β -巯基乙醇(BME), 3% 十二烷基磺酸钠(SDS), 搅匀后, 在 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 20~30 分钟, 离心(12 000rpm, 2min), 将上清液转入干净离心管中, 加入等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 缓慢颠倒混匀, 离心(12 000rpm, 5min), 上清液再以氯仿: 异戊醇(24: 1)抽提后离心(12 000rpm, 5min), 收集上清液, 加入 10 μ l 5 mol/L 醋酸钠和 0.6 倍体积异丙醇, 摇匀, 在 -20 $^{\circ}$ C 下静置 10min, 离心(12 000rpm, 2min), 倾去上清液, 沉淀物用 75% 酒精浸泡, 无水酒精漂洗, 真空干燥, 最后加入 100 μ l TE 溶解, 即为 DNA 粗提液。此方法在柑桔、苹果、桃等多种果树上提取效果均较好, 但在梨中提得的 DNA 为深褐色, 无法用作 RADP 分析。因此, 本试验在磨样时添加抗酚类氧化褐变的物质, 各处理方法如下:

对照: 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L Na₂EDTA, pH8.0, 500mmol/L NaCl, 100mmol/L BME, 3% SDS。

处理 A: 将提取缓冲液中的 BME 浓度提高到 200 mmol/L; 处理 B: 提取缓冲液+0.05g/g 鲜样水溶性 PVP; 处理 C: 提取缓冲液+0.10g/g 鲜样水溶性 PVP; 处理 D: 提取缓冲液+0.05g/g 鲜样不溶性 PVP; 处理 E: 提取缓冲

液+0.10g/g 鲜样不溶性 PVP; 处理 F: 提取缓冲液+0.005g/g 鲜样抗坏血酸(Vc); 处理 G: 提取缓冲液+0.05g/g 鲜样抗坏血酸; 处理 H: 提取缓冲液+0.5g/g 鲜样抗坏血酸; 其它程序同前。

1.2.2 DNA 质量检测 提取的 DNA 以蒸馏水稀释 25 倍, 在 Berkman DU640 紫外分光光度计上读取 260nm 和 280nm 的 OD 值。

1.2.3 DNA 扩增 扩增在 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 PCR 仪上进行, 每 25 μ l 反应液中含 50mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 250 μ g/ml BAS, 2% Ficoll; 1mmol/L Tartrazine, 2mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 0.8 μ mol/L 10-mer primer, 0.8 unit Taq polymerase(作物遗传改良国家重点实验室制)及 25~50ng DNA。反应条件为: 93 $^{\circ}$ C 2 min; 然后在 93 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 运行 43 个循环, 之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后, 紫外分析仪上观察并照像。

2 结果与讨论

2.1 几种添加剂对提取液 pH 值的影响

添加抗氧化剂后, 在磨样前后以精密 pH 试纸测提取液的 pH(65 $^{\circ}$ C), 结果见表 1。可见水溶性 PVP 和不溶性 PVP 对提取液的 pH 影响均较小, 而添加 Vc 后 pH 值略有降低, 随添加量不同而有变化。磨样后, 不同处理即显现不同颜色, 在经苯酚抽提后, 颜色的差异更明显, 增加 BME 用量、加入水溶性 PVP 等几个处理与对照无差别, 添加不溶性 PVP 虽然颜色略有减轻, 且能够沉淀出 DNA, 但仍然不能作 RAPD 分析用。唯有加 Vc, 磨样后颜色变为浅红色, 再经苯酚和氯仿抽提后, 样液基本上为无色, 少数仍微带颜色, 加入醋酸钠和异丙醇后得到的 DNA 粗提物微带颜色或白色。

表 1 添加剂对提取液 pH 和 DNA 褐变的影响

处 理	pH 值	DNA 状 况	处 理	pH 值	DNA 状 况
对 照	7.0	深褐色, 不易沉淀	+ 不溶性 PVP 0.100g/g 鲜样	7.0	褐色, 易沉淀
+BME	—	深褐色, 不易沉淀	+ Vc 0.005g/g 鲜样	6.8	褐色, 易沉淀
+ 水溶性 PVP 0.050g/g 鲜样	7.0	深褐色, 不易沉淀	+ Vc 0.050g/g 鲜样	6.5~6.8	浅褐至浅绿色, 易沉淀
+ 水溶性 PVP 0.100g/g 鲜样	7.0	深褐色, 不易沉淀	+ Vc 0.100g/g 鲜样	6.0	无色透明状沉淀
+ 不溶性 PVP 0.050g/g 鲜样	7.0	深褐色, 易沉淀			

2.2 Vc 添加量的优化

在提取缓冲液中分别添加不同量的 Vc, 观察对 pH 的影响, 提样过程中颜色的变化, 沉淀 DNA 的多少、颜色和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值, 结果见表 2。由表 2 可见, Vc 添加量越大, pH 值降低越明显。但只要 Vc 的量控制在 0.250g/g 鲜样以下, 提取液的 pH 值可保持在 6.0~6.5 以上。磨样后的样品颜色也发生变化, 随着 Vc 添加量增加, 磨样后样品颜色由褐色变为红色或淡红色, 最终沉淀出的 DNA 颜色也逐渐减轻, 变为白色或透明状, 但量逐渐减少。紫外检测结果也证实, 若 Vc 添加量少于 0.100g/g 鲜样, 则所得 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值低于 1.8, 表明其中的蛋白质或酚类物质含量可能较高, 若 Vc 添加量高于 0.500g/g 鲜样, 则所得 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值达 2.0 以上, 可能 RNA 含量较高。

表 2 Vc 添加量对提取效果的影响

添加 Vc 量 (g/g 鲜样)	提取液 pH 值 (65 $^{\circ}$ C)	苯酚抽提后 样液颜色	DNA 粗提物 颜色	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
0.005	7.0	绿褐色++	+++	3.0743	2.7709	1.1095
0.025	7.0	绿褐色+	++	2.9562	2.6597	1.0669
0.050	6.8	红色+	+	2.9997	1.9459	1.5415
0.100	6.5	红色+	-	2.9997	1.6197	1.8520
0.250	6.0	红色++	-	2.0743	1.1502	1.8034
0.500	5.8	红色+++	-	1.1323	0.5238	2.1617

一般说来, DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值低于 1.5, 则难进行 RAPD 扩增。因此, 在提取梨 DNA 时, 磨样前添加 Vc 0.050~0.250 g/g 鲜样, 可以沉淀出供 RAPD 扩增用的 DNA, 其中以 0.100g/g 鲜样左右较好。

2.3 RAPD 扩增

以上述方法提取黄花、长十郎等品种 DNA, 以 Operon 公司产引物 OPV07 扩增, 结果见图 1。

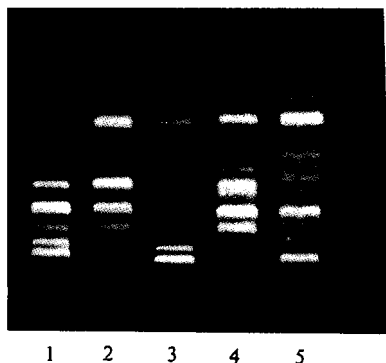


图 1 几个梨品种的 RAPD 图谱(OPV07)

1. 黄花; 2. 长十郎; 3. 金盖酥; 4. 湘菊; 5. 克菲。

DNA 的提取质量往往是决定 RAPD 分析成功与否的关键。CTAB 法虽然是 DNA 提取中的经典方法, 但由于其成本较高, 毒性较大, 且操作繁琐, 目前往往仅在需 DNA 量较大的 RFLP 等分析中采用。而 SDS 法对于模板 DNA 质量要求不严的 RAPD 分析采用较多。肖顺元认为 SDS 提取的柑桔 DNA 的分子量可达 50kb, 可用于 RFLP 分析^[5], 戴思兰等采用更简单的碱(NaOH)法提取菊属植物 DNA, 也能用于 RAPD 扩增^[6]。

许多研究者认为, 虽然 RNA 有无和带有少量的蛋白质并不会影响扩增, 但是一些酸性多糖、多酚、单宁及色素等严重影响 Taq(DNA 聚合酶)的活性, 而导致扩增失败^[3]。在我们的前期试验中, 由于梨 DNA 提取物含较多酚类物质, 呈深褐色, 用苯酚、氯仿及乙醇等无法去除, 不能用作 RAPD 扩增, 甚至连 DNA 沉淀也难于得到。

为防酚类物质氧化成为一些非水溶性物质与 DNA 结合后影响 DNA 解链或降低 Taq 酶活性, 通常都在提取液中加入一定量的巯基乙醇(也防止 DNA 链断裂并重聚为二聚体), 但在本试验中发现进一步提高 BME 浓度并不能防止酚类物氧化变色; 水溶性 PVP 和不溶性 PVP 也是生物大分子提取时常用的抗氧化褐变剂, 我们在提取柑桔、梨等植物的 DNA 时, 发现水溶性 PVP 完全没有减轻褐变的效果, 而不溶性 PVP 有一定的抗氧化褐变能力, 但对于梨, 其抗褐变能力仍很有限。Vc 是抗氧化剂, 能阻止酚类物质氧化为不溶性物质, 但 Vc 带羧基, 对提取液的 pH 会有影响。因此须用量适当, 以不致影响提取液的 pH 值。在我们的试验完成时, 看到戴思兰等在提取菊属植物时也试用了 Vc, 但他们未取得正结果^[6], 可能他们在试验中 Vc 添加量太低(约 0.001g/管)。

一些报道中还提到不同时期、不同材料提样难度不同, 而我们发现只要磨样容易, 无论老叶新叶, 磨样前添加适量 Vc(约 0.100g/g 鲜样), 均能得到较多的 DNA 粗提物, 且色泽洁白, 能够用于 RAPD 扩增。

参 考 文 献

- 1 卢 江. 基因定位及其在园艺作物遗传育种中的应用. 园艺学年评, 1995, 1: 165~179
- 2 史永忠, 邓秀新, 郭文武, 胡春根. RAPD 技术与果树种质资源及育种研究. 中国果树, 1997, 2: 46~48, 56
- 3 汪小兰, 邹喻年, 张大明等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38(12): 954~962
- 4 Sayuri T, Yuriko K-M, Masahiko H *et al.* DNA Finger-printing to Listinguish Cultivar and Parental Relation of Japanese Pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 1994, 63(1): 17~21
- 5 肖顺元. RAPD 分析——鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法. 遗传, 1995, 17(4): 40~42
- 6 戴思兰, 陈俊愉, 高英孚, 李文彬. DNA 提取方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响. 园艺学报, 23(2): 169~174