

# 油葵种子 DNA 提取和 RAPD 反应体系的优化

薛志忠, 艾鹏飞, 魏景芳\*, 李冬杰, 李楠, 刘晨 (河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

**摘要** [目的] 为利用 RAPD 技术进行油葵的亲缘关系分析及杂种鉴定奠定基础。[方法] 以 6 种杂交油葵种子为试材, 采用改良的 CTAB 法提取油葵基因组 DNA, 并对提取 DNA 的浓度和纯度进行测定。通过单因子梯度试验, 筛选出优化、稳定的 RAPD PCR 反应体系。[结果] 采用改良 CTAB 法提取的油葵 DNA 质量好、得率高, 且无蛋白质和酚类的污染。油葵的最适 RAPD PCR 反应体系为: 2.0  $\mu$ l 10  $\times$  Buffer, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 150  $\mu$ mol/L dNTPs, 1.5 U Taq 酶, 2.0 ng/ $\mu$ l DNA 模板, 0.25  $\mu$ mol/L 引物, 总体积为 20.0  $\mu$ l。利用该体系对不同含油量的 6 个油葵杂交种进行扩增, 均表现为带形清晰稳定、带数适宜。[结论] 该 RAPD 技术体系适用于各种油葵杂交种的 DNA 分析。

**关键词** 油葵; DNA 提取; RAPD 反应体系

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02259-03

## DNA Extraction from Oil Sunflower Seeds and the Optimization of Its RAPD Reaction System

XUE Zhi-zhong et al (College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

**Abstract** [Objective] The research aimed to lay the foundation for the genetic relationship analysis of oil sunflower and hybrid identification by RAPD technology. [Method] With 6 varieties of hybrid oil sunflower seeds as tested materials, genomic DNA were extracted from oil sunflower by the improved CTAB method and the concentration and purity of the extracted DNA were determined. Through single-factor gradient test, the optimized and stable RAPD PCR reaction system was screened out. [Result] DNA extracted from oil sunflower by the improved CTAB method had no pollution of protein and phenols, with good quality and high yield. The optimum RAPD PCR reaction system was as follows: 2.0  $\mu$ l 10  $\times$  Buffer, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 150  $\mu$ mol/L dNTPs, 1.5 U Taq enzyme, 2.0 ng/ $\mu$ l DNA template and 0.25  $\mu$ mol/L primers with total volume of 20.0  $\mu$ l. 6 oil sunflower hybrids with different oil content were amplified by this system and they all showed clear and stable bands type with suitable band number. [Conclusion] This RAPD reaction system was suitable for DNA analysis of all kinds of oil sunflower hybrids.

**Key words** Oil sunflower; DNA extraction; RAPD reaction system

杂交油葵(Oil sunflower hybrids) 是人工培育的籽实含油率较高的栽培型向日葵, 作为一种新型油料作物其种植面积逐年扩大<sup>[1]</sup>。因此, 在实际育种过程中, 其遗传分析及品种纯度鉴定方面的研究具有重要的理论和实用价值。刘杰等<sup>[2]</sup>对油葵杂交种 A15 的 DNA 提取及检测进行过初步探讨, 但其 DNA 提取技术体系有待完善。笔者对目前在生产中被广泛应用的油葵杂交种的 DNA 提取技术及 RAPD 分析中的关键因子进行了较为系统的探索, 旨在建立油葵杂交种简单、实用、有效的 DNA 分析技术体系, 为进一步采用 RAPD 对油葵的亲缘关系进行分析及杂种鉴定奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 6 种杂交油葵: 新葵杂四号, 矮大头(567DW), 利马 349(A15), 新 101(长城油葵), 欧洲种杂(A17), 引进的罗马尼亚品种“精选”。均由河北正阳葵业科技有限责任公司提供。

## 1.2 方 法

**1.2.1 基因组 DNA 提取。** DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[3]</sup> 并加以改进。取种仁 0.5 g, 在液氮中迅速研磨成粉末, 转至 5 ml 离心管中, 加入 2 ml 65  $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液 (100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 用前加入 2% 体积 - 巯基乙醇, 1% 体积 PVP(W/V)), 65  $^{\circ}$ C 水浴 45 min, 间隔 10 min 摇匀 1 次; 待冷却到室温后, 8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入 5 ml 离心管中, 加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 后混匀, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 再加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 8 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液至新的 5 ml 离心管中, 加入 1  $\mu$ l Rnase(10 ng/ml) 37  $^{\circ}$ C 水浴 25 min, 等体积氯仿/异戊醇(24:1) 抽提 1

次, 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 值 5.2), 2 倍体积 4 无水乙醇, 混匀后用无菌牙签缠出 DNA 至 1.5 ml 离心管, 70% 的乙醇洗涤 2 次, 风干后 TE 溶解。

**1.2.2 DNA 检测。** 凝胶电泳: DNA 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳 60 min(5 V/cm), EB 染色后观察; 分光光度计检测: UV-2401PC 紫外分光光度计测定波长 260 和 280 nm 时的 OD 值, 算出其浓度和纯度。

**1.2.3 RAPD PCR 反应体系的建立。** RAPD 反应中各组分浓度及用量见表 1, DNA 选用新葵杂四号。参照李先平等<sup>[4]</sup> 及张今今等<sup>[5]</sup> 的方法采用单因子梯度试验, 即在其他因子不变的情况下按一定浓度梯度改变某一因子(表 2), 筛选出优化、稳定的反应体系。PCR 程序: 预变性 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 36  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 70 s, 40 循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。4  $^{\circ}$ C 保存。

表 1 油葵 RAPD PCR 反应体系

Table 1 RAPD PCR reaction system for oil sunflower

反应成分	试剂浓度	体积 $\mu$ l	终浓度
Reaction components	Actual concentration	Volume	Final concentration
Buffer	10 $\times$	2.0	1 $\times$
$MgCl_2$	20 mmol/L	2.0	2.0 mmol/L
dNTPs	2.5 mmol/L	1.2	150 $\mu$ mol/L
Taq polymerase	2.5 U/ $\mu$ l	0.6	1.5 U
DNA	40 ng/ $\mu$ l	1.0	2 ng/ $\mu$ l
Primers	5 $\mu$ mol/L	1.0	0.25 $\mu$ mol/L

注: Taq 酶由上海 Promega 公司提供, 引物 (CAATCGCCGT) 由上海生工公司提供。下同。

Note: Taq polymerase comes from Promega, primer (CAATCGCCGT) offered by Shanghai Sargon corporation. The same as below.

**1.2.4 凝胶电泳成像** 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳。电泳缓冲液 1  $\times$  TAE 点样 5  $\mu$ l, 电压 3~5 V/cm。电泳 50 min 后在 AITM26 型凝胶成像系统上检测。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA 质量检测** DNA 在 1.0% 琼脂糖水平电泳结果见

基金项目 河北科技大学大学生科技创新基金项目。

作者简介 薛志忠(1983-), 男, 河北秦皇岛人, 硕士研究生, 研究方向: 油葵育种及植物细胞培养。\* 通讯作者。

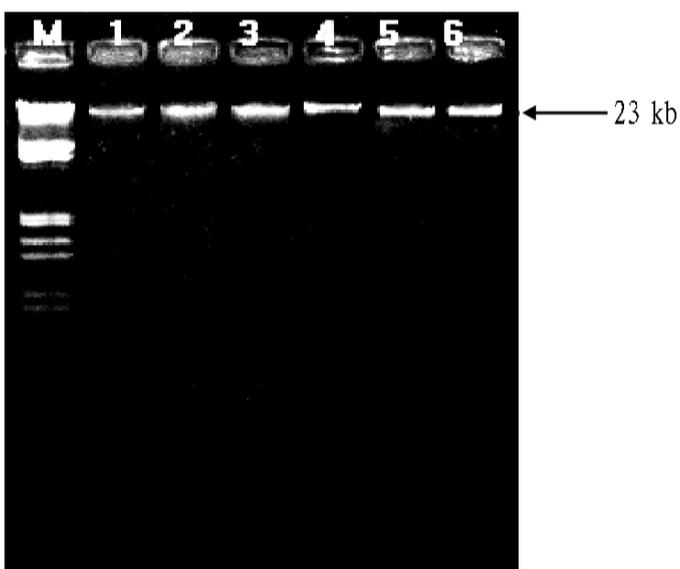
收稿日期 2007-11-28

图1,改良的CTAB 法提取的DNA 片段大小在23 kb 左右。紫外分光光度计测定,6 种油葵基因组 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.8 ~2.0,表明样品中蛋白质和酚类物质去除较干净;按照公式  $DNA(\mu g/ml) = OD_{260} \times 50/1000 \times \text{稀释倍数}$ ,将 DNA 浓度稀释到 40 ng/ $\mu$ 。

表2 RAPD PCR 反应体系优化设计

Table 2 Optimum design for RAPD-PCR reaction system

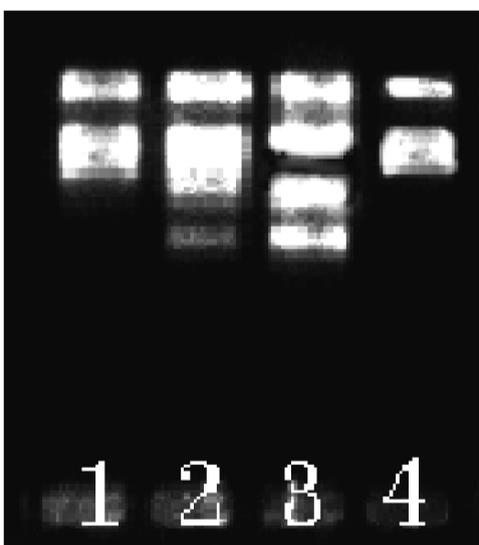
序号 No.	$Mg^{2+}$ $\mu$	dNTPs $\mu$	Taq 酶 $\mu$ Taq polymerase	Pi ners $\mu$
1	1.2	0.8	0.4	0.5
2	1.6	1.2	0.5	0.1
3	2.0	1.6	0.6	2.0
4	2.5	2.0	0.7	3.0
CK	0	0	0	0



注:M. DNA/ Hnd Markers; 1~6 泳道分别为油葵、  
、  
、  
、  
、  
。  
Note: M. DNA/ Hnd Markers; Lanes 1~6 indicate oil sunflower  
、  
、  
、  
、  
、  
。

图1 6 种油葵基因组 DNA 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of genomic DNA from 6 oil sunflower varieties



注:1.1.2  $\mu$ ; 2.1.6  $\mu$ ; 3.2.0  $\mu$ ; 4.2.5  $\mu$ 。

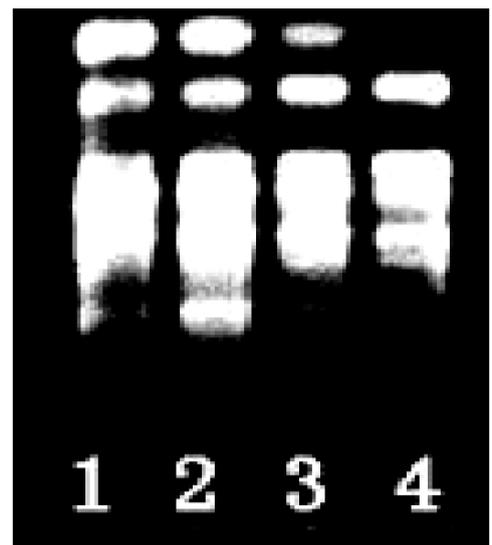
图2  $Mg^{2+}$  浓度对 RAPD 扩增的影响

Fig.2 Effects of  $Mg^{2+}$  concentration on RAPD amplification

2.2 RAPD PCR 反应体系建立

2.2.1  $Mg^{2+}$  浓度。不同  $Mg^{2+}$  浓度下 RAPD 结果如图2 所示, $Mg^{2+}$  为 1.2 ~2.0  $\mu$  时,谱带清晰,2.0  $\mu$  时谱带清晰且条带多,2.5  $\mu$  时谱带模糊,带数少。故较理想的  $Mg^{2+}$  量为 2.0  $\mu$ 。其原因可能是  $Mg^{2+}$  作为 Taq 酶的激活剂,浓度过低时 Taq 酶的活性也较低,导致扩增不完全;浓度过高时同样影

响酶的活性,引起带型弥散。



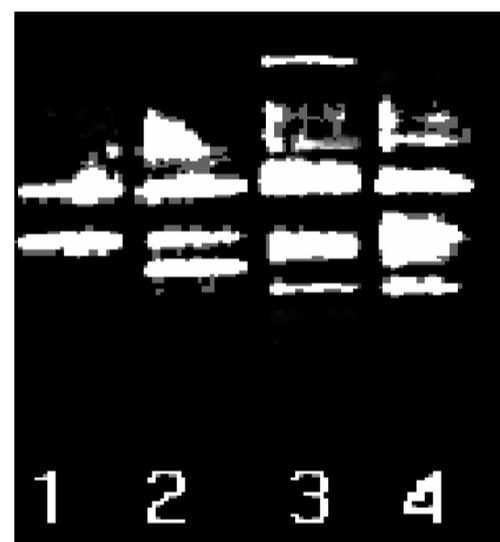
注:1.0.8  $\mu$ ; 2.1.2  $\mu$ ; 3.1.6  $\mu$ ; 4.2.0  $\mu$ 。

图3 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增的影响

Fig.3 Effects of dNTPs concentration on RAPD amplification

2.2.2 dNTPs 浓度。dNTPs 作为反应成分之一,其含量直接影响着扩增产物的效果:dNTPs 浓度过高时易错配,浓度过低时产率较低。由图3 可知,当 dNTPs 加入量为 1.2  $\mu$  时谱带稳定清晰,故试验选择该浓度。

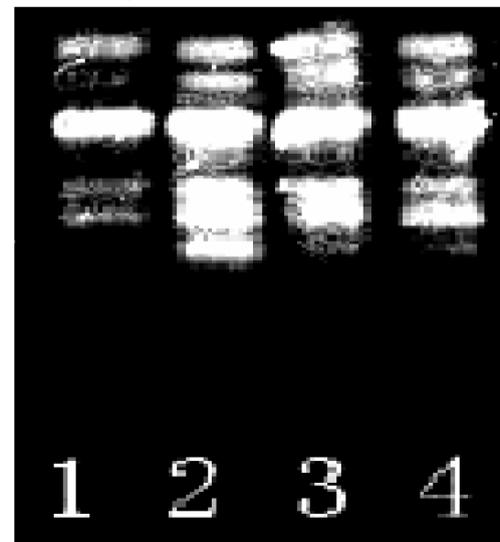
2.2.3 Taq 酶浓度。Taq 酶的用量为 RAPD 的关键因子之一。试验设计的 4 个浓度梯度时 RAPD 的结果见图4,用量为 0.6  $\mu$  时扩增的带数多、带形清晰稳定,过低时带数少,过高时带形模糊,出现假阳性。故试验选用 Taq 酶为 0.6  $\mu$ (即 1.5 U)。



注:1.0.4  $\mu$ ; 2.0.5  $\mu$ ; 3.0.6  $\mu$ ; 4.0.7  $\mu$ 。

图4 Taq DNA 聚合酶对 RAPD 扩增的影响

Fig.4 Effects of Taq polymerase concentration on RAPD amplification



注:1.0.5  $\mu$ ; 2.1.0  $\mu$ ; 3.2.0  $\mu$ ; 4.3.0  $\mu$ 。

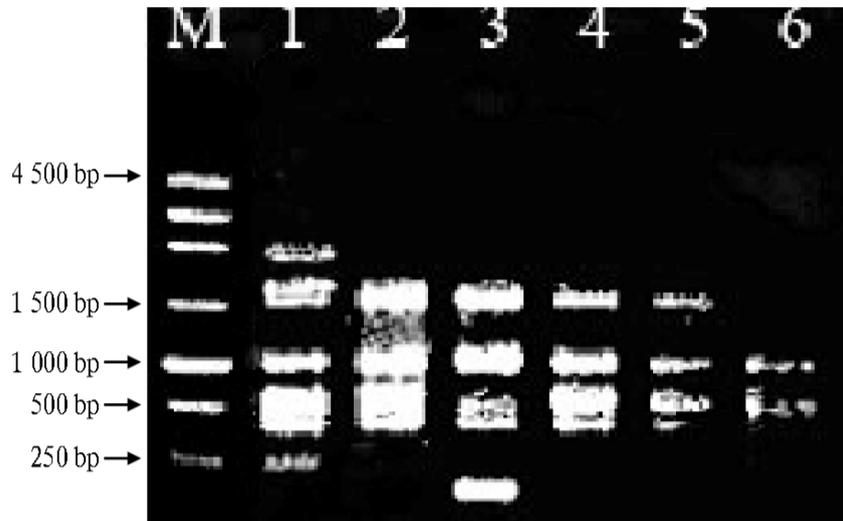
图5 随机引物对 RAPD 扩增的影响

Fig.5 Effects of random primers concentration on RAPD amplification

2.2.4 Pi ners 浓度。引物浓度直接影响着 RAPD 谱带的真

伪性。不同引物浓度下RAPD 结果见图5, 引物浓度为0.5  $\mu$ l 时带数少、带形模糊, 浓度为1.0  $\mu$ l 时条带多、带形稳定清晰, 浓度为2.0 和3.0  $\mu$ l 时条带分辨不清。因此, 引物为1.0  $\mu$ l (0.25  $\mu$ mol/L) 时适宜。

**2.2.5 RAPD PCR 体系建立。**采用优化后的RAPD 体系(10  $\times$ Buffer 2.0  $\mu$ l,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTPs 150  $\mu$ mol/L, Taq 酶 1.5 U, DNA 2.0 ng/ $\mu$ l, RAPD 引物0.25  $\mu$ mol/L) 对6 个油葵杂交种进行扩增, 结果如图5 所示, 不同含油量的6 个杂交种均表现出带形清晰稳定, 带数适宜。故该RAPD 技术体系对不同油葵杂交种都较为适用。



注:1~6 泳道分别为 、 、 、 、 、 。

Note: Lanes 1~6 indicate , , , , , respectively.

图6 不同油葵杂交种 RAPD 图谱

Fig. 6 RAPD patterns of different oilseed sunflower hybrids

### 3 讨论

CTAB 法常用于提取植物 DNA, 但因油葵为高油料作物,

(上接第2250 页)

时产生大量氧自由基、离子, 发生复杂的声化学反应, 亦能作用于微生物的遗传物质, 引起突变<sup>[3-4]</sup>。另外在超声波作用下, 存在于液体中的微小气泡(气泡或空穴) 所发生的一系列动力学过程足可以改变孢子壁结构<sup>[5]</sup>, 使细胞内外发生物质交换, 促进硫酸二乙酯进入细胞内, 使诱变作用更加充分。这样超声波照射时的生物学效应与硫酸二乙酯协同作用, 产生了更强的突变效果, 提高了高产菌株的筛选得率。尽管 2%DES 单因子诱变的诱变强度也很高, 但是诱变作用因子单一, 不能多方位的充分诱变, 容易发生回复突变, 而且大量研究表明, 采用复合诱变对遗传性较稳定抗逆能力极强的孢子处理, 能导致较大的突变。

该试验采用活性生物测定的筛选方法<sup>[6]</sup>, 直接根据诱变株对供试菌抑制圈直径的大小来确定诱变效果的好坏, 结果

特别是种子, 故其 DNA 的提取难度相对较大<sup>[2,6]</sup>。该试验采用改良的CTAB 法, 即添加1 次CTAB 提取液, 后期辅以Rnase 和盐处理, 从6 个油葵杂交种子中直接提取出了 DNA, 其得率高、简单实用。利用该方法提取的 DNA 进行后续的 RAPD 体系建立和优化, 图谱清晰、稳定, 证明该 DNA 质量也较高。

通常, RAPD PCR 对 DNA 质量要求不高, 模板中的少量 RNA 和蛋白质对 RAPD 扩增影响不大<sup>[7]</sup>。但该试验中, 油葵杂交种子中脂类物质丰富, 其提取的 DNA 对 RAPD PCR 效果产生影响。故该试验中采用较低浓度的 DNA (2.0 ng/ $\mu$ l) 以降低反应体系中有机物杂质的含量, 同时采用较高浓度的 Taq 酶 1.5 U 和  $Mg^{2+}$  (2.0 mmol/L) 来降低这些杂质对 PCR 扩增效率的影响。在 RAPD PCR 体系优化过程中, 采用单因子梯度试验, 筛选出各反应物的浓度, 但其缺乏对反应物在反应中的动态交互作用, 如能考虑到反应物之间的相互影响, 无疑将使得到的 RAPD PCR 反应体系更加完善。

### 参考文献

- [1] 李英杰, 赵世强, 杨金深. 河北省油葵产业现状分析[J]. 河北农业科学, 2002, 6(2): 56-60.
- [2] 刘杰, 熊艳文, 刘公社, 等. 向日葵种子不同部位微量提取 DNA 用于 PCR 的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(4): 615-619.
- [3] MURRAY G H, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [4] 李先平, 何云昆, 孙茂林, 等. 马铃薯 RAPD 分析方法优化初探[J]. 西南林业学报, 2000, 13(1): 59-64.
- [5] 张今今, 张莹, 李文燕. 榕属植物基因组 DNA 的提取及 RAPD 体系的优化[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(5): 147-152.
- [6] 莫结胜, 刘杰, 刘公社. 杂交油葵 A15 种子纯度的 RAPD 鉴定[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 85-90.
- [7] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. 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.

证明这种筛选方法是有效可行的, 较之一般的随机筛选, 可减少盲目性, 减轻工作量, 提高筛选效率。在产物产生及调控机制不明晰的情况下, 此方法不失为一种理性的筛选方法。

### 参考文献

- [1] 王惠, 童应凯, 吴兆亮. 亚硝酸诱变选育黄霉素高产菌的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(8): 17-19.
- [2] 田三德, 孙鹏, 任红涛. 超声波对酿酒酵母诱变作用的初探[J]. 北京工商大学学报, 2004, 22(1): 12-14.
- [3] JEONG Y K, SUNG O P, BONG S N. Ultrasonic flexural-plate-wave sensor for detecting the concentration of settling *E. coli* W310 cells[J]. Food Science and Biotechnology, 2000, 9(2): 124-129.
- [4] 袁易全, 陈思忠. 近代超声原理与应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 1996.
- [5] 张晓勇, 林壁润, 高向阳, 等. 农用抗生素高产菌株的诱变筛选新技术[J]. 广东农业科学, 2006(5): 80-82.
- [6] 陈代杰, 朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵控制技术[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995.