

黄瓜基因组 DNA 提取与 RAPD 分析

刘殿林, 杨瑞环, 哈玉洁

(天津市黄瓜研究所, 天津 300192)

摘要: 采用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄法和 CTAB 法对黄瓜的基因组 DNA 进行提取。结果表明, 改良 SDS 法提取的黄瓜叶片 DNA 具有典型的天然 DNA 分子的标准紫外吸收光谱特点, 其 A_{260}/A_{280} 在 1.7~ 1.9 之间, DNA 的产量为 450 $\mu\text{g/g}$ 。用该法提取的黄瓜 DNA 适合进行 RAPD 分析。

关键词: 黄瓜; DNA 提取方法; RAPD 分析

中图分类号: S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2002) 04- 0009- 04

快速提取高质量的 DNA 是对植物基因组进行研究的基础, 也是对植物遗传转化后代进行分子鉴定的前提。目前, 国内外已有许多 DNA 的提取方法^[1~ 6], 这些方法因所研究的对象和目的不同而有差异。本试验从中选取 5 种有代表性的方法对黄瓜基因组 DNA 提取进行了比较研究, 旨在筛选出一种快速、简便且可获得高质量 DNA 分子的方法, 为进一步开展黄瓜分子生物学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 黄瓜材料

所用材料为黄瓜抗枯萎病材料 YS 及感病材料 MC。

1.2 黄瓜幼苗的培养

挑选成熟饱满且表面有光泽的黄瓜种子, 先用 70% 乙醇处理 30 s, 然后用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次后, 播于消毒后的蛭石营养钵中, 置于 26 °C, 12 h 光照, 光强 1 500 lx 条件下培养 14 d, 取幼嫩的叶片提取 DNA。

1.3 DNA 的提取方法

SDS 法^[1], 尿素法^[7], 改良 SDS 法^[4], 氯化苄法^[5], CTAB 法^[8]。

1.4 RAPD 扩增反应

反应体系为 25 μL : 反应液包括 1 \times PCR Buffer (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% TritonX- 100), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTP, 1 U Taq (上海生工生物公司), 30 ng 的引物(上海生工生物公司)和 40 ng 的模板 DNA。

扩增反应在 PTC- 200 型 PCR 仪(MJ Research Inc.)上进行, 程序为: 94 °C 预变性 4 min 后, 94 °C 30 s, 37 °C 30 s, 72 °C 105 s, 经 35 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。扩增产物

在 1.6% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳介质为 1×TAE 缓冲液, 电泳完毕以 0.5 μg/μL 浓度的 EB 染色 30 min, 用蒸馏水振荡洗涤凝胶 15~30 min, 紫外透射仪上观察照相。

2 结果与分析

2.1 电泳检测

取 4 μL DNA 溶液在 0.6% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 λDNA/*Hind* III 做标准分子量对照, 可以看出 5 种方法所提取的 DNA 分子量都大于 25 kb, 泳带清晰整齐。SDS 法、改良 SDS 法及 CTAB 法所提取的 DNA 明显好于氯化苄法和尿素法。氯化苄和尿素法提取的 DNA 有部分降解现象, 而其他三种方法提取的 DNA 没有产生降解, 其中改良 SDS 法提取的 DNA 泳带最好(图 1)。



M 为 λDNA/*Hind* III Markers; 1, 2, 3, 4, 5 分别为用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄法和 CTAB 法提取的 YS 的 DNA; 6, 7, 8, 9, 10 分别为用 SDS 法、尿素法、改良 SDS 法、氯化苄法和 CTAB 法提取的 MC 的 DNA

图 1 5 种方法提取 DNA 的电泳图

2.2 紫外吸收检测

取 15 μL 原液用 TE 稀释至 500 μL, 在 TU900 型紫外扫描仪上进行扫描, 5 种方法所提取的 DNA 样品在 260 nm, 280 nm 波长处的紫外吸收值如表 1。

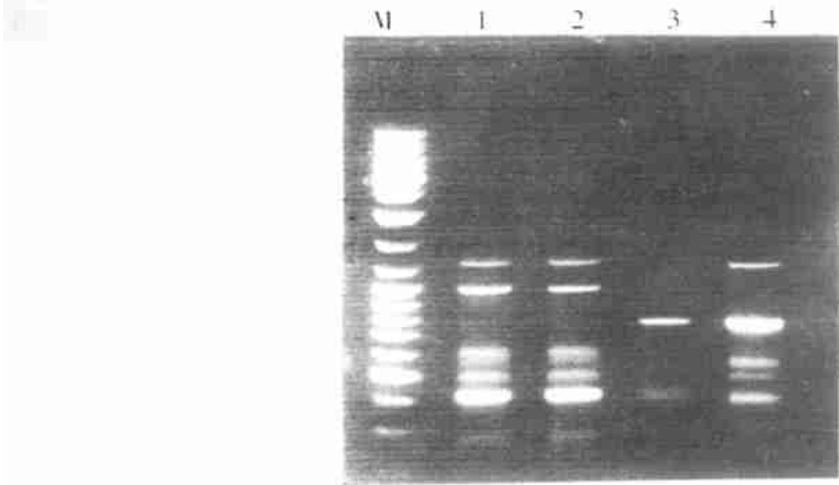
表 1 5 种方法提取的 DNA 紫外吸收值

品种	方 法	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 产量(μg/g)
YS	SDS 法	0.843	0.492	1.713	702.49
	尿素法	0.289	0.180	1.656	240.83
	改良 SDS 法	0.562	0.308	1.825	468.34
	氯化苄法	0.275	0.180	1.528	229.17
	CTAB 法	0.364	0.201	1.811	303.32
MC	SDS 法	0.749	0.445	1.683	624.17
	尿素法	0.274	0.175	1.566	228.30
	改良 SDS 法	0.550	0.299	1.839	458.34
	氯化苄法	0.268	0.177	1.514	223.32
	CTAB 法	0.355	0.194	1.829	295.83

从表 1 可知, 用尿素法和氯化苄法提取的黄瓜叶片 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值偏低, 说明提取的 DNA 中蛋白质含量较高, DNA 纯度不好, 并且 DNA 的产量也较少(约 200 $\mu\text{g/g}$); CTAB 法和改良 SDS 法提取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.8 左右, DNA 的纯度较好, 但 CTAB 法所提取的 DNA 产率较低(250 $\mu\text{g/g}$), 且提取步骤繁琐, 成本高, 毒性大; SDS 法虽产率较高(650 $\mu\text{g/g}$), 但 DNA 纯度较差。综合看来, 改良 SDS 法是一种适合黄瓜叶片 DNA 提取的方法, 提取的纯度较高, 其紫外吸收曲线具有典型的天然 DNA 标准吸收光谱特征。

2.3 RAPD 分析

以改良 SDS 法提取的 YS 和 MC 的 DNA 为模板, 用上海生工生物公司的 S112 和 S114 随机引物进行扩增, 扩增产物带型丰富且泳带清晰(图 2)。对此结果进行多次重复, 均表现良好的稳定性和重复性。此外, 以改良 SDS 提取的 YS 和 MC 的 DNA 为模板, 用 172 条随机引物进行扩增, 都得到了理想的扩增结果。



M 为 PCR Markers; 1, 3 以 YS 为模板, 采用 S112 和 S114 引物扩增的 RAPD 图谱;
2, 4 以 MC 为模板, 采用 S112 和 S114 引物扩增的 RAPD 图谱

图 2 DNA 样品的 RAPD 分析

3 讨论

提取植物 DNA 的方法很多, 但每种方法中最为关键的有三部分, 首先破碎细胞壁和细胞膜使 DNA 充分释放到缓冲液中; 其次消除蛋白质、多糖、色素等杂质的干扰; 最后防止 DNA 的降解。一般好的 DNA 提取方法应该是所得到的 DNA 完整性好, 电泳检测精确性高, 具有重复性好的迁移泳带, 纯度应满足后续操作的要求, 并且产量高, 提取操作的程序应当快速、简便、成本低, 尽可能避免有毒试剂。所以我们选择了 5 种有代表性的方法对黄瓜抗枯萎病材料 YS 及感病材料 MC 的基因组 DNA 进行提取。经电泳分析、紫外检测及 RAPD 分析, 发现改良 SDS 法最适合黄瓜基因组 DNA 的提取。表现在提取的 DNA 分子量大, 纯度高, 能扩增出带型丰富、清晰的 RAPD 图谱。目前, 我们以改良的 SDS 法提取的黄瓜基因组 DNA 为材料, 正在进行黄瓜抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记研究。

参考文献:

- [1] Pich U, Schubert I. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3328– 3332.
- [2] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 9(8): 4321– 4325.
- [3] Tai T H, Tanksley D D. Rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8(4): 229– 303.
- [4] 江昌俊, 陈彦. 分离芸薹属植物基因组 DNA 的一种方法[J]. 中国油料, 1995, 17(4): 34– 36.
- [5] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA [J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34– 40.
- [6] F. 奥斯伯, R. 布伦特. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001. 3.
- [7] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 131– 136.
- [8] 顾红雅, 瞿神嘉. 植物分子生物学手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 3– 12.

Genomic DNA Extraction and RAPD Analysis of Cucumber

LIU Dian-lin, YANG Rui-huan, HA Yu-jie

(Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: The preparation of DNA samples with good quality is the basis for researches of plant molecular biology. The DNA samples of cucumber male sterile line YS and maintainer line MC were prepared by SDS, Urea, Improved SDS, Benzyl chloride and CTAB method, respectively. The results showed that DNA samples obtained by improved SDS method possessed the standard ultra-violet absorbance spectrum of the pure natural DNA and the A_{260}/A_{280} was between 1.7– 1.9, the yield of DNA obtained by improved SDS method was 450 $\mu\text{g/g}$ young leaves, and the DNA samples prepared by this procedure were suitable for RAPD analysis.

Key words: Cucumber; DNA extraction; RAPD analysis