

文章编号 :1003- 8701(2006)03- 0035- 03

RAPD 分析中大豆基因组 DNA 的快速制备

苏 颖,王 霁,王江红,赵洪锬,郭中校,董英山

(吉林省农业科学院,吉林 公主岭 136100)

摘 要:提出一种简便、实用的 DNA 提取方法, DNA 得率可达到 $80 \mu\text{g/g}$, 所得 DNA 样品的 OD260/OD280 值在 1.8 以上, 且不含 PCR 反应抑制剂, RAPD 扩增结果良好, 该方法提取的 DNA 产量和质量均能够满足基因工程操作的要求。

关键词:RAPD;大豆;基因组 DNA;提取

中图分类号:Q78

文献标识码:A

利用基因工程手段对植物进行定向改造,已成为当今植物育种学发展的一个新领域。DNA 是生物遗传信息的载体,植物基因工程操作离不开基因组 DNA。关于植物 DNA 提取方法的研究报道很多,但因植物材料不同,所采用的方法也不尽完全相同。传统的 CTAB 法(Murry,1980)步骤较多,操作烦琐,虽然获得的 DNA 质量较纯,但产率较低,尤其在分析大量样品时,工作效率很难提高。本实验以大豆材料为例,采用了本实验室改进的 DNA 提取方法,所得 DNA 产率大、纯度,高且无降解现象,完全可以用于 RAPD、PCR 等分子生物学实验。

1 材料与方 法

1.1 实验材料、溶液及试剂

暗培养 5~7 d,长约 8~10 cm 的大豆黄化苗。

提取缓冲液:300 mmol/L NaCl,200 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0,250 mmol/L EDTA,1.5% SDS,1% β-巯基乙醇(临用前加)。

TE 缓冲液:10 mmol/L Tris·Cl,1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

其它试剂:液氮,5mol/L KAc,3mol/L NaAc,氯仿-异戊醇(24:1;V/V),异丙醇(-20℃保存),无水乙醇(-20℃保存),70%乙醇(预冷),无菌双蒸水(ddH₂O)。

1.2 仪器设备

移液器、台式高速离心机、水浴锅、陶瓷研钵、1.5mL 离心管、弯成钩状的小玻棒、电泳仪、紫外检测仪和分光光度计。

1.3 实验步骤

取 0.5g 新鲜植物材料,于研钵中快速用液氮研成粉末;将研好的粉末迅速转入 1.5 mL 离心管中,立即加入 900 μL 提取缓冲液(65℃ 预热),轻轻混匀;置 65℃ 水浴中 20 min;取出后立即置于冰上,并加入 300 μL 5mol/L KAc,于冰上反应 30 min,在 4℃ 下 12 000 r 离心 10 min,收取上清;向上清液中加入等体积的异丙醇,轻轻混匀后 4℃ 放置 10~20 min,用玻璃棒将白色丝状物挑出,或于 4℃ 12 000 r 离心 10 min,收集沉淀,晾干后回溶于 600 μL TE;向其中加等体积的氯仿-异戊醇溶液(24:1;V/V)混匀后 4℃ 10 000 r 离心 5 min,收集上清液,若蛋白没抽提干净,有必要重复一次;向上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇,于 -20℃ 放置 1~2 h,于 4℃ 12 000 r 离心 10 min,收集沉淀;沉淀用 70%乙醇

收稿日期:2006-04-10

作者简介:苏颖(1977-),女,吉林省公主岭人,硕士,主要从事高粱育种研究。

漂洗1次,真空干燥或晾干,溶于200 μ l TE 或 ddH₂O, -20 保存备用。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度及提取率的测定

取2 μ l DNA溶液,加1 μ l上样缓冲液,在0.8% 琼脂糖凝胶上100 V电压电泳1 h,用2 μ l DNA (50 ng/ μ l) 和1kbDNA Ladder作Marker,凝胶用溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察电泳结果(图1)。在加样孔附近呈现一致密亮带,分子量较高(>20 kb),且无降解现象,与 DNA亮度作比较,可判断所提DNA浓度大约为200 ng/ μ l, DNA得率(μ g/g材料鲜重)=DNA浓度/取材量(g) 约为80 μ g/g。

2.2 DNA 纯度和质量的检测

采用紫外分光光度法,可以检测DNA的纯度。纯净的DNA溶液其OD₂₆₀/OD₂₈₀应为1.8。如果OD₂₆₀/OD₂₈₀大于1.8,表明含有较多的RNA;如果OD₂₆₀/OD₂₈₀小于1.6,则说明样品中蛋白质较多;通常260/A₂₈₀应不小于1.8才符合一般分子生物学反应DNA的最佳质量要求,1.6以上即可用于RAPD分析。

将所提取的DNA稀释后(稀释倍数为25),以稀释所用超纯水为对照,用分光光度计测定其在260 nm、280 nm 波长处的光吸收值:OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.892(为5次提取结果的平均值)。表明所得的mtDNA纯度较高,无RNA和蛋白质的污染。

2.3 PCR 扩增结果

随机选取5个RAPD随机引物(OPERON公司)进行PCR扩增反应,反应体系为25 μ l,其中包括10 \times Buffer (含Mg²⁺)2.5 μ l,10mmol/L dNTPs 0.4 μ l, Taq酶1U,引物2 μ l,模板DNA20ng,其余体积用超纯水补齐。PCR反应在T-G96型DNA扩增仪中进行,反应程序为94 预变性5 min、94 变性1 min、36 退火1 min、72 延伸1 min 30 s,40个循环;再72 保温10min。扩增产物在1.5% 琼脂糖凝胶上120V电压电泳1 h~2 h,紫外灯下观察照相(图2),所选引物均能良好扩增,扩增条带清晰,效果良好。

3 讨论

因大豆材料中含有较多的蛋白和脂类,一般提取方法多采取增加抽提次数来获得较纯净的DNA,但对DNA产率有重大影响,选择在提取缓冲液中加入一定量的巯基乙醇,适当减少抽提次数,可使DNA的产率大大提高。

在实验中我们发现,用液氮研磨材料后,一定要在材料未融化之前及时地放入65 水浴中,否则提取的DNA常会有降解现象。

在提取过程中,染色体会发生机械断裂,产生大小不同的片段,因此分离基因组DNA时应尽量在

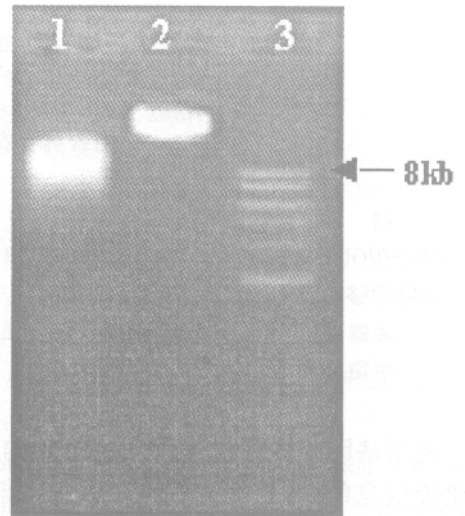


图1 大豆基因组DNA 琼脂糖凝胶电泳

1:大豆基因组DNA

2: λ DNA (100ng)

3:1kb DNA Ladder

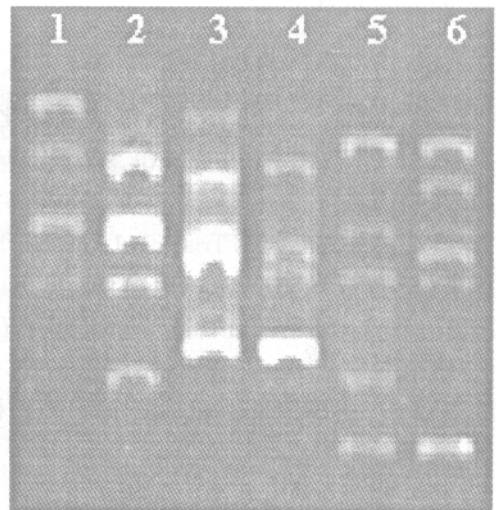


图2 大豆基因组DNA RAPD 扩增图谱

1-6:引物分别为 OPA03、OPA06、OPA12、OPB01、

OPB10、OPB15

温和的条件下操作,如尽量减少酚/氯仿抽提的次数、混匀过程要轻缓,以保证得到较长的 DNA。另外在吸取上清的步骤中,所用枪头最好用剪刀把枪头尖儿稍剪一点,并在酒精灯上烘烤一下,这样做可以防止因枪头尖过细而对大分子量 DNA 所产生的机械剪切作用。

从本实验的步骤和结果可以看出,用此方法小量提取的基因组 DNA 用时较少(一般在 3 h 内均可完成),保证质量,得率较高,并且实验所用药品和仪器均为分子生物学实验常规配备,所得 DNA 可直接用于基因组文库构建、Southern 杂交、RFLP 和 RAPD 等实验。

参考文献:

- [1] 陈永强. 植物组织 DNA 提取的一种快速方法[J]. 遗传, 1979, (1): 39- 40.
- [2] Murry H G, et al. Rapid isolation of weight DNA[J]. Nucleic Res, 1980, 8: 4321- 4325.
- [3] 田清震, 等. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)研究[J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 210- 217.
- [4] 杨婉身, 等. 大豆等植物材料 DNA 提取方法的改进及其干扰机制的探讨[J]. 四川农业大学学报, 1996, 14(2): 153- 156.
- [5] 王 灏, 王道杰, 谭小力, 等. 用于 RAPD 分析的油菜总 DNA 的快速提取[J]. 西北农业学报, 2001, 10(3): 32- 34.

A Method of Extracting DNA from Soybean Used in RAPD Analysis

SU Ying, WANG Nai, WANG Jiang-hong, et al.

(Academy of Agricultural Sciences of Jilin Provinces, Gongzhuling, 136100, China)

Abstract: A simple and practical method of DNA extraction was described in this paper. The effective rate of DNA reached 80 μ g/g. The value of OD260/OD280 of DNA simple was more than 1.8, and there was not inhibitor of polymerase chain reaction. The results of RAPD were all right. The quantity and quality of DNA simple extracted by this method could satisfy the requirement of genetic engineering operations.

Key words: RAPD; Soybean; Genomic DNA

《牧草与饲料》杂志复刊启事

真诚合作 恳请赐稿

《牧草与饲料》杂志 1987 年创刊, 1993 年停刊, 2006 年复刊。

《牧草与饲料》杂志是专业性科技期刊, 是理论与实践相结合、普及与提高并重的综合性期刊, 由中国农业科技东北创新中心主办。其办刊宗旨是交流和推广我国牧草与饲料作物最新的科研成果、生产及经营管理经验, 普及科学知识, 报道国内外牧草与饲料研究动态, 新技术、新方法与新理论, 为推动草业和饲料科学的发展, 促进实现畜牧业现代化而服务。栏目设置: 试验报告、综述与专论、引种试验、推广应用、品种介绍、饲料加工及饲料营养等方面内容。适合科研、教学、生产及管理方面人员参考。

本刊拟由国内牧草与饲料等学术界知名专家、学者组成编辑委员会及顾问委员会。

《牧草与饲料》为季刊, 大 16 开本(210mm×285mm), 56 页。封面用 128 g 铜版纸覆亚光膜, 内页用 80 g 双胶纸。每期定价: 6.00 元, 全年总计 24.00 元。自办发行, 刊号: JN04- 027。

主办单位: 中国农业科技东北创新中心、吉林省农业科学院 出版单位: 吉林省农业科学院信息中心 《牧草与饲料》编辑部

主编: 徐安凯 副主编: 韩 萍 责任编辑: 李海燕 地址: 吉林省公主岭市科贸西大街 303 号 邮编: 136100

Tel: 0434- 6283138 E-mail: mcysl@cjaas.com 联系人: 韩 萍 李海燕

《农产食品科技》杂志启事

欢迎订阅 恳请赐稿

《农产食品科技》由中国农业科技东北创新中心(吉林省农业科学院)主办, 是以报道国内外农产食品行业最新发展动态和研究成果(包括新产品、新技术、新工艺等)为主要内容的科技性期刊, 它集学术性、专业性、实用性于一体。

《农产食品科技》以推进农产食品行业领域的学术交流, 促进科技进步, 振兴我国农产品加工业为办刊宗旨。

《农产食品科技》主要栏目: 工艺研究、文献综述、营养安全、检测分析、食品保鲜、食品机械、食品添加剂、专题论述、知识产权、展会报道等栏目。以后还将根据读者的需求, 增加更为实用的内容。

本刊内容丰富, 具有极强的学术性、前沿性、指导性和实用性, 适合农产食品行业及从事相关研究开发的科研人员、生产技术人员、高等院校师生等参阅。

作为专业、全面、实用的载体, 《农产食品科技》不仅是农产食品科技人员了解国内外最新科研成果的最佳读物, 也是农产食品原辅料、食品机械设备生产商和农产食品生产企业等宣传产品及传递信息的理想窗口。

《农产食品科技》版式采用国际标准大 16 开本, 暂定为季刊, 自办发行, 刊号: JN04- 026。每期定价: 8.00 元, 全年总计: 32.00 元。

主 编: 杨贞耐 副主编: 王海岩 责任编辑: 高阳

地 址: 吉林省公主岭市科贸西大街 303 号 邮 编: 136100

电 话: 0434- 6283150 E-mail: ncspkj@cjaas.com