

# 小麦基因组 DNA 的高效提取和稳定 RAPD 体系的构建\*

李勇超<sup>1</sup>, 杨靖<sup>2</sup>, 魏燕燕<sup>1</sup>, 王银萍<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100; 2. 河南科技学院生命科技学院, 新乡 453003)

**摘要:** 对小麦黄化苗、叶片和种子基因组 DNA 提取, 以及对影响 RAPD 结果的反应体系和反应条件的各项因素进行了研究。建立了快速、高效的适合于多种情况的 DNA 提取方法。构建了适用面宽而且稳定可靠的 RAPD 反应条件和反应体系。即反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 37℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 循环 2 次, 94℃ 变性 1 min, 37℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 再从 94℃ 变性 1 min 开始循环 38 次, 最后 72℃ 延伸 10 min; 20 μL 反应体系为 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.2 mmol/L dNTP, 10 pmol 引物, 25 ng 模板, 0.8 U Taq 酶。

**关键词:** 小麦; 基因组 DNA; RAPD

中图分类号: S512.1

文献标识码: A

文章编号: 1004 1389(2006)03 0012 05

## Efficient Extraction of Wheat Genome DNA and Construction of Steady System of RAPD

LI Yong chao<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, WEI Yan yan<sup>1</sup> and WANG Yin ping<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. College of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** Two efficient methods of extracting wheat genome DNA and an optional reaction RAPD system were established. The methods were simple and rapid in etiolations, leaves and seeds genomic DNA isolation, and the optional reaction RAPD system were set up for the assay and usage in wheat by testing and comparing some essential factors. The reaction program consisted of 2 cycles of pre-denaturation at 94℃ for 3 min, annealing at 37℃ for 1 min, and extension at 72℃ for 2 min, followed by 38 cycles of denaturation at 94℃ for 1 min, annealing at 37℃ for 1 min, and extension at 72℃ for 2 min. The final cycle had a 10 min extension at 72℃. The PCR mixtures of 20 μL contained 25 ng template DNA, 0.2 mmol/L of each deoxynucleotide (dNTP, dATP, dGTP and dTTP), 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 10 pmol primer and 0.8 U Taq polymerase.

**Key words:** Wheat; Genome DNA; RAPD

RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增的多态性 DNA) 技术是美国杜邦公司 Williams 等于 1990 年初首先建立的一种 DNA 分子标记技术<sup>[1,2]</sup>。该技术是用 9~10 个碱基的任意顺序的寡聚核苷酸片段作为引物, 以未知序列的基因组 DNA 为模板进行 PCR (Polymerase chain reaction), 得到的这种随机扩增的多态 DNA 片段称为 RAPD 标记<sup>[3]</sup>。RAPD 标记

具有信息量大、快速高效和成本低廉等优点<sup>[3]</sup>。目前已经在遗传图谱构建、基因的定位与克隆、物种亲缘关系和进化关系研究、品种鉴定等诸多领域广泛应用<sup>[4]</sup>。RAPD 标记主要缺点是稳定性差, 所以建立稳定可靠的反应体系是 RAPD 标记关键所在。影响 RAPD 反应的主要因素是模板 DNA 的浓度和纯度、Taq 酶活性及退火温度。本文对小麦叶片、黄化苗及种子 3 种材料的基因组

\* 收稿日期: 2005 10 25 修回日期: 2005 12 05

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (A 类, JY03 A 13)。

作者简介: 李勇超 (1978 -), 男, 汉族, 硕士研究生, 现从事植物分子生物学研究。E-mail: liyongchao\_223@tom.com

DNA 提取方法进行比较研究, 同时对 RAPD 反应体系中模板浓度、Taq 酶的种类及用量、 $Mg^{2+}$  和退火温度等进行了优化, 希望建立稳定可靠的小麦 RAPD 标记体系, 为小麦 RAPD 技术的应用研究奠定理论和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用小麦的品种有 87341 和陕优 225。

### 1.2 DNA 提取(参照 Doyle 等的方法<sup>[5]</sup>, 略作修改)

1.2.1 叶片大量提取法 在小麦营养生长期内取嫩叶片 2 g, 剪成 2~3 cm 段状。-80℃保存待用或即刻提取。①在干净的 50 mL 离心管中, 加入 8 mL 1.5×CTAB 提取液(150 mmol/L Tris-Cl, 105 mmol/L NaCl, 15 mmol/L EDTA, 1.5% CTAB), 和 8 μL β 巯基乙醇, 待用。②用液氮预冷干净且干燥的研钵, 把叶片放入研钵并倒入适量液氮开始研磨, 磨碎叶片至颜色泛白即可, 迅速转入离心管中, 65℃水浴振荡 1 h。③冰浴 5 min, 加入 1× 体积的氯仿/异戊醇(24:1), 振荡 30 min。④24℃ 6 500 r/min 离心 30 min。⑤吸上清到另一离心管中, 加入 10 μL RnaseA, 37℃温育 30 min。⑥加入 1× 体积的异丙醇(-20℃预冷), 4℃沉淀 30 min。⑦轻轻振荡, 用玻璃钩钩出 DNA。或 4℃ 5 000 r/min 离心 4 min 沉淀出 DNA。⑧将 DNA 转入 1.5 mL 离心管中, 用 75%乙醇清洗 DNA 2~3 次。⑨弃去乙醇, 在超净工作台中风干, 加 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 溶解待用。

1.2.2 黄化苗大量提取法 培育黄化苗: 取约 100 粒种子用 0.1% 的升汞消毒 10 min。然后冲洗干净, 浸泡过夜。把种子腹沟朝下均匀摆放在铺有厚约 2~3 mm 吸水纸的培养皿上。再将培养皿置于暗箱中培养。在培养期间要经常浇水保持吸水纸湿润。待 8~9 d 后即可剪下苗进行 DNA 提取。方法同 1.2.1。

1.2.3 种子小量提取法 ①种子砸成粉末放入 1.5 mL 离心管, 并加 800 μL 1.5×CTAB 提取缓冲液, 震荡 30 min, 10 000 r/min 离心。②取上清 800 μL 的 Tris 饱和酚, 震荡 5 min, 然后 10 000 r/min 离心 10 min。③吸上清加入氯仿-异戊醇(24:1)800 μL, 震荡 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min。④吸上清, 加入 -20℃预冷的异丙

醇。轻轻颠倒混匀, 钩出 DNA 或离心沉淀 DNA。⑤用 75%乙醇清洗 2 次。弃去乙醇。⑥在超净工作台中风干, 加 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 溶解待用。

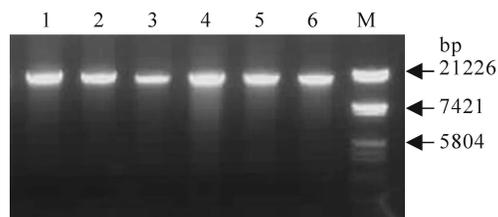
### 1.3 RAPD 反应体系及条件

本试验用上海生工公司的 2 个引物, 即 S37 (GACCGCTTG T) 和 S389 (TGCGAGAGTC), 该引物在预实验中经过筛选多态性较好。Taq 酶为 Promega、Famentas (M BI)、天为时代和东胜四家公司的产品, dNTP 为德国宝灵曼公司 (B. M.) 产品, H<sub>2</sub>O 为重蒸水。PCR 扩增在 PTC 200 (MJ Research 公司, 美国)、PE9 600 (PE 公司, 美国) 和 PCR SYSTEM9700 (ABI, 美国) 上进行。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶、0.5×TBE 缓冲液中电泳, 经 EB 染色, 在凝胶成像系统 (Bio imaging system) 照相并保存。基本反应体系 (20 μL): 2 mmol/L 10× Buffer, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.2 mmol/L dNTP, 10 pmol 引物, 25 ng 基因组 DNA 模板, 0.8 U Taq 酶。基本反应条件为 94℃ 3 min, 37℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 2 次, 94℃ 1 min, 37℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 38 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的纯度和产率

DNA 样品用蛋白核酸紫外分光光度计和 0.9% 琼脂糖凝胶 (3.5 V/cm 约 1.5 h, 0.5×TBE 缓冲液) 电泳检测 (图 1)。经 RAPD-PCR 验证, 均可扩增出较好条带 (图 2)。结果表明: ① 3 种材料所提 DNA 的纯度黄化苗最高, 叶片次之, 籽粒最后; OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 分别为 1.89、1.86 和 1.85。② 产率 (每 2g 的材料所提 DNA 的量) 最



M 为 λDNA/EcoRI M: λDNA/EcoRI  
1 和 4 为用黄化苗所提 DNA 1, 4 DNA from etiolation ;  
2 和 5 为用叶片所提 DNA 2, 5 DNA from leaves ;  
3 和 6 为用种子所提 DNA 3, 6 DNA from seeds

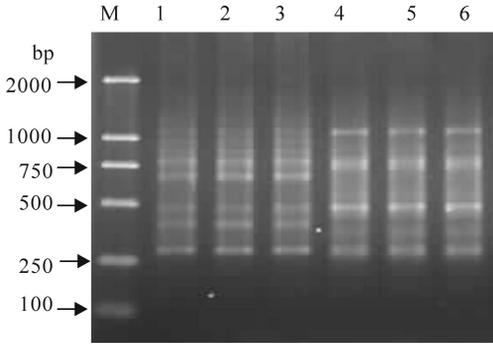
图 1 不同材料所提小麦 DNA 的电泳图谱

Fig. 1 The electrophoretogram of wheat genome DNA extracted from different material

高的是黄化苗为约 400 μg, 叶片其次为 300 μg, 籽粒最低为 30 μg。③从不同材料中所提出的 DNA 均未出现降解, RNA 和蛋白含量也极低。有研究认为, DNA 中含有少量的 RNA 和蛋白质对 RAPD PCR 扩增影响不大<sup>[7]</sup>。

## 2.2 RAPD 反应体系优化

2.2.1 模板 DNA 浓度 模板 DNA 的浓度对 RAPD 结果有较大影响。试验表明, 在 20 μL 体系中, 当模板的量在 10~50 ng 范围内时, 扩出的条带数较多而且带型清晰(图 2, 4)。



M: DL2000( TaKaRa) M: DL2000(TaKaRa);

1, 2, 3 为品种 87341 4, 5, 6 为品种陕优 225 1, 2, 3 variety is 87341; 4, 5, 6 variety is shaanyou 225; 1, 4 所用模板为用黄化苗提取的 DNA 1, 4 template DNA from etiolations; 2, 5 所用模板为用叶片提取的 DNA 2, 5 template DNA from leaves; 3, 6 所用模板为用种子提取的 DNA 3, 6 template DNA from seeds

图 2 三种方法提取两个小麦品种 DNA 经 RAPD PCR 扩增后电泳图(s37)

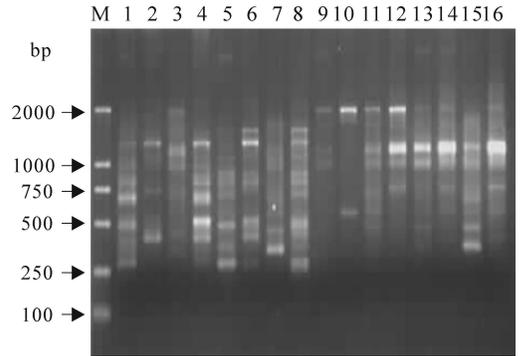
Fig. 2 RAPD pattern with different template DNA obtained from two varieties and three extraction methods

这个范围与前人研究结果有所不同, 刘列钊等认为在 25 μL 的体系中能扩出清晰条带模板的量范围在 5~25 ng 内<sup>[8]</sup>, 而郭长虹等认为在 25 μL 的体系中模板的量范围在 15~100 ng 内<sup>[9]</sup>。当模板量低于 10 ng 或高于 50 ng 时, 条带弱或扩不出条带, 而且极易产生拖尾, 造成带与带之间连接难以辨认。

2.2.2 酶的浓度及生产厂家 酶是 PCR 反应中又一重要影响因素。本试验做了酶的浓度梯度, 结果与刘列钊等研究结果一致<sup>[8]</sup>, 即在 20 μL 体系中, 酶量在 0.5~1 U 范围内就可扩增出较好的条带。酶量太少导致产物量少, 条带数少带型弱; 量大成本高, 易出现非特异性扩增。

本试验又比较了 Promega(美国)、MBI(立陶宛)、天为时代(国产)和东胜(国产)公司不同厂家的酶对 PCR 结果的影响, 结果表明在相同反应体系及条件下, 4 个厂家的酶均能扩增出多态性丰

富的条带; 但是不同厂家的酶扩增出的条带不同(图 3)。因此, 在构建 RAPD 反应体系时, 根据试验需要选定某一厂家的 Taq 酶, 切忌中途更换, 以免前后结果不一致造成误差。



M: DL2000( TaKaRa) M: DL2000(TaKaRa);

1, 5, 9, 13 为 Promega 公司 Taq 酶 1, 5, 9, 13 patterns with Taq polymerase from Promega; 2, 6, 10, 14 为 Famentas ( MBI) 公司 Taq 酶 2, 6, 10, 14 patterns with Taq polymerase from Famentas( MBI); 3, 7, 11, 15 为天为时代公司 Taq 酶 3, 7, 11, 15 patterns with Taq polymerase from TIANGEN; 4, 8, 12, 16 为东胜公司 Taq 酶 4, 8, 12, 16 patterns with Taq polymerase from Dongsheng 1~8 为引物 S37; 9~16 为引物 S389. 1~4 和 9~12 的模板为品种 87341 的 DNA; 5~8 和 13~16 的模板为品种陕优 225 的 DNA

图 3 不同产地的酶对 RAPD PCR 结果的影响

Fig. 3 RAPD patterns with Taq polymerase from different company

2.2.3 Mg<sup>2+</sup>、dNTP 和引物 公司一般都是把 Mg<sup>2+</sup> 和酶一起捆绑销售的, 而且提供了其 Mg<sup>2+</sup> 和酶的适合比例, 根据所扩的条带情况, 也可做适当范围内的调整。本试验设了 Mg<sup>2+</sup> 的浓度梯度, 结果和前人的研究基本一致: 在 20 μL 体系中, 1.2~4.0 mmol 范围内都可扩出较好的条带(图 4, 表 1)。dNTP 在 20 μL 体系中浓度在 0.05~0.3 mmol 即可。另外, 不同公司生产的 dNTP 差别不大, 可以随意选择。引物在 20 μL 体系中有 10~25 pmol 都可扩出较好的条带。在构建稳定反应体系时, 可以把这些 PCR 反应成分定量到许可范围内的中间值上, 以避免由于操作或仪器的误差而造成不稳定的结果。

2.2.4 PCR 仪 本试验用 3 个公司的 PCR 仪, 2 个引物和 2 个小麦品种的基因组 DNA, 用同一反应体系来检验其对 RAPD 结果的影响。PCR 仪分别是 PE9600 (PE USA), PCR SYSTEM9700 (ABI USA) 和 PTC 200 (MJ Research USA)。反应条件为: 94℃预变性 3 min, 37℃退

火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循环 2 次, 94 °C 变性 1 min, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 再从 94 °C 变性 1 min 开始循环 38 次, 最后 72 °C 延伸 10 min; 20 μL 反应体系为: 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.2 mmol/L dNTP, 10 pmol 引物, 25 ng 模板, 0.8 U

Taq 酶。结果发现, 相同的 PCR 反应体系在 3 种不同型号的 PCR 仪上运行, 结果基本一致, 只有一个条带的差异(图 5)。表明 PCR 仪的型号对扩增效果基本没有影响。

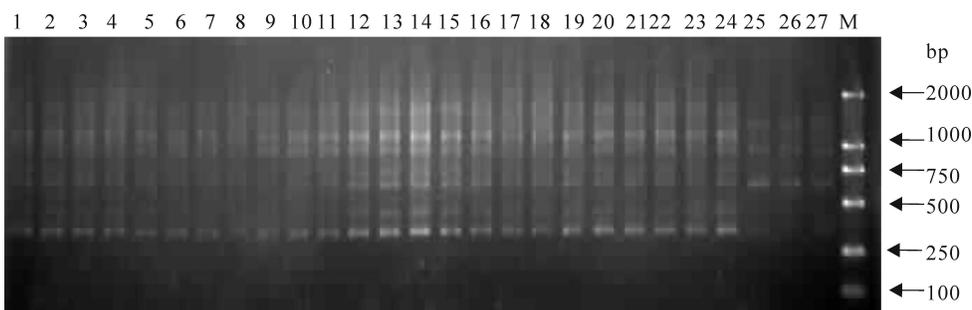


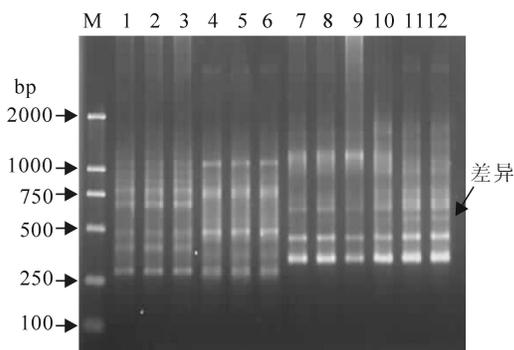
图 4 不同模板 DNA 量、Mg<sup>2+</sup> 浓度和 Taq 酶用量的 RAPD PCR 的电泳图  
(泳道 1~27 代表的浓度组合见表 1)

Fig. 4 RAPD pattern with different concentration of template DNA, Mg<sup>2+</sup> and Taq polymerase.  
(line 1~27 in stand for combination of different concentration in table 1)

表 1 1~27 泳道代表的浓度组合

Table 1 Line 1~27 in stand for combination of different concentration

DNA /ng	Mg <sup>2+</sup> / (mmol/L)								
	1.25 Taq polymerase /u			2.5 Taq polymerase /u			3.75 Taq polymerase /u		
	0.4	0.8	1.2	0.4	0.8	1.2	0.4	0.8	1.2
10	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50	10	11	12	13	14	15	16	17	18
100	19	20	21	22	23	24	25	26	27



M: DL2000 M: DL2000(TaKaRa); 1, 4, 7, 10 在 PE9600 型 PCR 仪上运行 1, 4, 7, 10 in PE9600(PE USA);  
2, 5, 8, 11 在 PCR SYSTEM9700 型 PCR 仪上运行  
2, 5, 8, 11 in PCR SYSTEM9700(ABI USA);  
3, 6, 9, 12 在 PTC 200 型 PCR 上运行  
3, 6, 9, 12 in PTC 200(MJ Research USA)

图 5 不同 PCR 仪对 RAPD 结果的影响比较

Fig. 5 RAPD patterns in different thermal cyclers

### 3 讨论

#### 3.1 关于 DNA 提取

用 CTAB 法对小麦 3 种材料进行了 DNA 的提取, 并对结果作以比较。结果表明这 3 种材料

都可提出较好的能用于做 RAPD 的 DNA。这样, 无论小麦处于任何生长时期, 只要有种子或叶片就可用较少的试剂随时提取其 DNA, 既降低了成本, 又节约了时间。

在提取过程中, 用液氮研磨材料时, 务必迅速而且要保持研钵中有液氮, 研磨完毕要趁液氮尚未挥发干净转入离心管中, 即刻进行下一步操作, 可有效防止 DNA 降解。

值得一提的是, 许多报道认为, 在加入预冷的异丙醇沉淀 DNA 时, 应在 4 °C 或 -20 °C 下静置 30 min 或更长时间。本文对此步骤进行了探究: 对同一个样品设计 4 个重复。其中 2 组样品在加入异丙醇后轻轻摇动, 使离心管中的两相逐渐混合, 另 2 组静置。结果发现, 轻轻摇动 1~2 min 后即可产生棉絮状的 DNA 团。而另 2 个静置, 30 min 后也产生团状 DNA, 但是 DNA 团较小, 经轻轻摇动才逐渐变大。后经电泳检测和 PCR 验证, 4 个重复的 DNA 质量并没有差别。因此建议将静置改为轻轻摇动 1~2 min, 以节省时间。

但切忌用力太大,以避免震断 DNA 链。另外,用玻璃钩或枪头挑出得到的团状 DNA 比直接离心收集的 DNA 杂质少,若因 DNA 不抱团而必须用离心法收集,收集后用重蒸水溶解再加 2 倍体积的无水乙醇沉淀,可有效地纯化 DNA。在 DNA 提取结束后,建议立刻检测其是否降解并进行定量,然后根据实验所需浓度将其稀释并分装成多管冷冻保存待用。这样一则可以对某一浓度的 DNA 稀释液长期保存以备使用,二则可随时更新以避免由反复冻融造成的 DNA 降解。

### 3.2 关于 RAPD 反应参数

稳定的 RAPD 体系与所用试剂的质量和剂量有关,反应条件一般从变性温度和时间,退火温度和时间,以及延伸时间和循环数等这几个方面考虑。本试验改变这些反应参数作以比较,结果发现:变性温度在  $94^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ ,时间在  $1 \sim 3 \text{ min}$  之间,退火温度在  $35^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ ,时间在  $0.5 \sim 1 \text{ min}$ ,延伸温度  $72^{\circ}\text{C}$ ,时间  $2 \text{ min}$ ,循环数  $30 \sim 39$  间,都可扩出较好的条带。

试验发现,退火温度是反应过程中最敏感的条件之一。对某一引物同一酶量这一温度扩出的带好,而另一温度扩出的带弱,甚至扩不出带。例如退火温度在  $37^{\circ}\text{C}$  时,引物 S52 和 S116 扩增出的条带极弱,而在  $38^{\circ}\text{C}$  时条带较为清晰。这一结果与刘红彦的报道一致<sup>[10]</sup>。对于适宜温度较高的引物并没有发现其与 G+C 含量有关。

若某一引物在一般反应条件下扩增不出条带或条带弱,而调整退火温度也无效时,可以考虑调整引物浓度和酶量。调整引物浓度和酶量可以从

降低和提高两方面着手,带弱并不一定就是量少的原因。

本试验认为,在反应体系确定后,确定反应模板的量并固定使用某一厂家同一批次的酶可以有效提高 RAPD 结果重复性。

### 参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelik A R. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers[J]. Nucl. Acids Res., 1990, 18: 6531~6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Finger printing genomics using PCR with arbitrary primer[J]. Nucl. Acids Res., 1990, 18: 7213~7218.
- [3] 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,2001.30~51.
- [4] Glick B R, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat[J]. Theor. Appl Genet., 1992, 84: 567~572.
- [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 9(1): 11~15.
- [6] 刘红彦,牛永春.小麦 RAPD 分析中温度循环参数的优化[J].麦类作物学报,2001,21(4):1~4.
- [7] 汪小全,邹喻苹. 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.
- [8] 刘列钊,陈万权.小麦随机扩增多态性 DNA 的反应体系探索[J].生物技术,2000,10(3):1~4.
- [9] 郭长虹,石锐.小麦 RAPD 反应体系的研究[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,1999,15(1):77~80.
- [10] 刘红彦,牛永春.用超常的复性温度改善小麦 RAPD 分析的效果[J].遗传,2001,23(4):333~335.