

广东野百合 DNA 提取和 RAPD 条件的优化

黄永芳, 杨懋勋, 柳 军, 周锦平

(华南农业大学林学院, 广州 510642)

摘要: 以野百合(*Lilium brownii*)新鲜叶片、硅胶干燥叶片及鳞片为材料,研究了 DNA 的提取方法,并对影响随机扩增多态 DNA (RAPD)反应各因素进行了优化。建立了野百合 RAPD 的优化反应体系及程序,即在 20 μ l 反应体系中,含 20 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.2 mmol/L dNTPs、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.3 μ mol/L 随机引物 S1519; 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 38 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

关键词: 野百合; DNA 提取; RAPD

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)03-0251-05

DNA Extraction and Optimization of RAPD Reaction System for *Lilium brownii* (Liliaceae)

HUANG Yong-fang, YANG Mao-xun, LIU Jun, ZHOU Jin-ping

(College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: DNA of *Lilium brownii* was extracted from the fresh leaves, silica gel dried leaves and scales. The optimized reaction system and programme of RAPD for *Lilium brownii* are as follows. The reactions were performed in a volume of 20 μ l containing 20 ng of DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 0.3 μ mol/L primer (S1519). Thermal cycling was programmed by 1 cycle for 5 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles for 30 sec at 94 $^{\circ}$ C, 50 sec at 38 $^{\circ}$ C, and 1 min at 72 $^{\circ}$ C and finally, by 1 cycle for 10 min at 72 $^{\circ}$ C, storing at 4 $^{\circ}$ C.

Key words: *Lilium brownii*; DNA extraction; Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

百合有“球根花卉之王”的美称,为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物,其用途广泛,具有药用、食用、观赏价值。我国是百合属植物自然分布的中心,但由于种种原因,百合育种研究工作较为落后,目前栽培的绝大多数品种引自国外,由于引种途径各异,许多品种缺乏背景资料,难以进行分类鉴定研究,造成品种名称混乱、种系不清等问题,严重地影响我国百合育种研究及商品种球的生产^[1]。加强对我国百合资源尤其是野生资源的研究、开发和应用,利用我国丰富的百合资源培育出具有国际竞争力的新品种已刻不容缓。利用 RAPD 技术

对我国百合属植物种质资源进行分析,建立百合属植物的分子鉴别、分类体系,弄清各天然居群的遗传关系,对我国百合属植物的研究与开发有很大的促进作用^[2]。运用 RAPD 技术对百合的遗传多样性分析已有研究^[3-5],但对野百合居群进行 RAPD 分析尚未见报道。

广东省是百合属植物在我国分布的南缘,据文献记载广东省内野百合只分布于惠阳、乳源、连州、乐昌等地^[6],而我们在深圳梧桐山、信宜大雾岭等地也发现有野百合分布。本研究用在广东省内采集到的野百合样品,进行 DNA 提取方法及 RAPD 条件

收稿日期: 2005-11-07 接受日期: 2006-03-22

基金项目: 广东省教育厅自然科学研究项目(Z02008)资助

的优化,为进一步开展野百合的遗传多样性分析,了解广东省野百合的居群内与居群间的遗传变异状况,为广东省百合属植物的系统研究及杂交育种工作提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为从广东乳源大桥镇采集的野百合 (*Lilium brownii* F. E. Brown ex Miellez)。采新鲜无病虫害嫩叶,或将嫩叶放入封口袋中,加入 1:20 (W/W)的变性硅胶快速干燥后带回实验室内超低温冰箱中保存,并采集鳞茎(或鳞片)进行盆栽。标本存放于华南农业大学林学院。

1.2 试剂和仪器

主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、MgCl₂ 为华美生物工程公司产品;脱氧核苷三磷酸 (dNTPs)、随机引物为上海生工生物工程有限公司产品;琼脂糖(西班牙产),购自宝泰克生物工程有限公司;十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl triethyl ammonium bromide, CTAB)、乙二胺四乙酸二钠 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、NaCl、无水乙醇、硼酸 (H₃BO₃)、氯仿、异戊醇、醋酸钠 (NaAc) 等试剂为国产分析纯;三羟甲基氨基甲烷 (Tris-hydroxymethyl aminomethane, Tris) 的纯度 >99.5%,聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 的纯度 >95%, β - 巯基乙醇的纯度 \geq 99.0%;分子量标准 (Marker): 100 bp DNA Ladder Plus 为晶美生物工程有限公司产品;RNA 酶 A 购自北京拜尔迪生物公司;goldview DNA 染料购自北京赛百盛基因技术有限公司。

主要仪器 Centrifuge 5810R 型冷冻离心机为德国 Eppendorf 公司产品;PCR 仪:PTC-100™ Peltier Thermal Cycler 为美国 MJ Research™ 公司产品;DYY-11 型电泳仪购自北京市六一仪器厂;凝胶成像与分析系统:捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3.1 为江苏省捷达软件工程有限公司产品。

1.3 DNA 提取

根据 RAPD 扩增的实验要求和现有实验条件,设计了 3 种样品 DNA 提取处理方法:

(1) 新鲜幼嫩叶片:①取 0.8 g 新鲜幼嫩叶片,

在液氮中迅速研磨成细粉末状后加入 600 μ l 80℃ 预热的 2 \times CTAB 提取缓冲液 (2% CTAB; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA (pH 8.0); 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 2% PVP。用前加入 2% (V/V) 的 β - 巯基乙醇), 56℃ 水浴保温 30 min, 期间每隔几分钟摇动一次;②加入 600 μ l 氯仿:异戊醇 (24:1), 振荡混匀 10 min, 室温下 6 000 \times g, 离心 15 min;③取上清液, 加入 1/10 体积的 10% CTAB 及 2/3 体积氯仿:异戊醇 (24:1), 振荡混匀 10 min, 室温下 6 000 \times g, 离心 10 min;④取上清液, 加入 1/1000 体积的 RNA 酶 A, 使其终浓度为 10 μ g ml⁻¹。放置 37℃ 水浴 30 min 以上;⑤加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 倍体积的冷无水酒精, 轻轻混匀, 将离心管置于 4℃ 冰箱中沉淀 30 min 以上;⑥将成团的悬浮物用广口无菌吸管头吸出, 转至新的离心管中, 去掉水相;⑦用 70% 酒精洗沉淀 1-2 次, 将离心管倒置在吸水纸上, 置于通风橱内干燥沉淀;⑧加入适量的 1 \times TE (Tris-EDTA) 溶解沉淀, 置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

(2) 硅胶干燥叶片:取 0.3 g 硅胶干燥的叶片, 用 2 \times CTAB 提取缓冲液进行 DNA 提取, 各试剂用量及提取方法同 (1)。

(3) 鳞片:取 0.8 g 经蒸馏水冲洗并晾干后的野生百合鳞片, 加入 1 ml 4 \times CTAB 提取液 (提取液中 PVP 的浓度增至 4%, 用前加入 4% (V/V) 的 β - 巯基乙醇;), 在冰浴下研磨成匀浆后转入 1.5 ml 离心管中, 再加入 0.5 ml 4 \times CTAB 提取液充分摇匀, 60℃ 温浴 30 min, 期间每隔几分钟摇动一次, 6 000 \times g, 4℃ 下离心 15 min, 之后的步骤与方法 (1) 基本相同, 不同在于用冰乙醇沉淀 DNA 之前, 往第二次氯仿:异戊醇 (24:1) 处理后的上清液中加入 1/2 体积的 5 mol/L NaCl, 4℃ 放置 30 min。

1.4 DNA 质量和浓度的电泳检测

分别取 2 μ l DNA 溶液用 0.8% 琼脂糖凝胶, 加入 5 μ l (100 ml)⁻¹ 凝胶的 goldview 荧光染料, 以 4 V cm⁻¹ 的电压进行电泳分析, 至指示剂移动到凝胶前沿停止电泳。在捷达凝胶分析系统成像及分析。

1.5 RAPD 反应条件的优化

以新铁炮百合 (*Lilium formolongi*) 的 RAPD 反应体系 (在 20 μ l 反应体系中, 含 50 ng 模板 DNA,

1.5 mmol/L Mg²⁺、0.15 mmol/L dNTPs、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶、0.3 μmol/L 随机引物) 及程序 (94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 37℃ 50 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72℃ 10 min, 4℃ 保存) 为基础对 RAPD 反应体系 (总体积 20 μl) 中的模板 DNA 用量、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 聚合酶用量、随机引物 (本优化实验所用的引物为 S1519, 序列为 AGCCTCGGTT) 浓度及 RAPD 反应程序中的退火温度、循环次数等影响因素, 逐一设置多个水平进行试验 (具体见结果部分), 找出适合于野百合 RAPD 反应的最佳反应条件。

1.6 RAPD 扩增产物的检测

配制 1.4% (W/V) 的琼脂糖凝胶, 加入 5 μl (100 ml)⁻¹ 凝胶的 goldview 荧光染料, 于 0.5× TBE (Tris-H₃BO₃-EDTA) 缓冲液中, 以 100 bp DNA Ladder Plus 为分子量标准, 3 V cm⁻¹ 的电压下恒压电泳 2.5 h, 在捷达凝胶分析系统成像及分析。

2 结果和分析

2.1 DNA 提取

DNA 的提取和纯化是进行 RAPD 扩增的首要步骤, DNA 质量的好坏直接关系到实验的成败。对野生植物居群水平的研究, 要有足够的居群代表和个体代表, 特别是对于那些分布在远离实验的交通不便的边远地区或海拔很高的地区的物种, 要采集和及时运输新鲜植物材料以提取 DNA 十分困难^[4], 本试验以野百合新鲜叶片、硅胶干燥叶片及鳞片为材料, 全部样品都成功提取出 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 所提取的 DNA 都为清晰明亮的主带, 点样孔基本无滞留, 说明 3 种方法所提取的 DNA 质量都较高, 经综合比较, 用野百合新鲜叶

片提取的 DNA 质量最好。

百合是多年生草本植物, 每年开花后地上部分枯萎, 选取叶片作为提取 DNA 材料, 受到时间的限制。从 RAPD 扩增试验结果 (图 2) 看, 三种方法提取的 DNA 都能扩增出清晰、明亮、稳定的条带, 完全符合 RAPD 反应的要求。

高文远等曾用浙贝母鳞片为材料成功提取出 DNA^[8]。本实验尝试用野生百合鳞片为材料提取 DNA, 发现常用的液氮研磨破碎组织的方法并不适用于百合鳞片, 因与液氮接触后鳞片变硬而难以进一步研磨。而改用冰浴研磨后, 取得较好的效果。百合鳞片采集方便, 易于保存, 可繁殖再生, 是用于提取 DNA 的好材料, 特别在叶片枯萎时, 采集百合鳞片用于提取 DNA 更具有重要的意义。

在百合生长发育的任何时期, 鳞茎的干物率显著高于茎叶^[9], 百合鳞片中的多糖含量很高, 可达鲜重的 28.26%^[10], 多糖、多酚往往与 DNA 缠在一起共沉淀, 形成粘稠的褐色混合物而难以得到适用于 RAPD 的高质量 DNA。为了消除多糖、多酚的干扰, 我们选取对去除多糖等杂质有显著作用的 CTAB 法, 并作了一些改进。以叶片为材料时, 在 2% 的 CTAB 提取液中加入 2% 的 PVP 及 2% (V/V) 的 β-巯基乙醇就能得到较好的 DNA 提取效果。而以鳞片为材料时, 提取液中 CTAB、PVP 及 β-巯基乙醇的浓度均增至 4%; 在用冰乙醇沉淀 DNA 之前用高盐去除多糖。实验表明, 此方法简单、有效, 能够获得高质量的野生百合 DNA。

2.2 RAPD 反应体系的优化

2.2.1 模板 DNA 用量

模板 DNA 用量在 10–100 ng 时都有扩增产物, 但模板 DNA 用量为 20–50 ng 时, 能够获得稳

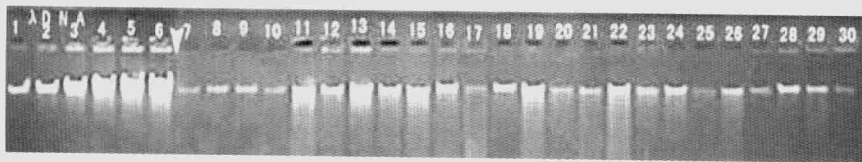


图 1 野百合乳源居群总 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of genomic DNA isolated from Ruyuan populations of *Lilium broomei*

1–6 为分别加入 100 ng、200 ng、400 ng、600 ng、800 ng 和 1 000 ng 的 λDNA; 7–14 为新鲜叶片, 15–22 为硅胶干燥叶片, 23–30 为鳞片。Lanes 1–6 are concentrations of λDNA of 100 ng, 200 ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng and 1 000 ng, respectively; Lanes 7–14 show genomic DNA isolated from fresh leaves, lanes 15–22 from silica gel dried leaves, lanes 23–30 from scales.

定的、条带清晰的 RAPD 图谱;DNA 模板浓度低于 20 ng 时,条带变得模糊;大于 50 ng,则由于浓度过大而产生弥散型产物,条带不清晰。20–50 ng 扩增的效果基本相同,但是在弱带的重复性方面,20 ng 的模板 DNA 用量比其它用量更好,因此模板 DNA 用量选择 20 ng。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度

引物和模板的双链杂交体的解链和退火温度受 Mg^{2+} 的影响,确定扩增反应的最佳 Mg^{2+} 的浓度对 PCR 至关重要。本试验共设置了 6 个不同的浓度水平。当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时,扩增谱带模糊,亮度不够,当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 和 2.75 mmol/L 时亮度太亮,谱带不易辨别开; Mg^{2+} 浓度为 1.75–2.25 mmol/L 时扩增效果较好,而扩增条带的明亮度、清晰度和稳定性都是以 2.0 mmol/L 最佳,故最终选择 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L。

2.2.3 dNTPs 浓度

本试验分别比较了 0.1、0.15、0.2 mmol/L dNTPs 对扩增的影响。dNTPs 浓度为 0.1 和 0.15 mmol/L 时,条带无或较模糊,而浓度为 0.2 mmol/L 时,条带较多且较清晰。从本试验看,dNTPs 浓度以 0.2 mmol/L 较合适。

2.2.4 *Taq* 聚合酶用量

设置了 1.0、1.5、2.0 U *Taq* 聚合酶用量梯度进行扩增比较。*Taq* 聚合酶用量为 1.0 U 时,DNA 扩增强度弱,条带暗淡难辨;用量为 1.5 U 时,扩增出的条带数量多且较清晰;用量上升到 2.0 U 时,扩增出的条带带型模糊不清。因此,*Taq* 酶用量以 1.5 U 为宜。

2.2.5 随机引物浓度

对 RAPD 反应体系的引物(S1519)进行以下浓度试验:0.15、0.3、0.6 及 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 。当引物浓度低于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时条带模糊,弱带消失;而大于 0.60 $\mu\text{mol/L}$ 时造成非特异扩增,在 0.3 及 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最佳,最终选定随机引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 RAPD 反应程序的优化

以新铁炮百合 (*Lilium formolongi*) 的 RAPD 反应程序为基础,对退火温度和循环次数设置多个水平进行优化实验,结果如下:

2.3.1 退火温度

RAPD 反应的退火温度一般在 30–40℃,要针对不同物种确定最佳的退火温度。本实验设置了 35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃ 等 6 个水平。在

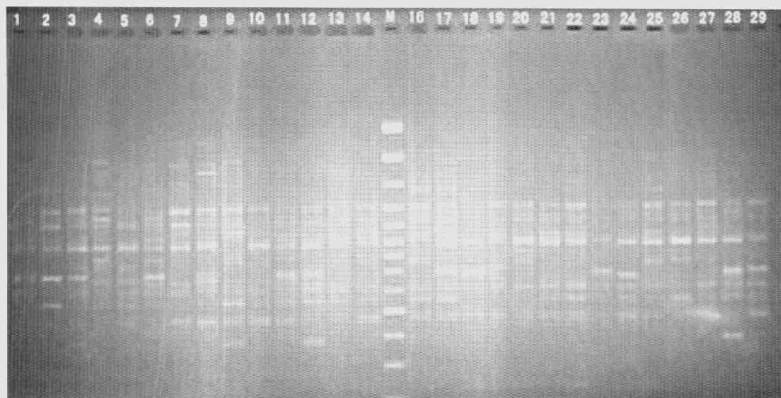


图2野百合 RAPD 图谱(引物 S1519)

Fig. 2 RAPD pattern using the template DNA of *Lilium brownii*

M: Marker, 100 bp DNA Ladder Plus; 1–14 and 16–29 为野百合乳源居群 RAPD 产物。Lanes 1–14 and 16–29 show RAPD pattern of samples from Ruyuan population using primer S1519.

较低的退火温度下(小于 37℃), PCR 非特异扩增产物过多, 条带清晰度不好; 退火温度为 39℃, 40℃ 时, 部分样品没有扩增产物; 37℃, 38℃ 为较适宜的退火温度, 而退火温度为 38℃ 的扩增稳定性比 37℃ 更好, 最终选定退火温度为 38℃。

2.3.2 循环次数

当 PCR 循环次数为 30 次时, DNA 不能得到充分的扩增, 扩增带少而模糊; 而循环次数为 35 次时带型清晰、稳定。最终选定 PCR 循环次数为 35 次。

运用优化好的体系及程序, 即在 20 μl 反应体系中, 含 20 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L Mg²⁺、0.2 mmol/L dNTPs、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.3 μmol/L 随机引物 S1519; 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s, 38℃ 50 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。对野生百合乳源居群样本进行扩增, 其扩增后的凝胶电泳图谱见图 2。

参考文献

- [1] Zhao X Y(赵祥云), Chen X L(陈新露), Fang H(方海), et al. Using rapid marker to evaluate the genetic relationship among genus *Lilium* [J]. *J Beijing Agri Coll* (北京农学院学报), 1995, (10):58-63.(in Chinese)
- [2] Yang M X(杨懋勋), Huang Y F(黄永芳). Application of RAPD technique in *Lilium* study [J]. *Sci Res Monthly*(科学研究月刊), 2005, (5):55-56, 59.(in Chinese)
- [3] Xiao Y(肖艳), Zhou H G(周厚高), Huang Z F(黄子锋), et al. The RAPD analysis of the genetic diversity in self-inbred early generations of *Lilium formolongi* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2005, 32(3):524-526.(in Chinese)
- [4] Zuo Z R(左志锐), Mu D(穆鼎), Gao J P(高俊平), et al. Studies on the genetic diversity and phylogenetic relationship of *Lilium* ssp. by RAPD technique [J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 2005, 32(3):468-472.(in Chinese)
- [5] Zhao Q F(赵庆芳), Ma S R(马世荣), Zeng X Y(曾小英), et al. RAPD analysis of *Lilium* cultivar resources [J]. *J Lanzhou Univ* (Nat Sci)(兰州大学学报 自然科学版), 2005, 41(2):30-33.(in Chinese)
- [6] South China Institute of Botany, Academia Sinica(中国科学院华南植物研究所). *Flora of Guangdong Vol. 6* [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2005. 340-341.(in Chinese)
- [7] Zou Y P(邹喻苹), Ge S(葛颂), Wang X D(王晓东). *Molecular Markers in Systematic and Evolution Botany* [M]. Beijing: Science Press, 2001. 11.(in Chinese)
- [8] 高文远, 李志亮, 肖培根, 等. 浙贝母基因组 DNA 的提取与分析 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(2):79-81.
- [9] Zhou H G(周厚高), Ning Y F(宁云芬), Zhang S J(张施君), et al. The physiological and biochemical changes in bulb development of *Lilium formolongi* [J]. *Guihaia*(广西植物), 2003, 23(4):357-361.(in Chinese)
- [10] Zhao X L(赵小亮), Wu J(吴建), Zhang J(张继), et al. Extraction of polysaccharide from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb. [J]. *Chin J Pract Chin Modern Med*(中华实用中西医杂志), 2004, 4(12):2823-2824.(in Chinese)