

文章编号: 1001-1498(2003)01-0117-06

桉木群体遗传分化研究

I. DNA 提取和 PCR 条件的建立

卓仁英, 孟现东, 陈益泰

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 桉木; RAPD 分子标记; PCR 扩增条件

中图分类号: S792.14

文献标识码: A

桉木(*Alnus cremastogyne* Burk)为桦木科(Betulaceae)植物,主要分布于四川盆地及其周边地区。桉木喜光、喜湿,根系发达,对土壤要求不严,适应性强,在长江中下游地区防护林建设中具有重要作用。

国外对桉木属(*Alnus*)植物的研究起步较早,主要集中于生理生化方面包括生长、固 N、抗涝性以及种间杂交研究等^[1-3]。虽有学者利用 RFLP 研究其核糖体 DNA 的基因结构、以同工酶技术研究桉木属的群体遗传变异^[4-6],但未见应用 RAPD 技术的研究报道。随着现代生物技术的发展,生物多样性的检测技术日趋成熟和多样化,近 20 年来发展的 RFLP、RAPD、SSR 等分子标记技术,可从不同角度和层次来揭示物种的变异性。本项研究旨在建立桉木属植物 DNA 提取方法和 RAPD 反应程序,以进行桉木属种间和种内遗传变异的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以 1996 和 1998 两年从桉木原分布区四川盆地及其周边地区采集的种子,在中国林业科学研究院亚热带林业研究所苗圃培育成的 2 年生幼苗为实验材料,7 月份采当年生嫩叶用于实验分析。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 根据 PCR 扩增的实验要求^[7-9]和现有实验条件,设计了 3 种样品 DNA 提取处理方法:

(1)取 4 g 新鲜样品加入液氮进行研磨,然后用 $w = 5\%$ CTAB 提取缓冲液(含 $w = 5\%$ CTAB、 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 值 8.0、 20 mmol L^{-1} EDTA、 1.4 mol L^{-1} NaCl、 $w = 2\%$ PVP、 $w = 2\%$ - 巯基乙醇)进行提取。DNA 提取方法为:处理后的材料在预冷的研钵中研磨成粉末状,加入 20 mL 提取缓冲液,混匀,于 65℃ 恒温温育 40 min,(中间不断震荡、混匀),然后加入等体积的 Cl(氯仿 异戊醇体积比为 24:1),在摇床上混匀 10 min,于 $4\ 500 \text{ r min}^{-1}$ 离心 15 min,取上

收稿日期: 2002-08-15

基金项目: 2002—2004 年浙江省自然科学基金项目“桉木属植物系统生物学及群体结构遗传研究”(编号 301265)

作者简介: 卓仁英(1969—),男,福建莆田人,博士。

清液移入另一离心管,加入 20 mL 异丙醇沉淀 DNA,用干净玻璃钩捞出 DNA, = 70 % 乙醇洗涤 3 ~ 5 次,晾干后溶解于 1 mL TE,4 ℃ 保存。

(2) 取 4 g 新鲜样品在 - 18 ℃ 低温条件下处理 7 h 以上,然后用 $w = 5\%$ CTAB 提取缓冲液进行 DNA 提取。方法同(1),所得 DNA 用 1 mL TE 溶解。

(3) 取 4 g 新鲜样品用 108 ℃ 灭活 15 min,80 ℃ 烘干 12 h 以上,然后用 $w = 5\%$ CTAB 提取缓冲液进行 DNA 提取。方法同(1),所得 DNA 用 1 mL TE 溶解。

分别取 50 μL 基因组 DNA 溶液用 TE 稀释至 1 000 μL ,用贝克曼 DU-640 紫外分光光度计测定其在 260、280 nm 波长下的光吸收值,计算 A_{260}/A_{280} 的比值并估算 DNA 浓度。

1.2.2 不同处理所得基因组 DNA 的纯度和分子量 分别取 5 μL 基因组 DNA 溶液用 $w = 1.2\%$ 琼脂糖进行电泳分析,恒压 110 V。至指示剂移动到凝胶前沿停止电泳。EB 染色 30 min,紫外灯下观察、拍照。

1.2.3 PCR 扩增条件的建立 根据 PCR 实验要求,分别采用不同的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度和模板 DNA 浓度进行 PCR 扩增。实验条件如表 1。

表 1 PCR 反应条件

条件	Mg^{2+}	dNTP	模板 DNA
PCR 缓冲液/ μL		2.5	
dNTP/(mmol L^{-1})	2.5	1.5, 2.0, 2.5, 3.0	
引物(s60 + s155)/(mmol L^{-1})		每个引物 2 μL	
Mg^{2+} (mmol L^{-1})	1.5, 2.0, 2.5, 3.0		
Taq 酶		1 u(上海华美公司)	
模板 DNA/ng		40	20, 40, 80, 100
ddH ₂ O/ μL		加 ddH ₂ O 补足 20 μL	

注:引物序列为 S60:ACCCGGTCAC; S155:ACGCACAACC,均为加拿大 Songon 公司上海分公司生产。

取 10 μL PCR 扩增产物在 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶上电泳分析,恒压 100 V,至指示剂电泳到凝胶前沿停止。EB 染色 30 min,紫外灯下观察、拍照。

1.2.4 对不同处理方法所得的 DNA 进行 PCR 扩增 分别对 3 种处理所得的 DNA 进行 PCR 扩增。

反应条件为:反应总体积为 20 μL ,其中 PCR 反应缓冲液(100 mmol L^{-1} Tris-HCl, (pH 9.0), 500 mmol L^{-1} KCl, 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , 0.01 % 明胶, 5.0 g L^{-1} BSA) 2.5 μL , dNTP 2.5 mmol L^{-1} , 引物(s60 + s155) 各 2 mmol L^{-1} , Mg^{2+} 3.0 mmol L^{-1} , Taq 酶 1 u, 模板 DNA 各 40 ng, 用 ddH₂O 补足 20 μL 。

反应程序为:在 PE9600 型 PCR 基因扩增仪中,先进行 94 ℃ 预变性 3 min,然后 94 ℃ 变性 18 s, 36 ℃ 退火 80 s, 72 ℃ 延伸 120 s, 40 个循环,最后 72 ℃ 反应 10 min。取 10 μL PCR 扩增产物在 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶上电泳分析,恒压 100 V,至指示剂电泳到凝胶前沿停止。EB 染色 30 min,紫外灯下观察、拍照。

1.2.5 优化条件的 PCR 以上述建立的优化条件组合即:PCR 反应缓冲液 2.5 μL , dNTP 2.5 μL , 引物(s60 + s155) 各 2 mmol L^{-1} , Mg^{2+} 3.0 mmol L^{-1} , Taq 酶 1 u, 模板 DNA 各 40 ng, 用 ddH₂O 补足 20 μL 。对 12 个不同桉木种源的 DNA 进行 PCR 扩增,电泳分析扩增结果,记录实验结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同处理所得的基因组 DNA 纯度和分子量

通过紫外分光光度计和电泳分析,可以看出不同处理方法对所提取的 DNA 有较大影响。DNA 的纯度差异较大(表 2),通过液氮 + CTAB 过程提取的 DNA 纯度略大于冰冻 + CTAB 提取的 DNA,远大于烘干处理 + CTAB 提取的 DNA 样品,但三者的 DNA 样品都可以满足 PCR 的要求,电泳结果如图 1,不同处理所得的 DNA 样品分子量完全一致,约为 30 kb 左右。本文中 Marker 均为 Lambda DNA/ EcoRI + HindIII。

表 2 不同处理条件下紫外分光光度计测定结果

项目	处理 I(液氮 + CTAB)		处理 II(冰冻 + CTAB)		处理 III(烘干 + CTAB)	
	样品 I	样品 II	样品 I	样品 II	样品 I	样品 II
A260	0.720 7	0.784 1	0.710 4	0.708 9	0.605 3	0.643 2
A280	0.402 4	0.440 1	0.410 6	0.405 6	0.441 0	0.520 1
A260/ A280	1.79	1.78	1.73	1.74	1.37	1.23
DNA 浓度/(ng L ⁻¹)	720.7	784.1	710.4	708.9	605.3	643.2

2.2 不同浓度的 Mg²⁺、dNTP、模板 DNA 对 PCR 扩增的影响

2.2.1 不同 Mg²⁺ 浓度对 PCR 扩增结果的影响 以 1.5、2.0、2.5、3.0 mmol L⁻¹ 4 个浓度的 Mg²⁺ 进行 PCR 扩增,电泳分析实验结果如图 2,可以看出,1.5 mmol L⁻¹ 的 Mg²⁺ 浓度偏低,影响了 PCR 扩增,扩增片段数量少,甚至无扩增产物;而 2.0、3.0 mmol L⁻¹ 的 Mg²⁺ 浓度基本能够满足 PCR 扩增的要求,对 PCR 扩增有较好的促进作用,这主要是由于 Mg²⁺ 与 dNTP 结合,从而影响到 Taq 酶反应的底物浓度。

2.2.2 不同浓度的 dNTP 对 PCR 扩增的影响 以不同浓度(1.5、2.0、2.5、3.0 mmol L⁻¹ 4 个浓度)的 dNTP 进行 PCR 扩增,电泳分析实验结果如图 3,可以看出,1.5—2.0 mmol L⁻¹ 的 dNTP 浓度偏低,导致反应不完全,影响了 PCR 扩增,扩增片段数量少,出现弱带;而 2.5—3.0 mmol L⁻¹ 的 dNTP 浓度基本能够



图 1 不同处理所得的 DNA 电泳结果 (处理方法:1、2 冰冻 + CTAB,3、4 液氮 + CTAB,5、8Marker,6、7 烘干 + CTAB)

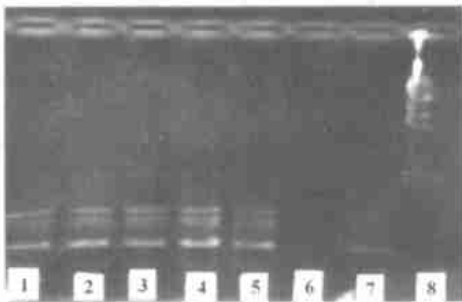


图 2 不同 Mg²⁺ 浓度对 PCR 扩增结果的影响 (Mg²⁺ 浓度 1: 3.0 mmol L⁻¹,2,3: 2.5 mmol L⁻¹,4、5: 2.0 mmol L⁻¹,6,7: 1.5 mmol L⁻¹,8: Marker)

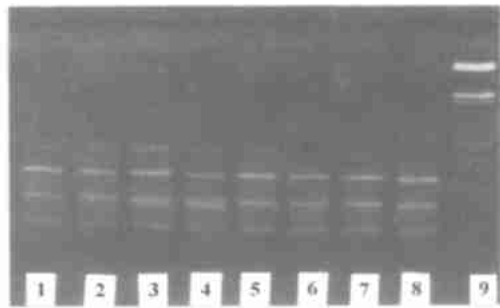


图 3 不同浓度的 dNTP 对 PCR 扩增的影响 (dNTP 浓度:1、2:3.0 mmol L⁻¹,3、4: 2.5 mmol L⁻¹,5、6: 2.0 mmol L⁻¹,7,8: 1.5 mmol L⁻¹,9 Marker)

满足 PCR 扩增的要求,对 PCR 扩增反应较为完全,获得较多的强带。

2.2.3 不同浓度的模板 DNA 对 PCR 扩增的影响 分别以 20、40、80、100 ng 的模板 DNA 进行 PCR 扩增,电泳分析扩增结果如图 4,从图中可以看出,40 ng 的模板 DNA 已经能够满足 PCR 扩增的要求,可以获得较为清晰的谱带;以 20 ng 的模板 DNA 进行扩增,所得扩增产物多为弱带,表现为模板 DNA 浓度过低;而以 100 ng 的模板 DNA 进行扩增,产物中有假阳性谱带出现,表现为模板 DNA 浓度过高。

2.3 不同处理所得的模板 DNA 对 PCR 扩增的影响

分别取 40 ng 3 种不同处理所得的模板 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,电泳结果如图 5。3 种处理方法所得的 DNA 均可以满足 PCR 扩增的要求,但烘干处理后用 CTAB 提取的 DNA 不利于 PCR 扩增,仅有弱扩增带出现,而用液氮 + CTAB 和冰冻 + CTAB 提取的模板 DNA 扩增结果基本相似,完全可以满足 PCR 扩增要求。

2.4 优化条件组合的 PCR 扩增结果

以优化条件组合对 12 个不同桉木种源所提取的模板 DNA 进行 PCR 扩增,电泳结果如图 6。多数 DNA 有扩增产物,且多态性较强,表明所建立的 PCR 扩增优化条件基本适合于不同桉木种源的 RAPD 反应需要。

3 小结与讨论

由于桉木叶片中含有大量的酚类和多糖类物质,对 PCR 扩增结果影响较大,为了减少这些物质的影响,在提取缓冲液中加入了 $w = 2\%$ PVP、 $w = 2\%$ -巯基乙醇,消除酚类物质对 DNA 的影响,从而获得了较好的结果^[10,11],使 3 种处理所得的 DNA 都可以满足 PCR 扩增的需要。在一些实验室

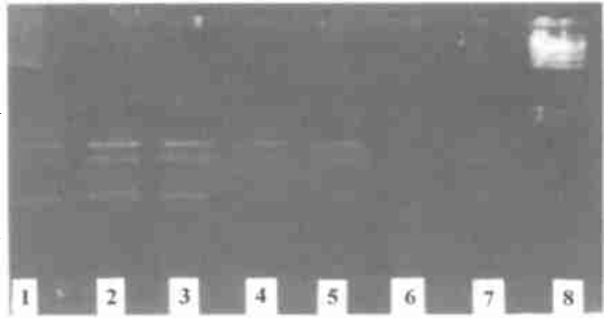


图 4 不同浓度的模板 DNA 对 PCR 扩增的影响 (DNA 模板浓度:1、2:100 ng,3、4:80 ng,5、6:40 ng,7:20 ng,8:Marker)

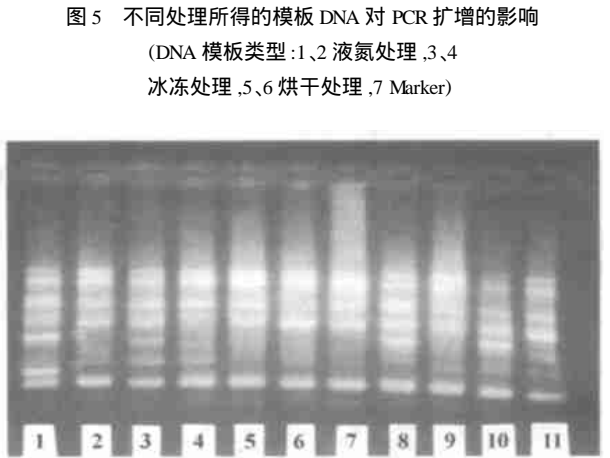


图 5 不同处理所得的模板 DNA 对 PCR 扩增的影响 (DNA 模板类型:1、2 液氮处理,3、4 冰冻处理,5、6 烘干处理,7 Marker)

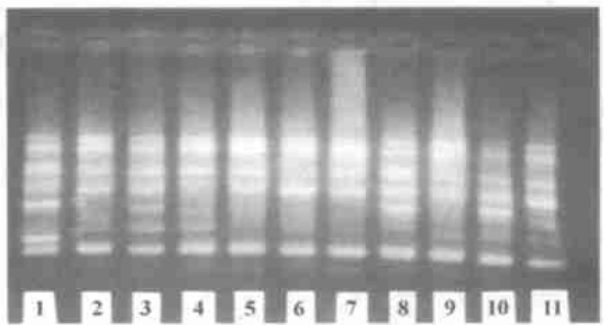


图 6 优化条件组合的 PCR 扩增结果 (模板 1. 石草(1),2. 石草(2),3. 宣恩(1),4. 宣恩(2),5. 盐亭(1),6. 盐亭(2),7. 邛崃,8. 雅安(1),9. 雅安(2),10. 金堂(1),11. 金堂(2))

由于条件限制,采用冰冻处理后再进行 DNA 提取,可节省经费,简化实验条件,在研磨时样品应保持冰冻。

PCR 扩增对各种条件比较灵敏。许多研究表明,只要严格控制 PCR 的扩增条件,可以得到较好的可重复的试验结果^[12],反应混合物中离子浓度尤其是 Mg^{2+} 对 PCR 扩增的特异性和扩增效率有较大的影响,浓度过高会形成非特异性扩增产物。此外 Mg^{2+} 可与 dNTP 结合,促进 PCR 反应^[13];dNTP 是 PCR 反应的重要底物之一^[12],其浓度可以略为过剩,保证 PCR 扩增反应的完全。模板中含有 TE 溶液,会抑制 PCR 扩增,且过量模板会形成假阳性扩增产物,20 ng 的模板 DNA 已经足以进行 PCR 扩增了。

本实验设计了 3 种 PCR 扩增程序,PCR 扩增均在 PE9600 型 PCR 扩增仪上进行,程序 1 为:先 94 °C 预变性 3 min,然后 94 °C 变性 18 s,36 °C 退火 80 s,72 °C 延伸 120 s,40 个循环,最后 72 °C 反应 10 min。程序 2 为:先 94 °C 预变性 3 min,然后 95 °C 变性 18 s,55 °C 退火 80 s,72 °C 延伸 120 s,40 个循环,最后 72 °C 反应 10 min^[14]。程序 3 为:94 °C 预变性 3 min,然后 94 °C 变性 30 s,35 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 80s,40 个循环,最后 72 °C 反应 10 min。但程序 2、3 均未能获得扩增产物。

本实验中采用双引物进行 PCR 扩增,提高扩增产物的多态性和引物的利用效率,以本实验建立的 PCR 扩增程序进行引物筛选和扩增,可以得到较好的实验结果。

参考文献:

- [1] Ewing-k. Tolerance of four wetland plant species to flooding and sediment deposition[J]. Environmental-and-Experimental-Botany, 1996, 36(2): 131-146
- [2] Johnson D A, Chan C G Y, Gttlob McHugh S. C. Structure of 5S rRNA genes in birch (*Betula papyfera*) and alder (*Alnus incana*) [J]. Genome, 1992, 35:337-341
- [3] Gasson L, Lalonde M. Restriction pattern analysis of deoxyribonucleic acid isolated from callus and cell suspension of actinorhizal and non-actinorhizal Betulaceae[J]. Physiol Plantarum, 1987, 70:304-310
- [4] Bouquet J, Cheliak W M, Lalonde M. Allozyme variability in natural population of green alder (*Alnus crisp*) in Quebec[J]. Genome, 1987, 29:345-352
- [5] Bouquet J, Cheliak W M, Lalonde M, et al. Genetic differentiation among 22 mature population of green alder (*Alnus crisp*) in central Quebec[J]. Can J For Res, 1987, 17: 219-227
- [6] Murillo O, Hattemer H H. Inheritance of Isozyme variants of *Alnus acuminata* ssp. *Arguta* (SCHLECTENDAL) Furlow[J]. Silvae Genetica, 1997, 46 (1):51-55
- [7] 奥斯伯 F. 布伦特 R, 金斯顿的 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林译. 北京:科学出版社, 1998
- [8] 张明永,孙彩云. 一步法提取植物 DNA 用于大规模 RAPD 分析[J]. 遗传, 2002, 22(2):106-106
- [9] 左永忠,安连荣. 两种林木总 DNA 提取效果的比较[J]. 河北农业大学学报,1999, 22(1):40-42
- [10] Clark M S. 植物分子生物学—实验手册[M]. 北京:高等教育出版社, 1998. 4-6
- [11] 刘春林,官春云. 植物 RAPD 标记的可靠性研究[J]. 生物技术通报, 1999, (2):31-34
- [12] Skov E. Are RAPD-markers reproducible between different laboratories? [J]. Silvae Genetica, 1998, 47(5-6): 282-287
- [13] 荆玉祥,匡廷云. 植物分子生物学—成就与前景[M]. 北京:科学出版社, 1995
- [14] Marcon C, Firrao G, Ragazzino A, et al. Detection of MLOs in declining alder trees in southern Italy and their characterization by RFLP analysis[J]. Eur J of For Path, 1994, 24: 217-228

Research on the Populations Variation of *Alnus cremastogyne*

I. DNA Extracting and Protocol Optimum for PCR

ZHUO Ren-ying, MENG Xian-dong, CHEN Yi-tai

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract : Taking China's endemic tree species *Alnus cremastogyne* and other 5 *Alnus* species as test materials, the DNA extraction of genome and the amplification of PCR were studied. Two methods were tested, i. e. freezing treatment + 5% CTAB and liquid nitrogen + 5% CTAB. It is proved that the optimum PCR program is as follows: pre-denaturing under 94 °C for 3 min., denaturing under 94 °C for 18 seconds, annealing under 36 °C for 80 seconds and extending under 72 °C for 120 seconds. After 40 cycles, the sample is reacted for 10 minutes under 72 °C. PCR system includes buffer 2.5 μL, d-NTP 2.5 μL, primer (s60 + s155) 2 mmol L⁻¹, Mg²⁺ 3.0 mmol L⁻¹, Tap enzyme 1 U, DNA 40 mg, then adding ddH₂O to 20 μL. This study may provide some references for the application of RAPD technique in genetic research of alder tree species.

Key words : *Alnus cremastogyne*; RAPD molecular marker; PCR