

文章编号:1001-1498(2004)01-0042-05

# 枫香 DNA 提取方法与 PCR 扩增程序的优化

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)

**摘要:**从 SDS、CTAB、高盐低 pH 值 3 种方法中选择了 CTAB 法作为枫香适合的 DNA 提取方法,同时构建了枫香 DNA 的 PCR 扩增程序,并从  $Mg^{2+}$  浓度、Taq 酶用量、dNTP 浓度、引物浓度、DNA 模板用量等方面优化了 PCR 扩增程序。

**关键词:**枫香;DNA 提取;PCR 扩增程序

**中图分类号:**S792.14      **文献标识码:**A

枫香 (*Liquidambar formosana* Hance) 为金缕梅科 (Hamamelidaceae) 落叶乔木,广泛分布于我国南方大部分省区,是优良的用材、生态树种。目前对该树种的研究主要集中在优树及子代选择方面,在分子群体遗传方面的研究尚未见报道。用 RAPD 等分子标记方法研究林木的群体遗传结构与遗传分化已经成为比较常见的方法,由于各树种的内含物差异较大,其中 DNA 含量差异也很大,故针对不同树种需要采用不同的 DNA 提取方法。本实验的目的是确定最佳的枫香 DNA 提取方法和优化 PCR 扩增程序,为进一步开展枫香的分子群体遗传研究作好前期的基础工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

用 2001 年 11 月从浙江富阳采集的枫香种子,于次年 3 月在中国林业科学研究院亚热带林业研究所苗圃播种,育成 1 年生幼苗,7 月份采顶端嫩叶作为实验材料。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 取新鲜枫香嫩叶 5 g,采用 SDS、CTAB、高盐低 pH 值法 3 种方法对枫香进行 DNA 提取<sup>[1~3]</sup>。

(1) SDS 提取法 参照一般植物基因组 DNA 提取方法中的 SDS 提取液成分 ( $100\text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl、 $50\text{ mmol L}^{-1}$  EDTA、 $50\text{ mmol L}^{-1}$  NaCl、1.5% SDS、2% PVP、0.5%  $\beta$ -巯基乙醇, pH 8.0),对其中 NaCl 设 0、50、100、150、200、250  $\text{mmol L}^{-1}$  6 个浓度梯度,对 pH 值设 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 6 个梯度,进行实验比较。

(2) CTAB 提取法 参照一般植物基因组 DNA 提取方法中 CTAB 提取液的成分 (3% CTAB、 $25\text{ mmol L}^{-1}$  EDTA、 $1.4\text{ mol L}^{-1}$  NaCl、2% PVP、1.5%  $\beta$ -巯基乙醇, pH 8.0),对其中 NaCl

收稿日期: 2003-01-10

基金项目: 浙江省“十五”科技重点项目“重要阔叶树种资源培育技术研究”(011102198)部分内容

作者简介: 孟现东(1977—),男,山东陵县人,硕士。

设 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.4 mol L<sup>-1</sup> 6 个浓度梯度,对 pH 值设 7.0、7.5、8.0、8.4、8.8、9.5 6 个梯度,进行实验比较。

(3) 高盐低 pH 值法<sup>[4]</sup> 提取液的成分(100 mmol L<sup>-1</sup> NaAc、50 mmol L<sup>-1</sup> EDTA、500 mmol L<sup>-1</sup> NaCl、1.4% SDS、2% PVP、0.5% β-巯基乙醇,pH 5.5),对其中 NaCl 设 0、0.1、0.2、0.5、0.7、1 mmol L<sup>-1</sup> 6 个浓度梯度,对 pH 值设 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0 6 个梯度,进行实验比较。

对提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度计检测 OD 值(DNA 在波长 260 nm 与 280 nm 处吸收值的比值)。对提取符合要求(OD 值在 1.6 ~ 2.0 之间)的 DNA 进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增程序的构建 参照一般 PCR 扩增方法,20 μL 反应系统成分:PCR 反应缓冲液(500 mmol L<sup>-1</sup> KCl、100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl、1.0% Triton X-100,pH 9.0) 2 μL、Mg<sup>++</sup> 2.0 mmol L<sup>-1</sup>、Taq 酶(上海华美公司 100 U·支<sup>-1</sup>) 1 U、dNTP(上海华美公司) 2.5 mmol L<sup>-1</sup>、引物(上海生工公司 10 bp 引物) 0.7 mmol L<sup>-1</sup>、DNA 模板 50 ng;用 PE-9600 型 PCR 基因扩增仪扩增,反应程序:先 94 ℃ 预变性 4 min,然后进行 40 个循环(94 ℃ 变性 1 min,36 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min),最后 72 ℃ 延伸 8 min 后,降至 10 ℃ 后取出琼脂糖凝胶电泳分析,并从 Mg<sup>++</sup> 的浓度、Taq 酶的用量、dNTP 浓度、引物浓度、DNA 模板用量等方面进行优化<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取方法的优化

2.1.1 SDS 提取法 在提取过程中,pH 值为 8.0 ~ 9.0 时都能获得白色絮状沉淀,随着 NaCl 浓度的增加白色絮状沉淀粘稠度降低,但沉淀量减少,在 NaCl 浓度为 250 mmol L<sup>-1</sup> 时,沉淀消失。经 UV-2401 紫外分光光度计检测,在 pH 值 8.0,NaCl 浓度为 150 mmol L<sup>-1</sup> 时,获得最高 OD 值(1.36),电泳检测为一条粘在点样孔处的条带,说明存在较为严重的糖污染。

2.1.2 CTAB 提取法 在 pH 值为 7.5 ~ 9.0 时都能获得白色絮状沉淀,随着 NaCl 浓度的增加白色絮状沉淀粘稠度降低,沉淀量减少,在 NaCl 浓度为 1.4 mol L<sup>-1</sup> 时,沉淀消失。经 UV-2401 紫外分光光度计检测,在 pH 值 8.4,NaCl 浓度为 1.0 mol L<sup>-1</sup> 时,获得最佳 OD 值(1.806),琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片断显示为一条带,大小在 48 kb 左右,可用于 PCR 扩增。

2.1.3 高盐低 pH 值法 在 pH 值为 4.5 ~ 6.0 时都能获得白色絮状沉淀,随着 NaCl 浓度的增加白色絮状沉淀粘稠度降低,沉淀量减少。经 UV-2401 紫外分光光度计检测,在 pH 值 5.5,NaCl 浓度为 1.0 mol L<sup>-1</sup> 时,获得最佳 OD 值(1.47),且提取的 DNA 量较少;电泳检测同样为一条粘在点样孔处的条带,说明也存在较为严重的糖污染。

通过采用 SDS、CTAB、高盐低 pH 值法 3 种方法对枫香进行 DNA 提取,从实验结果看出,用 SDS 方法和高盐低 pH 值法提取的 DNA 的 OD 值均小于 1.6,主要原因是糖污染;只有用 CTAB 方法提取的 DNA 量较多,且 OD 值在 1.6 ~ 2.0 之间,符合 PCR 扩增要求,故认为枫香 DNA 适合的提取方法为 CTAB 法,主要步骤如下:

(1) 取新鲜枫香嫩叶 5 g,液氮研磨成粉末,加入 20 mL 65 ℃ 预热的提取液(提取液的成分为 3% CTAB、25 mmol L<sup>-1</sup> EDTA、1.0 mol L<sup>-1</sup> NaCl、1.5% β-巯基乙醇,pH 8.4)。

(2) 65 ℃ 水浴 20 min,其间摇匀 2 ~ 3 次,取出冷却至室温后,加入等体积氯仿 异戊醇(体积比 24:1),摇匀 30 min。

(3)  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,加入 2 倍体积无水乙醇,4 ℃ 放置 4 h。

(4) 挑出白色的絮状物或  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 沉淀絮状物,70%乙醇冲洗絮状物 2 ~ 3 次,滤纸吸干,加入 2 mL TE 溶解。

(5) 在溶解的 DNA 溶液中加入 2/3 倍体积氯仿-异戊醇(体积比 24:1),摇匀 30 min,重复步骤(3)、(4)。

(6) 将提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度计检测 OD 值。将 OD 值在 1.6 ~ 2.0 之间的合格 DNA 稀释至  $50\ \text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$ ,用于 PCR 扩增。

## 2.2 PCR 扩增程序的优化

参照一般 PCR 扩增方法,20  $\mu\text{L}$  反应体系成分:PCR 反应缓冲液( $500\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}\ \text{KCl}$ 、 $100\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}\ \text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 、1.0% Triton X-100、pH 9.0)2  $\mu\text{L}$ 、Taq 酶 1 U、dNTP 2  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ 、引物 1  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板 50 ng;用 PE-9600 型 PCR 基因扩增仪扩增,反应程序:先 94 ℃ 预变性 4 min,然后进行 40 个循环(94 ℃ 变性 1 min,36 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min),最后 72 ℃ 延伸 8 min 后,降至 10 ℃ 取出 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。扩增结果为有条带扩出,但谱带不很清晰,决定从  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度、Taq 酶的用量、dNTP 浓度、引物浓度、DNA 模板用量方面进行优化,研究各因子对枫香 PCR 扩增结果的影响。

**2.2.1  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度** 一般认为 PCR 反应的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度在 1.5 ~ 4.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  之间,所以在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中,反应体系中的其他成分不变,做  $\text{Mg}^{2+}$  的 6 个不同浓度梯度(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ ),扩增电泳结果(图 1)看出,随  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加,扩增条带数和扩增产物的量也增加,但在高浓度时谱带不是特别清晰,考虑以上两方面因素,反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度选定 3.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  是较为合适的。 $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 PCR 反应的特异性和扩增效率有很大影响, $\text{Mg}^{2+}$  浓度降低,使扩增效率降低,扩增产物减少; $\text{Mg}^{2+}$  浓度过高,会使非特异性产物增加,使扩增谱带变宽。

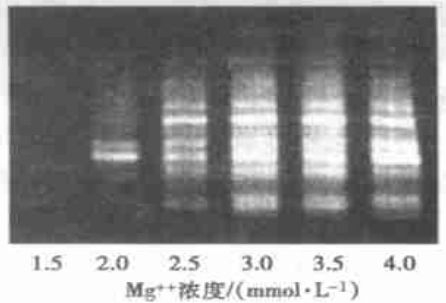


图 1 不同  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 PCR 扩增结果的影响

**2.2.2 dNTP 浓度** dNTP 浓度对 PCR 反应的扩增效率有很大影响,在反应体系中提供足够浓度 dNTP 是非常重要的,一般认为 2.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  的 dNTP 浓度可满足 PCR 反应的要求。在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中( $\text{Mg}^{2+}$  3.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ 、Taq 酶 1 U、引物 1.0  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板 50 ng),对 dNTP 浓度做 6 个不同浓度梯度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ ),扩增电泳结果看出(图 2),随 dNTP 浓度的增加,扩增条带数和扩增产物的量也增加,在 dNTP 浓度为 2.5  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  时,扩增结果较为理想,故在反应体系中选用此浓度。由于 dNTP 能与  $\text{Mg}^{2+}$  结合, $\text{dNTP}$  浓度对  $\text{Mg}^{2+}$  浓度有所影响,但本实验提供了足够浓度的  $\text{Mg}^{2+}$ ,所以  $\text{Mg}^{2+}$  浓度并未因 dNTP 浓度变化而受影响。在 dNTP 浓度大于 2.5  $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  时,扩增结果变化不大,但实验成本

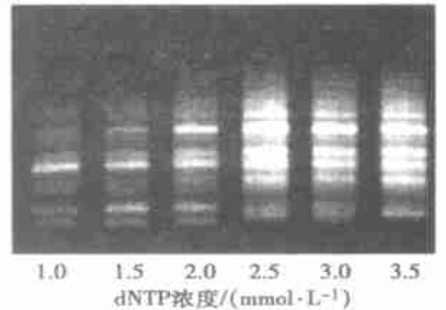


图 2 不同 dNTP 浓度对 PCR 扩增结果的影响

增加。

**2.2.3 引物浓度** 一般认为,引物浓度在  $0.4 \sim 1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  能满足 PCR 反应的要求。在  $20 \mu\text{L}$  反应体系中 ( $\text{Mg}^{++} 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{dNTP} 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Taq}$  酶  $1 \text{ U}$ 、 $\text{DNA}$  模板  $50 \text{ ng}$ ) ,引物选用 6 个浓度梯度 ( $0.4$ 、 $0.5$ 、 $0.6$ 、 $0.7$ 、 $0.8$ 、 $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 进行扩增电泳,结果(图 3)看出,随着引物浓度的加大,扩增条带数增加,引物浓度在  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  以上时条带数稳定,但扩增产物的量增加,为了获得条带清晰特异性好的谱带,在反应体系中选择引物浓度为  $0.7 \text{ mmol L}^{-1}$  是比较适宜的。在引物浓度较低时,扩增产物效率较低;在引物浓度过高时,会影响扩增产物的特异性,使谱带变模糊。

**2.2.4 Taq 酶的用量** 一般认为在  $20 \mu\text{L}$  反应体系中酶用量在  $0.5 \sim 1.5 \text{ U}$ 。在  $20 \mu\text{L}$  反应体系中 ( $\text{Mg}^{++} 3.0 \text{ mmol L}^{-1}$ 、引物  $0.7 \text{ mmol L}^{-1}$ 、 $\text{dNTP} 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ 、 $\text{DNA}$  模板  $50 \text{ ng}$ ) , $\text{Taq}$  酶做 6 个不同用量梯度 ( $0.4$ 、 $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $1.2$ 、 $1.4 \text{ U}$ ) ,扩增电泳结果看出(图 4) ,随  $\text{Taq}$  用量的增加,扩增条带数和扩增产物的量也增加, $\text{Taq}$  酶用量在  $1 \text{ U}$  以上时,扩增情况变化不大,所以反应体系中  $\text{Taq}$  酶用量选择  $1 \text{ U}$  较为合适。

**2.2.5 DNA 模板用量** 在  $20 \mu\text{L}$  反应体系中 ( $\text{Mg}^{++} 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Taq}$  酶  $1 \text{ U}$ 、 $\text{dNTP} 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物  $0.7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ,选用 10 个  $\text{DNA}$  模板用量梯度 ( $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $40$ 、 $50$ 、 $60$ 、 $70$ 、 $80$ 、 $90$ 、 $100 \text{ ng}$ ) 进行扩增电泳,结果(图 5)看出,模板用量从  $10 \sim 100 \text{ ng}$  都能扩出较为清晰的谱带,可见 PCR 反应适宜的  $\text{DNA}$  模板浓度有一个较宽的范围。但在  $\text{DNA}$  模板用量为  $50 \sim 70 \text{ ng}$  时,弱带扩增较其它用量清晰,所以在反应体系中选择  $\text{DNA}$  模板的用量为  $60 \text{ ng}$ 。 $\text{DNA}$  模板在浓度过低时,产物的量减少,弱带变得不清晰;浓度过高会增加非特异性产物,使扩增谱带变宽。

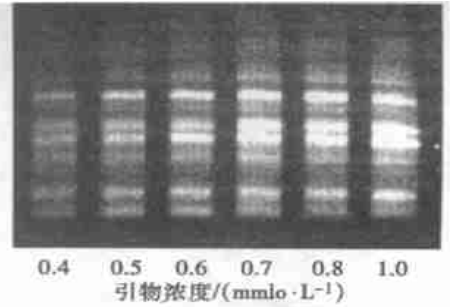


图 3 不同引物浓度对 PCR 扩增结果的影响

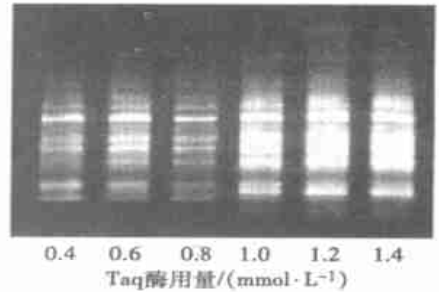


图 4 不同  $\text{Taq}$  酶用量对 PCR 扩增结果的影响

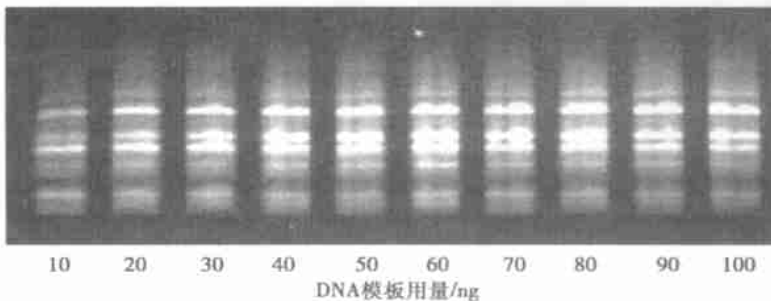


图 5 不同  $\text{DNA}$  模板用量对 PCR 扩增结果的影响

经过对以上几个主要因子的比较,确定了 PCR 的扩增程序:  $20 \mu\text{L}$  反应体系中的成分为,

PCR 反应缓冲液 (500 mmol L<sup>-1</sup> KCl、100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl、1.0 % Triton X-100、pH 9.0) 2 μL、Mg<sup>++</sup> 3.0 mmol L<sup>-1</sup>、Taq 酶 1U、dNTP 2.5 mmol L<sup>-1</sup>、引物 0.7 mmol L<sup>-1</sup>、DNA 60 ng; 反应程序为, 先 94 °C 预变性 4 min, 然后进行 40 个循环(94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min), 最后 72 °C 延伸 8 min 后, 降至 10 °C 后取出 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 3 小结与讨论

在枫香 DNA 提取中, 影响其纯度的主要是糖类物质<sup>[1,6]</sup>, 除糖的主要方法是使用 CTAB 裂解, 能减少糖和蛋白质的污染; 合适的 NaCl 浓度也是获得足够高纯度的 DNA 的重要影响因素, 在裂解液中的 NaCl 浓度越大, 提取的 DNA 纯度越高, 但 DNA 的量却越来越少。对于 DNA 含量较少且杂质较多的物种, 需选择合适的 NaCl 浓度。pH 值也与 NaCl 浓度的影响相似, 高 pH 值可减少糖和蛋白质的污染, 在枫香 DNA 提取中选择 pH 值 7.8 ~ 9.0 都是可行的, 但最合适 pH 值为 8.4。在 PCR 扩增程序的优化过程中, 发现各成分的优化有累加效应。在枫香的 PCR 扩增反应中, 起主要作用的是 Mg<sup>++</sup>, 与大部分木本植物相似, 都需要较高的浓度。在枫香 PCR 扩增反应中选用较低的引物浓度, 有利于扩增的特异性, 使电泳谱带清晰, 在扩增条带数目多时, 便于电泳分析。在退火温度上, 参照一般 PCR 的退火温度(36 °C), 在枫香 PCR 扩增中能取得较好的效果。

#### 参考文献:

- [1] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 等. 几种木本果树 DNA 的有效提取[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481 ~ 483
- [2] 王景雪, 高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J]. 山西大学学报, 2000, 23(3): 271 ~ 272
- [3] 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, 2000, 22(2): 106
- [4] Guillemaut P, Marechal-Drouard L. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive and reliable methods[J]. Plant Biology Reporter, 1992 (10): 60 ~ 65
- [5] 童再康. 药用植物厚朴的遗传改良[D]. 南京: 南京林业大学, 2002
- [6] 陈大明, 张上隆. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621 ~ 624

## The Method for *Liquidambar formosana* DNA Extracting and the Optimization of PCR Procedure

MENG Xian-dong, CHEN Yi-tai

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

**Abstract:** Three methods (SDS method, CTAB method and high salt low pH method) for DNA extracting were compared. The CTAB method was the best method for *Liquidambar formosana* DNA extracting. And PCR procedure was optimized about the factors Mg<sup>++</sup>, DNA density etc. It's proved that the optimum PCR procedure was as follows: pre-denaturing under 94 °C for 4 minutes, denaturing under 94 °C for 1 minutes, annealing under 36 °C for 1 minutes and extending under 72 °C for 1.5 minutes. After 40 cycles, the sample was reacted for 8 minutes under 72 °C. PCR system includes buffer 2 μL, Mg<sup>++</sup> 3.0 mmol L<sup>-1</sup>, Taq enzyme 1 U, dNTP 2.5 mmol L<sup>-1</sup>, primer 0.7 mmol L<sup>-1</sup>, DNA 60 ng.

**Key words:** *Liquidambar formosana*; DNA extracting; PCR procedure