

兰州百合 DNA 提取方法比较及 RAPD 体系的快速优化

崔文娟, 林玉红, 欧巧明, 石有太, 罗俊杰

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以兰州百合鳞片和叶片为试材, 采用改良CTAB法获得了高质量的基因组DNA。为优化兰州百合 RAPD-PCR反应体系, 利用正交试验设计, 对兰州百合RAPD-PCR反应体系中的5种主要因素进行4水平共计16个组合设计, 并选用3种反应程序, 通过琼脂糖凝胶电泳结果分析, 最终获得最佳反应体系为: 20 uL反应体系中含 30 ng模板DNA、0.5 μmol/L随机引物、0.2 mmol/L dNTPs、2.25 mmol/L MgCl₂, 及1.5U Taq DNA聚合酶。最佳反应程序: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性1 min, 36 °C退火1.5 min; 72 °C延伸2 min; 35个循环; 最后72 °C延伸7 min。

关键词: 兰州百合; DNA提取; RAPD-PCR; 体系优化

中图分类号: S644.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)01-0008-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.003

Comparison of DNA Extraction and Rapid Optimization of RAPD-PCR Reaction System for Lanzhou Lily

CUI Wenjuan, LIN Yuhong, OU Qiaoming, SHI Youtai, LUO Junjie

(Institute of Bio-technology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: High quality genomic DNA is obtained from lily bulbs and leaves using improved CTAB method. In order to get reliable and repeatable reaction system of RAPD-PCR amplification for Lanzhou lily, we optimized the RAPD-PCR reaction system at 4 levels and 5 factors by orthogonal experimental design. The optimized RAPD-PCR system is tested on 3 PCR amplification procedure. The result of polyacrylamide gel electrophoresis shows that the best reaction system is 20 ul reaction solution, which contained 30 ng template DNA, 0.5 μmol/L primers, 0.2 mmol/L dNTPs, 2.25 mmol/L MgCl₂ and 1.5 U Taq DNA polymerase. The reaction procedure is as follows: pre-denaturing at 94 °C for 4 min, 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 36 °C for 1.5 min and extending at 72 °C for 2 min, extending at 72 °C for 7 min after the cycles.

Key words: Lanzhou lily (*Lilium davidii*); DNA extraction; RAPD-PCR; System optimization

兰州百合(*Lilium davidii* Duch. var. *unicolor*) 又称甜百合, 是百合科百合属川百合的一个变种, 属多年生草本植物, 其用途广泛, 具有药用、食用和观赏价值^[1]。学者们对兰州百合的研究主要集中在离体快繁、化学成分、种植栽培、贮存保鲜等方面, 并取得了丰富的研究成果。但对兰州百合种质资源调查研究工作相对薄弱, 加之不同地区之间相互引种, 致使兰州百合植物种质及其

亲缘关系至今不清, 给兰州百合资源研究、保存、评价、利用以及新种质的创新等带来很大困难^[2]。

RAPD 分子标记技术^[3], 因其具有操作简便快捷, 灵敏度高, 通用性好且无需预先了解物种基因组信息等优点而被广泛应用于种质资源和亲缘关系分析方面^[4-5], 特别是遗传多样性的检测^[6]。但 RAPD 标记也存在一些不足, 其中最主要的是其受反应条件影响较大, 检测的重复性较

收稿日期: 2016-12-06

基金项目: 甘肃省农业科学院青年基金项目(2013GAAS28); 甘肃省农业科学院科技创新工程学科团队项目(2015GAAS02)。

作者简介: 崔文娟(1981—), 女, 河北邯郸人, 助理研究员, 主要从事农业生物技术应用研究工作。联系电话: (0)13609311627。E-mail: wjcui@qq.com。

通信作者: 罗俊杰(1962—), 男, 陕西华县人, 研究员, 主要从事农业生物技术研究工作。联系电话: (0931)7612658。

差^[7],使得不同研究者的研究结果难以比较。因此,建立一个稳定性好、可重复性高的适合兰州百合的 RAPD-PCR 反应体系对于 RAPD 技术在兰州百合研究中的应用至关重要。

兰州百合鳞片中多糖含量较高,多糖、多酚往往与 DNA 一起形成共沉淀,对 DNA 的提取造成很大困难,而高质量的 DNA 则是分子标记的基础与关键环节。本研究以兰州百合为材料,进行 DNA 提取方法的比较和优化,并采用正交实验优化百合 RAPD-PCR 反应体系,以期应用 RAPD 分子标记技术进行兰州百合种质资源和遗传育种等研究奠定良好基础。

1 材料与方 法

1.1 试材及取样

兰州百合(*Lilium davidii* Duch. var. *unicolor*)来源于甘肃省兰州市七里河区,以其新鲜叶片及鳞片为试材,4℃冰箱保存待用。

1.2 总 DNA 的提取

参考杨秀梅等^[8]不用液氮研磨的提取方法和使用液氮改良 CTAB 法^[9]分别对兰州百合新鲜叶片及鳞片进行基因组 DNA 提取,并略作改动。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,用 TC-P II G 型紫外分光光度计测定所提取的总 DNA 含量和纯度,并稀释至 100 ng/μL, -20℃保存备用。

1.3 RAPD-PCR 反应扩增程序筛选

设计的 RAPD-PCR 反应扩增程序 3 个方案如下。①94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 36℃退火 1.5 min; 72℃延伸 2 min; 35 个循环; 最后 72℃延伸 7 min; 4℃保存。②94℃预变性 1 min; 94℃变性 2 s, 34℃退火 9 s; 72℃延伸 70 s; 40 个循环; 最后 72℃延伸 4 min; 4℃保存。③94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 36℃退火 1.5 min; 72℃延伸 2 min; 5 个循环; 94℃变性 1 min, 42℃退火 1.5 min; 72℃延伸 2 min; 30 个循环; 最后 72℃延伸 7 min; 4℃保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL)于 2.5 V/cm 电压下电泳,用美国 Bio-rad 伯乐 GelDoc XR System 凝胶成像系统拍照保存。本试验选用 B19、E2、B12 等 3 对引物进行反应体系的优化。

1.4 RAPD-PCR 反应体系的优化

采用 PCR 扩增体系正交设计软件——正交设

计助手 II V 3.1 进行百合 RAPD-PCR 扩增体系设计。选择 PCR 反应中的 5 个因素(Taq 酶,模板 DNA, dNTP, Mg²⁺ 和引物)作为正交试验 L₁₆(4⁵)的影响因子,各因素的浓度水平详见表 1,处理组合见表 2。各处理反应体系中均含有 10× PCR Buffer 2 μL,并加 ddH₂O 补足至 20 μL。16 个反应体系分别在 3 个 RAPD-PCR 反应扩增程序(①、②、③)进行 PCR 扩增,上样量 10 μL,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 RAPD-PCR 反应体系的因素与水平

水平	Tag DNA 聚合酶 / (U/μL)	模板浓度 / ng	dNTPs / (mmol/L)	Mg ²⁺ / (mmol/L)	引物 / (μmol/L)
1	0.5	30	0.1	1.50	0.4
2	1.0	60	0.2	1.75	0.5
3	1.5	90	0.3	2.00	0.6
4	2.0	120	0.4	2.25	0.7

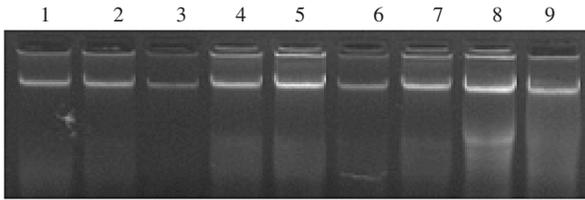
表 2 百合 RAPD-PCR 正交组合设计

编号	Tag DNA 聚合酶 / (U/μL)	模板浓度 / ng	dNTPs / (mmol/L)	Mg ²⁺ / (mmol/L)	引物 / (μmol/L)
1	0.5	30	0.10	1.50	0.4
2	0.5	60	0.15	1.75	0.5
3	0.5	90	0.20	2.00	0.6
4	0.5	120	0.25	2.25	0.7
5	1.0	30	0.15	2.00	0.7
6	1.0	60	0.10	2.25	0.6
7	1.0	90	0.25	1.50	0.5
8	1.0	120	0.20	1.75	0.4
9	1.5	30	0.20	2.25	0.5
10	1.5	60	0.25	2.00	0.4
11	1.5	90	0.10	1.75	0.7
12	1.5	120	0.15	1.50	0.6
13	2.0	30	0.25	1.75	0.6
14	2.0	60	0.20	1.50	0.7
15	2.0	90	0.15	2.25	0.4
16	2.0	120	0.10	2.00	0.5

2 结果与分析

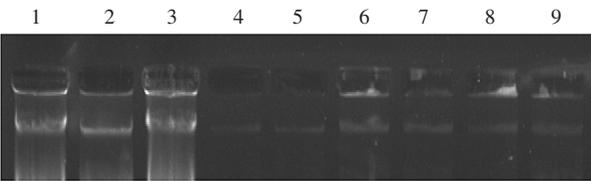
2.1 DNA 提取结果

DNA 的浓度和质量直接关系到 RAPD-PCR 反应的成败。实验比较了兰州百合叶片和鳞茎不用液氮研磨方法和 CTAB 法提取 DNA 的质量和浓度，1%琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1 和图 2。结果表明，用直接加去多糖缓冲液方法提取，可获得质量好、纯度高的 DNA，且条带清晰明亮，好于 CTAB 法提取 DNA 的结果。用直接加去多糖



泳道 1~7 为鳞茎 DNA 提取结果，8~9 为叶片 DNA 提取结果

图 1 去多糖缓冲液法提取鳞茎和叶片的总 DNA 电泳检测结果



泳道 1~3 为鳞茎 DNA 提取结果，4~9 为叶片 DNA 提取结果

图 2 液氮提取鳞茎和叶片的总 DNA 电泳检测结果

缓冲液方法提取兰州百合鳞茎组织 DNA 的结果要好于用叶片组织提取 DNA 的结果。采用液氮方法得到的 DNA 得率普遍较低，而且鳞茎组织在液氮中研磨比较费力。

2.2 RAPD-PCR 反应体系的优化

图 3 为引物 B19 PCR 反应组分正交试验设计电泳检测结果，其图上半部选用 RAPD-PCR 反应扩增程序①，下半部选用 RAPD-PCR 反应扩增程序②。可以看出，RAPD-PCR 反应扩增程序①扩增条带的亮度和清晰度明显好于②。经过 3 对引物对 3 个 RAPD-PCR 反应扩增程序和 16 个 RAPD-PCR 反应体系的琼脂糖电泳分析，最终确定 RAPD-PCR 反应扩增程序①最稳定。

图 3 中组合 1-4、4-8、9-12、13-16 Taq 酶用量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0 U，明显可以看出 Taq 酶对 RAPD-PCR 扩增试验结果影响较大，随着 Taq 酶含量的增高，扩增条带的数量增加，亮度增强；但当 Taq 酶含量为 2.0 U 时，扩增效果未能超越 Taq 酶含量为 1.5 U 时。从经济考虑，当 Taq 酶含量为 1.5 U 时，就可以使扩增反应达到最佳，再增加 Taq 酶含量会引起非特异性扩增。

图 3 中 Taq 酶含量为 1.5 U 的区间 9-12，组合 11 在各个 PCR 反应程序中均表现条带少，亮度

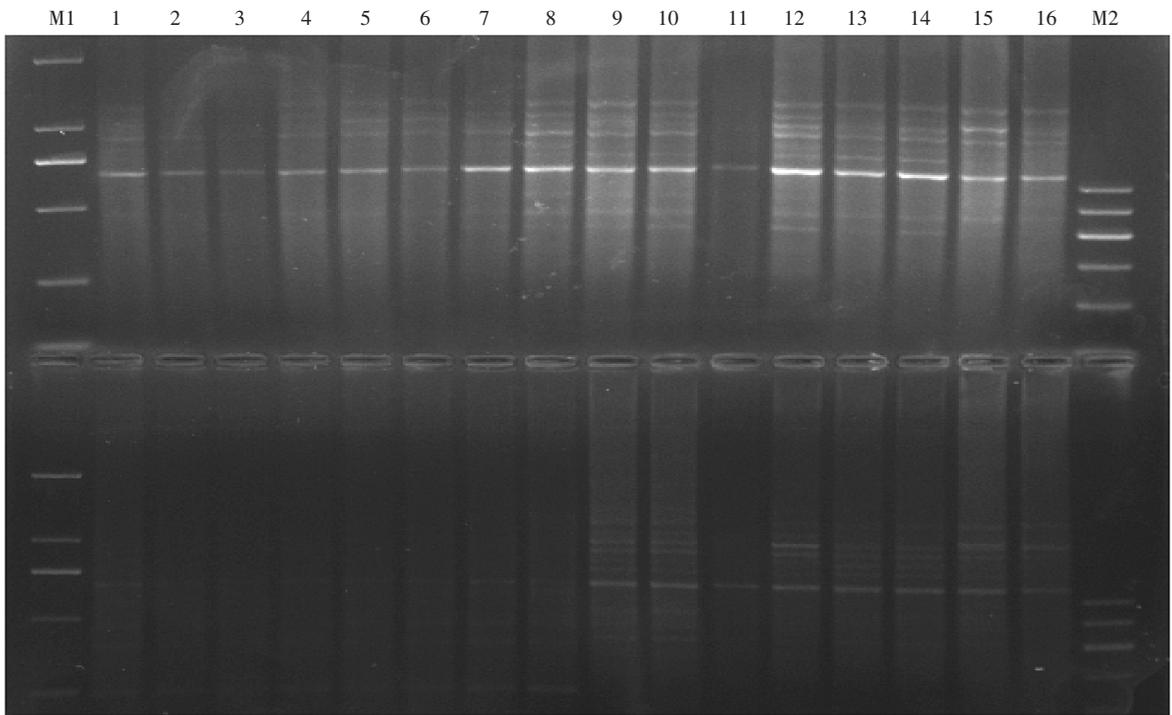


图 3 引物 B19 PCR 反应组分正交试验设计电泳检测结果

弱。分析该 PCR 反应体系发现, dNTP 用量 0.1 mmol/L, 同时比较 dNTP 用量为 0.1 mmol/L 的其他 3 组, 即组合 1、6、16, 可以看出其条带模糊, dNTP 是 PCR 反应的原料, 其浓度的高低直接影响了 PCR 反应的结果。

从图 4 中可以看出组合 12 的非特异扩增增多, 分析该 PCR 反应体系发现, 其 DNA 含量为 120 ng, 同时比较 DNA 含量 120 ng 的其他 3 组, 即组合 4、8、16 可以看出, 模板量太大时, 产物量增多。组合 9、10 在 3 个程序中均扩增出清晰的条带, 表现较好, 从节约成本的角度最终选择组合 9。兰州百合 RAPD-PCR 反应的最适反应体系为: 20 μ L 体系中含模板 DNA 30 ng、随机引物 0.5 μ mol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、 $MgCl_2$ 2.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, buffer 2.0 μ L。

3 小结与讨论

以兰州百合鳞片和叶片为试材, 采用改良的 CTAB 法获得了高质量的基因组 DNA。为优化兰州百合 RAPD-PCR 反应体系, 利用正交试验设计, 对兰州百合 RAPD-PCR 反应体系中的 5 种主要因素进行 4 水平共计 16 个组合设计, 并选用 3 种反应程序, 通过琼脂糖凝胶电泳结果分析, 最终获得最佳反应体系为: 20 μ L 反应体系中含 30 ng 模板 DNA、0.5 μ mol/L 随机引物、0.2 mmol/L dNTPs、2.25 mmol/L $MgCl_2$, 及 1.5U Taq DNA 聚合酶。最佳反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

高质量的 DNA 是进行分子标记研究的基础, DNA 的纯度和完整性直接影响 PCR 扩增结果。不同植物组织由于成分不同应选用与之相适宜的 DNA 提取方法。兰州百合的鳞茎和叶片中多糖、淀粉含量较高, 直接用 CTAB 法提取时, 最后在溶解 DNA 时有不溶物出现, 另外电泳检测时, 电泳孔易出现杂质, 影响后续的 PCR 反应。我们选用的去多糖缓冲溶液, 可以有效的去除鳞茎和叶片中的多糖等物质, 纯化了 DNA。兰州百合是多年生草本植物, 选用鳞茎提取 DNA, 对植物生长有一定的破坏性, 选用叶片作为 DNA 提取对象可以防止和降低对兰州百合生长的伤害, 且叶片相比较鳞茎更容易获得。但是要注意选用新鲜叶片或在 4 $^{\circ}$ C 短期保存, 不可将材料放在 -20 $^{\circ}$ C 或其他低温条件保存, 低温保存的材料用该方法容易降解。当然, 选取叶片作为 DNA 提取材料受到一定的时间限制^[10], 这时选用鳞茎作为 DNA 提取材料是很好的补充, 并且鳞茎材料在 4 $^{\circ}$ C 可以长期保存。

RAPD-PCR 反应程序有很多种, 大致分为单循环和双循环。单循环的退火时间又有长有短, 此外, RAPD-PCR 反应体系中 Taq 酶活性、模板 DNA, dNTP, Mg^{2+} 和引物浓度等, 这些因素共同相互作用, 决定了 RAPD-PCR 反应的结果。Taq 酶浓度过低, 不能获得足够的扩增产物; Taq 酶活性还依赖于 Mg^{2+} 浓度; dNTP 是 PCR 反应的原料, 其浓度的高低直接影响了 PCR 反应的结果; 模板或引物的浓度过高或过低都不利于引物与模板的

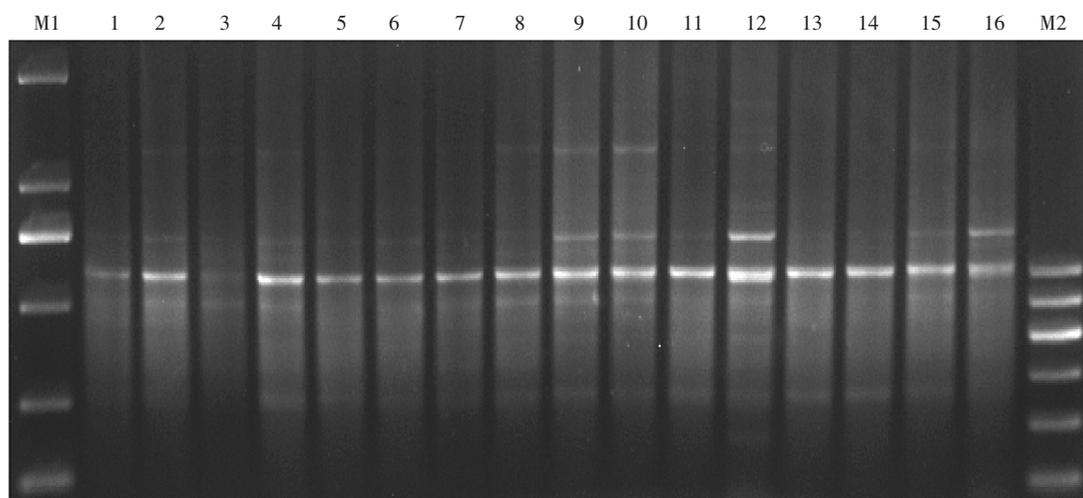


图 4 引物 E2 PCR 反应组分正交试验设计电泳检测结果电泳图

全膜垄作栽培对马铃薯产量及土壤水分利用效率的影响

王晓霞

(甘肃省庄浪县朱店镇农业综合服务中心, 甘肃 庄浪 744699)

摘要: 研究了垄作栽培模式对土壤水分利用效率及马铃薯产量的影响。结果表明, 马铃薯全膜双垄垄播栽培商品薯率高、结薯数多, 折合产量 35 606.1 kg/hm², 较露地垄作增产 7 310.6 kg/hm², 增产率 25.8%。建议在庄浪县大面积推广马铃薯黑色全膜双垄垄播栽培技术。

关键词: 马铃薯; 栽培模式; 产量; 水分利用效率; 庄浪县

中图分类号: S532 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)01-0012-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.004)

庄浪县地处六盘山西麓, 海拔 1 400 ~ 2 857 m, 年均降水量 498 mm, 年均气温 8.1 ℃, 是典型的旱作农业区^[1]。马铃薯是庄浪县的第二大作物, 也是特色优势产业, 近年来, 随着旱作农业的发展, 马铃薯全膜栽培面积不断扩大, 常年播种面积 2 万 hm² 以上。但庄浪县马铃薯的栽培模

式比较单一, 产量低而不稳。为此, 笔者于 2015 年进行了马铃薯不同栽培方式研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试氮肥为尿素(含 N 46%, 中国石油天然气

收稿日期: 2016-08-23

作者简介: 王晓霞(1979—), 女, 甘肃庄浪人, 农艺师, 主要从事农业技术推广工作。联系电话: (0)18993317968。

结合。各因素间存在着复杂的相互关系。本研究对这 5 个因素 4 个浓度水平通过正交实验设计 16 个组合, 并同时应用 3 个反应程序进行 RAPD-PCR 扩增, 扩增结果很直观的反应在琼脂糖凝胶电泳图像中。选用了 3 对引物, 相当于做了 3 次重复, 各重复之间相互印证。最终建立了适合兰州百合 RAPD-PCR 的反应体系和反应程序。这为兰州百合种质资源的鉴定、种间关系的研究提供了科学依据, 也为选育优良的百合品种创造了条件。

参考文献:

- [1] 石有太, 林玉红, 崔文娟. 兰州百合高效配方施肥技术[J]. 甘肃农业科技, 2013(7): 61-62.
- [2] 马君义, 赵小亮, 张继, 等. 兰州百合的研究进展[J]. 塔里木大学学报, 2006(4): 53-56
- [3] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers[J]. Nucl. Acids. Res., 1990 (18): 6531-6535.
- [4] 赵庆芳, 马世荣, 曾小英, 等. 百合栽培品种资源的

RAPD 分析[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2005 (2): 30-33.

- [5] 马虹, 左开井, 唐克轩, 等. 东方百合杂交系部分栽培品种的遗传多样性分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2006(1): 181-185.
- [6] 陈郇俊, 马虹, 左开井, 等. 利用 RAPD 标记分析百合种质的遗传多样性[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2009(5): 475-479.
- [7] 邹喻苹, 葛颂, 王小东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 杨秀梅, 瞿素萍, 王丽花, 等. 百合鳞片 DNA 提取及 RGA-PCR 体系的优化[J]. 西南农业学报, 2011 (1): 266-269.
- [9] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009(9): 14-16.
- [10] 童巧珍, 周日宝, 刘湘丹, 等. 百合鳞叶 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2010 (1): 48-53.

(本文责编: 陈珩)