

文章编号:1000-582X(2007)01-0126-03

杂交狼尾草分子标记分析 DNA 快速提取方法*

王凭青,吴明生,刘 博,唐 芳,李志中

(重庆大学 生物工程学院,重庆 400030)

摘 要:以杂交狼尾草叶片为材料,用 0.05 mol NaOH 溶液在沸水浴中加热处理 10 min,进而用 pH3.0 的 TE 溶液进行中和获得 DNA 提取液,并用该 DNA 提取液为模板进行 RAPD-PCR 和 SSR-PCR 扩增.结果显示:用该方法提取的 DNA 与常规 CTAB 法提取的 DNA 质量相当,可用于以 PCR 技术为基础的 DNA 分子标记分析与 96 孔板技术相结合,可以实现 DNA 高通量提取.

关键词:杂交狼尾草;DNA 提取;分子标记

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

分子标记辅助选择(molecular marker assisted selection, MAS)依据与目标基因紧密连锁的分子标记来对目标性状进行间接选择,它实现了育种从表型选择到基因型选择的根本性转变,已广泛应用与植物新品种的选育上,大大促进了作物育种进程^[1].然而分子育种工作量非常大,往往要对几百个乃至几千个后代进行筛选分析,因此,如何快速、高效、高质量地提取适合于 DNA 分子标记分析的基因组 DNA 就成为该项技术能否推广和应用的关键.到目前为止,虽然已经建立很多植物基因组 DNA 提取方法,但大多需要液氮研磨或多步提取,在制备大批量样品 DNA 时仍受到限制^[2-4].针对这些方法缺陷,笔者在相关研究的基础上,以杂交狼尾草为材料,提出了一种适合分子标记分析的 DNA 快速提取方法.

1 材料和方法

1) 试验材料. 杂交狼尾草新品种由重庆大学生物工程学院提供. 该品种是通过美洲狼尾草与非洲象草进行种间杂交,并在重庆地区选育而成.

2) 试剂. SSR 引物和 RAPD 引物由上海生工合成, PCR 扩增试剂购自华美生物工程公司. 其他试剂均为分析纯.

3) DNA 提取. 取杂交狼尾草叶片 0.1 g 放入 96 深孔板中,用玻璃棒将其捣碎. 在每孔中加入 200 mL 溶液 I (0.05 mol NaOH), 盖上封口膜后将其放在沸

水浴中加热 10 min, 加热结束后每管中加入 200 mL 溶液 II (TE, pH3.0), 随即轻拍深孔板将溶液混匀, 将其放入 4 °C 冰箱中保存或直接用于 PCR 扩增. 同时对对照组采用 CTAB^[5]法进行 DNA 提取.

4) DNA 质量检测. 取 8 μ L DNA 提取液, 加上 2 μ L 上样缓冲液混合, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶(含 1 μ g/mL 溴化乙锭)电泳测定 DNA 的质量.

5) RAPD-PCR. 在 50 μ L PCR 管中依次加入 10 \times PCR Buffer 2 μ L; 25 mmol/MgCl₂ 1.6 μ L; 10 mmol/L dNTPs 0.4 μ L; 5U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L; 25 μ mol/L 10 碱基引物 0.2 μ L; 2 μ L DNA 提取液, 补水至总体积 20 μ L. PCR 反应在 PTC-100 扩增仪上进行. PCR 反应程序为: 95 °C 5 min; 然后 94 °C 50 s, 38 °C 50 s, 72 °C 90 s, 36 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存. PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 1 μ g/mL 溴化乙锭)电泳检测.

6) SSR-PCR. 在 50 μ L PCR 管中依次加入 10 \times PCR Buffer 2 μ L; 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L; 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L; 5U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L; 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L; 2 μ L DNA 提取液, 补水至总体积 20 μ L. PCR 反应在 PTC-100 扩增仪上进行. 扩增程序为: 94 °C 5 min; 然后 94 °C 45 s, 58 °C 35 s, 72 °C 50 s, 36 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存. PCR 扩增产物采用 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染检测.

* 收稿日期:2006-08-11

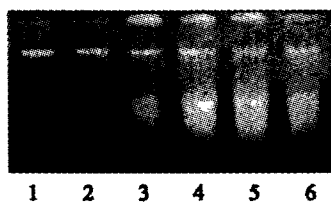
基金项目:重庆市科技攻关项目资助(CSTC2005AC1021)

作者简介:王凭青(1962-),男,教授,博士,主要从事生物医学工程、农业生物工程研究. E-mail:wang_pq@hotmail.com.

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测

如图1所示,用快速法和常规的CTAB法所提取的DNA在点样孔附近都呈现一条亮带,说明DNA提取成功。但是相比较而言,用快速法提取的DNA有弥散现象,而且点样孔出现发亮现象,说明DNA在提取过程中被部分降解,DNA提取液中存在蛋白、多糖类等大分子物质,DNA纯度不是很好。

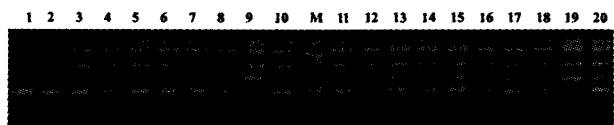


1-2:由CTAB法提取;3-6:由快速法提取

图1 杂交狼尾草DNA电泳图

2.2 PCR 扩增反应

为了验证快速法提取的DNA是否可用于分子标记分析,随机选用2个RAPD引物和一对SSR引物对10个单株提取的DNA分别进行PCR扩增,结果见图2和图3。快速法与CTAB法提取的DNA扩增带型一致,且不同单株之间没有明显差异,可重复性好,说明快速法提取的DNA可用于RAPD和SSR标记反应。



(a)引物OPD-01



(b)引物OPD-09, M: DNA marker

1-10:DNA模板由快速法提取,11-20:由CTAB法提取

图2 RAPD-PCR扩增结果



1-10:DNA模板由快速法提取,

11-20:由CTAB法提取,M:DNA marker

图3 SSR-PCR扩增结果

3 讨论

分子标记辅助选择育种需要对成百上千个分离后代基因型进行分析,从而筛选出与目的性状基因紧密连锁的分子标记,其总的工作量相当大。在PCR扩增程序

以及结果分析方法得到简化后,DNA提取速度就成为限制其有效应用的最关键步骤。近年来,有关植物DNA提取方法的研究很多,提出了很多的简化方法,如水煮法^[6]、叶片直接扩增法^[7]等。但是这些方法在实际操作过程中仍存在问题,主要有提取的DNA质量不高,降解严重;DNA提取的量少,扩增效率低以及DNA保存时间过短等问题。NaOH是一种很好的溶解细胞试剂,常被用来DNA的快速提取,在先前一些研究的基础上^[8-9],对NaOH溶液浓度以及处理的时间进行了优化,提出了一种基于96孔板DNA快速提取方法,该方法简单、快速,不需要特殊仪器,每人每天可以提取几百个样品的DNA,满足了高通量提取DNA的要求。

但是与常规的CTAB方法相比,简化法也存在一些问题,如DNA在NaOH作用下存在部分降解变性。另外,由于DNA没有纯化,DNA提取液中存在大量的杂质,因此一些对DNA质量要求高的试验,如酶切反应、Southern杂交等就需要对DNA提取液进行抽提纯化。除此以外,在使用简化法时,有2点值得注意:溶液II对溶液I起到中和作用,因此溶液II的pH对DNA提取非常重要,如果pH偏离较大会使得DNA提取液偏酸或偏碱,从而造成对PCR扩增的失败;另外在做PCR时,加入的DNA提取液的量不易过多,一般20 μL体系加入2 μL提取液为宜,这可能和提取液中杂质过多影响PCR反应有关。

杂交狼尾草是一种高产、优质牧草,在我国热带和暖温带地区大面积种植,对我国畜牧业的发展起到重要作用。近年来,其优良品种的选育已成为牧草研究的热点^[10-11],但是目前基本上仍采用常规育种技术,这样不仅费时,而且效果也不明显。为此,笔者欲通过分子标记技术和传统育种相结合,筛选与优良性状相关的分子标记辅助育种,从而加速其育种进程,而该研究的成功也为下一步研究打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 沈新莲,张天真.作物分子标记辅助选择育种研究的进展与展望[J].高技术通讯,2003(2):105-110.
- [2] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C, et al. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Acids Res*, 1991, 19 (6):1349.
- [3] 宣朴,徐利远,余桂容,等.植物DNA快速高效提取方法研究[J].西南农业学报,1998,11(2):111-114.
- [4] 黄萱,高丽美,张永彦,等.一种优化的植物总DNA提取方法[J].西北植物学报,2004,24(6):1103-1106.
- [5] DOYLE J, DOYLE JL. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19:11-15.

- [6] THOMSON D, HENRY R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR[J]. *Biotechniques*, 2003, 19:394-400.
- [7] 汪秀峰,杨剑波,向太和,等. 一种叶片直接用作 PCR 扩增的新方法及其应用[J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 67-70.
- [8] KLIMYUN VL, CARROLL BJ, THOMAS CM, et al. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis[J]. *Plant J*, 1993(3):493-494.
- [9] 楼巧君,陈亮,罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(5):749-752.
- [10] 王凭青. 杂交狼尾草新品种的生物学特性与营养价值[J]. *重庆大学学报:自然科学版*, 2001, 24(5):96-97.
- [11] 吴秀峰,陈平,祁桂林,等. 杂交狼尾草新品系 1 号的特性及牧草品质[J]. *广东农业科学*, 2005(5):60-61.

Rapid DNA Extraction method for Molecular Marker Analysis of Pennisetum Hybrid

WANG Ping-qing, WU Ming-sheng, LIU Bo, TANG Fang, LI Zhi-zhong
(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: A rapid method for DNA extraction from Pennisetum hybrid was developed. Using the method, leaves of the Pennisetum hybrid was treated by the 0.05 mol NaOH solution and heated in the boiling water for 10 min, followed by the neutralization with TE solution ($pH=3.0$), and the DNA extraction was used for RAPD-PCR and SSR-PCR analysis. The result indicates. The quality of the DNA by the simplified method is amount to DNA extracted by the CTAB method, and the DNA extracted by this method an meet the requirement of molecular marker analysis based on PCR technology. Combined with the 96-well plate, it can realize the high-throughput DNA extraction.

Key words: Pennisetum; DNA extraction; molecular marker.

(编辑 陈移峰)

(上接第 122 页)

Biological Effect of Catheter-based Ultrasound Irradiating dog's Myocardium

YUAN Qiao-ying¹, HUANG Jing¹, ZHU Zhng-wei², DENG Hui-sheng¹, LI Jing-song¹

(1. Cardiological Department, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of
Medical Science, Chongqing 400016, China;

2. College of Civil Engineering of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: This paper investigates the biological effect of intracardiac ultrasound irradiating myocardium in dogs. A ultrasound catheter was inserted into the dog's left ventricular chamber and the therapeutic ultrasound energy ($1w/cm^2$, one minute) was delivered. The immediate change of myocardial pathobiology and microstructure were observed, meanwhile hemodynamics was measured. Compared with controls, mitochondria generally little swell, capillary endothelium cell also swell after the dogs were irradiated by ultrasound. In general, intracardiac ultrasound irradiating myocardium can enhance the permeability of capillary and myocardial cell membrane, which may be a new, safe and effective method for interventional ultrasound therapy of cardiovascular disease.

Key words: catheter; ultrasound irradiation; biological effect

(编辑 侯湘)