

一步法提取植物 DNA 用于大规模 RAPD 分析

张明永, 孙彩云, 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

One Step Isolation of Plant DNA for Large-scale RAPD Analysis

ZHANG Ming-yong, SUN Cai-yun, LIANG Cheng-ye

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)02-0106-01

RAPD 技术已广泛地用于植物的系统演化、种群多样性、群体遗传学及杂种种籽纯度的鉴定等工作中^[1-3]。本文基于快速节省的原则对碱液法提取植物 DNA 进行一些改进。

1 材料与 方法

DNA 提取方法 取 10~20mg 幼叶, 加 100 μ l 0.5mol/L NaOH(或附加 0.5%~1.5% 巯基乙醇) 研磨后, 取 40 μ l 研磨液加入 200 μ l 100 mmol/L Tris-HCl pH7.6 缓冲液(或附加 0.5% 不溶性聚乙烯吡咯烷酮, PVP) 中, 8 000 \times g 离心 5min, 上清液即可用于 PCR 反应。

PCR 反应体系含 10mmol/L Tris-HCl pH8.8, 50mmol/L KCl, 1.5mol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 μ mol/L dNTP, 1.0 U *Taq* 酶(华美生物工程公司), 10pmol/L 10bp 的附机引物(上海生物工程公司)。PCR 扩增在 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 复性 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2 结果与 分析

用这种方法提取的水稻、玉米、小麦、菜心、花生、香蕉和蕃薯幼叶的 DNA, 直接用于 PCR 反应, 都可扩增出 RAPD 谱带(图 1), 并有较好的重复性。表明这种方法用于以上植物的 DNA 提取, 做 RAPD 分析是可行的。这比传统的 CTAB 等方法减少了很多步骤, 可大大节省时间。水稻、玉米、小麦和菜心直接用 0.5mol/L NaOH 提取放入 100mmol/L Tris-HCl 中后在 4 $^{\circ}$ C 放置 1 月后仍可用于 PCR 反应。但香蕉、蕃薯则发生褐变, 因而在用 0.5mol/L NaOH 提取这两种植物的 DNA 时, NaOH 提取液中附加 0.5% 的巯基乙醇并在起缓冲作用的 Tris-HCl 中附加 0.5% 的不溶性 PVP, 以与引起褐变的多酚类物质起作用, 不溶性 PVP 可在离心中除去, 这样提取的香蕉与蕃薯 DNA 放置后不再发生褐变, 且在 4 $^{\circ}$ C 放置 1 月后也可用于 PCR 反应。

应用本方法的过程中需要注意以下几个问题: (1) 材料应越幼嫩越好, 因本法不含 CTAB 或 SDS 这样的细胞膜裂解剂而是靠研磨方法破碎细胞。(2) NaOH 溶液应每周新配。(3) 如含酚类物质较多的材料就应附加巯基乙醇或 PVP。(4) 此法中失败的通常原因是在提取 DNA 时所用材料太多^[4], 因而为控制取材时的均一性可用打孔器取样。

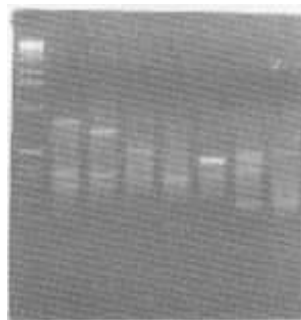


图 1 0.5mol/L NaOH 提取水稻、玉米、小麦、菜心、花生、香蕉和蕃薯幼叶 DNA 的 RAPD 结果

参考文献:

- [1] Yu KF, *et al.* Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. In: Glick BR, *et al.*(eds), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*[M]. New York: CRC Press, 1996, 287~301.
- [2] Rogers SO, *et al.* Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Gelvin SB, *et al.*(eds), *Molecular Biology Manual*[M]. (2ed), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, D1: 1~8.
- [3] Rueda J, *et al.* Plant total DNA extraction. In: Karp A, *et al.*(eds), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*[M]. London: Chapman & Hall, 1998, 10~14.
- [4] Edwards KJ. Miniprep procedures for the isolation of plant DNA. In: Karp A, *et al.*(eds), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*[M]. London: Chapman & Hall, 1998, 22~24.

收稿日期: 1999-05-24, 修回日期: 1999-07-26

基金项目: 广东省自然科学基金资助

作者简介: 张明永(1968-), 男, 汉族, 助理研究员, 博士, 专业方向: 遗传学。E-mail: zhangmy@scib.ac.cn