

玉米种子基因组 DNA 提取及 RAPD 分析^{*}

徐其放¹, 朱苏文², 常 弘¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要: 采用了两种不同 DNA 提取方法(常规法及改进法)从玉米 *Zea mays* 种子的胚和胚乳中分别提取基因组。结果表明, 在两种不同的提取方法中, 改进法比常规法有提取的 DNA 纯度高、RNA 含量少、DNA 降解少等优点。无论从胚和胚乳中提取的 DNA 都可以满足 RAPD 的要求。为玉米 RAPD, 分子标记, 品质鉴定等研究提供可行的依据。

关键词: 玉米; 胚; 胚乳; 基因组; RAPD

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0078-04

RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) 技术是 1990 年由 William 和 Welsh 等发展的一种分子生物学技术, 在此前国内外对玉米 *Zea mays* 自交系和杂交系的室内鉴定工作主要是利用蛋白质及同工酶电泳方法, 而 RAPD 技术测定是特定的 DNA 片段, 对于一个特定的基因型来说, 这些扩增的片段是唯一的, 所以用 RAPD 技术来鉴定玉米自交系及杂交种的纯度及真伪有很强的优势, 因此它被迅速用于品质鉴定^[1]、分子标记、转基因分析及克隆等生物技术领域里。本实验就是探讨从玉米种子中提取基因组 DNA 及用于 RAPD 分析, 而不同于一般方法的从植株中提取基因组 DNA。因为从种子中提取 DNA 快速, 不用等待其萌发, 甚至长出子叶, 这样就可以随时对其进行 DNA 提取作相关的研究。而且实验又从种子胚乳中提取基因组 DNA, 不破坏种子胚, 直接切取种子胚乳部分, 这样没有受到损伤的种子胚仍可以发芽, 长出植株。

1 材料与方法

1.1 材 料

以玉米种子 (*L₁₇₃*) 用做实验材料, 分别取种子的胚及胚乳两个不同的部分进行。

1.2 实验仪器及试剂

DNA 提取液 (100 mmol/L Tris HCl, 100 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, $\rho = 1.5\%$ SDS), 氯仿, 无水乙醇, $\varphi = 70\%$ 乙醇, TE (含 RNA 酶), PCR 反应体系 (buffer, Taq 酶, dNTPs, MgCl₂, primers, DNA 模板, 无菌水), 移液枪 (20, 200, 1 000

μ L), 电泳仪, PCR 扩增仪 (HEMA 4800), 离心机, 冰箱, 水浴锅。

1.3 基因组提取

1.3.1 DNA 提取液的配置 参考文献[2]。

1.3.2 常规法提取基因组^[3] 取下玉米种子的胚 (或胚乳), 放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 300 μ L 的 DNA 提取液后研磨, 立即放入 65 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 取出每管加入 100 μ L 5 mol/L KAc, 放于冰箱 (-20 $^{\circ}$ C) 10 min, 再加入 100 μ L 氯仿, 混匀后, 于 8 000 r/min 离心 10 min, 吸上清液加到盛有 500 μ L 的冷无水乙醇的 1.5 mL 离心管中, 待 DNA 静止沉淀后, 8000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液, 用 $\varphi = 70\%$ 无水乙醇洗涤 2~3 次, 室温干燥后, 每管加入 100 μ L TE 溶解备用。

1.3.3 改进法提取基因组^[3] 取下玉米的胚 (或胚乳), 放入 1.5 mL 的离心管中, 加 100 μ L 的氯仿后研磨, 再加 300 μ L 的 DNA 提取液, 混匀后于 10 000 r/min 离心 2 min, 吸上清液, 加到装有 500 μ L 的无水乙醇的离心管中, 轻轻倒置 3 次, 再于 12 000 r/min 离心 1 min, 倒掉上清液, 用 $\varphi = 70\%$ 乙醇洗涤 2~3 次后加入 100 μ L 的 TE 溶解备用。

1.3.4 电泳预检测 取提取的 DNA 样品, 在 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶上电泳 (8 μ L DNA 样品 + 2 μ L EB + 2 μ L 溴酚兰)。经凝胶成像系统检测, 其符合 PCR 的要求, 留样品做 RAPD 分析。

1.4 RAPD 分析

PCR 反应体系为 50 μ L^[4] (10 倍的缓冲液 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 取 4 μ L, $A_{30} = 0.5$ 的 10 bp 引物 10

^{*} 收稿日期: 2002-10-23

作者简介: 徐其放 (1978 年生) 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 常弘; E-mail: ls106@zsu.edu.cn

μL, DNA Taq 聚合酶 2~3 U (0.6 μL), 10 mmol/L 的 dNTPs 1 μL, DNA 模板 5 μL (根据其预电泳条带的亮度、宽度及一般 PCR 的用量要求, 将提取的 DNA 样品稀释 100 倍以后再取 5 μL), 不足的用无菌水定量到 50 μL 即可, 在 HEMA 4800 PCR 基因扩增仪上进行 PCR 反应^[5] (94 °C 预变性 5 min, 共 40 个循环, 每个循环包括: 94 °C 变性 30 s, 36 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 最后一步 72 °C 终延伸 4 min)。

1.5 扩增后电泳检测

将扩增的产物在 w=1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 (电压 40 V, 电泳时间为 35 min 左右), 拍照, 得到不同的条带。

2 结果与分析

2.1 基因组提取

采用直接从玉米种子中提取 DNA, 无须用常规的液氮处理, 加入的 KAC 可以除去多糖和色素等一些干扰 RAPD 效果的物质。

2.1.1 不同方法对玉米种子基因组 DNA 的提取
本实验采用了两种方法提取胚中的 DNA。其结果见图 1。

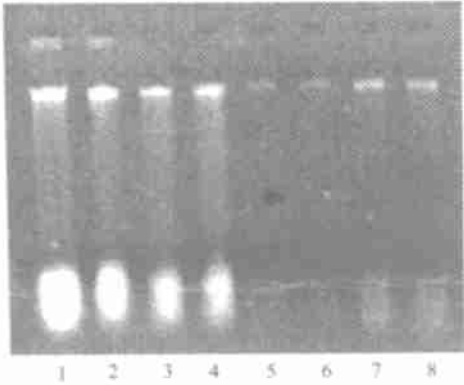


图 1 两种方法提取种子胚 DNA

Fig 1 DNA from maize seeds' embryo by two different methods

1—4: 常规法提取; 5—8: 改进法提取

从图 1 可以看出, 改进法提取的 RNA 含量少, DNA 降解少, 快速, 成本低, 故对于一般要求的 DNA 提取可采用该方法。其中图 1 是从种子胚 (浸泡 1 h) 中提取的 DNA, 常规法采用了 65 °C 处理了 30 min, 所提取的 DNA 仍有较多的降解, 因为操作过程中有一短时间的间隙, DNA 酶对 DNA 进行了降解, 而改进法中提取的 DNA 降解很少, 而且 RNA 的量也大大降低了, 因为改进法先用氯仿使蛋白质 (DNA 酶) 变性, 然后再加入 DNA 提

取液, 并且提取液中的 EDTA 浓度大, 可以螯合 Ca^{2+}/Mg^{2+} , 值得一提的是, 改进法可以大大节省提取时间 (一般 10 min 即可)。

2.1.2 玉米种子的不同部位提取的基因组 DNA
分别从种子胚及胚乳中提取 DNA, 结果见图 2。

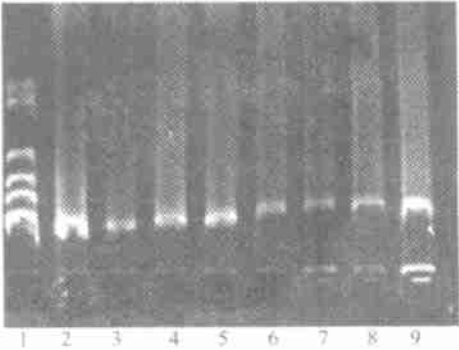


图 2 不同部位提取的样品的比较

Fig 2 Comparison between the samples from different parts

1: DNA marker; 2—5: 从种子胚中提取的 DNA;
6—9: 从种子胚乳中提取的 DNA

理论上说, 8 个样品的条带应该一致的, 但因实验技术的原因, 而出现的轻微偏差, 其中 2~5 是从胚中提取 DNA, 6~9 是从胚乳中提取的 DNA, 他们在 DNA 得率上, 质量上没有太大的差别, 故在生物学研究中, 可以以胚乳中提取的 DNA 代替从胚中提取 DNA。

2.2 RAPD 分析

2.2.1 不同方法提取的基因组 DNA 对 RAPD 影响的分析
对 RAPD 分析的影响因素很多的, 如 DNA 的纯度、完整性、浓度、引物的种类、 $MgCl_2$ 、Taq 酶、dNTPs 的浓度、PCR 反应中的 3 个阶段的温度及时间设定等, 都会影响 RAPD 的分析结果。采用不同的方法提取的 DNA 应用于 RAPD 实验, 其结果见图 3。

图 3 是用两种不同方法提取的 DNA 在同一 PCR 扩增条件 (引物 S_{89}) 下扩增的结果。改进法和常规法提取的 DNA 在 RAPD 扩增后在条带, 亮度等方面差异不显著。故可以以改进法提取的 DNA 代替常规法提取 DNA 做 RAPD 实验。

2.2.2 不同种子部位提取的基因组 DNA 扩增的结果
采用在同一 PCR 反应体系 (引物 S_{96}) 下, 用种子胚及胚乳中提取 DNA 进行 PCR 扩增实验, 结果见图 4。

图 4 结果显示, 在扩增条带上, 亮度上也没有明显差异。故可以胚乳中提取的 DNA 代替从胚中提取的 DNA 作 RAPD 分析。在同一品种, 同一个 PCR 反应体系下, 无论是胚还是胚乳提取 DNA 都

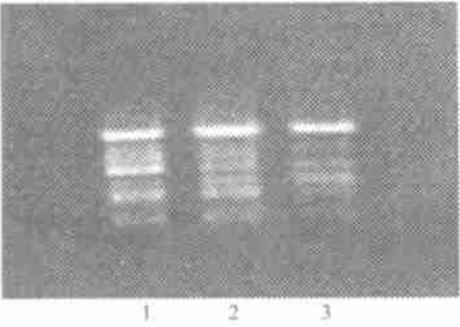


图 3 两种不同方法提取的 DNA 经 RAPD 扩增结果

Fig. 3 RAPD results of DNA extracted by two different methods

1—2: 常规法提取的 DNA; 3: 改进法提取的 DNA

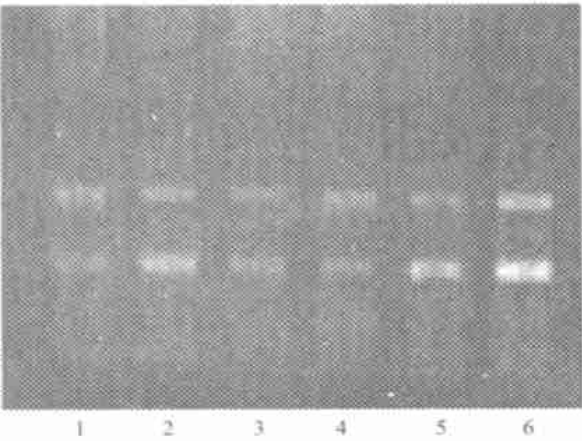


图 4 不同种子部位的 DNA 经 RAPD 扩增的结果

Fig. 4 RAPD results of DNA for different seed parts

1—2: 种子胚; 3—4: 种子胚乳;
5—6: 1—2 样品的重复

可以得到基本相同的扩增结果。这也是本实验所探讨的目的。

3 讨论

3.1 不同方法提取的 DNA 差异及对 RAPD 实验的影响

提取基因组 DNA 时, 常规法采用了 65 °C 处理, 加入 KAC 去除多糖等, 而改进法是加氯仿提前使 DNA 酶变性。所以 DNA 降解少, 完整性好, 但是氯仿的残留易在 PCR 反应时影响 Taq 酶活性。

3.2 不同种子部位提取的基因组 DNA 差异及对 RAPD 实验的影响

从图 4 可知, 胚和胚乳中提取的 DNA 经 RAPD 分析没有显著差异, 只是有部分的拖带严重一些。可能因为是在 PCR 时, DNA 模板浓度太大的原因, 也可能是在提取中研磨时, 操作剧烈, 导致其降解。

3.3 其他因素对 RAPD 的影响

用不同的方法, 提取的 DNA 的浓度、质量、纯度、完整性都有差异, 但是因 RAPD 技术仅要求提取少量的基因组 DNA 即可, 所以用上述的方法提取的基因组 DNA 一般可以做 RAPD 扩增, 但是具体在 RAPD 实验中, 影响因素很多。

3.3.1 MgCl₂ 浓度可影响 RAPD 谱带相对强弱
Mg²⁺ 是 PCR 反应中一个重要因素。Mg²⁺ 浓度不但会影响酶的活性及合成的忠实性, 而且还会影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成等。本实验 Mg²⁺ 适宜的浓度为 2.0 mmol/L。

3.3.2 dNTPs 是作为 PCR 反应的原料 其量的多少直接影响产物的产量、特异性及合成的忠实性如果其浓度过高, 扩增产物增多, 还容易与 Mg²⁺ 结合而降低游离的 Mg²⁺ 浓度, 从而影响 DNA Taq 聚合酶的活性。而且它的浓度会导致某些 RAPD 谱带弯曲, 甚至难以检测到。

3.3.3 DNA 模板浓度、纯度 当 DNA 浓度太低, 扩增效率低, 且 DNA 与引物不能配对, 当 DNA 过多时, 过早消耗引物, 使退火发生在 PCR 产物 3'-OH 端和模板 DNA 间, 或 PCR 产物间, 这可通过增加引物用量或减少循环次数而控制。其中, DNA 模板提取中, 可因某些试剂成分的残留 (如氯仿, 酚等) 影响扩增效果, 但是其中的蛋白质、多糖、RNA 影响很小。

3.3.4 PCR 每个阶段的温度设置及时间设置 温度 (预变性温度, 变性温度, 退火温度, 延伸温度, 保温温度) 即要考虑到 DNA 模板之间和 DNA 与引物之间能够充分解链, 但要控制温度不能太高, 否则 DNA 酶也可能变性而失去部分活性,

3.3.5 非基因组 DNA 假带的排除 RAPD 容易产生非基因组 DNA 的假带, 可通过设置重复和无模板的 DNA 对照而排除。通过以上对 DNA 提取方法可知; 改进法提取的种子基因组 DNA 在质量、完整性上都和常规方法提取的 DNA 没有显著的差别, 而且改进法提取速度比常规法大大提高了, 也降低了实验成本, 所以建议用改进的方法来提取种子基因组 DNA。通过 RAPD 实验我们可以知道: 从种子胚及胚乳中提取的基因组 DNA, 他们进行 PCR 扩增以后在带数上、亮度上也没有什么显著的差别, 所以做玉米种子的品种鉴定、分子标记等实验可以用从胚乳中提取的 DNA 代替胚中提取的 DNA, 因为如果那样做的话, 种子的胚可以继续去发芽, 以达到快速、简单、可靠的研究效果。

参考文献:

[1] McDONALD M B, ELLIOT L J, SWENEY P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies[J]. Seed Sci & Tech, 1995, 7(2): 171—176.

[2] 郭景伦, 赵久然. 利用 RAPD 技术鉴定玉米[J]. 玉米科学, 1998, 6(4): 6—7.

[3] 郭景伦. 玉米种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学, 1997, 15(2): 1—2.

[4] 孙志良, 张超良. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系中的应用[J]. 遗传学报, 1999, 26(1): 709—717.

[5] 傅骏骅, 李连成. 玉米 RAPD 程序化的研究和初步分析[J]. 作物学报, 1997, 23(1): 56—61.

Extraction of Maize Seed DNA and RAPD Analysis

XU Qi fang¹, ZHU Su wen², CHANG Hong¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The genome of *Zea mays* seeds was respectively extracted from embryo or endosperm by two different kinds of methods (normal method and improving method). The results showed that the genome made of improving method had purer DNA, less RNA, bigger DNA fragments than that of normal method. The genome from embryo or endosperm can meet for RAPD (Random Amplified polymorphic DNA). This experiment provides the RAPD of maize, molecular marker, quality identification with the useful pathway.

Key words: maize; embryo; endosperm; genome; RAPD

(上接第 62 页)

Different Construction for Human c Mpl Ligand Expressed Plasmid and Their Optimizing Strategy for Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Qing, GE Yi chen, PAN Rui min, XU Pei lin

(School of Life Sceinces //The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Thrombopoietin (TPO), the major cytokine affecting the proliferation and differentiation of megakaryocytes through its interaction with the c Mpl receptors, is believed to be the major physiological regulator of circulating platelet levels. c Mpl was used as the bait protein to screen human liver cDNA library using a yeast two hybrid system. A clone, *xp1* gene, was obtained. The constructions of expression plasmid pET 28(b) -*xp1*, pBV220-*xp1* and pBAD *g IIIA* -*xp1* were selected by using different promote controlling *xp1* gene expression, then by inducing with IPTG, temperature, arabinose. The biological activity of XP1 protein was measured by culturing colony forming units of murine megakaryocyte (CFU MK). Comparison of these expressions indicates that the solution and the stability of pET 28(b) -*xp1* expression were higher than the others, The solution and the stability of pBV 220 -*xp1* expression were enhanced after induced a little time in the low temperature, but its expression capacity was weaker than that of pET 28(b) -*xp1*, and its activity was decreased. The expression proteins of pBAD *g IIIA* -*xp1* were not secreted to the periplasmic space, which existed in inclusion body and presented no activity.

Key words: c mpl; XP1; expression; solution; stability; activity