

# 基于 PCR 技术快速制备 DNA Marker 的研究

吕金浮, 乔 宁\*, 刘永光, 薛其勤, 裴华丽, 刘晓明

(潍坊科技学院 蔬菜花卉研究所, 山东 寿光 262700)

**摘要:** DNA Marker 是一组分子量大小已知的 DNA 片段混合物, 用于指示核酸电泳中未知样品的分子量大小。基于 PCR 方法, 设计了不同的引物对, 以质粒 p32a-CP 为模板, 分别扩增出大小为 2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp 的 DNA 片段, 初次制备出 DNA Marker, 并参照商品化的 DM2000 按一定的比例混合各片段进行优化。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 所制备的 DNA Marker (命名为 DL2000) 质量稳定、条带清晰、分布均匀, 在分子生物学试验中可用于标记 DNA 大小。

**关键词:** DNA 标准; PCR 扩增; 核酸电泳

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)08-0149-04

## Study on Rapid Preparation of DNA Marker by PCR Technology

LÜ Jin-fu, QIAO Ning\*, LIU Yong-guang, XUE Qi-qin, PEI Hua-li, LIU Xiao-ming

(Institute of Vegetables and Flowers, Weifang University of Science and Technology, Shouguang 262700, China)

**Abstract:** DNA Marker is a mixture of known molecular weight DNA fragments, which indicates the molecular weight of the unknown sample. Different DNA fragments of 2.0 kb, 1.0 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp were amplified with designed different primers and plasmid p32a-CP as template based on PCR technology. The PCR products were mixed by a certain percentage and used as DNA Marker, which was optimized referring to DM2000. After detected with 1% agarose gel electrophoresis, the DNA Marker (named DL2000) had stable quality, clear bands, and can be used as DNA Marker in molecular biological experiments.

**Key words:** DNA standard; PCR amplification; nucleic acid electrophoresis

自 20 世纪中叶以来, 近代生物学与基因工程技术相继诞生, 分子生物学各种相关技术迅速发展。新的试验技术和方法不断出现, 并且在生命科学、现代医学、生物化学等相关学科得到了广泛应用。众所周知, 核酸技术是分子生物学技术的核心, 只要试验中涉及到核酸的检测及鉴定都需要通过核酸电泳技术的辅助来实现。而在核酸电泳试验过程中, DNA 分子量标准 (DNA Marker) 是必备试剂之一<sup>[1-2]</sup>。

由于 DNA Marker 应用的普遍性和必要性, 为了节约试验经费, 许多实验室都尝试自制常用的简单的分子量标准。根据 DNA 分子量标准制备所涉

及的技术, 其制备方法可分为 PCR 扩增和限制性内切酶酶切 2 种<sup>[3-5]</sup>。由于 PCR 扩增技术具有强大的扩增 DNA 片段能力, 利用该技术制作 DNA 分子量标准不存在技术问题, 模板 DNA、反应 buffer 等均可自制<sup>[6-7]</sup>, 所需成本主要是 Taq 聚合酶、引物、dNTP 及其他试剂的购置费用, 材料价格相对比较低廉, 且利用 PCR 技术制备 DNA Marker 方便快捷, 目前商品化的 Marker 多采用该法制备; 而限制性内切酶酶切得到的 DNA 片段大小不均匀, 性能不稳定。故本研究采用 PCR 扩增技术快速制备 DNA Marker, 其中以最为常用的 100~2 000 bp 片段为主。

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目 (J07WG06, J09LC59, J10LC73); 大宗蔬菜产业技术体系项目 (CARS-25); 潍坊科技学院校级项目 (W13K029, W13K033)

作者简介: 吕金浮 (1978-), 女, 山东金乡人, 讲师, 主要从事蔬菜育种及分子生物学研究。E-mail: jinfu\_2008@163.com

\* 通讯作者: 乔 宁 (1978-), 男, 山东泰安人, 讲师, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: qning78@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及仪器

试验在潍坊科技学院蔬菜花卉研究所植物生理生化实验室完成,原核表达载体 p32a-CP 由本实验室保存<sup>[8]</sup>。

柱式质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自北京科百奥生物技术有限公司,2×Taq Master Mix 购自北京华大基因科技有限公司,DNA Marker DM2000 购自北京康为世纪生物科技有限公司,PCR 扩增仪购自杭州朗基科学仪器有限公司(型号:MG96G)。引物均由北京华大基因科技有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 各引物序列

名称	序列(5'→3')	T <sub>m</sub> /℃
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	49.8
T7-R1	GCTTTATCGCTCATATGTA	52.0
M-0	CGATCTCGATCCCGCGAAATT	57.8
M-R2.5	CCGTCAGCGATTTTCATCCAG	59.5
M-R5	TTAGAACCGCGTGGCACCAGA	59.7
M-R7.5	GTCGCTTGTGTGTCCTTGGA	57.8
M-R1k	GGCATCCATCCAGACTTTACC	57.8
M-R2k	CCGTTAACCAATAGGCCGAAAT	56.2

### 1.2 重组质粒 p32a-CP 的小量提取

将含有重组质粒 p32a-CP 的大肠杆菌重新活化,并按照柱式质粒提取试剂盒的说明书提取质粒。

### 1.3 PCR 扩增

本试验设计了 2 种程序,分别为 Marker1(用于扩增 100 bp)、Marker2(用于扩增 250~2 000 bp)。Marker1 反应体系:2×Taq Master Mix 12.5 μL、T7 (10 μmol/L) 1.0 μL、T7-R1(10 μmol/L)1.0 μL、模板 DNA 1.0 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 10 min;94℃高温变性 30 s,48℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共循环 35 次;72℃终延伸 10 min;扩增完成后 4℃保存。

Marker2 反应体系:2×Taq Master Mix 12.5 μL、M-0(10 μmol/L) 1.0 μL、M-R2.5(10 μmol/L)1.0 μL、模板 DNA 1.0 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 10 min;94℃高温变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共循环 35 次;72℃终延伸 10 min;扩增完成后 4℃保存。引物 M-0 与引物 M-R5、M-R7.5、M-R1k、M-R2k 的反应体系和反应条件均同上。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 DNA Marker 的制备

1.4.1 DNA Marker 的初次制备 将上述 PCR 产物 100~2 000 bp 各取 5 μL 充分混合,其混合物标记为 H1。

1.4.2 100 bp 片段的浓缩纯化 将扩增得到的 100 bp 片段按照 PCR 产物纯化试剂盒的说明书进行浓缩纯化。

1.4.3 DNA Marker 的优化 利用浓缩后的 100 bp 片段重新设计 DNA Marker 的混合体系(表 2)。并对上述优化产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将最终产物命名为 DL2000。

表 2 DNA Marker 的混合体系

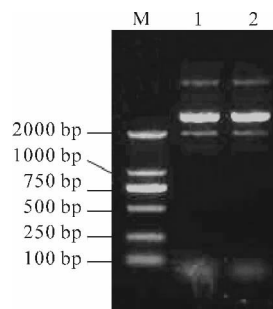
编号	加入体积/μL						
	100 bp	250 bp	500 bp	750 bp	1 kb	2 kb	H <sub>2</sub> O
H2	7	4	5	5	4	4	1
H3	8	3	5	5	3	3	3
H4	5	4	5	5	4	4	3

1.4.4 反应体系的放大 为了使用方便,将 PCR 的反应体系由 25 μL 放大到 50 μL,对各片段进行大量制备。本着节约原则适当减少 2×Taq Master Mix 加入量,理论上 50 μL 的反应体系应加入 25 μL 2×Taq Master Mix,但实际操作中将其加入量分别减为 20 μL、16 μL,并以理论加入量作对比用来扩增各 DNA 片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 p32a-CP 的提取结果

本试验 PCR 所用的引物模板为本实验室保存的原核表达载体 p32a-CP,其质粒提取结果如图 1 所示。



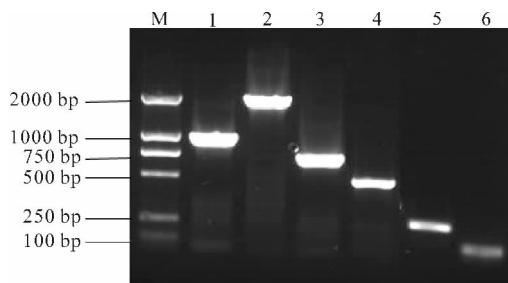
M:DM2000 DNA Marker; 1-2:重组质粒 p32a-CP

图 1 重组质粒 p32a-CP 的琼脂糖凝胶电泳结果

### 2.2 PCR 产物的鉴定

根据质粒 p32a-CP 基因序列设计并合成引物,以质粒为模板进行 PCR 扩增。由于扩增 100 bp 的退火

温度(48 ℃)与扩增其他片段的退火温度(52 ℃)不同,故需设计 2 种 PCR 反应程序,而且利用 Marker2 程序能同时扩增 250~2 000 bp 的 DNA 片段,这一设计节省了大量时间,方便了试验操作。由图 2 可以看出,扩增的 DNA 条带清晰明亮,分子量大小正确,达到预期效果,可以用作下一步 DNA Marker 的制备。

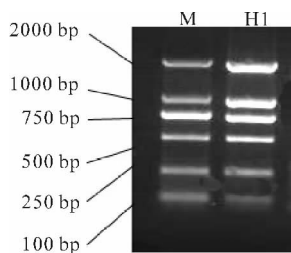


M:DM2000 DNA Marker; 1—6 分别为扩增的 1 000、2 000、750、500、250、100 bp 片段

图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

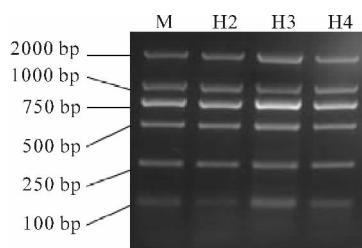
### 2.3 DNA Marker 的制备及检测

从图 3 可以看出,实验室自制的 DNA Marker 除了 100 bp 的条带,其他条带与商品化的 DM2000 相比更加清楚明亮。于是,对扩增得到的 100 bp 片段进行浓缩纯化,并参照上述的 DM2000 设计了优化试验,调整各 DNA 片段的混合比例,其电泳结果如图 4 所示,H3 的电泳效果与 DM2000 的相应片段最接近,完全可以用作其他分子试验的 DNA 分子量标准参照物(DL2000)。



M:DM2000 DNA Marker; H1:各 PCR 产物等体积混合的 Marker

图 3 初次制备的 DNA Marker 电泳结果

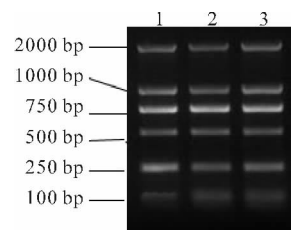


M:DM2000 DNA Marker; H2—H4:各 PCR 产物加入比例优化后的 Marker

图 4 优化后的 DNA Marker 电泳结果

### 2.4 DNA Marker 反应体系的放大结果

通过适当减少  $2\times$  Taq Master Mix 的加入量,并放大各 DNA 片段的 PCR 反应体系到 50  $\mu$ L,以实现 DNA Marker 的大量制备。结果显示, $2\times$  Taq Master Mix 的减少和反应体系的放大并不影响各 DNA 片段的扩增质量,有助于 DNA Marker 的大量制备(图 5)。



1—3: $2\times$  Taq Master Mix 的加入量分别为 25、20、16  $\mu$ L

图 5 DNA Marker(DL2000)反应体系的放大结果

## 3 讨论

随着科学技术尤其是分子生物学的快速发展,基因工程技术在现代生物学中所占比重越来越大。核酸电泳技术也变得越来越重要,而 DNA Marker 是核酸电泳技术中不可或缺的部分<sup>[9]</sup>。

实验室自制 DNA Marker 不但可以为实验室节约一定的试验经费,而且关键的是实验室掌握了这种技术就可以随时自制任何一种 DNA Marker,甚至可以制备市场上没有的而试验中又需要的 DNA Marker。这样就在一定程度上解决了某些 DNA 标准参照物不能准确指示样品 DNA 分子量大小的问题<sup>[2]</sup>。

因为 250~2 000 bp 片段扩增引物的退火温度相差不大,所以本研究尝试把这些片段扩增的  $T_m$  值都设在 52 ℃,以缩减繁琐的试验步骤。而最终试验证明这一设计是十分成功的。

自制 DNA Marker 虽然简单,但是如果要做成商品,在引物设计、试剂购置以及成品优化方面还有很大的提升空间。这也是实验室以后自制 DNA Marker 需要努力的方向。

#### 参考文献:

- [1] 韦柳静,韦宇拓,黄小凤,等.一种新型可用于 DNA 分子量标准的质粒构建[J].生物技术,2004,14(5):33-35.
- [2] 朱春江,魏清跃,欧维琳,等.用 DNA 阳性及阴性标本制备专用 DNA marker 的实验研究[J].华夏医学,2005,18(6):937-938.
- [3] 张守峰,扈荣良,赵君.1 个改进的 DNA 分子量标准物 pT13/Hind III Marker[J].中国兽医学报,2000,20(6):611-612.

(下转第 156 页)

- [10] 马玉平,王石立,张黎. 针对华北小麦越冬的 WO-FOST 模型改进[J]. 中国农业气象,2005,26(3):145-149.
- [11] 邬定荣,刘建栋,刘玲,等. 华北地区冬小麦生产潜力数值模拟[J]. 干旱地区农业研究,2012,30(5):7-14.
- [12] 陈振林,张建平,王春乙,等. 应用 WOFOST 模型模拟低温与干旱对玉米产量的综合影响[J]. 中国农业气象,2007,28(4):440-442.
- [13] 谢文霞,严力蛟,王光火. 运用 WOFOST 模型对浙江水稻潜在生长过程的模拟与验证[J]. 中国水稻科学,2006,20(3):319-323.
- [14] 中国气象科学数据共享服务网. 中国地面气候资料日值数据集[DB/OL]. (2004-08-17) [2014-04-12] <http://cdc.cma.gov.cn/home.do>.
- [15] 王文佳,冯浩. 基于 CROPWAT-DSSAT 关中地区冬小麦需水规律及灌溉制度研究[J]. 中国生态农业学报,2012,20(6):795-802.
- [16] 河南省土壤普查办公室. 河南土壤[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [17] 杨春收. 磷肥及施用位置对夏玉米生长发育及产量的影响[D]. 郑州:河南农业大学,2009.
- [18] 莫志鸿,冯利平,邹海平,等. 水稻模型 ORYZA2000 在湖南双季稻区的验证与适应性评价[J]. 生态学报,2011,31(16):4628-4637.
- [19] van Ittersum M K, Leffelaar P A, van Keulen H, *et al.* On approaches and applications of the Wageningen crop models [J]. European Journal of Agronomy, 2003,18(3/4):201-234.
- [20] Kassie B T, Van Ittersum M K, Hengsdijk H, *et al.* Climate-induced yield variability and yield gaps of maize (*Zea mays* L.) in the Central Rift Valley of Ethiopia [J]. Field Crops Research,2014,160(1):41-53.
- [21] Ghanbari A, Taei-Semiromi J. New approach for regional crop yield gap analysis in the Borujen Plain, Iran [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11 (23):6367-6368.

(上接第 151 页)

- [4] Hyman D H. Method of making DNA ladders; US, 5939293[P]. 1999-08-17.
- [5] Hartley J L. Nucleic acid marker ladder for estimating mass;US,7132520[P]. 2006-11-07.
- [6] Hu A L W, Hartley J L, Jordan H J. Nucleic acid ladders;US,6924098[P]. 2005-08-02.
- [7] 刘慧娟,冯志国,何光源. 利用 PCR 技术快速制备 DNA 分子量标准物[J]. 生物技术,2008,18(2):38-39.
- [8] 乔宁,李美芹,郭宝太,等. 山东寿光地区番茄黄化曲叶病毒外壳蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中国蔬菜,2012(6):35-40.
- [9] 张守峰,邱薇,扈荣良. 1 个新的 DNA 分子量标准物[J]. 中国兽医学报,2000,20(3):227-229.