

文章编号: 1000-5692(2006)01-0052-04

柳杉 CAPS 遗传标记反应体系的优化

杨萍¹, 郑前剑¹, 赵明水², 汤定钦¹

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300;

2. 浙江省天目山国家级自然保护区 管理局, 浙江 临安 311300)

摘要: 建立柳杉 *Cryptomeria fortunei* CAPS 反应优化体系 是进行柳杉遗传多样性研究的前提。通过对影响柳杉 CAPS 遗传标记反应体系结果主要因子的研究, 确定了最佳的柳杉 CAPS 扩增反应体系: 含有 2.0 μL 10× Buffer, 0.08 mmol·L⁻¹ dNTPs, 200 mg·L⁻¹ 铸型 DNA, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.1 μmol·L⁻¹ 引物和 41.675 nkat *Taq* DNA 聚合酶的 20 μL 反应液。扩增程序是 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 80 s, 共 35 个循环, 然后在 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物 10.0 μL, 加入 2.0 μL 10× Buffer, 83.350 nkat 内切酶, 7.5 μL 双蒸水构成 20 μL 酶切反应体系。图 5 表 1 参 8

关键词: 植物学; 柳杉; 切割的扩增产物多态性序列(CAPS); DNA 标记; 反应体系; 优化
中图分类号: S718.43; Q523 **文献标识码:** A

柳杉 *Cryptomeria fortunei* 为我国特有种, 常绿针叶乔木, 是重要的用材和绿化树种, 主要分布于浙江天目山、龙泉, 福建南屏、沙县, 江西庐山及云南昆明等地。由于西天目山的生境条件适合柳杉的生长, 成为此地个体最大的建群树种, 为西天目山最具特色的森林植被之一。以老殿附近为中心, 分布有较大面积, 天然林与人工林并存。西天目山也由此以“大树华盖闻九州”而驰名中外^[1]。近年来, 西天目山柳杉林呈现出逐渐衰退的迹象。加强柳杉林的遗传多样性水平是解决西天目山柳杉林退化的根本措施之一, 同时柳杉林的个体经历了几百年甚至千年的环境胁迫和选择, 本身就是一个珍惜的种质资源基因库。把握该基因库的遗传多样性和遗传结构, 对其育种利用也具有现实意义。CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence, 切割的扩增产物多态性序列)^[2-3] 是将特异引物 PCR 与限制性酶切相结合而产生的一种 DNA 标记技术, 具有操作简便快捷, 自动化程度高, 所需 DNA 量极少, 结果稳定可靠, 且为共显性分子标记, 含有的遗传信息大等优点^[2-5], 已成功应用于遗传多样性和遗传结构等研究^[6]。实验通过对影响柳杉 CAPS 遗传标记反应体系主要因子的研究, 确定了柳杉 CAPS 遗传标记反应体系中最佳的 PCR 扩增反应体系和酶切反应体系, 为今后进一步研究柳杉遗传多样性和遗传结构提供了技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料

本实验使用的材料采自西天目山柳杉林, 采取的针叶装入塑料袋, 置于低温保鲜箱, 带回实验室

收稿日期: 2004-11-16; 修回日期: 2005-09-29

作者简介: 杨萍, 硕士, 从事林木生物技术研究。E-mail: yangping@zjfc.edu.cn. 通讯作者: 汤定钦, 教授, 博士, 从事林木生物技术研究。E-mail: tang@zjfc.edu.cn

置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。所用试剂除注明外,均购自上海生工生物工程公司。

1.2 DNA 提取及检测

DNA 提取采用改良 CTAB 法^[7,8],取约 0.3 g 左右的针片,加液氮中迅速研磨成粉末,转入预热的 600 μL CTAB 提取液[20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTAB, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris (pH8.0), 1.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl] 中,加入 30 μL 的巯基乙醇,于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min。加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀后离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1 万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。取上清液,加入等体积的异丙醇,轻轻混匀,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冰冻 2 h。离心(条件同上),弃上清液留沉淀物使其自然风干;用 600 μL 双蒸水充分溶解,离心(条件同上),将上清液移入干净的 1.5 mL 离心管中。加入 300 μL 饱和酚和 300 μL 氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 h,离心(条件同上)取上清液;在上清液中再加氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次,离心(条件同上),取上清液;加入 1/10 体积的 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻 2 h;离心(条件同上),弃上清液,将沉淀物用乙醇洗涤后,自然晾干。加入 100 μL TE 溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

用紫外分光光度计(DU800)和凝胶自动成像系统(VDS)检测 DNA, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8,电泳条带清晰完整的 DNA 用于实验分析。

1.3 优化实验设计

PCR 反应体系的优化:从影响 PCR 扩增的因素如 Mg^{2+} , dNTP, 引物 [CD1216 (5' GCCAAGACCCCTGAGCAAATC 3', 5' CCTGIGCGAAAGCCAAATCAA 3')], 铸型 DNA 的质量浓度梯度设计实验(表 1)。PCR 扩增在 PE9700 进行,扩增的反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后是 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s, 共 35 个循环,然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束扩增^[9]。取 10 μL 扩增产物经 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

酶切反应的优化:设计内切酶的浓度梯度(表 1)。PCR 产物经酶切后用 30 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度

Mg^{2+} 浓度梯度的 PCR 扩增产物经酶切结果见图 1。由图 1 可以看出,第 4 条泳道条带明亮清晰。由此可以得出 PCR 扩增的最佳 Mg^{2+} 浓度是 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 dNTP 浓度

dNTP 浓度梯度的 PCR 扩增产物酶切结果见图 2。可以看出第 6 条泳道条带明亮清晰。由此得出 PCR 扩增的最佳 dNTP 浓度是 0.08 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 引物浓度

引物浓度梯度的 PCR 扩增产物酶切结果见图 3。可以看了第 7 泳道条带较为清晰和明亮。由此得出 PCR 扩增的最佳引物浓度是 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 DNA 质量浓度

铸型 DNA 质量浓度梯度的 PCR 扩增产物酶切结果见图 4。反应体系中含有 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铸型 DNA, 其 PCR 扩增及其酶切的效果比含有 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的要明亮并清晰。由此可以得出结论, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右为较佳 DNA 质量浓度。

表 1 Mg^{2+} , dNTP, 引物, DNA 浓度和内切酶活性梯度

Table 1 Test to Mg^{2+} , dNTP, primer, DNA and restriction enzyme concentration

编号	Mg^{2+} 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	dNTP 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	引物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	DNA 质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	内切酶活性/ nkat
1	2.4	0.18	0.40	200	133.360
2	2.1	0.16	0.35	20	116.690
3	1.8	0.14	0.30		100.020
4	1.5	0.12	0.25		83.350
5	1.2	0.10	0.20		66.680
6	0.9	0.08	0.15		50.010
7			0.10		
8			0.05		

说明: 内切酶活性按 1U=16.67 nkat 换算。

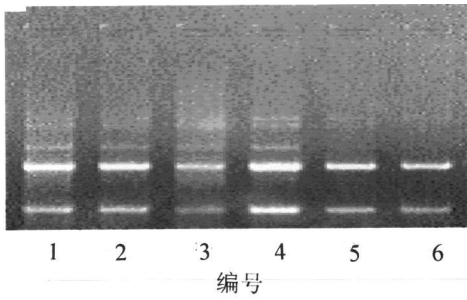


图1 Mg^{2+} 浓度梯度的 PCR 产物酶切结果
(编号见表 1)

Figure 1 Effect of Mg^{2+} concentration on PCR products' restriction digestion (See table 1 for details)

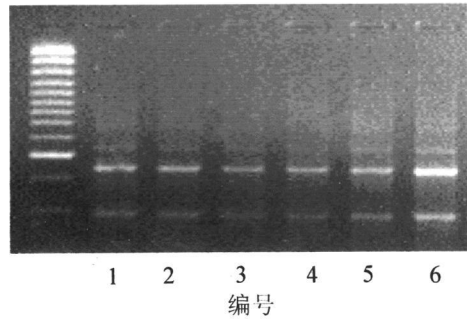


图2 dNTP 浓度梯度 PCR 产物酶切结果
(编号见表 1)

Figure 2 Effects of dNTP concentration on PCR products' restriction digestion (See table 1 for details)

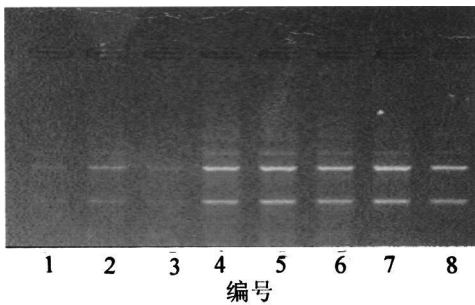


图3 引物浓度梯度 PCR 产物酶切结果
(编号见表 1)

Figure 3 Effects of primer concentration on PCR products' restriction digestion (See table 1 for details)

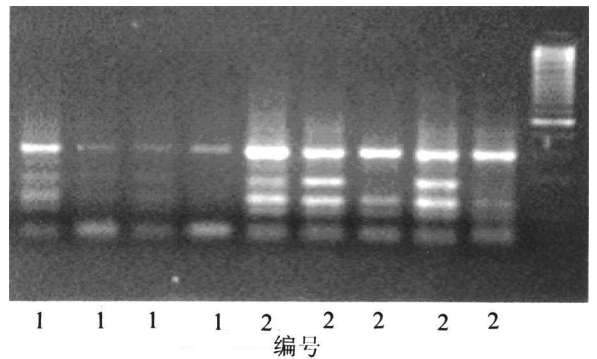


图4 DNA 质量浓度梯度 PCR 产物的酶切结果
(编号见表 1)

Figure 4 Effects of DNA concentration on PCR products' restriction digestion (See table 1 for details)

2.5 内切酶活性

PCR 产物酶切时酶活性梯度结果见图 5。可以看出酶活性对结果影响很大，过多或过少不仅使电泳条带不清楚，甚至根本没有电泳条带。第 4 条泳道条带比较明亮和清晰，其对应酶活性是在 $10 \mu\text{L}$ 的 PCR 产物中加入 83.35 nkat (5 个单位) 内切酶。

通过对影响柳杉 CAPS 遗传标记反应体系结果主要因子的研究，确定了柳杉 CAPS 遗传标记反应体系中最优的 PCR 扩增反应体系和酶切反应体系： $20.0 \mu\text{L}$ 扩增反应体系 ($2.0 \mu\text{L}$ $10\times$ Buffer, 41.675 nkat Taq DNA 聚合酶, $0.08 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铸型 DNA, $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $MgCl_2$, $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物), $20.0 \mu\text{L}$ 酶切反应体系 ($2.0 \mu\text{L}$ $10\times$ Buffer, 83.350 nkat 内切酶, $7.5 \mu\text{L}$ 双蒸水, $10 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物)。

3 讨论

3.1 DNA 品质和质量浓度对扩增效果的影响

高品质的 DNA 和适宜的 DNA 质量浓度是扩增好坏的先决条件，所以在提取 DNA 时选取适当的方法，是非常关键的。而且，也应尽量除去如饱和酚、氯仿和异戊醇等影响 Taq DNA 酶活性的物质。在柳杉

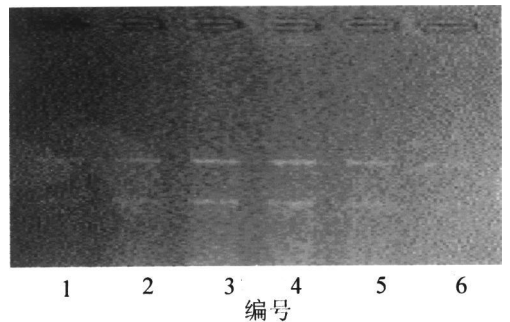


图5 内切酶活性梯度的结果
(编号见表 1)

Figure 5 Effects of restriction enzyme concentration (See table 1 for details)

DNA 提取过程中异丙醇沉淀 DNA 后, 可以用枪头将絮状沉淀挑出来代替常用的离心沉淀, 这样可以减少提取的 DNA 中杂质的量。

3.2 CAPS 遗传标记反应体系的优化

Mg^{2+} 是 *Taq* 酶不可缺少的辅助因子, Mg^{2+} 浓度过高会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 影响扩增效果。同时 Mg^{2+} 浓度也影响引物与 DNA 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。

dNTP 是合成 DNA 的原料, 在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下, 引物与单链 DNA 碱基配对相结合, dNTP 延伸结合上去, 产生了不同长度的 DNA 片段, dNTP 浓度过高会产生错误渗入, 过低导致 PCR 产率下降。

引物浓度的高低对扩增结果影响也很大。引物浓度低时, 与模板碰撞机会减少, 不足以扩增出供 EB 染色的 DNA; 引物浓度过高时, 又会引起错配。

模板浓度是 PCR 反应的一个制约因子。其浓度过低扩增产物无或不稳定, 其浓度过高会相应增加非专一性扩增产物。

参考文献:

- [1] 夏爱梅, 达良俊, 朱虹霞, 等. 天目山柳杉群落结构及其更新类型[J]. 浙江林学院学报, 2004, 21(1): 44—50.
- [2] 王春明, 安井秀, 吉村醇, 等. 水稻叶蝉抗性基因回交转育和 CAPS 标记辅助选择[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 237—241.
- [3] 梁慧玲, 梁月荣. 植物分子标记技术原理及其在茶树育种中的应用[J]. 茶叶, 2003, 29(4): 191—194.
- [4] KONIECZYN A, AUSUBEL F M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific RCR-based markers[J]. *Plant*, 1993, 4: 404—410.
- [5] 张海英, 许勇, 王永健, 等. 分子标记技术概述(下)[J]. 长江蔬菜, 2001(3): 15—16.
- [6] TSUMURA Y, TOMARU N. Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequenced tagged sites[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 93: 396—404.
- [7] 米景九, 林书康. 高分子量植物 DNA 的快速提取[J]. 北京农业大学学报, 1990, 16(3): 580—583.
- [8] 刘学春, 潘春欣. 1 种单子叶植物总 DNA 提取方法的改进及应用[J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(4): 491—495.

Optimization of the reaction system for CAPS marker analysis in *Cryptomeria fortunei*

YANG Ping¹, ZHENG Qian-jian¹, ZHAO Ming-shui², TANG Ding-qin¹

(1. Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300 Zhejiang, China; 2. Management Office, National Nature Reserve of Mount Tianmu, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: An optimized system for CAPS reaction in *Cryptomeria fortunei* is a precondition for analyzing genetic diversity of *Cryptomeria fortunei*. The authors optimized a reaction system for CAPS in *Cryptomeria fortunei* by analyzing different factors. The results showed that the best one was 20 μ L amplification reaction solution composed of 2.0 μ L 10 \times Buffer, 0.08 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 200 mg \cdot L⁻¹ template DNA, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.1 μ mol \cdot L⁻¹ primer and 41.675 nkat *Taq* DNA polymerase, which was amplified under the program of predenaturing at 94 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 40 s, annealing 58 $^{\circ}$ C for 40 s, extension 72 $^{\circ}$ C for 80 s, and a final extension 72 $^{\circ}$ C for 5 min. The restriction digestion system consisted of 10 μ L PCR products, 2.0 μ L 10 \times Buffer, 83.350 nkat restriction enzyme and 7.5 μ L ddH₂O. [Ch, 5 fig. 1 tab. 8 ref.]

Key words: botany; *Cryptomeria fortunei*; CAPS; DNA marker; reaction system; optimization