

文章编号: 1000-5692(2003)02-0141-05

大血藤 RAPD 条件的优化

金则新¹, 李钧敏¹, 钟章成²

(1. 台州学院 生物系, 浙江 临海 317000; 2. 西南师范大学 生命科学学院, 重庆 北碚 400715)

摘要: 在进行大血藤遗传多样分析时, 首先要建立大血藤 RAPD 反应优化体系, 有必要就反应条件进行探索。以改进 SDS 法抽提藤本药用植物大血藤叶片总 DNA, 进行随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析, 分别测试了镁离子、dNTP、模板 DNA 含量、引物浓度、DNA 聚合酶量和牛血清白蛋白浓度对反应结果的影响。通过各因子的组合研究, 得出大血藤 RAPD 分析较适宜的扩增条件是: 15 μL PCR 反应体积, $1\times\text{Taq}$ 酶配套缓冲液 ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·HCl pH 9.0, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 0.1% Triton X-100, $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2); $25.01\times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$ Taq 酶 (上海华美公司); 10 ng 模板 DNA; 15 pmol 引物 (上海 Sangon 公司); $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA; dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 $0.15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 4 表 2 参 8

关键词: 大血藤; RAPD; 化学成分; 药用植物

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A

大血藤 *Sargentodoxa cuneata* 隶属大血藤科 Sargentodoxaceae 大血藤属。大血藤科为我国所特有^[1]。大血藤为落叶木质藤木, 长达 10 m, 根和藤可入药, 有强筋骨、活血散瘀、止痛和通经之效, 并可治疗阑尾炎和风湿性关节炎等, 又可用作杀虫剂^[2]。国内外对大血藤的研究较少, 仅对大血藤的次生代谢产物如三萜类皂素^[3]、木质素^[4]和黄酮^[5]等进行了研究。为探索大血藤种群的遗传变异, 从分子水平阐明植物变异与环境的关系。随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是运用随机引物扩增寻找多态性 DAN 片段, 用以作为分子标记的一种分子生物学研究手段, 具有快速简便等优点^[6]。利用 RAPD 技术对大血藤种群进行遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系, 有助于 RAPD 结果的可靠性与重复性。为此, 我们就大血藤 RAPD 反应中的 dNTP 浓度、镁离子浓度、Taq 酶用量、模板 DNA 浓度、引物浓度和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 等因素对实验结果的影响进行了实验, 建立了重复性强, 稳定的大血藤 RAPD 反应参数, 为进一步分析大血藤遗传多样性提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 模板 DNA 的制备与定量

将采自浙江省临海市云峰的大血藤嫩叶, 用湿布包裹, 塑料袋封装, 立即带回实验室, 洗净后晾干, 冻于 -70°C 超低温冰箱中, 备用。

大血藤 DNA 抽提根据刘康德等^[7]方法进行改进, 取 -70°C 冻存叶片研磨成粉状, 取 0.1 g 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μL 提取缓冲液 [$100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·HCl (pH 8.0), 3% 可溶性 PVP, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)], $8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 取沉淀加入

收稿日期: 2002-08-02; 修回日期: 2003-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870160)

作者简介: 金则新(1960-), 男, 浙江临海人, 教授, 硕士, 从事植物生态学等研究。

500 μL 裂解缓冲液 [100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris $\cdot\text{HCl}$ (pH 8.0), 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0), 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1.5% SDS], 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 不时轻轻颠倒, 取出加入 500 μL 氯仿/异戊醇 (24:1), 颠倒成乳浊状, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清加入体积分数为 0.25 乙醇和体积分数为 0.11 的 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KAc (pH 4.8), 立即 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清加入体积分数 0.6 异丙醇, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取沉淀, 溶于 30 μL TE (含 RNase 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 备用。

DNA 定量采用紫外分光光度计 (日本岛津 UV-2401 PC 紫外可见分光光度计) 与琼脂糖凝胶电泳双重定量。紫外分光光度法以 λDNA 为标准品, 以 A_{260} 对 DNA 进行定量; 电泳图谱经 UTHSCSA ImageTool 软件分析荧光面积, 与标准 DNA 分子量参照物比较定量而得。

1.2 RAPD 反应程序

本实验所用的 PCR 仪为上海高机公司生产的 SRX-481 PCR 仪。经过摸索, 得适合大血藤 RAPD 分析的 PCR 反应程序 (用 6 $^{\circ}\text{C}$ 循环水冷却); 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min。

1.3 大血藤 RAPD 实验中各影响因素

1.3.1 Mg^{2+} 与 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响 15 μL PCR 反应液中含 1 \times Taq 酶缓冲液, 16.67 $\times 10^{-9}$ $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ Taq 酶 (上海华美公司), 10 ng 模板 DNA, 20 pmol 引物 (上海 Sangon 公司), 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白。Mg²⁺ 与 dNTP 浓度见表 1, 加水补足体积至 15 μL , 覆盖石蜡油按方法 1.2 进行 PCR。

1.3.2 其余因素对 RAPD 扩增的影响 模板 DNA

量、引物用量、Taq 酶量和 BSA 浓度如表 2 所示, 各管加水补足体积至 15 μL 。覆盖石蜡油按方法 1.2

表 1 Mg^{2+} 与 dNTP 浓度组合

Table 1 Different treatment of Mg^{2+} and dNTP concentration

管号	dNTP 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.10	1.5
2		1.8
3		2.1
4		2.4
5	0.15	1.5
6		1.8
7		2.1
8		2.4
9	0.20	1.5
10		1.8
11		2.1
12		2.4

表 2 供试因子浓度用量

Table 2 Volume of each factor concentration

管号	共有成分	引物/pmol	模板 DNA/ng	Taq 酶/ ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)	BSA/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
13		10			
14		15			
15		20	10	16.67 $\times 10^{-9}$	2
16		25			
17		30			
18			25		
19			50		
20		20	75	16.67 $\times 10^{-9}$	2
21			100		
22			125		
23	1 \times Taq 酶缓冲液			8.34 $\times 10^{-9}$	
24	1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2			16.67 $\times 10^{-9}$	
25	0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 \times dNTP	20	10	25.01 $\times 10^{-9}$	2
26				33.34 $\times 10^{-9}$	
27				41.67 $\times 10^{-9}$	
28					0.50
29					0.75
30					1.00
31		20	10	16.67 $\times 10^{-9}$	1.50
32					2.00
33					2.50
34					3.00

进行 PCR。

1.4 PCR 产物的鉴定

扩增产物取 15 μL 在 2% 琼脂糖凝胶 (0.5 \times TBE, 含 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溴化乙锭) 上进行电泳分析, 于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统 (上海天能科技服务公司) 拍照保存。

2 结果与讨论

2.1 大血藤 DNA 的提取及分析

按方法所述对大血藤嫩叶 DNA 进行抽提, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射反射分析仪中分析结果见图 1。结果显示大血藤 DNA 分子量在 23 kb 以上, 确定是基因组 DNA。

2.2 Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度对 RAPD 带影响

不同 Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度的组合对 RAPD 扩增结果的影响如图 2 所示。由图 2 可知, dNTP 浓度对扩增结果影响较大, 当 dNTP 浓度较低 (0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时, 扩增产物条带较少, 并且随着 Mg^{2+} 浓度的升高, 扩增的条带数明显增加, 亮度也明显增加。当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 只出现分子量较小的条带, 当 Mg^{2+} 浓度升高至 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带数目增加, 但仍缺少分子量较大的 2 条带。当 dNTP 浓度升高至 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时, 具有清晰的扩增结果, 并且 Mg^{2+} 浓度的改变对扩增结果影响不大。由于较低的 Mg^{2+} 浓度有利于增强 PCR 扩增的特异性, 因此最适 Mg^{2+} 浓度选择 1.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP 浓度 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最适的组合浓度, 此时 RAPD 条带最清晰, 条带数最多, 亮度最大。

2.3 引物量对 RAPD 带的影响

在本研究中, 引物量的变化对 RAPD 带的数量和强弱影响较大 (图 2)。当引物量为 10 μmol 时, 分子量较大的条带亮度较低; 当引物量增高至 15 μmol 和 20 μmol 时, 扩增产物条带最清晰, 亮度最大; 当引物量继续增高至 25 μmol 和 30 μmol 时, 出现明显的引物带, 并且某些条带的亮度反而减弱。根据结果选择最适的引物用量为 15 μL RAPD 反应体积中添加 15 μmol 引物。

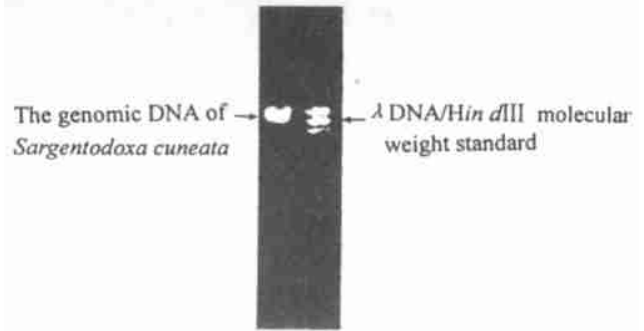


图 1 大血藤 DNA 凝胶电泳结果

大血藤 DNA 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (含 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溴乙锭) 鉴定, 1 \times TAE 缓冲液, 6 V $\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压强度

Figure 1 The agarose gel analysis of *Sargentodoxa cuneata* DNA
Sargentodoxa cuneata DNA was determined on 0.8% agarose gel (including 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EB), 1 \times TAE buffer, 6 V $\cdot\text{cm}^{-1}$ voltage intensity



图 2 几种因素对大血藤 RAPD 扩增的影响 (引物 S21)

M: $\lambda\text{DNA}/\text{Eco RI} + \text{Hin d III}$ 标准分子量参照物

1~22: 方法 1.3 表 2 中管号 1~22 的 RAPD 扩增结果

Figure 2 The effect of amplification conditions on *Sargentodoxa cuneata* RAPD amplification (primer S21)

M: $\lambda\text{DNA}/\text{Eco RI} + \text{Hin d III}$ molecular weight standard. 1~22: The RAPD amplification of

1~22, appendix listed in the table 2 in method 1.3

2.4 模板 DNA 量对 RAPD 带的影响

如图 2 所示, 模板 DNA 的量对 RAPD 扩增结果有明显的影 响。当模板 DNA 量为 25 ng 或 50 ng 时, 扩增的条带量度太大, 导致电泳条带的重叠; 而当 DNA 量增加至 75 ng 时, 扩增的条带清晰, 但当 DNA 量继续增加至 100 ng 以上时, 扩增的条带反而减少。由于本实验所用的模板 DNA 未经纯化, 且大血藤叶中含大量的次生代谢产物, 因此分析原因可能是所提 DNA 中含有一定的次生代谢产物, 抑制了 RAPD 的扩增。为了进一步确定模板 DNA 的量, 我们对 1~20 ng 的模板 DNA 量进行分析, 结果显示模板 DNA 量为 1 ng 时, 扩增的条带数较少; 当模板 DNA 量增加至 5~20 ng 之间时, 模板 DNA 量对 RAPD 扩增结果影响不大, 均可获得清晰的条带 (图 3)。我们最终选择最适的引物用量为 15 μL RAPD 反应体积中添加 10 ng 模板 DNA。



图 3 模板 DNA 量对大血藤 RAPD 扩增的影响 (引物 S21)

M: λDNA/Eco RI+Hin d III 标准分子量参照物
1~4: 模板 DNA 量分别为 1 ng, 5 ng, 10 ng 和 20 ng

Figure 3 The effect of the content of the template DNA on *Sargentodoxa cuneata* RAPD amplification (primer S21)

M: λDNA/Eco RI+Hin d III molecular weight standard. 1~4: The content of the template DNA was 1 ng, 5 ng, 10 ng and 20 ng

2.5 Taq 酶单位对 RAPD 带的影响

Taq 酶单位的变化对 RAPD 带的数量和强弱影响较大 (图 4)。当 Taq 酶为 $8.34 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 扩增的条带数较少; 当 Taq 酶用量增加至 $16.67 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 条带数目有所增加, 但有些条带仍模糊不清; 当 Taq 酶用量增加至 $25.01 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 可获得清晰的扩增结果; 当 Taq 酶用量再增加至 $33.34 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上时, 对扩增结果有所影响, 分子量较大的条带反而丢失。这与一些文献^[8]报道相符: 酶量过高, 反而引起 RAPD 扩增效果的降低。我们最终选择最适的 Taq 酶的用量为 15 μL RAPD 反应体积中添加 $25.01 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ Taq 酶。

2.6 BSA 浓度对 RAPD 带的影响

BSA 浓度的变化对 RAPD 带的数量和强弱有一定的影响 (图 4)。当 BSA 质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带较弱, 有些条带丢失; 当 BSA 质量浓度增加至 $1.00 \sim 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 RAPD 扩增结果影响不大, 带型变化不明显; 当 BSA 质量浓度增加至 $3.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有些条带发生丢失。我们最终选择最适的 BSA 浓度为 $2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

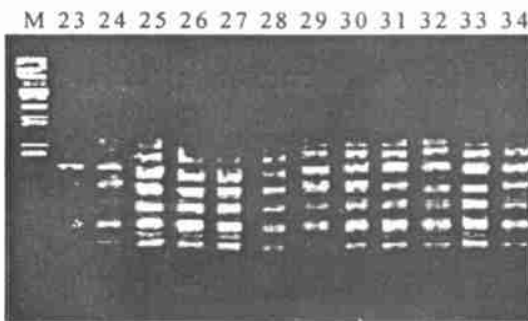


图 4 Taq 酶和 BSA 浓度对大血藤 RAPD 扩增的影响 (引物 S21)

M: λDNA/Eco RI+Hin d III 标准分子量参照物

23~34: 方法 1.3 表 2 中管号 23~34 的 RAPD 扩增结果

Figure 4 The effect of the unit of Taq polymerase and the concentration of BSA on *Sargentodoxa cuneata* RAPD amplification (primer S21)

M: λDNA/Eco RI+Hin d III molecular weight standard. 23~34: The RAPD amplification of 23~34 eppendorf listed in the table 2 in method 1.3

3 结语

由实验结果可知, 扩增条件的变化会对 RAPD 图谱产生较大的影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性, 而 RAPD 带谱的准确性与稳定性是利用 RAPD 标记进行遗传多样性分析的前提条件。从以上分析可看出大血藤的 RAPD 分析较适宜的扩增条件如下: 15 μL PCR 反应体积, $1 \times \text{Taq}$ 酶配套缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris} \cdot \text{HCl}$ pH 9.0, 50

mmol·L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 25.01×10⁻⁹ mol·s⁻¹ 酶 (上海华美公司), 10 ng 模板 DNA, 15 pmol 引物 (上海 Sangon 公司), dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 0.15 mmol·L⁻¹, 2.00 g·L⁻¹ 牛血清白蛋白。以此条件对同一大血藤植株 DNA 进行 3 次 RAPD 分析, 结果可靠, 带型稳定。

参考文献:

- [1] 应俊生, 张玉龙. 中国种子植物特有属 [M]. 北京: 科学出版社, 1994. 536—539.
- [2] 王景祥. 浙江植物志: 第2卷 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992. 306.
- [3] Rmoker G, Mayer R, Shin-Kim J S. Triterpene saponins from the Chinese drug "Daxueteng" (*Caulis sargentodoxae*) [J]. *Planta Med*, 1991, 57 (5): 468—470.
- [4] Han G Q, Chang M N, Hwang S B. The investigation of lignans from *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 1986, 21 (1): 68—70.
- [5] 葛明菊, 金则新, 李钧敏, 等. 大血藤黄酮类化合物组成的初步研究 [J]. 浙江林学院学报, 2002, 19 (4): 383—386.
- [6] 梁月荣, 田中淳一, 武田善行. 茶树品种资源多态性 RAPD 分析 [J]. 浙江林学院学报, 2000, 17 (2): 215—218.
- [7] 刘康德, 李建国, 彭世清, 等. 油梨基因组 DNA 的提取及 RAPD 分析 [J]. 热带作物学报, 1999, 20 (4): 57—61.
- [8] 袁长春, 施苏华, 叶创兴. 扩增条件对茶类植物 RAPD 带的影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7 (4): 313—317.

Optimization of RAPD conditions of *Sargentodoxa cuneata*

JIN Ze-xin¹, LI Jun-min¹, ZHONG Zhang-cheng²

(1. Department of Biology, Taizhou University, Linhai 317000, Zhejiang, China; 2. Faculty of Life Sciences, Southwest Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The optimized system used in RAPD reaction of *Sargentodoxa cuneata* must be established before analyzing the genetic diversity of *Sargentodoxa cuneata*. It is necessary to explore the reaction conditions. The genomic DNA of *Sargentodoxa cuneata* is extracted with improved SDS method and RAPD amplification is carried out. The effect of content of Mg, Dntp, DNA templates, primers and DNA polymerase on experimental results is tested and the optimal reaction system of RAPD for *Sargentodoxa cuneata* is determined as follows: 1×Taq polymerase corresponding buffer (10 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 9.0, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂), 25.01×10⁻⁹ mol·s⁻¹ Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 15 pmol primer, 2.00 g·L⁻¹ BSA. 0.15 mmol·L⁻¹ dATP, dCTP, dGTP, dTTP for each in total 15 μL reaction volume. [Ch, 4 fig. 2 tab. 8 ref.]

Key words: *Sargentodoxa cuneata*; RAPD; chemical composition; medicinal plant