

文章编号: 1000-5692(2003)04-0429-05

山核桃 RAPD 反应体系的优化

王正加^{1,2}, 黄坚钦², 郭传友³, 杨萍², 王华芳¹

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300;

3. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 建立山核桃 RAPD 反应优化体系 是进行山核桃遗传多样性分析的前提。通过对影响 PCR 扩增结果的主要因子的组合研究, 确定了山核桃 *Carya cathayensis* 的最适反应体系和扩增程序, 即在 20 μL 反应体系中, 含 2.5 mg·L⁻¹ (50 ng) 模板, 2.0 μL 10× Buffer, 16.67 pmol·s⁻¹ Taq DNA 聚合酶; 各 0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs, 3.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.3 μmol·L⁻¹ 引物。扩增程序为: 94 °C 预变性 300 s, 94 °C 变性 30 s, 38 °C 退火 30 s, 72 °C 链延伸 90 s, 38 次循环, 72 °C 后延伸 420 s。图 5 表 2 参 6

关键词: 林木遗传育种学; 山核桃; 随机扩增多态性 DNA (RAPD); 反应体系; 优化
中图分类号: S718.46 **文献标识码:** A

RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA), 是众多分子标记中应用最广的一种, 它具有快速简便, 通用性好, 对 DNA 的需求量小, 质量要求不高和无需用同位素等优点。被成功应用于各种生物的遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究等领域¹⁻³。该研究通过对 PCR 反应中几个主要影响实验结果的因素进行了优化, 找到最佳反应体系及反应条件, 为进一步用 RAPD 技术对山核桃 *Carya cathayensis* 不同地理种群遗传多样性分析奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 基因组 DNA 的提取及检测

以山核桃为材料, 采用邹喻萍高盐低 pH 值法⁴ 提取基因组 DNA, 但作部分改良。称取约 0.1 g 新鲜叶片, 加液氮迅速研磨成粉末, 转入 2 mL 的离心管中; 加入 800 μL 65 °C 预热的高盐提取液 (100 mol·L⁻¹ 醋酸钠, 50 mmol·L⁻¹ EDTA, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, 2% PVP, 1.4% SDS, pH 5.5, 现加 2% β-巯基乙醇), 充分混匀, 65 °C 温浴 30 min (期间不停颠倒混匀), 1 万 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min; 取上清, 加入 2/3 体积 2.5 mol·L⁻¹ KAC (pH 4.8), 混匀, 0 °C 冰浴 30 min, 1 万 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min; 取上清, 加入等体积饱和酚, 混匀, 1 万 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min; 取上清, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1) 的混合液, 混匀, 室温下静置 10 min, 1 万 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min; 重复 1 次; 取上清, 加入等体积预冷的异丙醇, 轻轻混匀, -20 °C 放置 30 min, 1 万 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 70% 的乙醇精洗 2 次, 自然状态下干燥, 100 μL TE 溶解, -20 °C 保存备用。

收稿日期: 2003-07-04; 修回日期: 2003-09-24

基金项目: 浙江省科学技术厅重大招标项目(0211025); 浙江省自然科学基金重大项目(ZA0208); 杭州市科技局重大攻关项目(2002112A12)

作者简介: 王正加(1972-), 男, 浙江三门人, 讲师, 从事植物生物技术研究。E-mail: wzj21@163.com

用 Genequantpro (pharmacia) 和凝胶自动成像系统 (pharmacia) 检测基因组 DNA, A_{260}/A_{280} 于 1.8 左右为较纯, 可用于实验分析, DNA 质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) = OD 值 $A_{260} \times 50$ 稀释倍数。

1.2 试验

Taq 酶 (购自上海生工)、dNTP (购自上海生工) 和引物 (S262, 购自上海生工) 浓度试验及 Mg^{2+} 和模板 DNA 浓度试验见表 1~2。

表 1 Taq 酶、dNTP 和引物浓度三因素试验

Table 1 Test of three factors of Taq, dNTP and primer concentration

编号	Taq 酶/ ($\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$)	dNTP/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	编号	Taq 酶/ ($\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$)	dNTP/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	12.50	0.15	0.15	15	16.67	0.20	0.45
2	12.50	0.15	0.30	16	16.67	0.25	0.15
3	12.50	0.15	0.45	17	16.67	0.25	0.30
4	12.50	0.20	0.15	18	16.67	0.25	0.45
5	12.50	0.20	0.30	19	25.00	0.15	0.15
6	12.50	0.20	0.45	20	25.00	0.15	0.30
7	12.50	0.25	0.15	21	25.00	0.15	0.45
8	12.50	0.25	0.30	22	25.00	0.20	0.15
9	12.50	0.25	0.45	23	25.00	0.20	0.30
10	16.67	0.15	0.15	24	25.00	0.20	0.45
11	16.67	0.15	0.30	25	25.00	0.25	0.15
12	16.67	0.15	0.45	26	25.00	0.25	0.30
13	16.67	0.20	0.15	27	25.00	0.25	0.45
14	16.67	0.20	0.30				

1.3 对比

本实验对增效剂 BSA (牛血清白蛋白, 购自上海生工) 和 TmAc (四甲基氯化铵, 购自上海生工) 对 PCR 结果的影响做了对比。

1.4 退火温度和预变性时间设计

热循环扩增条件中主要以退火温度和预变性时间为研究对象。据资料, 本实验

表 2 Mg^{2+} 和模板 DNA 浓度试验

Table 2 Test of two factors of Mg^{2+} and template DNA concentration

编号	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	编号	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	3.5	5.000	9	2.5	5.000
2	3.5	2.500	10	2.5	2.500
3	3.5	1.250	11	2.5	1.250
4	3.5	0.625	12	2.5	0.625
5	3.0	5.000	13	2.0	5.000
6	3.0	2.500	14	2.0	2.500
7	3.0	1.250	15	2.0	1.250
8	3.0	0.265	16	2.0	0.265

设计 3 个程序: I. 94°C 预变性 180 s, 一个循环, 94°C 变性 30 s, 36°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 45 个循环; 72°C 后延伸 420 s, 4°C 保温。II. 94°C 预变性 300 s, 一个循环, 94°C 变性 30 s, 38°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 38 个循环; 72°C 后延伸 420 s, 4°C 保温。III. 94°C 预变性 240 s, 一个循环, 94°C 变性 30 s, 40°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 38 个循环; 72°C 后延伸 420 s, 4°C 保温。比较退火温度和预变性时间对谱带清晰度与带量数的影响。

2 结果与分析

2.1 Taq 酶、dNTP 和引物浓度筛选

根据实验设计, 进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果如图 1 所示。Taq 酶分为 3 组: 第 1 组为 $12.50 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 第 2 组为 $16.75 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 第 3 组为 $25.00 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ 。结果第 2 组 $16.75 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ 扩增条带清晰稳定, 相对应的 dNTP 为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物为 $0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 为最佳组合, 图 1 中第 14 泳道。

2.2 Mg^{2+} , DNA 模板浓度筛选

通过 Mg^{2+} 和模板 DNA 2 因素 4 水平试验, PCR 扩增, 电泳结果显示: Mg^{2+} 浓度 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 最佳。

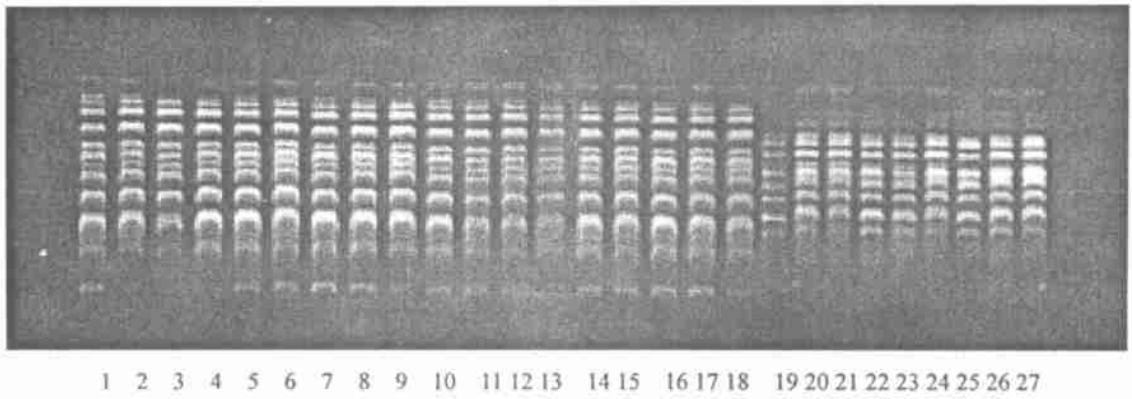


图1 Taq 酶、dNTP 和引物三因素试验结果 (引物 S262)

Figure 1 Result of test of three factors of Taq, dNTP and primer (primer S262)

带多且清晰。模板 $0.625 \sim 5.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 效果均比较好, 证明模板在一定范围内对 PCR 影响不大。图2中第6泳道为最佳组合, Mg^{2+} 浓度 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 DNA $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (50 ng)。

2.3 增效剂 BSA 和 TmAc 筛选

本实验设计了加增效剂与不加增效剂或只加其中一个进行对比, 结果如图3。加增效剂明显优于不加或单独加其中一个, 而且带多清晰。BSA 与 TmAc 的浓度配比如图4。其中4~10泳道条带多, 较清晰。其对应 BSA 与 TmAc 的浓度为: BSA $0.8 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, TmAc $0.165 \sim 0.0275 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。遵循经济和条带清晰、量多少的原则, 选择第6泳道为最佳组合, BSA 和 TmAc 浓度最佳配比分别为 $1.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

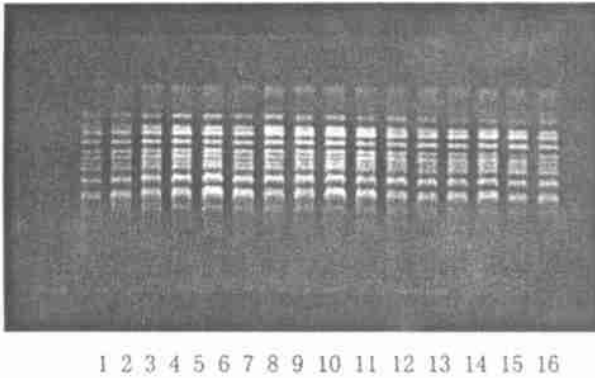
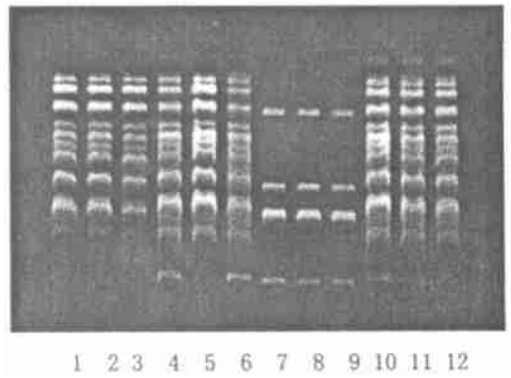
图2 Mg^{2+} 、模板 DNA 二因素试验结果 (引物 S262)Figure 2 Result of test of two factors of Mg^{2+} and template DNA (Primer S262)

图3 BSA 和 TmAc 实验 (引物 S262)

Figure 3 Test of BSA and TmAc (primer S262)

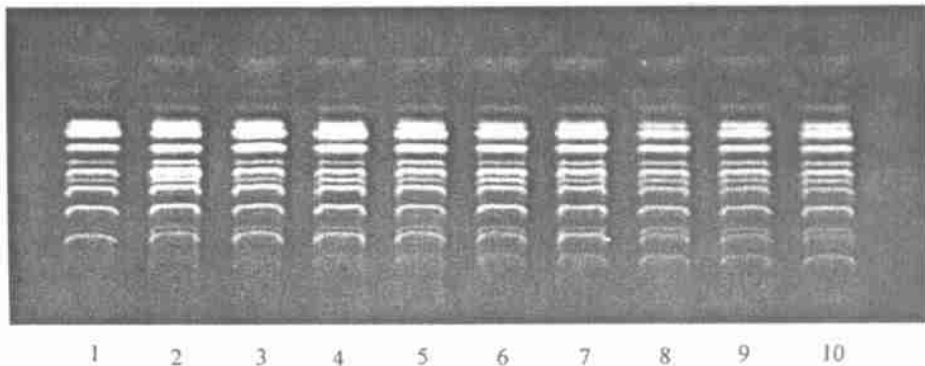


图4 BSA 和 TmAc 浓度试验结果 (引物 S262)

Figure 4 Result of test of concentration of BSA and TmAc (primer S262)

根据以上实验, 确定山核桃 RAPD 反应体系最佳组合为: 模板 DNA $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (50 ng), 引物浓度 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 酶 $16.67 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 浓度 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10\times$ Buffer $2 \mu\text{L}$, BSA $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 TmAc $0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 总体积为 $20 \mu\text{L}$ 。

2.4 热循环条件筛选

根据 1.4 设计的 3 个程序, 电泳结果如图 5。第 2 条程序谱带较其他 2 个程序清晰且量多, 故确定为理想程序。即 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 300 s, 一个循环, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s, 38 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 后延伸 420 s, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温。

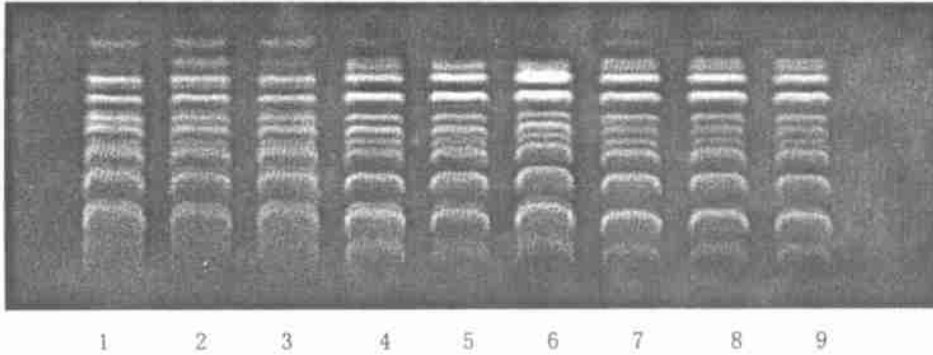


图 5 热循环扩增条件实验结果 (引物 S262, 其中 1~3, 4~6, 7~9 分别为第 I, II, III 程序)

Figure 5 Result of test of thermocycle amplification program (primer S262, 1~3, 4~6, 7~9 are procedure I, II, III)

3 讨论

长期以来, 人们认为 RAPD 技术有很大程度上的不稳定性, 这是因为物种、仪器设备、DNA 质量和浓度、引物种类及使用浓度、dNTP 浓度、Taq 酶型号、 Mg^{2+} 浓度及 PCR 热循环反应温度、时间及操作技术等均有不同程度的影响。笔者认为如果使用相同的试剂和药品, 在相同的反应体系和实验条件下, RAPD 分析还是具有很高的重复性。

3.1 高质量 DNA 与适宜的模板 DNA 浓度是 RAPD 扩增效果好坏的先决条件

像山核桃这样含矿多酚物质的材料, 选择合适的 DNA 提取方法, 有效地防止褐化, 是 DNA 提取的关键。而且应尽量去除模板中如饱和酚、氯仿、异戊醇和 SDS 等直接影响扩增中 Taq 酶活性的小分子物质。

3.2 RAPD 反应体系的调整

TaqDNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, Mg^{2+} 浓度过高会抑制 Taq 酶的活性, 过低对 Taq 酶的活化不够, 影响扩增效果。dNTP 是 RAPD 反应的“原料”, 在 TaqDNA 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掺入, 过低导致 PCR 产率下降。一般 RAPD 反应体系中的 dNTP 的浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 山核桃 RAPD 反应体系中也是如此。引物浓度过高或过低, 同样也会影响 RAPD 扩增效果。过高, 非特异性谱带增加, 过低, 扩增谱带明显减少。不同的材料对增效剂的要求有所不同。据边才苗^[3]报道, BAS 的使用浓度可为 $0.6 \sim 4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 均有较好的扩增效果。BSA 和 TmAc 是用于改善扩增结果的特异性与酶的稳定性, 用于内源抑制的干扰作用。绝大部分材料都没用增效剂, 但在本实验中, 加了增效剂明显比不加要好, 条带清晰, 且量多, 这可能跟本材料含有较多的酚类物质有关。

3.3 RAPD 反应条件的确定

预变性是指 DNA 在温度升到一定程度时双链打开, 形成单链的过程。合适的预变性时间是 PCR 扩增成功的必要条件。山核桃和其他材料一样, 一般预变性时间是 $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 2~5 min。退火温度是引物与模板 DNA 结合的关键。温度太高, 背景虽然清晰, 但条带数量明显减少; 温度太低, 非特异性谱带明显增加, 甚至背景发亮。本实验确定山核桃的最佳退火温度为 $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

参考文献:

- [1] Staub J E. Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in cucumber [J]. *Gene Resou Grp Evol*, 1997, **44** (3): 257—269.
- [2] Turksa M. Potential use of RAPD markers in verification of cucumber hybrids [J]. *Rost Linna Vyroba*, 1996, **42** (6): 24—224.
- [3] Rowland L J, Leva A. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darroui* and *V. ellioti*) [J]. *Theor Appl Gene*, 1994, **87**: 863—868.
- [4] 邹喻萍, 汪小全. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定 [J]. *植物学报*, 1994, **36** (7): 528—533.
- [5] 边才苗. 牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用 [J]. *遗传*, 2002, **24** (3): 279—282.
- [6] Soud W A, Rdsr M P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells [J]. *J Clinic Microbio*, 2001, **39** (2): 485—493.

The optimal reaction system of RAPD in *Carya cathayensis*

WANG Zheng-jia^{1,2}, HUANG Jian-qin¹, GUO Chuan-you², YANG Ping², WANG Hua-fang¹

(1. School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 10083, China; 2. School of Life Sciences Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The optimized system used in RAPD reaction of *Carya cathayensis* must be established before analyzing the genetic diversity of *Carya cathayensis*. It is necessary to explore the reaction conditions and system. The optimal reaction mixture and amplification procedure of RAPD in *Carya cathayensis* were studied. The result showed that each 20 μ L amplification reaction solution was consisted of 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (50 ng) template DNA, 2.0 μ L 10 \times Buffer, 16.67 $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ Taq DNA polymerase, each 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 2.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.15 $\times 10^{-3}$ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer. The PCR amplification program is predenature at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 300 s, followed by denature at 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, annealing 38 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, extension 72 $^{\circ}\text{C}$ for 90 s, cycling 38 times, last extension 72 $^{\circ}\text{C}$ 420 s. [Ch, 5 fig. 2 tab. 6 ref.]

Key words: forest tree genetics and breeding; *Carya cathayensis*; RAPD; reaction system; optimization