

文章编号: 1000-5692(2007)03-0279-05

# 珍稀濒危植物香果树 RAPD 反应条件的优化

杨敬元<sup>1</sup>, 熊丹<sup>2</sup>, 梁宏伟<sup>2</sup>, 王玉兵<sup>2</sup>, 廖明尧<sup>2</sup>, 陈发菊<sup>2</sup>

(1. 湖北省神农架自然保护区 管理局, 湖北 神农架 442421; 2. 三峡大学  
生物技术中心-湖北省天然产物利用与研究重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 以采自湖北省神农架地区的 14 株香果树 *Emmenopterys henryi* 为材料, 提取其叶片基因组 DNA, 并以其基因组 DNA 为模板进行随机扩增多态性 DNA (RAPD) 反应条件的优化。RAPD 反应条件中的各个因子, 包括模板 DNA 质量浓度、引物浓度、dNTP 浓度、DNA 聚合酶浓度和  $Mg^{2+}$  浓度。结果表明, 香果树基因组 DNA 在以下条件有较好的扩增效果: 25  $\mu$ L 体系中, *Taq* 酶  $1.33 \times 10^{-3}$   $kat \cdot L^{-1}$ ; 随机引物  $0.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ ;  $Mg^{2+}$   $2.6 mmol \cdot L^{-1}$ ; dNTP  $220 \mu mol \cdot L^{-1}$ ; DNA 模板  $4.40 mg \cdot L^{-1}$ 。聚合酶链式反应 (PCR) 程序为:  $94^{\circ}C$  预变性 5 min,  $94^{\circ}C$  变性 1 min,  $43^{\circ}C$  退火 1 min,  $72^{\circ}C$  延伸 2 min, 经过 40 个循环, 最后  $72^{\circ}C$  延伸 8 min。此体系和反应程序可获得比较稳定的扩增结果。图 6 表 1 参 8

**关键词:** 植物学; 香果树; 基因组 DNA; 随机扩增多态性 DNA

中图分类号: S718.4 文献标志码: A

香果树 *Emmenopterys henryi* 为茜草科 Rubiaceae 香果树属 *Emmenopterys* 高大落叶乔木, 我国特有单种属植物, 第四纪冰川幸存的古老孑遗植物之一。香果树自然条件下种子萌发力极低, 天然更新能力差, 现存数量有限, 濒于灭绝, 被列为国家二级重点保护植物和国家林业局公布的国家珍贵树种。该树种主要分布在江西、福建、湖南、湖北、四川、安徽与浙江南部等地区海拔 400~1400 m 土壤湿润肥沃的山坡、谷地。香果树材质洁白细密, 纹理通直, 是一种优良用材树种; 树皮纤维是制蜡纸和人造棉的原料; 树姿优美, 花色艳丽, 也是很好的观赏植物<sup>[1]</sup>。目前对香果树的研究主要有: 王诗云等<sup>[2]</sup>的地理分布及群落特征和资源状况, 李铁华等<sup>[3]</sup>的种子休眠和萌发的生理学特性以及徐小玉等<sup>[4]</sup>的自然群落中香果树的演替情况等方面, 而对其自然种群的遗传结构及遗传多样性的研究鲜有报道。笔者对香果树基因组 DNA 的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 反应条件进行了优化, 为探讨香果树居群的遗传多样性奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 采集神农架地区 14 株香果树嫩叶为试材, 编号为 1~14。

收稿日期: 2006-09-18; 修回日期: 2006-12-12

基金项目: 湖北省宜昌市科学技术重点攻关项目(A06209)

作者简介: 杨敬元, 工程师, 从事保护生物学研究。E-mail: yangjingyuan670@yahoo.com.cn. 通信作者: 陈发菊, 副教授, 从事植物发育生物学研究。E-mail: chenfg616@163.com

1.1.2 试剂 试验所用的引物(表1)。dNTPs, *Taq* 酶,  $MgCl_2$ , 缓冲液(PCR buffer)均由上海博亚生物技术有限公司提供; DNA 标记物(DNA marker)购自华美生物技术公司。

## 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 参考邹喻莘等<sup>[5]</sup>的植物基因组提取(CTAB)法, 稍做修改后提取香果树的总 DNA。具体步骤为: 取 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的香果树幼叶约 1 g, 在研钵中加液氮研磨后, 加入 10 mL  $65\text{ }^\circ\text{C}$ 预热的 CTAB 提取液, 分装到 1.5 mL eppendorf 管后,  $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 50 min, 每 10 min 颠倒混匀数次; 加入等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1)进行抽提,  $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 重复 1 次; 加入等体积 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰浴的异丙醇, 小心颠倒 eppendorf 管数次, 可见絮状沉淀, 用玻璃钩小心捞取沉淀; 用体积分数为 70%的乙醇冲洗沉淀,  $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 在通风橱风干 1~2 h, 沉淀用 100  $\mu\text{L}$  双蒸水溶解,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。在紫外可见光分光光度计(HITACHI U-2800)上, 波长 260 nm 处测定其光吸收值, 计算 DNA 浓度; 10.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色后, 用自动凝胶成像系统(BIO-RAD)观察拍照<sup>[5]</sup>。

1.2.2 RAPD 预扩增 预试验所用的 RAPD 反应体系是: *Taq* 酶为  $4.17\times 10^{-8}\ \text{kat}$ , dNTP ( $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $MgCl_2$  为  $2.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物为  $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 模板为  $6.16\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10\times$  buffer  $2.5\ \mu\text{L}$ , 总反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。

聚合酶链式反应(PCR)在 MJ 公司生产的 PTC220-PCR 仪上进行。反应程序如下:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min,  $43\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 经过 40 个循环, 最后  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 8 min。采用 20 条随机引物。扩增时为排除试验操作误差产生的非特异性带, 每一随机引物扩增时都设立一个不加模板的对照<sup>[6]</sup>。

扩增产物在  $18\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的琼脂糖凝胶中电泳 2 h, EB 染色, 在 Bio-RAD 公司生产的凝胶成像系统下观察并照相, 记录多态性片段。

1.2.3 RAPD 条件优化 在 RAPD 反应体系中, DNA 模板质量浓度、*Taq* 酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、随机引物浓度以及变性、退火、延伸温度及时间和循环次数均能影响 RAPD 扩增的产物。试验选取其中影响较大的几个因素如 DNA 质量浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度和 *Taq* 酶浓度等条件因子设置梯度, 比较扩增效果, 得到较优的反应体系。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 的提取

试验采取 CTAB 法提取香果树 DNA 呈白色絮状沉淀, 电泳结果显示 DNA 完整, 无明显降解(图 1)。2 号样品经 BA0001~BA0020 随机引物扩增出多态性条带(图 2), BA0002, BA0003, BA0004, BA0005, BA0006, BA0010, BA0011, BA0019 等 8 条随机引物扩增效果较理想, 故选取 2 号香果树基因组 DNA 为模板, BA0004 引物作为 RAPD 条件优化的引物。

DNA 提取的材料一般选取幼叶, 笔者的试验用幼叶与老叶作比较。结果表明, 幼叶提取的 DNA 的含量和质量都较好, 这与沈向等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。用异丙醇沉淀 DNA, 用玻璃钩挑出的 DNA 纯度要比离心机分离收集的 DNA 质量浓度高, 且以它为模板的 RAPD 效果较好, 这与陈宏等<sup>[7]</sup>所述观点一致。

表 1 随机引物及其碱基序列

Table 1 Random oligonucleotide primers and their sequences

博亚编号	序列 5'~3'	博亚编号	序列 5'~3'
BA0001	GTTTCGCTCC	BA0011	GTAGACCCGT
BA0002	TGATCCCTGG	BA0012	CCTTGACGCA
BA0003	CATCCCCCTG	BA0013	TTCCCCCGCT
BA0004	GGACTGGAGT	BA0014	TCCGCTCTGG
BA0005	TGCGCCCTTC	BA0015	GGAGGGTGT
BA0006	TGCTCTGCC	BA0016	TTTGCCCGGA
BA0007	GGTGACGCAG	BA0017	AGGGAACGAG
BA0008	GTCCACACGG	BA0018	CCACAGCAGT
BA0009	TGGGGGACTC	BA0019	ACCCCGAAG
BA0010	CTGCTGGGAC	BA0020	GGACCCTTAC

## 2.2 RAPD 条件优化

2.2.1 *Taq* 酶的用量对结果的影响 一般认为, 使用同一批次的 *Taq* 酶对 RAPD 反应获得重复性是必需的。乔爱民等<sup>[8]</sup>认为加酶量过多, 会导致非靶序列的扩增, 出现琼脂糖凝胶“拖带”现象; 加酶量过少, 则靶序列扩增产物浓度很低, 电泳后 DNA 带很弱或检测不出。笔者的试验扩增结果显示: *Taq* 酶的用量在 16.7~8.34 nkat 反应的扩增带比较清晰, 其他的带有的出现弥散现象, 有的带不稳定。考虑节约原则, *Taq* 酶的用量选择 3.34 nkat 反应(图 3)。

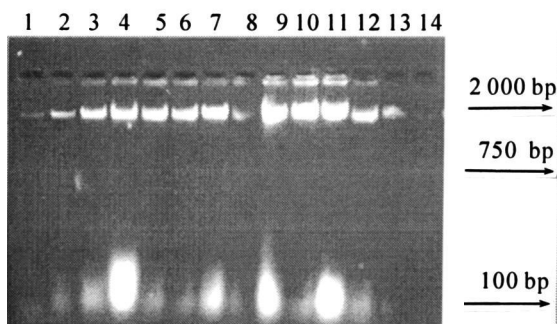


图 1 14 株香果树基因组 DNA 电泳图谱

Figure 1 Agarose gel analysis of 14 strains *Enmenopterys henryi* DNA



图 2 2 号香果树 DNA 用随机引物 BA0001~BA0020 扩增产物电泳图 (M. 100 bp ladder)

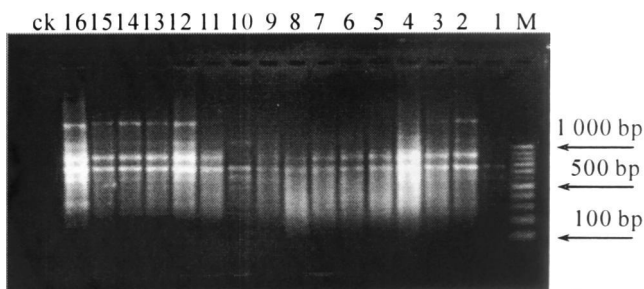
Figure 2 RAPD bands of No. 2 *Enmenopterys henryi* sample amplified with primer BA0001—BA0020 (M. 100 bp ladder)

2.2.2 引物浓度对 PCR 影响 引物浓度主要影响带的出现和强度。当模板 DNA 质量浓度一定时, 引物量的变化、扩增效率与扩增片段的大小有一个清楚的关系, 但在引物浓度较高时, 会出现小片段(<500 bp)。从试验扩增的结果可以看出, 引物浓度在  $0.4 \sim 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内都能扩增出比较清晰且基本一致的带(图 3), 其中以浓度  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为最佳。

2.2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 PCR 结果的影响 RAPD 反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  的有效浓度受到体系中金属螯合剂 EDTA 的浓度、高浓度的带负电荷离子基团(如 dNTP 中的磷酸根等)的影响。它们能与  $\text{Mg}^{2+}$  结合从而降低  $\text{Mg}^{2+}$  的有效浓度。以香果树为试验材料的研究结果表明,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $2.0 \sim 4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  可扩增出较为清晰的条带, 但以  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $2.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的效果最佳(图 4)。

2.2.4 dNTP 浓度对 PCR 结果的影响 dNTP 浓度过高有可能造成非靶序列结合和延伸时核苷酸的错误掺入, 降低精确性。笔者的研究结果表明: dNTP 浓度在  $120 \sim 240 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内均获得较好的扩增效果, 但以  $200 \sim 240 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内的试验结果最为稳定, 其扩增带型相似(图 4)。我们选择了  $220 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为反应条件。

2.2.5 模板 DNA 浓度对 PCR 的影响 根据邹喻萍等<sup>[5]</sup>用红花中国莲 *Nelumbo mucifera* DNA 进行 RAPD-PCR 时, 每反应中的终质量浓度小于  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时无扩增, 在模板终质量浓度为  $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内有最佳的扩增, RAPD 带的式样完全重复; 而超过此质量浓度范围如在  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时丢失大部分带, 在



M. 100 bp ladder. 1~8. *Taq* 酶活性优化: 1.  $8.33 \times 10^{-9} \text{ kat}$ , 2.  $1.67 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 3.  $3.34 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 4.  $4.17 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 5.  $5.0 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 6.  $6.67 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 7.  $8.33 \times 10^{-8} \text{ kat}$ , 8.  $1.0 \times 10^{-8} \text{ kat}$ . 9~16 为引物浓度优化: 9.  $0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 10.  $0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 11.  $0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 12.  $0.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 13.  $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 14.  $0.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 15.  $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 16.  $0.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . ck 阴性对照。

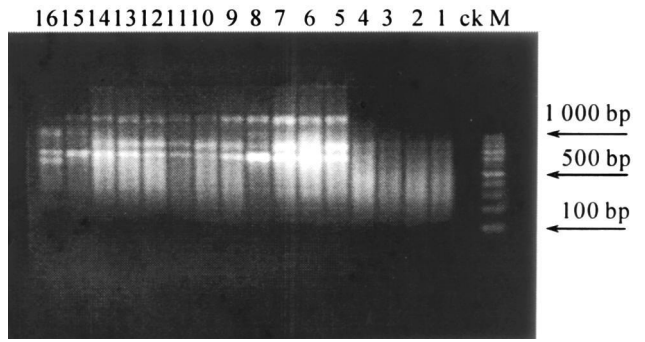
图 3 *Taq* 酶、引物的浓度对 RAPD 反应的影响

Figure 3 Effects of *Taq* enzyme and primer concentration on RAPD reaction

250 和 500 mg °L<sup>-1</sup> 时扩增产物一片弥散。在香果树的 RAPD 试验中, 以 4.40 mg °L<sup>-1</sup> 的扩增带最为清晰(图 5), 多态性带也很丰富。因此, 我们采用了 4.40 mg °L<sup>-1</sup> 作为最佳反应条件。

### 2.3 优化后反应体系的试验

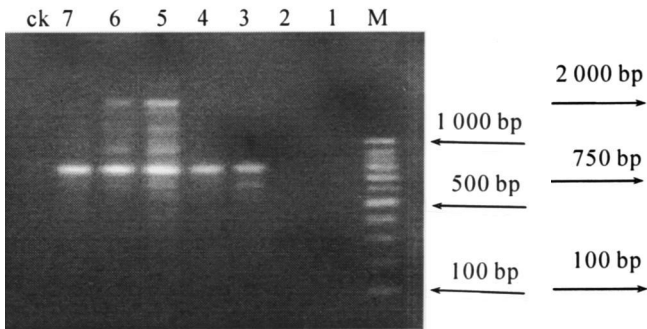
根据上述各实验得出的反应体系较优浓度值, 对神农架地区香果树的 14 个个体进行 RAPD 分析, 所用引物为 BA-4, 25 μL 反应体系中: *Taq* 酶 1.33 × 10<sup>-3</sup> kat °L<sup>-1</sup>; 随机引物 0.5 μmol °L<sup>-1</sup>; Mg<sup>2+</sup> 2.6 mmol °L<sup>-1</sup>; dNTP 220 μmol °L<sup>-1</sup>; DNA 模板 4.40 mg °L<sup>-1</sup>。94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 43 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 经过 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物在 15 g °kg<sup>-1</sup> 的琼脂糖凝胶(含 0.5 mg °L<sup>-1</sup> EB) 上电泳分离后, 紫外灯下观察拍照。结果得出此体系适宜于神农架地区香果树的 RAPD 分析, 可得到清晰扩增条带(图 6), 并具有很好的多态性和重复性, 完全能满足研究神农架地区香果树遗传变异的需要。



M. 100 bp ladder. 1~8. Mg<sup>2+</sup> 浓度的优化: 1. 1.0 mmol °L<sup>-1</sup>, 2. 2.0 mmol °L<sup>-1</sup>, 3. 2.2 mmol °L<sup>-1</sup>, 4. 2.4 mmol °L<sup>-1</sup>, 5. 2.6 mmol °L<sup>-1</sup>, 6. 2.8 mmol °L<sup>-1</sup>, 7. 3.0 mmol °L<sup>-1</sup>, 8. 4.0 mmol °L<sup>-1</sup>. 9~16. dNTP 优化: 9. 120 μmol °L<sup>-1</sup>, 10. 160 μmol °L<sup>-1</sup>, 11. 180 μmol °L<sup>-1</sup>, 12. 200 μmol °L<sup>-1</sup>, 13. 220 μmol °L<sup>-1</sup>, 14. 240 μmol °L<sup>-1</sup>, 15. 280 μmol °L<sup>-1</sup>, 16. 320 μmol °L<sup>-1</sup>. ck. 阴性对照。

图 4 Mg<sup>2+</sup> 浓度、dNTP 对 RAPD 反应的影响

Figure 4 Effects of Mg<sup>2+</sup> concentration and dNTP concentration on RAPD reaction



M. 100 bp ladder; 模板质量浓度优化: 1. 0.88 mg °L<sup>-1</sup>, 2. 1.76 mg °L<sup>-1</sup>, 3. 2.64 mg °L<sup>-1</sup>, 4. 3.52 mg °L<sup>-1</sup>, 5. 4.4 mg °L<sup>-1</sup>, 6. 5.28 mg °L<sup>-1</sup>, 7. 6.16 mg °L<sup>-1</sup>.

图 5 模板质量浓度对 RAPD 反应的影响

Figure 5 Effect of template concentration on RAPD reaction

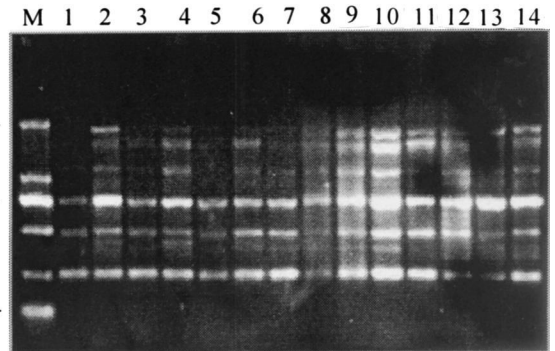


图 6 用优化后反应体系对 14 株香果树基因组 DNA 的 RAPD 扩增电泳图谱

Figure 6 RAPD bands of 14 *E. henryi* samples amplified with primer BA0004 (M. 100 bp ladder)

### 参考文献:

[1] 郑重. 湖北珍贵稀有植物[J]. 武汉植物学研究, 1986, 4(3): 276-289.  
 [2] 王诗云, 徐惠珠. 湖南及邻近地区珍稀濒危植物[J]. 武汉植物学研究, 1995, 13(5): 354-368.  
 [3] 李铁华, 周佑勋, 段小平, 等. 香果树种子休眠和萌发的生理特性[J]. 中南林学院学报, 2004, 24(2): 82-84.  
 [4] 徐小玉, 姚崇怀, 潘俊. 湖北九宫山香果树群落结构特征研究[J]. 西南林学院学报, 2002, 22(1): 4-8.  
 [5] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 27-28, 37.  
 [6] 沈向, 郑学勤, 任小林, 等. 核果类基因组 DNA 提取和 RAPD 条件优选[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 1999, 30(2): 154-160.  
 [7] 陈宏, 孙维斌, 雷初朝, 等. RAPD 标记稳定性的影响因素探析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(5): 139-142.  
 [8] 乔爱民, 刘佩瑛, 雷建军. 芥菜随机扩增多态性 DNA 最佳参数的研究[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(3): 235-239.

## Optimal reaction system for random amplified polymorphic DNA with endangered *Emmenopterys henryi*

YANG Jing-yuan<sup>1</sup>, XIONG Dan<sup>2</sup>, LIANG Hong-wei<sup>2</sup>, WANG Yu-bing<sup>2</sup>, LIAO Ming-yao<sup>2</sup>, CHEN Fa-ju<sup>2</sup>

(1. Administration of Shennongjia Nature Reserve, Shennongjia 442421, Hubei, China; 2. Biotechnology Research Center-Hubei Key Laboratory of Natural Products Use and Research, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

**Abstract:** Genome DNA from leaves of the *Emmenopterys henryi* tree (Henry emmenopterys) in the Shennongjia area of Hubei Province, China, was extracted to optimize its random amplified polymorphic DNA (RAPD) reaction conditions, which included concentrations of DNA polymerase, primers,  $Mg^{2+}$ , dNTP, and DNA. Results indicated that genome DNA of *E. henryi* had good amplification with the following conditions: 25  $\mu$ L solution with  $1.33 \times 10^{-3}$  kat  $\cdot L^{-1}$  *Taq* DNA polymerase, 0.5  $\mu$ mol  $\cdot L^{-1}$  random primer, 2.6 mmol  $\cdot L^{-1}$   $Mg^{2+}$ , 220  $\mu$ mol  $\cdot L^{-1}$  dNTP, and 4.40 mg  $\cdot L^{-1}$  genomic DNA. The polymerase chain reaction (PCR) amplification program was as follows: predenaturing at 94  $^{\circ}C$  for 5 min, followed by 40 cycles of denaturing at 94  $^{\circ}C$  for 1 min, annealing at 43  $^{\circ}C$  for 1 min, extension at 72  $^{\circ}C$  for 2 min, and final extension at 72  $^{\circ}C$  for 8 min. Such a system and reaction programs could achieve comparatively stable amplification. [Ch, 6 fig. 1 tab. 8 ref.]

**Key words:** botany; *Emmenopterys henryi* (Henry emmenoterys); genomic DNA; random amplified polymorphic DNA (RAPD)