

牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用

边才苗,李钧敏,金则新,葛明菊

(台州师范专科学校生化系,浙江临海 317000)

摘要:以水杉、七子花 DNA 为模板,添加牛血清白蛋白(BSA),观察其对植物 RAPD 扩增效果的改善情况。研究显示,在水杉及七子花 RAPD 扩增体系中,改善 RAPD 扩增反应的最佳的 BSA 浓度是不同的,分别为 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 与 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。另外,BSA 还可以封闭乙酰 BSA 对 RAPD 扩增反应的抑制作用,降低 RAPD 反应系统中 *Taq* 酶的用量。

关键词:牛血清白蛋白;水杉;七子花;RAPD

中图分类号:Q751

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)03-0279-04

Effect of BSA on Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) in Plants

BIAN Cai-miao, LI Jun-min, JIN Ze-xin, GE Ming-ju

(Biology and Chemistry Department, Taizhou Teachers College, Linhai, Zhejiang 317000, China)

Abstract: Using *Metasequoia glyptostroboides* and *Heptacodium miconioides* DNA as templates, the effect of bovine serum albumin(BSA) on RAPD in plants was studied. The results showed that suitable concentrations of BSA used in *Metasequoia glyptostroboides* and *Heptacodium miconioides* RAPD were different, which were $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively. The inhibition of acetylated BSA on the amplification of plant RAPD could be relieved by BSA. BSA could reduce the dosage of *Taq* DNA polymerase.

Key words: bovine serum albumin; *Metasequoia glyptostroboides*; *Heptacodium miconioides*; RAPD

随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphism DNA, RAPD)分析是建立在 PCR 反应基础上的一种新的分子生物学技术^[1],目前广泛应用于动、植物及微生物遗传多样性的研究^[2,3]。在对植物进行 RAPD 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。在合适的扩增条件下,为了获得更理想的实验结果,有研究报道在 RAPD 反应成分中添加各种有效成分。如四甲基氯化铵(TMACI)对 RAPD 扩增有一定的影响^[4]。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)广泛应用于酶反应系统及 PCR 反应系统中,用于减少内源抑制物的干扰作用^[5]。在一些 RAPD 扩增中都添加了一定浓度的 BSA 以提高反应效果,但不同的文献采用的 BSA 的最适浓度不同^[6,7],缺乏对

BSA 在 RAPD 扩增反应中的作用的系统研究。我们以种植水杉及濒危植物七子花的 RAPD 扩增来分析 BSA 对植物 RAPD 扩增反应的影响,为 BSA 在 RAPD 扩增反应中的正确应用提供一定的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

种植水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)的嫩叶于 2001 年 5 月采自本校校园内;七子花(*Heptacodium miconioides*)嫩叶于 2001 年 5 月采自于浙江省天台山国家森林公园狮子岩坑七子花林缘的 3 年生幼苗,用湿布包裹,塑料袋封装,立即带回实验室,洗净,晾干,冻于 -70°C 超低温冰箱中,备用。

收稿日期:2001-10-08;修回日期:2001-12-27

基金项目:浙江省自然科学基金项目(399203)和浙江省教委科研项目(1990367)资助

作者简介:边才苗(1963-),男,浙江诸暨人,讲师,从事遗传学的教学与科研工作。电话:0576-5137065;E-mail:lijm@mail.tzptt.zj.cn

1.2 模板 DNA 的制备与定量

根据刘康德等^[8]方法改进,取-70℃冻存叶片研磨成粉状,取 0.1g 转入 1.5ml 离心管中,加入 500 μ l 提取缓冲液[100mmol/L Tris · HCl(pH8.0),3%可溶性 PVP,20mmol/L β -巯基乙醇,20 mmol/L EDTA (pH8.0)],8000r/min 离心 5min,取沉淀重复洗涤 1 次,再取沉淀加入 500 μ l 裂解缓冲液[100mmol/L Tris · HCl (pH8.0),20 mmol/L EDTA (pH8.0),500 mmol/L NaCl,1.5%SDS],65℃水浴 30min,不时轻轻颠倒,取出加入 500 μ l 氯仿:异戊醇[24:1(v:v)],颠倒成乳浊状,10 000 r/min 离心 10min,取上清加入 0.6 (v/v)异丙醇,置-20℃冰箱 30min,12 000 r/min 离心 10min,取沉淀,溶于 100 μ l TE(含 RNase 5 μ g/ml),37℃水浴 1h,用等体积酚:酚:氯仿:异戊醇[25:24:1(v:v:v)]、氯仿:异戊醇[24:1(v:v)]抽提,取上层加入 1/10 (v/v)3mol/L NaAc,加入 2.5(v/v)无水乙醇沉淀,放入-20℃冰箱 30min,12 000 r/min 离心 10min,沉淀用 70%(v:v)乙醇洗涤,晾干后,溶于 50 μ l TE 中,备用。

DNA 定量采用紫外分光光度计(岛津 UV-7401PC 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 λ DNA 为标准品,以 A260 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 分子质量参照物比较定量而得。

1.3 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,适合水杉 RAPD 分析的 PCR 反应程序(用 6℃循环水冷却):94℃ 5min 1 个循环,再 94℃ 1min,40℃ 1min,72℃ 2min,共 40 个循环;最后一个循环 72℃延伸 5min,使 DNA 片段完全延伸。

1.4 RAPD 扩增条件

水杉 RAPD 扩增条件:15 μ l PCR 反应体积,1 \times *Taq* 酶缓冲液,0.2mmol/L 4 \times dNTP,1U *Taq* 酶(上海华美公司),10ng 模板 DNA,20pmol 引物(上海 Sangon 公司);MgCl₂ 1.5mmol/L。七子花 RAPD 扩增条件:15 μ l PCR 反应体积,1 \times *Taq* 酶缓冲液,0.1mmol/L 4 \times dNTP,1U *Taq* 酶(上海华美公司),10ng 模板 DNA,20pmol 引物(上海 Sangon 公司);MgCl₂ 2.5mmol/L。

1.5 PCR 产物的鉴定

扩增产物取 10 μ l 在 1.4% 琼脂糖凝胶(1 \times TAE,含 5mg/ml 溴化乙锭)上进行电泳分析,于紫

外透射反射分析仪观察并用 Leica 数码相机拍照。

2 结果与分析

2.1 BSA 对 RAPD 条带的影响

BSA 量的变化对植物 RAPD 扩增的条带的数量和强弱影响较大,结果如图 1 所示。不同浓度的 BSA 对水杉和七子花的影响不同。在水杉扩增体系中,BSA 浓度为 0.6 μ g/ μ l 对 RAPD 扩增效果的改善最明显,并且 BSA 浓度从 0.6 μ g/ μ l 至 4 μ g/ μ l 范围内对扩增效果的影响不大,但当浓度变为 6 μ g/ μ l 时,扩增条带的亮度略有减弱;而在七子花扩增体系中,BSA 浓度为 1 μ g/ μ l 时就具有较强的扩增条带,并且 BSA 浓度从 1 μ g/ μ l 至 4 μ g/ μ l 范围内对扩增效果的影响不大,但当浓度变为 6 μ g/ μ l 时,扩增条带的亮度略有减弱。BSA 的浓度变化范围与文献中应用的 BSA 浓度相差不大,如叶冰莹等^[6]应用 2~3 μ g/ μ l BSA 可获得最佳扩增效果,而任军等^[7]应用 0.5 μ g/ μ l。我们倾向于用 <3 μ g/ μ l,因为当浓度 >4 μ g/ μ l 时会发现 RAPD 产物呈现乳白颜色,并结成块状,对电泳的加样有明显的影。国外也有文献报道以 0.25 μ g/ μ l^[5]为最适浓度,我们发现,在水杉的 RAPD 扩增中,较低浓度即 0.6 μ g/ μ l 就可达到最佳扩增效果,但在七子花 RAPD 扩增中至少 BSA 浓度需达到 1 μ g/ μ l 才可获得最佳的效果。从 BSA 的作用分析原因可能是七子花 DNA 中杂质含量较高,需要较高浓度的 BSA 用于封闭杂质对 *Taq* 酶活性的影响。另外据报道,不同厂家来源的 BSA 对 PCR 结果的改善作用不尽相同,包括其最适浓度。因此在 RAPD 反应系统中添加 BSA 的最适浓度也要经过摸索才可确定。

2.2 乙酰化的 BSA 对 RAPD 扩增条带的影响

据文献报道,乙酰 BSA 对 PCR 反应具有明显的抑制作用,直到降低至 0.1ng/ μ l^[9]。我们研究发现当浓度降低至 0.1ng/ μ l 时乙酰 BSA 对七子花的 RAPD 仍有明显的抑制作用。但这种抑制作用可被 BSA 所封闭。如图 2 所示,0.1~10ng/ μ l 浓度范围内的乙酰 BSA 对 RAPD 有明显的抑制作用。当反应体系中含有 0.1 μ g/ μ l 的乙酰 BSA 时,添加 0.5 μ g/ μ l BSA 对乙酰 BSA 没有明显的封闭作用,但当 BSA 增加到 1 μ g/ μ l 时就可明显封闭乙酰 BSA 的抑制作用,可以扩增出明显的条带;当浓度增加至 2 μ g/ μ l 时,RAPD 扩增条带非常清晰。

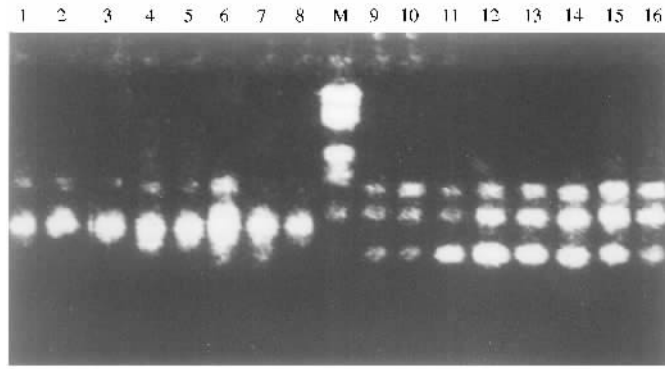


图 1 BSA 浓度对植物 RAPD 扩增效果的影响

1~8:水杉 RAPD 扩增结果(引物 S350),BSA 浓度分别为 $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$;
M: $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI}+\text{HindIII}$ 标准分子质量参照物;9~16:七子花 RAPD 扩增结果(引物 S31),BSA 浓度分别为 $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、
 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

Fig. 1 The effect of BSA concentrations on RAPD amplification in plants

1~8:RAPD amplification of *Metasequoia glyptostroboides* (primer S350), the concentration of BSA were $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、
 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively; M: marker $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI}+\text{HindIII}$; 9~16: RAPD amplification of *Heptacodium*
miconioides (primer S31), the content of BSA was $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively.

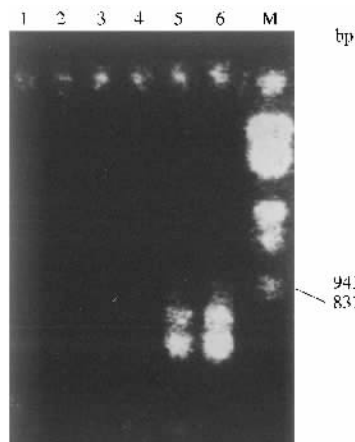


图 2 乙酰 BSA 对七子花 RAPD 扩增条带的影响(引物 S32)

1~3:RAPD 反应体系中的乙酰 BSA 浓度分别为 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、
 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ 和 $10\text{ng}/\mu\text{l}$; 4~6: RAPD 反应体系中含有的乙酰 BSA
($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 含有的 BSA 的浓度分别为 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和
 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$; M: $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI}+\text{HindIII}$ 标准分子量参照物。

Fig. 2 The influence of acetylated BSA on RAPD in *Heptacodium miconioides* (primer S32)

1~3:RAPD amplification with acetylated BSA, the concentra-
tions of which were $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ and $10\text{ng}/\mu\text{l}$, respectively;
4~6:RAPD amplification with $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ acetylated BSA, the
concentrations of BSA were $0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
respectively; M: marker $\lambda\text{DNA}/\text{EcoRI}+\text{HindIII}$.

2.3 BSA 对 *Taq* 酶浓度的影响

据国外文献报道,BSA 可以封闭扩增系统中 *Taq* 酶抑制物的抑制作用^[5],BSA 用于 PCR 可用于改善扩增结果的特异性与酶的稳定性^[9]。如果没有 BSA,将会明显减少 PCR 产物及产量^[10]。未加 BSA 时,七子花的 RAPD 扩增的最佳酶浓度为 3U,如图 3A 所示。但当在反应体系中添加 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA 时,最佳的 *Taq* 酶浓度降低为 0.5U,如图 3B 所示。在水杉 RAPD 扩增中也显示类似结果,当反应体系中添加 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA 时,最佳的 *Taq* 酶浓度降低为 0.5U(如图 3C 所示)。结果显示,添加 BSA 可以明显降低 *Taq* 酶的用量。

3 讨 论

BSA 的一个可能作用机制是作用于多酚体系,植物 DNA 中常含有内源的多酚类化合物,多酚化合物可与相应的蛋白质结合,致使酶失活,而 BSA 可以通过其上富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物的阴离子相互作用,或是通过疏水相互作用力消除内源的多酚类化合物,而起到消除多酚化合物与蛋白质的作用,即阻止它们与 *Taq* 酶结合,从而提高酶的活性,以最终对 PCR 反应起到改善的作用^[9]。从不同浓度的 BSA 对七子花 DNA 及水杉 DNA 的 RAPD 扩增反应的不同影响,可以看出 BSA 的用量

主要与植物 DNA 的质量有关,若 DNA 中含有较多酚类化合物,则所需的 BSA 的浓度相应较高。由于经抽提纯化的植物 DNA 中含有一定量的杂质,如多糖、酚类化合物等,往往会影响 PCR 扩增反应,而

添加适量的 BSA 可以封闭这种影响;同时添加 BSA 还可以降低 *Taq* 酶的用量。因此在植物 RAPD 分析中,添加 BSA 是一种既经济又有效的辅助措施。

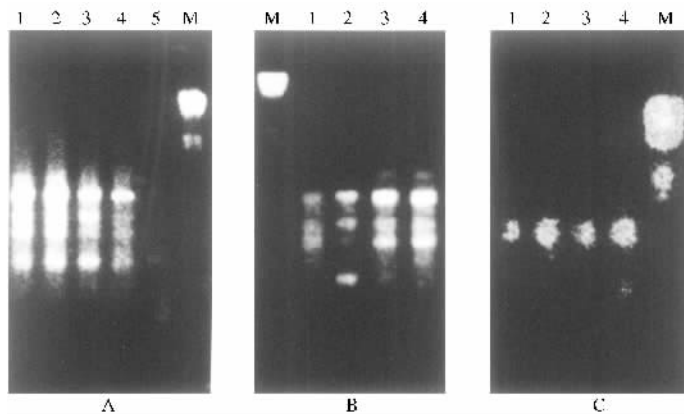


图 3 *Taq* 酶单位对植物 RAPD 扩增的影响

A 图:(引物 S122)1~5:未添加 BSA 时,*Taq* 酶单位对七子花 RAPD 扩增的影响,*Taq* 酶单位分别为 4U、3U、2U、1U 和 0.5U; M:λDNA/*Hind*III 标准分子质量参照物。

B 图:(引物 S122)M, λDNA/*Eco*RI+*Hind*III 标准分子质量参照物;1~4:添加 BSA 时,*Taq* 酶单位对七子花 RAPD 扩增的影响,*Taq* 酶单位分别为 3U、2U、1U 和 0.5U。

C 图:(引物 S302)1~4:添加 BSA 时,*Taq* 酶单位对水杉 RAPD 扩增的影响,*Taq* 酶单位分别为 3U、2U、1U 和 0.5U; M:λDNA/*Eco*RI+*Hind*III 标准分子质量参照物。

Fig. 3 The effect of the units of DNA *Taq* polymerase on RAPD amplification in plants

A:(primer S122) 1~5:Influences of the units of *Taq* polymerase on *Heptacodium miconioides* RAPD amplification with no BSA, the units of *Taq* polymerase were 4U,3U,2U,1U and 0.5U, respectively;M:Marker λDNA/*Hind*III.

B:(primer S122) M;Marker λDNA/*Hind*III 1~4:Influences of the units of *Taq* polymerase on *Heptacodium miconioides* RAPD amplification with 2μg/μl BSA, the units of *Taq* polymerase were 3U,2U,1U and 0.5U, respectively.

C:(primer S302)1~4:Influences of the units of *Taq* polymerase on *Metasequoia glyptostroboides* RAPD amplification with 2μg/μl BSA, the units of *Taq* polymerase was 3U,2U,1U and 0.5U, respectively;M:Marker λDNA/*Eco*RI+*Hind*III.

参考文献(References):

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Liavak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18(22): 6531~6535.
- [2] 王晓梅, 宋文芹, 李秀兰, 等. 用 RAPD 技术检测野生鲫鱼和四个金鱼代表品种的基因组 DNA 多态性[J]. 遗传, 1998, 20(5): 7~11.
- [3] 左开井, 孙济中, 张金发, 等. 用 RAPD 标记评估我国棉花品种遗传多样性[J]. 遗传学报, 2000, 27(9): 817~823.
- [4] 尹佟明, 李淑娴, 郑阿宝, 等. 四甲基氯化铵在杨树 RAPD 扩增反应中的作用[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(2): 11~13.
- [5] Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 485~493.
- [6] 叶冰莹, 陈由强, 朱锦懋, 等. 花生 RAPD 反应条件的研究[J]. 花生科技, 2000, 5(1): 23~25.
- [7] 任军, 黄路生, 高军, 等. 利用随机扩增多态 DNA 技术对江西地方黑猪群体遗传关系的初步研究[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(4): 13~15.
- [8] 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.
- [9] Kreader C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(3): 1102~1106.
- [10] Forbes B A, Hicks K E. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR; effects of bovine serum albumin[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9): 2125~2128.