

# 小麦 RAPD 扩增时间循环参数及琼脂糖浓度的优化\*

何丽莲<sup>1</sup>, 李元<sup>2\*\*</sup>

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201;  
2. 云南农业大学生态环境研究所, 云南昆明 650201)

**摘要:** 对小麦 RAPD 常规的扩增循环参数及琼脂糖浓度进行了试验优化。结果表明:适宜的扩增循环参数为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 15 s → 36 °C 15 s → 72 °C 30 s 40 个扩增循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保持。用于电泳介质的琼脂糖最佳浓度为 2%。时间比常规减少一半。

**关键词:** 小麦; RAPD; 循环参数; 琼脂糖浓度; 优化

**中图分类号:** S 512. 1. 032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2006)03 - 0283 - 04

## Optimization for Circular Parameter and Agarose Concentration of RAPD in Wheat

HE Li-lian<sup>1</sup>, LI Yuan<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Y A U, Kunming 650201, China;  
2. Institute of Eco-Environment Research, Y A U, Kunming 650201, China)

**Abstract:** This paper involved in Optimization for Circular Parameter and Agarose Concentration of RAPD in Wheat. The circular parameter of RAPD was 94 °C 2 min predenaturation, 94 °C 15 s → 36 °C 15 s → 72 °C 30 s by 40 cycling, 72 °C 10 min extending, 4 °C holding. As media of electrophoresis, optimum concentration of agarose was 2%. The time has decreased by one-second.

**Key words:** wheat; RAPD; circular parameter; agarose concentration; optimization

保持 RAPD 结果的稳定性一直是人们探讨的问题,影响其稳定性的因素很多,大致可分为:模板 DNA 的浓度和纯度、DNA 的反应体系、RAPD 扩增循环参数和琼脂糖浓度<sup>[1~3]</sup>。在小麦 RAPD 分析中,人们对模板 DNA, DNA 的反应体系以及扩增循环温度对 RAPD 结果的影响已有研究,并筛选出反应体系中各成分适宜的浓度和扩增循环温度<sup>[4,5]</sup>。而对 RAPD 扩增时间循环参数研究较少,通常的 RAPD 分子标记所采用的扩增程序是:模板 DNA 在 94 °C 变性解链 1 min → 36 °C 使引物与模板退火 1 min → 72 °C 延伸 1 ~ 2 min, 经过 45 个循环后,产物经琼脂糖凝胶电泳,溴化已锭染色,用紫外光进行检测,这一程序耗时 7 ~ 8 h<sup>[6,7]</sup>。

RAPD 反应灵敏。变性、退火、延伸时间等都是保持其稳定性的重要因素。同时,适当的琼脂糖浓度对试验结果的稳定性和可靠性也十分重要。在确保 RAPD 分析结果的重复性和稳定性的基础上,为了缩短 PCR 扩增时间,本文通过改变单因子试验对扩增时间循环参数和琼脂糖浓度进行了优化。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料

小麦品种:文麦 3 号、辽春 9 号、凤麦 24 号和云麦 39 号

#### 1.2 仪器及试剂

PCR 扩增仪 PE9600(美国),电泳仪,成像系统

收稿日期: 2005 - 09 - 30

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160023)

\*\* 通讯作者

作者简介: 何丽莲(1970 -),女,四川洪雅人,硕士,实验师,主要从事环境生态研究。

GDS, RAPD 引物试剂盒(美国 Operon 公司), Taq 酶(美国 Promesa 公司), DNA Marker (DL2000)

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DNA 提取

按 ZHENG 等的方法<sup>[8]</sup>稍加修改后进行提取。

取小麦新鲜叶片 250 mg, 置于已灭菌的研钵中, 加入液氮研磨成粉, 迅速转入盛有 DNA 提取液(2% SDS, 1% CTAB, 10 mmol/L Tris - HCl, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L NaCl, pH = 8.0) 的离心管中, 于 65 °C 水浴保温 30 min 以上(其间摇动离心管 2 ~ 3 次)。用等体积的氯仿 - 异戊醇(氯仿: 异戊醇 = 24:1) 抽提 5 min, 10 000 r/min 下离心 12 min, 取上清液转入另一离心管中, 重复抽提 1 次。用等体积异丙醇沉淀 DNA 30 min 以上, 10 000 r/min 下离心 12 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次后置于超净工作台上吹干。用适量的 TE(10 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0) 溶解, 4 °C 保存备用。

#### 1.3.2 RAPD 扩增反应体系

RAPD 扩增反应在美国 PERKIN ELMER 公司生产的 9600 型 PCR 仪上进行。反应体积为 25  $\mu$ L, 反应体系为: 10  $\times$  Reaction Buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris - HCl, pH = 8.0) 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 15 ng (5  $\mu$ mol/L) 的引物(美国 OPERON 公司产品) 1  $\mu$ L, 25 ng 的模板 DNA 1  $\mu$ L, Taq 酶(上海 Promega 公司生产) 1 U(0.2  $\mu$ L), 无菌双蒸水 16.3  $\mu$ L; 反应体系用 20  $\mu$ L 石蜡油覆盖<sup>[4,5]</sup>。

#### 1.3.3 循环参数的优化

一般的扩增程序为 94 °C 2 min; 94 °C 1 min  $\rightarrow$  36 °C 1 min  $\rightarrow$  72 °C 2 min(40 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C  $\rightarrow$   $\infty$ 。

试验在一般循环参数的基础上, 随机选取文麦 3 号、凤麦 24 号的 DNA 为模板, 引物为美国 Operon 公司供应的 OPJ - 16, OPJ - 20, 对变性时间、退火时间、延伸时间进行 4 个水平单因子试验, 3 次重复。试验方案如表 1 所示。

#### 1.3.4 琼脂糖浓度优化

为了得到清晰度高、重复性好的谱带, 本试验设计了 4 个浓度梯度, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%。选取文麦 3 号、辽春 9 号、凤麦 24 号、云麦 39 号的 DNA 为模板, 引物 OPJ - 20, 用优化后的扩增循环参数: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s  $\rightarrow$  36 °C 15 s  $\rightarrow$  72 °C 30 s

(40 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C  $\rightarrow$   $\infty$ , 用 100 V 的电泳电压对琼脂糖浓度进行优化试验。

表 1 RAPD 循环参数优化方案

Tab. 1 Optimization plan for circular parameter of RAPD

变性时间/s denaturation time	退火时间/s annealing time	延伸时间/s extension time
5	5	10
15	15	30
30	30	60
60	60	120

#### 1.3.5 体系稳定性检测

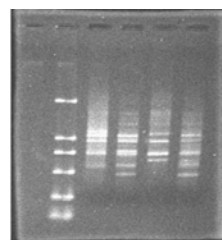
选取文麦 3 号、辽春 9 号、凤麦 24 号、云麦 39 号的 DNA 为模板, 引物 OPJ - 16, 用 2% 的琼脂糖检测优化后的扩增循环参数和琼脂糖浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 循环参数的优化结果

#### 2.1.1 变性时间优化结果(图 1)

从图 1 中可看出, 变性时间从 5 ~ 60 s 均有带, 5 s 泳道虽有条带, 但泳道上还有剩余的 DNA, 表明变性时间不够。60 s 泳道条带模糊, 是因为尽管 Taq 酶在 94 °C 的环境下数分钟后仍具有活性, 但其生命活性的跨度是有限的, 反复经历 60 s 的变性时间, 必然降低其催化活性, 影响扩增效果。15 s 泳道条带清晰且丰富, 说明变性时间缩至 15 s 对于 RAPD 反应中模板的解链是足够的。在一定范围内, 变性时间越短, Taq 酶催化活性越强, 越有利于 PCR 反应。



引物为 OPJ-20, 模板 DNA 为文麦 3 号  
RAPD 图谱从左至右为 marker  $\rightarrow$  5s  $\rightarrow$  15s  $\rightarrow$  30s  $\rightarrow$  60s  
Primer: OPJ-20, Template DNA: Wenmai 3  
Form left to right: marker  $\rightarrow$  5s  $\rightarrow$  15s  $\rightarrow$  30s  $\rightarrow$  60s

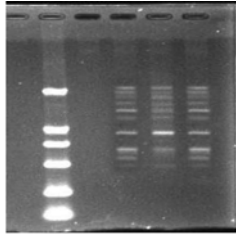
图 1 变性时间优化结果

Fig. 1 Optimization for denaturation time

#### 2.1.2 退火时间优化结果(图 2)

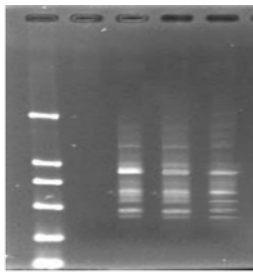
结果表明, 5 s 泳道无带, 说明太短的退火时间

不足于让引物与模板的特定结合位点相结合,导致引物的碱基序列不能与相应的模板碱基序列配对。15 s,30 s,60 s 泳道带型基本一致,将小麦 RAPD 的退火时间确定为 15 s。



引物为OPJ-16, 模板DNA为凤麦24号  
RADP图谱从左至右为marker→5s→15s→30s→60s  
Primer:OPJ-16, TemplateDNA: Fengmai24  
Form left to right: marker→5s→15s→30s→60s

图2 退火时间优化结果  
Fig. 2 Optimization for annealing time



引物为OPJ-16, 模板DNA为文麦3号  
RADP图谱从左至右为marker→10s→30s→60s→120s  
Primer:OPJ-16, TemplateDNA: Wenmai3  
Form left to right: marker→5s→15s→30s→60s

图3 延伸时间优化结果  
Fig. 3 Optimization for extension time

### 2.1.3 延伸时间优化

如图3所示,10 s 泳道无条带,30 s,60 s 与 120 s 泳道带型基本一致。确定延伸时间为 30 s。

根据以上试验结果,确定小麦的扩增循环参数为94 ℃2 min;94 ℃15 s→36 ℃15 s→72 ℃30 s(40 个循环);72 ℃10 min;4 ℃→∞。

### 2.2 琼脂糖浓度优化

从图4,图5,图6,图7中可以看出,1%的琼脂糖摩擦系数较小,对DNA分子的阻力较小,迁移率较大,但其孔隙大,分辨率低下。随着琼脂糖胶浓度的升高,DNA分子的摩擦阻力增大。迁移率变小,同时分辨率增加,2%琼脂糖能将不同的DNA分子彻底分离开来,电泳图谱条带清晰可辨。2.5%琼脂糖摩擦系数太大,使得一些大分子的迁移率太小,不

能很好地分散条带,降低了条带的分辨率。

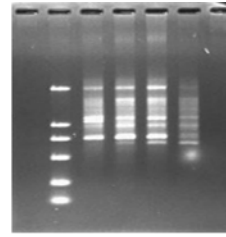


图4 1%琼脂糖胶电泳结果(t:2 h)  
Fig. 4 Electrtogramphore of 1% agarose gel

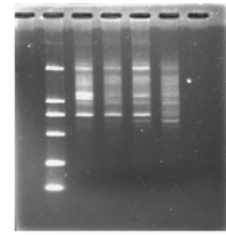
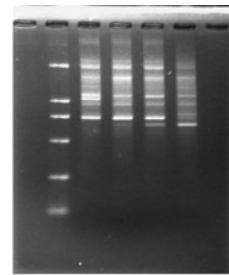
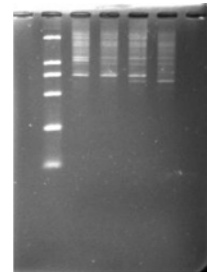


图5 1.5%琼脂糖胶电泳结果(t:2.5 h)  
Fig. 5 Electrtogramphore of 1.5% agarose gel



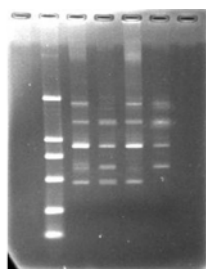
引物为OPJ-20; RAPD图谱从左至右为  
marke→文麦3号→辽春9号→凤麦24号→云麦39号  
Primer:OPJ-20; Form left to right:  
marker→Wenmai3→Liaochun9→Fengmai24→Yunmai39

图6 2%琼脂糖胶电泳结果(t:3 h)  
Fig. 6 Electrtogramphore of 2% agarose gel



引物为OPJ-20; RAPD图谱从左至右为  
marke→文麦3号→辽春9号→凤麦24号→云麦39号  
Primer:OPJ-20; Form left to right:  
marker→Wenmai3→Liaochun9→Fengmai24→Yunmai39

图7 2.5%琼脂糖胶电泳结果(t:3.5 h)  
Fig. 7 Electrtogramphore of 2.5% agarose gel



引物为 OPJ-16 RAPD 图谱从左至右为  
marker→文麦3号→辽春9号→凤麦24号→云麦39号  
Primer: OPJ-16; Form left to right:  
marker→Wenmai3→Liaochun9→Fengmai24→Yunmai39

图 8 RAPD 体系稳定性检测结果  
Fig. 8 Examination for RAPD stability

### 2.3 RAPD 体系稳定性检测

15 s 的变性时间、15 s 的退火时间和 30 s 的延伸时间是最佳的反应时间。这一时间下的扩增产物经 2% 的琼脂糖电泳, 条带清晰, 具有很高的稳定性和可靠性。

### 3 讨论

(1) RAPD 技术自 1990 年由 WILLIAMS 和 WELSH 建立以来, 因其特异、快速、操作简便、敏感的优点, 在微生物分型和检测, 生物亲缘关系的鉴定以及遗传育种中已得到广泛应用。由于 RAPD 在一些作物上扩增产物的重复性和稳定性差, 受反应条件的影响很大, 从而严重影响试验结果的可靠性。因此, RAPD 的稳定性是一个非常重要的问题, 并日益受到关注<sup>[2,3,9,10]</sup>。主要集中于以下几方面: ①提取高质量 DNA, 这是提高 RAPD 稳定性的关键因素。②优化反应体系与扩增条件。③在反应中尽量使用同一批试剂, 同一台 PCR 仪, 尽量减少系统误差。④选择好琼脂糖浓度, 提高电泳分辨率。⑤在统计扩增谱带时, 只统计重复出现的条带。

(2) 本试验确定的小麦 RAPD 最佳的扩增程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s→36 °C 15 s→72 °C 30 s

(40 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C →∞。利用该程序扩增大约历时 2 h 左右, 比常规扩增程序节省了近一半的时间, 大大提高了 RAPD 试验的效率。为进一步开展小麦的 RAPD 研究提供了参考。

(3) 本试验中, RAPD 扩增产物用 2% 的琼脂糖电泳, 条带清晰, 具有较高的稳定性和重复性, 提高了小麦 RAPD 结果分析的可靠性。

致谢: 云南省植物病理重点实验室对试验给予支持和帮助, 特此致谢。

### [参考文献]

- [1] 陈若雷, 宋道军, 余增亮. RAPD 分子标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 生物学杂志, 2000, 17(4): 32-34.
- [2] 任瑞文, 卢强, 徐晓立. 提高 RAPD 稳定性的几点经验与探讨[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 40-41.
- [3] 夏铭. RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化[J]. 植物研究, 1999, 19(2): 195-200.
- [4] 郭长虹, 石锐, 王同昌. 小麦 RAPD 反应体系的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1999, 15(1): 77-80.
- [5] 安德荣. 影响小麦 RAPD 稳定性的试验技术研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(1): 14-17.
- [6] 沈发富, 于元杰. 小麦双引物 RAPD 分析方法的研究[J]. 西北植物学报, 1998, 18(3): 428-432.
- [7] 陈建莉. 用 Langdon 二体代换系统建立染色体 RAPD 标记[J]. 遗传学报, 1996, 23(10): 32-39.
- [8] ZHENG K L, SUBUDI P K, DOMIGO J. Rapid DNA isolation for marker-assisted selection in rice breeding[J]. Rice Genet. Newsl, 1995, 12: 255-258.
- [9] 焦锋, 楼成富. RAPD 技术应用中的一些问题及对策[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4): 98-102.
- [10] 刘春林. 关于植物随机引物扩增多态性 DNA 标记的可靠性问题[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 125-128.