

## 天麻 PCR 反应体系的建立<sup>\*</sup>

王德信<sup>1,2</sup>, 段承俐<sup>1,2</sup>, 文国松<sup>1,2</sup>, 熊清泉<sup>3</sup>, 萧凤回<sup>1,2\* \* \*</sup>

( 1. 云南农业大学中药材研究所, 云南省中药材规范化种植技术指导中心, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

3. 云南九华生物科技有限公司, 云南 昭通 657000 )

**摘要:** 通过对  $Mg^{2+}$ , dNTP, 随机引物、模板 DNA, TaqDNA 聚合酶浓度等反应参数的系统研究, 建立了天麻 RAPD 分析体系。该体系反应总体积 20  $\mu$ L, 其中  $MgCl_2$  2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, 模板 20 ng, 随机引物 0.3  $\mu$ mol/L, Taq 酶 1.5 U。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 35 s, 36  $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。结果表明该体系具有良好的稳定性和重复性, 可应用于天麻的演化、系统分类、品种鉴定等研究。

**关键词:** 天麻; PCR; 反应体系

中图分类号: S 567.239 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2004)05-0514-04

## Establishment of PCR Reaction System in *Gastrodia elata*

WANG De-xin<sup>1,2</sup>, DUAN Cheng-li<sup>1,2</sup>, WEN Guo-song<sup>1,2</sup>, XIONG Qing-quan<sup>3</sup>, XIAO Feng-hui<sup>1,2</sup>

( 1. Institute of Chinese Medical Materials, Yunnan Agricultural University,

Yunnan Provincial Center for Chinese Medicinal Materials' GAP Technology, Kunming 650201, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Yunnan Jiuhua Biological Technology Co. Ltd, Zhaotong 657000, China )

**Abstract:** A RAPD analysis system has been established for *Gastrodia elata* through the optimization of the concentrations of  $Mg^{2+}$ , dNTP, random primer, template DNA and Taq DNA Polymerase. The reaction volume was 20  $\mu$ L, containing 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.25 mmol/L dNTP, 20 ng template DNA, 0.3  $\mu$ mol/L random primer and 1.5 U Taq DNA Polymerase. The PCR cycle was designed as following: pre-denaturing at 94  $^{\circ}$ C for 5 min, denaturing at 94  $^{\circ}$ C for 35 s, annealing at 36  $^{\circ}$ C for 35 s, extension at 72  $^{\circ}$ C for 1 min, total 40 cycles, then extension at 72  $^{\circ}$ C for 5 min. The results show that this system is stable and repeatable and can be used in the studies of *Gastrodia elata* evolution, systematic classification and variety identification.

**Key words:** *Gastrodia elata*; PCR; reaction system

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是我国名贵的中药材, 属兰科(Orchidaceae)天麻属多年生草本植物。天麻具有平肝息风、祛风定惊、抗炎免疫的功效, 可镇静安神、镇痛、扩血管、降压及增强机体免疫功能, 对中枢神经系统和心血管系统均有良好作

用<sup>[1]</sup>。

天麻属植物在世界各地分布的有 30 多种, 我国确认的有 5 个种, 常作药用的是天麻和 5 个变型, 即根据外部形态特征分为天麻(红天麻)、乌天麻、黄天麻、绿天麻、松天麻和毛天麻 6 个变型, 变

\* 收稿日期: 2004-06-05

\* \* 通讯作者

基金项目: 云南省中药现代化科技产业专项重点项目(2002ZY-24; 2002ZY-1)。

作者简介: 王德信(1975-), 男, 山东省聊城人, 在读硕士研究生, 主要从事天麻遗传资源研究。

间型和变型内遗传背景差异较大<sup>[2]</sup>。目前,天麻遗传与育种基础的研究还非常薄弱,天麻的种质资源学和演化研究也没有系统开展。因此,开展天麻遗传资源的研究具有重大意义。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术自1990年诞生以来<sup>[3,4]</sup>,因其具有快速、简便、多态性检出率高等特点,而广泛用于遗传图谱的构建,品种鉴别,分子标记辅助育种等诸多方面的研究<sup>[5,6]</sup>。在柴胡、金线莲、芦荟、大血藤、建泽泻、石斛、人参、西洋参、鱼腥草等多种药用植物的研究中也广泛应用<sup>[7~14]</sup>。本研究通过对影响天麻 PCR 反应体系的几个参数如模板 DNA, TaqDNA 聚合酶、随机引物, Mg<sup>2+</sup>, dNTP 浓度的系统研究,在多次重复试验的基础上建立了适合于天麻的 RAPD 反应体系,为该技术在天麻的演化、系统分类、种源鉴定、遗传多样性及亲缘关系等方面的进一步应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取自云南昭通市彝良县小草坝天麻种植基地的黄天麻变型。

### 1.2 DNA 的提取

采用液氮研磨和改良的 CTAB 法提取天麻样品中的基因组 DNA<sup>[15]</sup>。取 2~3 朵花,在液氮中研磨成粉末状,加入 CTAB 提取液(2% CTAB, 100 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2%  $\beta$ -巯基乙醇)浸提,再加入 1/2 体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提,用无水乙醇沉淀 DNA,然后用 1  $\times$  TE 缓冲液(含有 10  $\mu$ g/ $\mu$ L RNaseA)溶解 DNA,使用岛津 UV-120-02 型紫外分光光度计对 DNA 的浓度进行测定,每份 DNA 样品的浓度最终稀释为 10 ng/ $\mu$ L。

### 1.3 PCR 反应参数

PCR 反应在 T-Gradient (Biometra, 德国) PCR 仪上进行,反应总体积为 20  $\mu$ L。每一 RAPD 影响因素都有一个适应范围<sup>[16~19]</sup>,对于影响 RAPD 因素设立 1 个反应梯度,每次仅改变 1 个 PCR 参数,并保持其它条件不变,逐个研究每个参数对 RAPD 结果的影响,各影响参数的试验设计见表 1。反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C 变性 35 s,36  $^{\circ}$ C 退火 35 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。所用试剂:TaqDNA 聚合酶(Promega 公司),dNTP(华美公司),随机引物为 Y-15(北方同正提供 Operon 公司随机引物)。

表 1 PCR 反应参数的试验处理

Tab. 1 The experimental treatments of PCR parameters

影响因子	A		B		C		D		E	F		
Mg <sup>2+</sup>	1.5	2.0	2.5		2.5		2.5		2.5	2.5		
	0.5	3.0										
dNTP/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.3		0.15	0.2	0.3		0.3		0.3	0.3		
			0.25	0.30								
			0.35									
模板 DNA/ng	20		20		10	20	30	20		20		
					40	50						
引物/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )	0.3		0.3		0.3		0.1	0.2	0.3		0.3	
							0.4	0.5				
Taq 酶/u	1.5		1.5		1.5		1.5		1.5		0.5	1.0
											1.5	2.0

### 1.4 RAPD 产物的检测

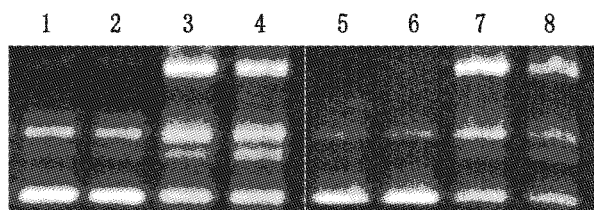
RAPD 产物加 3  $\mu$ L 上样缓冲液在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离,0.5  $\mu$ L/mL 溴化乙锭染色 20 min 后,在凝胶成像仪上观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 Taq 酶浓度的筛选

PCR 扩增能否正常进行与 Taq 酶活性及用量

有直接关系, Taq 酶是 PCR 反应中极为重要的因子。本研究设计了 0.5 U, 1 U, 1.5 U 和 2 U 4 个浓度梯度, 结果表明, 反应体系中用 1.5 U Taq 酶可以得到良好的扩增效果(图 1)。继续提高酶的用量并不能明显提高扩增产物的量, 酶量过大, 不仅造成浪费, 而且使非特异性扩增产物增加, 酶量过低, 则扩增产物减少。



泳道 1~4 TaqDNA 聚合酶浓度分别为 0.5 U, 1 U, 1.5 U 和 2 U。泳道 5~8  $Mg^{2+}$  浓度分别为 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

图 1 不同 Taq 酶浓度和不同  $Mg^{2+}$  浓度的扩增结果

Fig. 1 The PCR results amplified under different Taq DNA polymerase and  $Mg^{2+}$  concentrations

## 2.2 $Mg^{2+}$ 浓度的筛选

$Mg^{2+}$  是 Taq DNA 聚合酶的激活剂, 其浓度对酶的活性、PCR 反应的特异性和扩增效果均有明显的影响, 因此确定  $Mg^{2+}$  的最佳浓度是极为重要的。试验对 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L 共 4 种不同  $Mg^{2+}$  浓度进行了扩增。图 1 显示不同的  $Mg^{2+}$  浓度条件下扩增效果明显不同。当  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L 时, 扩增效果最为理想。浓度过低使扩增产物减少, 甚至不能扩增, 浓度过高, 则会使非特异性扩增产物增加。

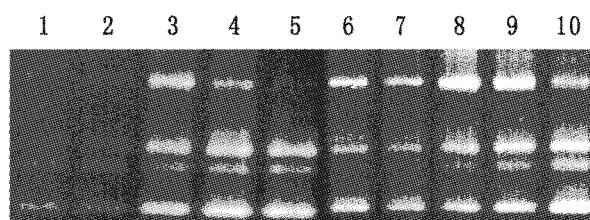
## 2.3 引物浓度的筛选

引物浓度的变化实质上是改变了引物和模板配对的几率, 从而影响扩效果。引物浓度过低, 导致引物和模板的结合率降低, 使扩增反应过早终止, 扩增带很弱, 甚至得不到可观察的结果。引物浓度过高, 引物与模板的非特异性配对增多, 出现非特异性扩增。在 RAPD-PCR 中引物浓度最佳范围为 0.1~2.0  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[16]</sup>。设计了 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  共 5 个浓度梯度, 图 2 的扩增结果显示, 0.3  $\mu\text{mol/L}$  为天麻 PCR 反应的理想引物浓度, 扩增出的条带效果较好。

## 2.4 dNTP 浓度的筛选

dNTP 是 RAPD 扩增的反应底物, dNTP 量的多少直接关系到扩增产物量的多少, 并对 RAPD 的非

特异性扩增也有一定的影响。本实验设计了 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 mmol/L 共 5 个浓度梯度, PCR 的扩增结果表明(图 2), dNTP 为 0.3 mmol/L 时扩增出的条带多且较清晰。浓度过低, 扩增产物明显减少或结果不稳定或扩增出来的带模糊不清。浓度过高, 则会产生错误掺入。



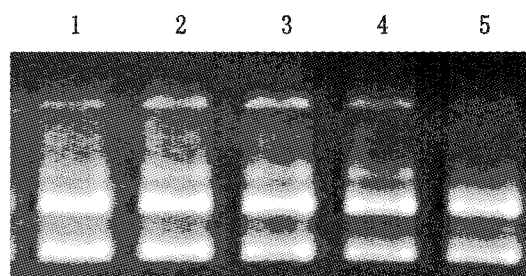
泳道 1~5 的引物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; 泳道 6~10 的 dNTP 浓度分别为 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 mmol/L。

图 2 不同引物浓度和不同 dNTP 浓度条件下的扩增效果

Fig. 2 The PCR results amplified under different primer and dNTP concentrations

## 2.5 模板 DNA 浓度的筛选

RAPD 对模板的适应性很大, 为了获得良好的扩增效果, 本研究设计了 10, 20, 30, 40, 50 ng 5 个 DNA 模板浓度梯度, 均有扩增产物产生, 20 ng~50 ng 扩增效果差异不大(图 3)。扩增结果表明, RAPD 对模板 DNA 要求不太严格, 有较大的浓度范围, 但是过量的模板 DNA 会造成扩增产物出现弥散的现象, 经过多次重复试验认为模板 DNA 浓度在 20~30 ng 之间较为适宜。



泳道 1~5 的模板浓度分别为 50, 40, 30, 20 和 10 ng

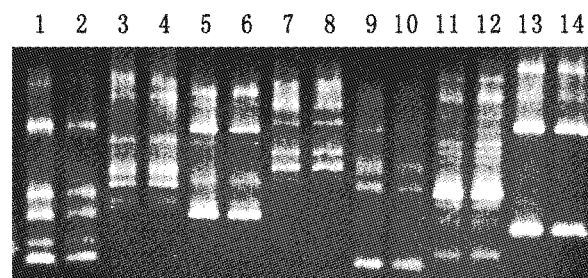
图 3 不同模板浓度条件下的扩增结果

Fig. 3 The PCR results amplified under different template concentrations

## 2.6 优化的天麻 RAPD 体系的建立

通过对天麻 PCR 扩增反应中影响扩增结果的诸多因素进行分析研究、反复实验和筛选优化, 建立了适宜于天麻 PCR 反应的最佳反应体系, 即反应总体积 20  $\mu\text{L}$ , 其中  $MgCl_2$  2.5 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, 模板 20 ng, 随机引物 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , Taq 酶

1.5 U. 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 35 s, 36 ℃ 退火 35 s, 72 μL 延伸 1 min, 40 个循环, 最后一个循环后接 72 ℃ 延伸 5 min. 图 4 是用随机引物 Y-15, Y-09, O-15, L-18, K-03, G-17 和 G-09 和该反应体系在天麻 DNA 样品中扩增出的 RAPD 带。从图 4 中可以看出, 该体系扩增出的条带清晰、强弱带明显、扩增产物量大且重复性好。



泳道 1,2 为 Y-15 引物扩增出的 DNA 条带, 泳道 3,4 为引物 Y-09 扩增出的 DNA 条带, 泳道 5,6 为引物 O-15 扩增出的 DNA 条带, 泳道 7,8 为 L-18 引物扩增出的 DNA 条带, 泳道 9,10 为引物 K-03 扩增出的 DNA 条带, 泳道 11,12 为引物 G-17 扩增出的 DNA 条带, 泳道 13,14 为引物 G-09 扩增出的 DNA 条带。

图 4 优化的 RAPD 反应体系在天麻中的 PCR 扩增结果

Fig. 4 The PCR results amplified by the optimized RAPD analysis system in *Gastrodia elata*

### 3 讨论

由于 RAPD 标记技术是基于 PCR 反应基础上, 反映 DNA 多态性的一种分子标记技术, 影响 PCR 反应的各种因素, 诸如  $Mg^{2+}$ , dNTP, 引物, TaqDNA 聚合酶、模板 DNA 的浓度等同样影响 RAPD 的扩增效果<sup>[16,17]</sup>。通过对这些因素的反复试验和筛选优化, 我们建立了一套适于天麻的 RAPD 反应体系, 该体系扩增出的条带清晰、强弱带明显、扩增产物量大且重复性好。

该体系的建立为从 DNA 分子水平研究天麻演化、系统分类和品种鉴别, 以及进一步进行天麻种质资源研究奠定了基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] 袁崇文. 中国天麻[M]. 贵州: 贵州科技出版社, 2002.
- [2] 周铤, 陈心启. 国产天麻属植物的整理[J]. 云南植物研究, 1983, 5(4): 361-368.
- [3] WILLIAMS J G, KUBLIK A R, LIVAK K J, et al.. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker[J]. Nucleic Acid Research, 1990, 18: 6 531-6 535.
- [4] WELSH J, McCLELAND M. Finger-printing genomes using PCK with arbitrary primers [J]. Nucleic Acid Research, 1990, 18: 5 275-5 279.
- [5] 赵云峰, 徐承水. RAPD 在生物学研究中的应用[J]. 曲阜师范大学学报, 2000, 26(2): 83-85.
- [6] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 随机扩增多态 DNA 规范化反应体系的探讨[J]. 生物技术通报, 2002, 3: 39-43.
- [7] 梁之桃, 秦民坚, 王崢涛, 等. 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中药材, 2002, 33(12): 1 117-1 119.
- [8] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬, 等. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(10): 949-950.
- [9] 李妮亚, 高培元, 周鹏, 等. RAPD 技术在芦荟属植物分类研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1 432-1 437.
- [10] 李钧敏, 金则新, 边才苗, 等. 大血藤 DNA 提取及 RAPD 研究初探[J]. 植物研究, 2002, 22(4): 483-486.
- [11] 胡珊梅, 周涵韬, 张启国, 等. 道地药材建泽泻的 RAPD 的研究[J]. 中草药, 2002, 33(2): 161-162.
- [12] 王爱民, 李申. 两种药用石斛 RAPD 反应的实验简报[J]. 中药材, 2002, 25(5): 324-225.
- [13] 姜玉新, 石思信, 张志娥, 等. 人参、西洋参的基因 DNA 的 RAPD 分析[J]. 特产研究, 1998, (1): 5-9.
- [14] 吴卫, 郑有良, 陈黎, 等. 鱼腥草种质资源的 RAPD 分析[J]. 药学学报, 2002, 37(12): 986-992.
- [15] 段承俐, 萧凤回, 文国松, 等. 文山三七栽培群体变异类型的分子鉴定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, (增刊): 13-16.
- [16] 夏铭, 栾非时, 李景鹏. RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化进展[J]. 植物研究, 1999, 19(4): 195-199.
- [17] 郭宝林, 戴波. 中药材 DNA 分子标记研究的技术问题 II. RAPD 实验技术和方法学论述[J]. 中草药, 2002, 33(2): 178-180.