

黄芪 RAPD 反应体系的优化

吴松权^{1,2}, 孙丽娜², 王立平², 吴基日^{2*} (1.东北林业大学开放室, 黑龙江哈尔滨 150040; 2.延边大学农学院, 吉林龙井 133400)

摘要 以蒙古黄芪和膜荚黄芪为材料, 建立了黄芪 RAPD 反应优化体系。即在 20 μ l 反应体积中, 模板 DNA 为 5 ng, 引物为 0.2 μ mol/L, dNTP 为 150 μ mol/L, MgCl₂ 为 2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶为 1 unit, 1 \times Buffer, 反应程序为预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 38 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共循环 40 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

关键词 黄芪; RAPD; 优化

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 0517-661X(2006)14-3389-03

Optimization of RAPD Reaction System for *Radix Astragali*

WU Song-quan et al (Laboratory of Northeast Forestry University, Haerbin, Heilongjiang 150040)

Abstract Optimization of RAPD reaction system for *Radix Astragali* was established with *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongholicus*. The condition was in a 20-ml volume with 5 ng template DNA; 0.2 μ mol/L primer; 150 μ mol/L dNTP; 2 mmol/L MgCl₂ and 1 unit of Taq DNA polymerase and 1 \times Buffer. Amplification protocol was initial denaturation of 5 min at 95 $^{\circ}$ C; 40 cycles of 45 s at 95 $^{\circ}$ C, 60 s at 38 $^{\circ}$ C, and 90 s at 72 $^{\circ}$ C and a final cycle of 7 min at 72 $^{\circ}$ C.

Key words *Radix Astragali*; RAPD; Optimization

黄芪是豆科黄芪属植物蒙古黄芪和膜荚黄芪的干燥根^[1]。随着对黄芪药理作用研究的不断深入及其药用范围的不断拓宽, 对其需求量越来越大。由于长期过度采挖, 造成野生黄芪资源已近枯竭, 因此栽培黄芪是黄芪产业发展的必然趋势。由于各种原因, 目前各地种植黄芪种质资源非常混杂, 因此对栽培黄芪种质资源进行评价就成为黄芪栽培的迫切需要。

RAPD 是 1990 年由美国科学家 Williams 和 Welsh 几乎同时采用 PCR 技术发展起来的一种 DNA 分子标记技术。该方法具有操作简洁、试验成本低、灵敏度高、通用性强, 且在不了解物种基因组相关分子生物学信息下就可进行等优点。目前, RAPD 方法正广泛应用于种质资源的评价和栽培植物品种鉴定等方面。但该方法对反应条件非常敏感, 具有稳定性和重复性差的缺点, 因此必须建立一个稳定的、最佳的反应体系来克服这一缺点^[2]。为此, 笔者就黄芪 RAPD 反应中的模板 DNA、引物浓度、dNTP 浓度、镁离子浓度、Taq 聚合酶用量等因素和扩增程序进行了优化, 旨在为 RAPD 技术在黄芪种质资源和遗传关系等方面的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为膜荚黄芪和蒙古黄芪, 于 2005 年 6 月在延边大学农学院中草药圃内采集新鲜幼嫩植物叶片, 并保存在 -75 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取。采用稍做改进的 CTAB 法^[3]。取 2~3 个叶片, 用液氮研磨并装入 1.5 ml 离心管后, 加入提取缓冲液 [浓度为 2% 的 CTAB; 浓度为 20 mmol/L 的 EDTA; 浓度为 100 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 值为 8.0); 浓度为 1.4 mol/L 的 NaCl; 浓度为 1% 的 pvp] 650 μ l 和 β -巯基乙醇 10 μ l, 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴保温 45 min。加入等体积的氯仿:异戊醇 体积比为 24:1, 剧烈震荡, 在室温下冷却。然后 10 000 r/min 离心 10 min, 取出的水相用氯仿:异戊醇 体积比为 24:1 再抽提 1

次。接着在抽提后的水相中加入 2/3 体积冰冷的异丙醇, 静置于 -20 $^{\circ}$ C 30 min。然后在 10 000 r/min 离心 5 min, 倾去上清液, 加入浓度为 70% 的酒精洗涤沉淀, 在滤纸上沥干。当沉淀无乙醇味时, 加入 1 \times TE 缓冲液 100 μ l, RNase 2 μ l 并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 h 以裂解 RNA, 最后 10 000 r/min 离心 2 min。取 DNA 溶液 5 μ l, 在 0.7% 的琼脂糖上电泳, 检测 DNA 浓度及纯度。检测后的 DNA 保存在 4 $^{\circ}$ C 待用或 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。取等量黄芪 DNA 混成基因池, 以此为优化体系的模板 DNA。

1.2.2 RAPD 反应成分用量。首先确立基本反应条件, 即 PCR 反应总体积为 20 μ l, 其中含模板 DNA 为 20 ng, 引物为 0.2 μ mol/L, dNTP 为 150 μ mol/L, MgCl₂ 为 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶为 1 unit, 10 \times 反应缓冲液为 2 μ l, 其余以重蒸馏水补充至 20 μ l。以 OPD06(ACCTGAACGG) 为引物, 对反应体系中的模板 DNA、引物、dNTP、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶分别设置不同浓度梯度 (表 1), 进行优化并确定最适用量。

表 1 RAPD 反应体系中的成分用量

浓度梯度	DNA ng	引物 μ mol/L	dNTP μ mol/L	MgCl ₂ mmol/L	TaqDNAse U
1	2.5	0.1	50	0.5	0.25
2	5.0	0.2	100	1.0	0.50
3	10.0	0.3	150	1.5	1.00
4	15.0	0.4	200	2.0	1.50
5	20.0	0.5	250	2.5	2.00
6	25.0	0.6	300	3.0	2.50

1.2.3 PCR 程序与参数。PCR 反应在 Eppendorf PCR 仪上进行, 反应程序为预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共循环 40 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。在此基础上, 以 OPD06(ACCTGAACGG) 为引物, 退火温度为 35 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 设, 11 个温度梯度, 分别为 30.1, 30.6, 31.5, 32.6, 33.9, 35.3, 36.6, 37.9, 39.0, 39.9, 40.4 $^{\circ}$ C, 来确定最佳反应程序。

1.2.4 PCR 产物检测。扩增产物用含有浓度为 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.4% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 Dolphin 凝胶成像仪照相。

2 结果与分析

2.1 模板浓度筛选 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应影响较

基金项目 吉林省科技厅项目资助(20040553)。

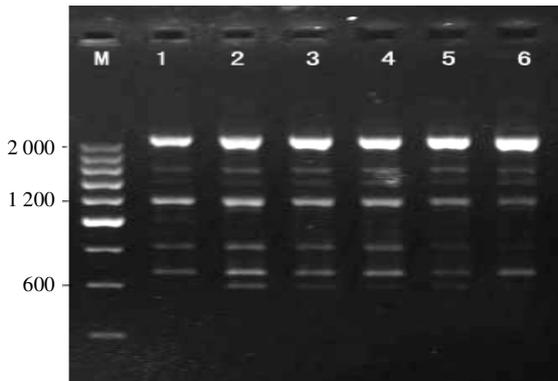
作者简介 吴松权(1972-), 男, 吉林龙井人, 在读博士, 讲师, 从事中草药栽培与育种研究。* 通讯作者。

收稿日期 2006-04-24

大(图1、2)。DNA用量在5 ng时,膜荚黄芪和蒙古黄芪都能扩增出比较清晰且不缺失的条带,多态性较高,因此模板DNA用量取5 ng。

2.2 引物浓度筛选 引物用量的变化对 RAPD 带的数量

和强弱影响较大(图3、4)。引物浓度在0.1 μmol/L时不能扩增出清晰的条带;在0.2、0.3 μmol/L时膜荚黄芪和蒙古黄芪的扩增产物条带最清晰,亮度最大;达到0.5、0.6 μmol/L时,某些条带缺失,亮度减弱并产生一些新的条带。因此,引物



注:M为200 bp的DNA分子量标记,数字为DNA浓度梯度。图2同。
图1 不同浓度的模板DNA对膜荚黄芪RAPD反应的影响

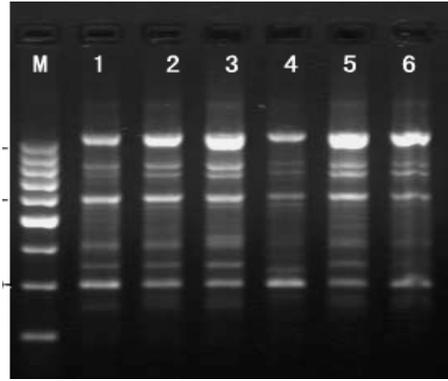
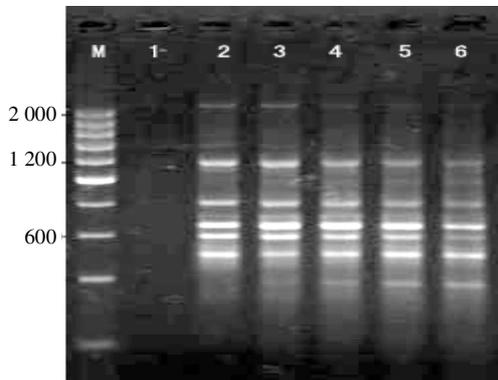


图2 不同浓度的模板DNA对蒙古黄芪RAPD反应的影响



注:M为200 bp的DNA分子量标记,数字为引物浓度梯度。图4同。
图3 不同浓度的引物对膜荚黄芪和RAPD反应的影响

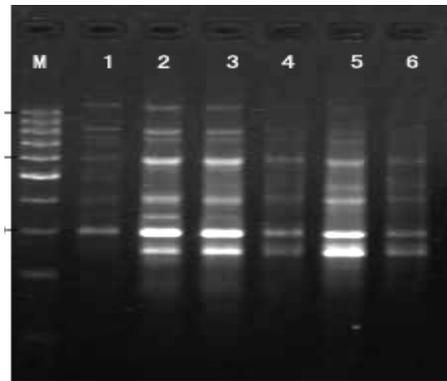
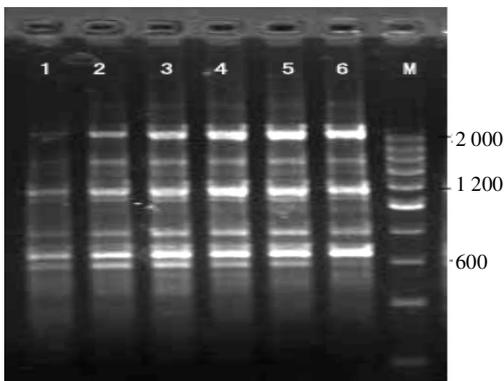


图4 不同浓度的引物对蒙古黄芪和RAPD反应的影响

用量以0.2 μmol/L为最适宜。

2.3 dNTP 浓度筛选(图5、6) 从图5、6可以看出,随着dNTP浓度的增加,扩增产物的条带有明显增多的趋势,但

浓度增高到一定程度时,膜荚黄芪泳道6缺失约600 bp的条带,蒙古黄芪泳道4缺失约650 bp的条带。综合dNTP浓度对膜荚黄芪和蒙古黄芪RAPD的影响,dNTP浓度为150



注:M为200 bp的DNA分子量标记,数字为dNTP浓度梯度。图6同。
图5 不同浓度的dNTP对膜荚黄芪RAPD反应的影响

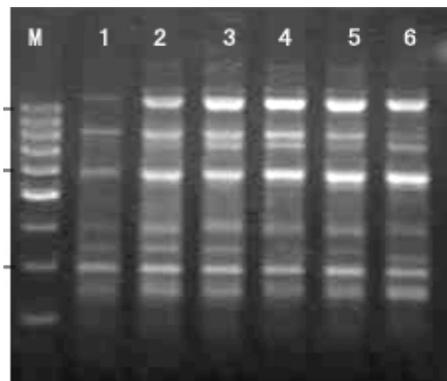


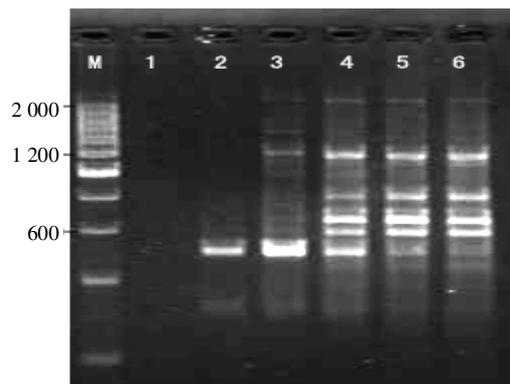
图6 不同浓度的dNTP对蒙古黄芪RAPD反应的影响

μmol/L时比较理想。

2.4 MgCl₂ 浓度筛选(图7、8) 从图7、8可以看出,随着Mg²⁺浓度增加,膜荚黄芪和蒙古黄芪扩增条带数不断增加,图谱清晰,扩增效果好,但到了一定浓度(膜荚黄芪2.0 mmol/L;蒙古黄芪为2.0、2.5 mmol/L)以后,扩增条带数不再增加且缺失部分条带。因此MgCl₂浓度为2 mmol/L时比较理想。

2.5 Taq 聚合酶浓度筛选(图9、10) 从图9、10中可以看出,Taq聚合酶浓度对RAPD反应影响较大。Taq聚合酶浓度低于0.25 U时,扩增的带少;在0.50~1.00 U时,扩增出较多清晰的DNA带。从扩增效果和经济效率考虑,Taq聚合酶浓度以1.00 U为宜。

2.6 扩增程序筛选(图11、12) 在试验区间范围内,随着变性温度的提高,扩增产物的条带数和产量增加,但到了一定



注: M 为 200 bp 的 DNA 分子量标记, 数字为 MgCl₂ 浓度梯度。图 8 同。

图 7 不同浓度 MgCl₂ 对膜荚黄芪 RAPD 反应的影响

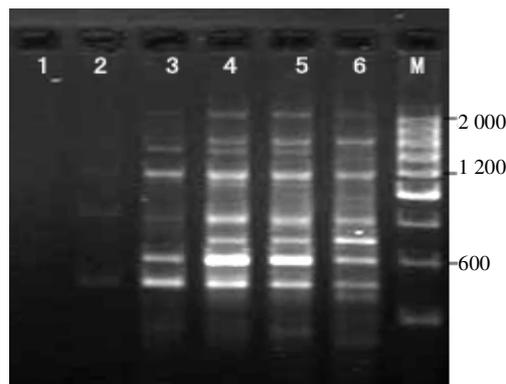
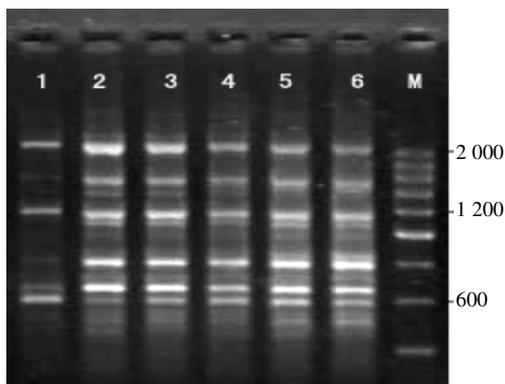


图 8 不同浓度 MgCl₂ 对蒙古黄芪 RAPD 反应的影响



注: M 为 200 bp 的 DNA 分子量标记, 数字为 Taq 浓度梯度。图 10 同。

图 9 不同浓度的 Taq 聚合酶对膜荚黄芪 RAPD 反应的影响

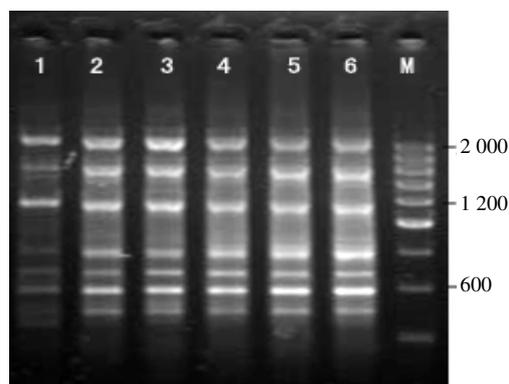
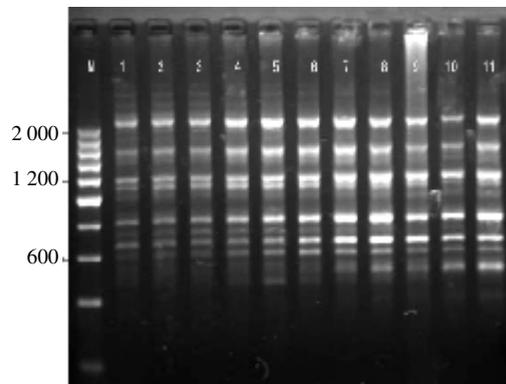


图 10 不同浓度的 Taq 聚合酶对蒙古黄芪 RAPD 反应的影响



注: M 为 200 bp 的 DNA 分子量标记, 数字为退火温度梯度。图 12 同。

图 11 不同退火温度对膜荚黄芪 RAPD 反应的影响

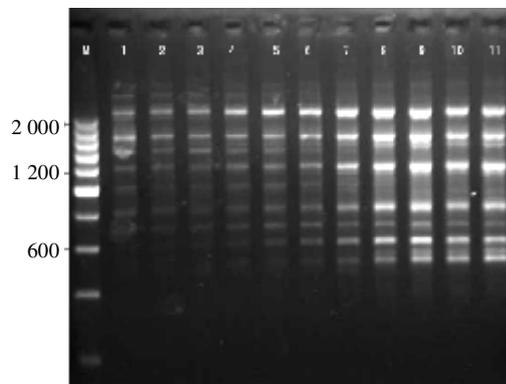


图 12 不同退火温度对膜荚黄芪 RAPD 反应的影响

的温度 膜荚黄芪为 36.6~37.9 ℃, 蒙古黄芪为 37.9~39 ℃), 扩增产物的条带数和产量不再增加甚至减少。故将退火温度确定为 38 ℃。

3 结论与讨论

RAPD 反应体系中的成分用量的变化对 RAPD 图谱会产生较大的影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性, 而 RAPD 带谱的准确性是利用 RAPD 标记进行种质资源和遗传关系等研究的基础, 因此对 RAPD 体系的优化是非常必要的。

合适的退火温度是 PCR 成功的重要条件, 是引物与模板 DNA 结合的关键。不同物种所需要的退火温度也必然不

同, 因此筛选适合不同物种的退火温度对 RAPD 分析来说也是非常必要的。该试验中, 退火温度太高或太低都会影响扩增的条带数目和背景, 最佳退火温度为 38 ℃。

通过该试验建立的 RAPD 优化体系, 为进一步进行黄芪种质资源的 RAPD 分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供了可靠的试验依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 249-250.

[2] 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.