

优化麝香百合 RAPD 反应体系的研究

黄子锋¹, 周厚高², 王凤兰²

(1. 广东省东莞市农业种子研究所, 广东东莞 523063; 2. 仲恺农业技术学院农业与园林学院, 广东广州 510225)

摘要 [目的] 建立适合百合种质的 RAPD 优化体系。[方法] 从麝香百合中提取基因组 DNA, 进行 RAPD 反应。通过正交试验设计, 优化麝香百合的 RAPD 反应条件和反应体系。[结果] 优化的 RAPD 反应条件为: DNA 50 ng, Primer 0.3 $\mu\text{mol/L}$, Taq 酶 1.0 U, dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 3.0 mmol/L 。在麝香百合的 RAPD 扩增程序中, 各因素显著性程度依次为: 循环次数 > 延伸时间 > 复性温度 > 复性时间。麝香百合的最佳 RAPD 反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 复性 50 s, 延伸 60 s, 循环 35 次。[结论] 该研究建立了一套稳定的 RAPD 反应体系, 具有较好的扩增效果。

关键词 麝香百合; RAPD; 优化

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07579-02

Optimization of RAPD Reaction System for *Lilium formlongii*

HUANG Zi-feng et al. (Dongguan Institute of Agricultural Seeds in Guangdong Province, Dongguan, Guangdong 523063)

Abstract [Objective] The aim of the research was to set up a kind of RAPD optimized system for lily germplasm. [Method] Genomic DNA was extracted from *Lilium formlongii* to make RAPD reaction. Through the orthogonal experimental design, RAPD reaction conditions and reaction system for *L. formlongii* were optimized. [Result] The optimized conditions of RAPD reaction were as follows: DNA 50 ng, Primer 0.3 $\mu\text{mol/L}$, Taq 1.0 U, dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$ and Mg^{2+} 3.0 mmol/L . In RAPD amplification program of *L. formlongii*, the significance of each factor in order was as cycle number > elongation time > annealing temperature > annealing time. The optimum RAPD reaction program for *L. formlongii* was as follows: annealing for 50 s at 37 $^{\circ}\text{C}$, elongating for 60 s, recycling for 35 times. [Conclusion] A set of stable RAPD reaction system was set up in this research and it had better amplification effects.

Key words *Lilium formlongii*; RAPD; Optimization

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是基于 PCR (Polymerase Chain Reaction) 的一种 DNA 分子标记。由于 RAPD 技术采用的引物比较短 (通常为 10-核苷酸单链 DNA 分子), 退火温度比较低 (常低于 45 $^{\circ}\text{C}$), 导致 RAPD 标记对反应条件比较敏感。因此在应用 RAPD 标记时, 对 RAPD 反应条件进行优化十分必要。有很多关于 RAPD 体系优化方案的报道^[1-2], 积累了大量经验, 但也有明显不足之处, 主要是优化方案的设计思路不明确, 不分主次而把众多因素同等对待; 设计过于庞杂, 浪费时间和财力。由于每种植物的 RAPD 扩增有其自身的特点, 因此很有必要对其进一步探讨。

国内对麝香百合 (*Lilium formlongii*) 的 RAPD 研究尚未见报道, 笔者拟建立适合百合种质的优化体系, 以期后续实验结果的稳定性、可信性提供保证。

1 材料与方

1.1 材料 麝香百合, 由仲恺农业技术学院花卉研究中心提供。随机引物、DNA/EcoR + Hind III 分子量标准物、Taq 聚合酶、dNTPs、琼脂糖、Tis、矿物油、CTAB、EDTA、Rnase A, 上述试剂购于上海生工公司; EB、点样缓冲液购于宝泰克生物工程公司; PE 2400 型 PCR 仪为 Perkin Elmer Cetus 公司产品。

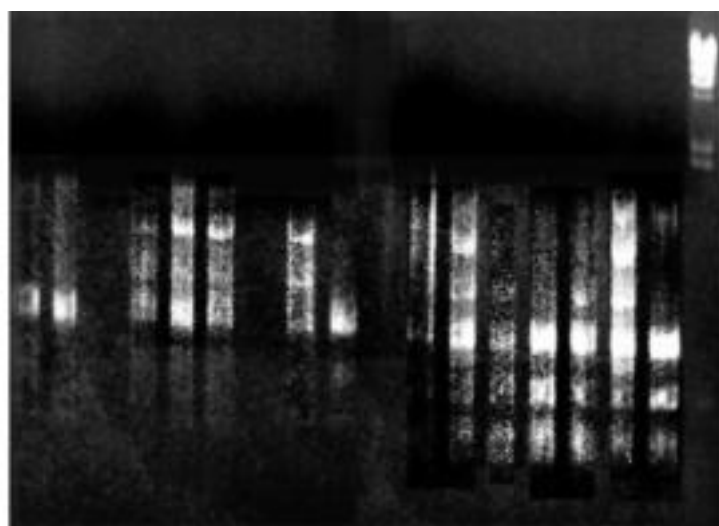
1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及浓度测定。 采用 2 \times CTAB 法制备模板 DNA, 参照 Couch 等^[3] 的微量分离 DNA 法。通过琼脂糖凝胶电泳方法来定量定质^[4]。

1.2.2 扩增反应与电泳检测。 反应总体积 20 μl , 稍离心混匀后, 加入 20 μl 矿物油, 在扩增仪进行 RAPD 反应, 并设计阴性对照, 重复 2 次。扩增结束后, 在反应混合物中加入 4

μl ml 上样缓冲液, 混匀。取 20 μl 滴入含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭的 1.4% (W/V) 琼脂糖凝胶中, 用 1 \times TBE 电泳缓冲液在 6 V/cm 的电场下电泳 3 h 左右, 然后在紫外光透射仪下观察照相。

1.2.3 确立反应条件。 采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计 (表 1), 对 dNTPs 浓度、Primer 浓度、 Mg^{2+} 浓度、Taq 聚合酶浓度进行筛选, 找出浓度最佳组合。用引物 S21 (CAGGCCCTTC)、S11 (GTAGACCCGT)、S17 (AGGGAACGAG) 进行扩增。依扩增条带的敏感性与特异性 (图 1) 即条带强弱及杂带的多少作 1~9 分计分, 分数越高, 表示敏感性、特异性越好^[5]。



注: 泳道 1~16 (从左至右) 代表正交设计实验的 9~25 号实验; 引物 S21, 泳道 17 为 DNA/EcoR + Hind III。

Note: Lane 1~16: Test No. 9~25 of orthogonal test design; Primer S21, Lane 17: DNA/EcoR + Hind III.

图 1 正交设计反应条件扩增效果

Fig. 1 Amplification effects of orthogonal design

1.2.4 确立反应程序。 用引物 S29 (GGGTAACGCC)、S32 (TCGGCGATAG) 进行扩增, 按 $L_9(3^4)$ 进行正交设计 (表 2)。按扩增效果 (图 2) 作 1~9 分计分评价。

2 结果与分析

2.1 确立反应条件 利用正交表进行择优试验中常用的 2

基金项目 广东省教育厅科学基金资助项目 (200044)。

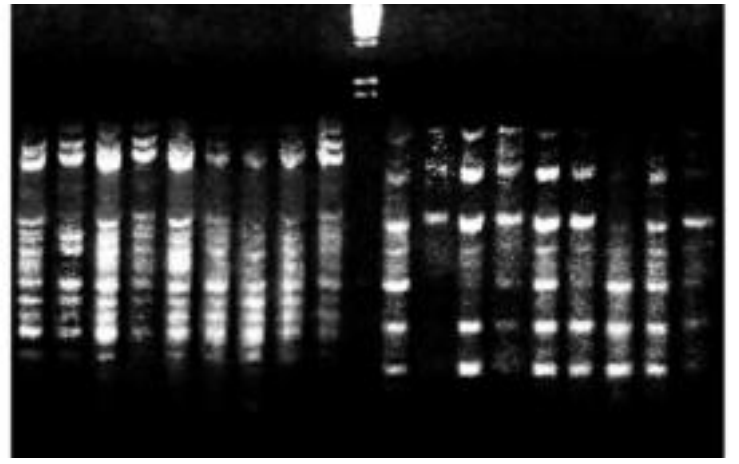
作者简介 黄子锋 (1977-), 男, 广西南宁人, 硕士, 农艺师, 从事花卉育种研究。

收稿日期 2008-04-18

种方法^[6],即直观分析法和极差分析法。对扩增效果(图1)进行评分,从评分结果(表1)可直观地看出,实验13的分数最高,其成分组合为:DNA 50 ng,Primer 0.3 $\mu\text{mol/L}$,Taq 酶 .0 U,dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 3.0 mmol/L。

极差 R_i 的大小可以用来衡量试验中相应因素作用的大小。极差大的因素意味着它的不同水平造成的差别较大,从极差分析中可以得到一个较好的试验条件。由表1可知,较好的试验搭配组合为:DNA 80 ng,Primer 0.3 $\mu\text{mol/L}$,Taq 酶1.0 U,dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 3.0 mmol/L。与直观法有点差异,除DNA浓度不同外,其他成分完全相同。也证实DNA浓度对RAPD实验的影响最小,对麝香百合RAPD实验影响大小的先后次序为 Mg^{2+} 、Primer、Taq、dNTPs、DNA。

2.2 优化反应程序 由图2、表2可知,循环次数的极差R值3.333最大,4个因素的显著性程度依次为:循环次数、延伸时间、复性温度、复性时间。直观分析法得到的最好的程序组合为实验8。极差法得到较好的程序组合为:复性温度



注:泳道1~9(从左至右)为引物S29的正交设计扩增实验1~9号;泳道11~19(从左至右)为引物S32的正交设计扩增实验1~9号;泳道10为DNA/EcoR + Hnd。

Note:Lane 1~9: No. 1~9 in amplification test of orthogonal design with primer S29; Lane 11~19: No. 1~9 in amplification test of orthogonal design with primer S32; Lane 10: DNA/EcoR + Hnd.

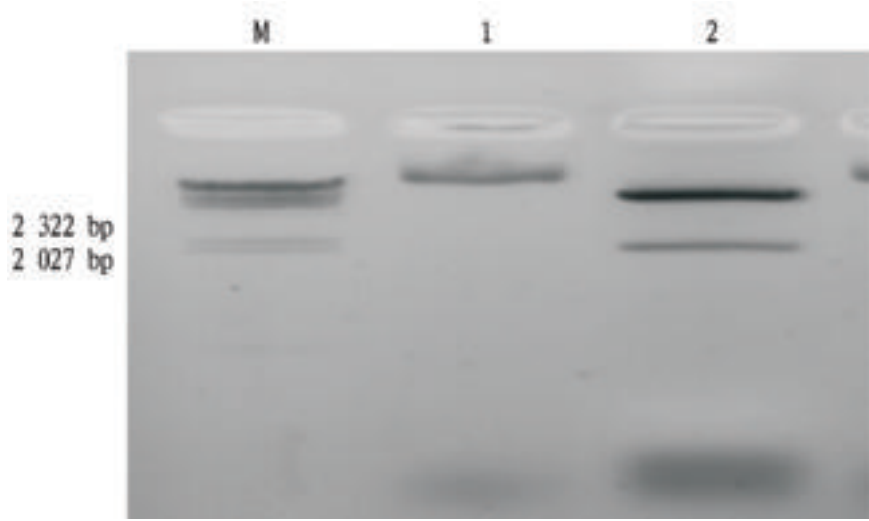
图2 正交设计优化反应程序

Fig.2 Optimization of reaction program by orthogonal design

表1 $L_{25}(5^6)$ 正交设计表及实验结果

Table 1 $L_{25}(5^6)$ orthogonal design and its result

Order	DNA	Primer	Taq	dNTPs	Mg^{2+}	S21	S11	S17	Average
1	10	0.1	1.0	250	2.0	7	4	4	5.0
2	20	0.1	2.5	300	3.0	1	1	3	1.7
3	40	0.1	2.0	100	2.5	5	7	8	6.0
4	80	0.1	0.5	200	1.0	0	0	0	0
5	100	0.1	1.5	150	1.5	7	7	8	7.3
6	10	0.2	1.5	200	2.5	0	0	0	0
7	20	0.2	1.0	150	1.0	2	5	1	2.7
8	40	0.2	2.5	250	1.5	2	3	4	3.0
9	80	0.2	2.0	300	2.0	5	4	6	5.0
10	100	0.2	0.5	100	3.0	6	3	3	4.0
11	10	0.3	0.5	300	1.5	5	9	7	7.0
12	20	0.3	1.5	100	2.0	6	2	7	5.0
13	40	0.3	1.0	200	3.0	9	9	9	9.0
14	80	0.3	2.5	150	2.5	9	8	8	8.3
15	100	0.3	2.0	250	1.0	0	0	0	0
16	10	0.4	2.0	150	3.0	8	4	6	6.0
17	20	0.4	0.5	250	2.5	7	5	5	5.7
18	40	0.4	1.5	300	1.0	0	0	0	0
19	80	0.4	1.0	100	1.5	6	6	3	5.0
20	100	0.4	2.5	200	2.0	4	3	5	4.0
21	10	0.5	2.5	100	1.0	2	3	7	4.0
22	20	0.5	2.0	200	1.5	4	4	4	4.0
23	40	0.5	0.5	150	2.0	7	7	6	6.7
24	80	0.5	1.5	250	3.0	4	5	6	5.0
25	100	0.5	1.0	300	2.5	3	7	7	5.7
K_1	4.053	4.000	4.667	4.800	1.333				
K_2	3.800	2.933	5.467	5.853	5.267				
K_3	4.933	5.8667	3.467	5.667	5.133				
K_4	4.667	3.787	2.853	3.733	5.133				
K_5	4.200	5.067	4.200	3.867	4.787				
R	1.133	2.933	2.613	2.120	3.933				



注: M 为 DNA Marker; 1 为构建好的载体 pLjIPT3-GUS 载体; 2 为酶切 pLjIPT3-GUS 结果。

Note: M, DNA Marker; 1, Constructed vector pLjIPT3-GUS; 2, Enzyme digestion results of pLjIPT3-GUS.

图3 LjIPT3 启动子表达载体的酶切鉴定

Fig.3 Identification of LjIPT3 promoter expression vector by enzyme digestion

达调控提供了条件,并为进一步探讨植物细胞分裂素的合成代谢和对植物生长发育的调控奠定了基础。

参考文献

- [1] MOK MC. Cytokins and plant development-an overview[M]// MOK DW, MOK MC. Cytokins: chemistry, activity, and function. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994: 155 - 166.
- [2] MOK DW, MOK MC. Cytokinin metabolism and action[J]. Plant Mol Biol, 2001, 52: 89 - 118.

- [3] GEORG HABERER, JOSEPH J. K. Cytokins, New insights into a classic phytohormone[J]. Plant Physiol, 2002, 128: 354 - 362.
- [4] KAKIMOTO T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(7): 677 - 85.
- [5] SAKAMOTO T, SAKAKIBARA H, KOIUMA M et al. Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice[J]. Plant Physiol, 2006, 142(1): 54 - 62.
- [6] BRUGEREN, HUMBERT S, RIZZO N, et al. A member of the maize isopentenyltransferase gene family, Zea mays isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development: Cytokinin biosynthesis in maize[J]. Plant Mol Biol, 2008, 8: 9312 - 9317.
- [7] MIYAWAKI K, MAISUMOTO K, ITANO M, KAKIMOTO T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate[J]. Plant Journal, 2004, 37(1): 128 - 138.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 742 - 744.
- [9] HU Y G, WHITTIER R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25: 674 - 681.
- [10] 黄培堂, 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 96 - 99.
- [11] HGO K, UGAWA Y, LWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 297 - 300.
- [12] LESCOT M, DEHAIS P, THLS G, et al. Plant CARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 325 - 327.
- [13] CHUNLIANG YE, SUOWEI WU, FANNAN KONG, et al. Identification and characterization of an isopentenyltransferase (IPT) gene in soybean (Glycine max L.)[J]. Plant Science, 2006, 170: 542 - 550.

(上接第7580页)

表2 反应程序的优化 $L_d(3^4)$ 正交设计表及实验结果

Table 2 $L_d(3^4)$ orthogonal design in reaction program and test result

实验号 Test No.	复性温度 Annealing temperature	复性时间 s Annealing time	延伸时间 s Elongation time	循环次数 Number of cycles	引物 S29 Primer S29	引物 S32 Primer S32	Average
1	36	30	120	35	9	4	6.5
2	37	30	60	30	1	1	1.0
3	38	30	90	40	7	7	7.0
4	36	40	90	30	4	3	3.5
5	37	40	120	40	5	9	7.0
6	38	40	60	35	2	6	4.0
7	36	50	60	40	3	5	4.0
8	37	50	90	35	8	8	8.0
9	38	50	120	30	6	2	4.0
K_1	4.667	4.833	3.000	2.833			
K_2	5.333	4.833	6.167	6.167			
K_3	5.000	5.333	5.833	6.000			
R	0.667	0.500	3.167	3.333			

3 结论与讨论

单因素逐项优化的表达方式直观,能从几个水平中轻易择优。但把各因素看成独立的因子,忽略了各因素的相互作用。然而, RAPD 实验中各因素间有一定的内在联系,正交设计能排除反应条件成分各因素的相互影响,得到较多的信息量,且实验周期短。在 RAPD 反应混合物中模板 DNA、引物和 dNTPs 均可与 Mg^{2+} 结合,而 Taq 酶需要的是游离的 Mg^{2+} 。没有考虑因素的相互作用,往往导致重复性差。该实验体系用于麝香百合株系间遗传关系分析,取得了较好的效果。

对麝香百合 RAPD 实验影响大小先后次序为 Mg^{2+} 、Primer、Taq、dNTPs、DNA。在扩增程序中 4 个因素的显著性程

度依次为:循环次数、延伸时间、复性温度、复性时间。

参考文献

- [1] 张鲁刚, 王鸣, 陈杭, 等. 白菜 RAPD 反应条件的优化[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(2): 1 - 7.
- [2] 孙杰, 杨青川, 韩国栋. 紫花苜蓿 RAPD 反应条件优化[J]. 草地学报, 2002, 10(1): 18 - 23.
- [3] COUCHJ A, FRITZ P J. Isolation of DNA from high plants in polyphenolics[J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8(1): 8 - 12.
- [4] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东, 等. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 27.
- [5] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403 - 404.
- [6] 石磊, 王学仁, 孙文爽. 试验设计基础[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1997: 189 - 195.