

# 高山红景天 RAPD 反应体系的优化研究

卜媛媛, 金东淳, 刘宪虎, 许明子\*, 孙博

(1. 延边大学农学院农学系, 吉林龙井 133400; 2. 延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400)

**摘要** [目的] 筛选适合高山红景天的 RAPD PCR 反应体系。[方法] 以药用植物高山红景天雌株的叶片为材料, 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA, 并对影响 RAPD 扩增反应的各因素进行优化。[结果] 结果表明, 适合高山红景天的 RAPD 反应体系为: 25  $\mu$ l 总体积中含 DNA 模板 20 ng,  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L, 引物 10 pmol, dNTP 100  $\mu$ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U。[结论] CTAB 法在高山红景天可获得质量较好的基因组 DNA。

**关键词** 高山红景天; RAPD; 反应体系

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13057-02

**Study on RAPD Reaction System for Endangered Pharmacy Plant *Rhodiola sachalinensis***

**BU Yuan-yuan et al** (Yanbian University Agriculture College Agricultural department, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract** [Objective] The study aimed to choose RAPD PCR reaction system of fit *Rhodiola sachalinensis*. [Method] With the leaves of genomic plant *Rhodiola sachalinensis* as materials, the genomic DNA was extracted from young leaves of endangered medicinal plant *Rhodiola sachalinensis* by means of improved CTAB method. The RAPD reaction system for *Rhodiola sachalinensis* was optimized including cycling program and the concentration of template, primer, dNTP, Taq DNA polymerase and  $Mg^{2+}$ . [Result] The results indicated that the RAPD reaction system were 20 ng of DNA template, 1.5 mmol/L of  $Mg^{2+}$ , primer 10 pmol, dNTP 100  $\mu$ mol/L, Taq DNA polymerase 1.0 U. [Conclusion] The CTAB will obtain high quality genome team DNA in *Rhodiola sachalinensis*.

**Key words** *Rhodiola sachalinensis*; RAPD; Reaction system

高山红景天(*Rhodiola sachalinensis* A.Br.)为景天科红景天属(*Rhodiola* L.)多年生草本植物,民间多以其匍匐的根状茎为药用,多用于强壮剂。高山红景天是雌雄异株的植物,其性别类型较复杂,有雌株、雄株和两性株,两性株主要由雄花和两性花组成<sup>[1]</sup>,各性别的形态在营养生长期差别不大,只有在生殖生长时才可能根据花器形态进行准确的鉴别。近几年,随着分子生物学实验技术的发展,利用分子标记技术早期鉴别不同性别<sup>[2]</sup>,已成为雌雄异株植物研究较常用的技术手段。该研究旨在通过对高山红景天 RAPD 扩增条件的优化,筛选适合高山红景天的 RAPD PCR 反应体系,为进一步开展高山红景天性别分化研究提供理论依据和实验技术。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 高山红景天植株采自吉林省和龙市高山红景天栽培基地,取高山红景天雌性植株 5 株,取干净的嫩叶,迅速放入封口袋密封,置于 -70 低温冰箱中保存备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组总 DNA 的提取。**基因组总 DNA 的提取,采用改进的 CTAB 法<sup>[3]</sup>,具体步骤如下:称取 0.1~0.3 g 叶片,在液氮中研磨至粉末状,置于 1.5 ml 离心管中,加入 600  $\mu$ l 预热到 65 的含有 1%PVP 的 2 $\times$ CTAB 提取缓冲液和 - 巯基乙醇,65 水浴 45 min,取出在室温下冷却。加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),剧烈震荡。室温下 11 000 r/min 离心 10 min,取上清液置 1.5 ml 离心管中,再加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)震荡混匀,室温下 11 000 r/min 离心 10 min。取上清液置于新的离心管中,再加入 2/3 体积 -20 预冷的异丙醇,置 -20 冰箱中放置 30 min 至出现絮状沉淀,11 000 r/min 离心 10 min,小心弃去上清液,用 70% 的酒精洗涤沉淀 3 次,将离心管倒置于吸水纸上干燥,加入 1 $\times$ TE 缓冲液溶解

DNA,再加入 2 $\mu$ l RNase37 保温 1 h 去除 RNA。待溶解后加入 0.3 ml/L NaCl、等体积的无水乙醇,冰上放置 20 min 沉淀,13 000 r/min 离心 15 min,小心去掉上清液,沉淀用 70% 酒精润洗 2 次,晾干,溶于 50  $\mu$ l TE 中, -20 保存,备用。

**1.2.2 基因组 DNA 检测。**将提取的 DNA 样品吸取 150  $\mu$ l,用 1 $\times$ TE 缓冲液稀释 20 倍,以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,根据所测 DNA 的浓度,用 1 $\times$ TE 缓冲液将其稀释至 10 ng/ $\mu$ l,于 -20 冰箱中保存、备用。

**1.2.3 RAPD 扩增反应。**建立 25  $\mu$ l 反应体系,分别加入 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ l,模板 DNA(5、10、20、30 和 40 ng),随机引物(5、10、20 和 30 pmol),Taq DNA 聚合酶(0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 U),2.5 mmol/L dNTP(50、100、150、200 和 250  $\mu$ mol/L), $Mg^{2+}$ (0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mmol/L)。PCR 仪的型号为:PCR system 9700,反应程序为<sup>[4]</sup>:94 预变性 5 min,然后进行 40 个循环,94 变性 45 s,37 退火 45 s,72 延伸 1 min,循环结束后 72 延伸 10 min。

**1.2.4 引物的初步筛选。**该试验把 220 个随机引物(由北京惠泽奥公司合成)作为筛选对象,进行了预扩增试验,选取扩增效果较好的 1 条引物 S12 用于优化扩增反应。

**1.2.5 PCR 产物的检测。**PCR 反应结束后,通过 1.4% 的琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu$ g/ml 的溴化乙锭)电泳 2 h(5 V/cm),电泳结束后,将凝胶平铺在凝胶成像仪的紫外透射灯上照相、记录。

## 2 结果与分析

DNA 提取质量往往是 RAPD 分析成功与否的关键。用改良的 CTAB 法提取的高山红景天基因组 DNA,样品色泽近白色或无色,总 DNA 电泳后呈现一条迁移率很小的整齐条带,无弥散的荧光出现,表明所提取的 DNA 样品较纯,基本无降解,不含有 RNA(图 1)。

**2.1 模板 DNA 浓度对 RAPD 扩增效果的影响** 该试验设置模板 DNA 浓度为 5 个梯度(图中 1~5 号),分别为 5、10、20、30 和 40 ng,进行 PCR 扩增。结果表明,DNA 用量在 5~40 ng 均能扩增出条带,这说明高山红景天 RAPD 反应对模板

基金项目 国家自然科学基金(30460072)。

作者简介 卜媛媛(1982-),女,吉林通榆人,硕士研究生,研究方向:药用植物遗传育种。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-01

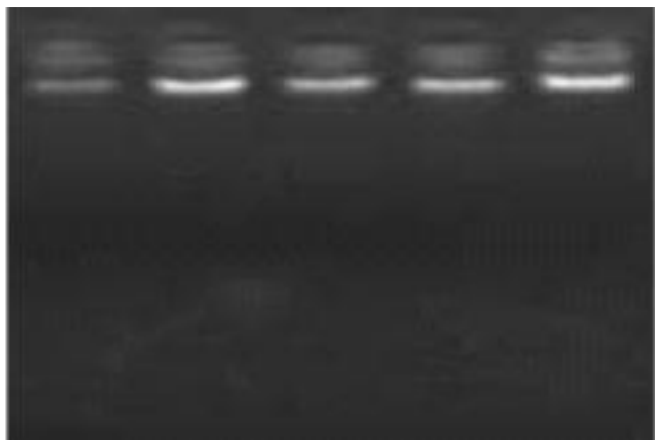
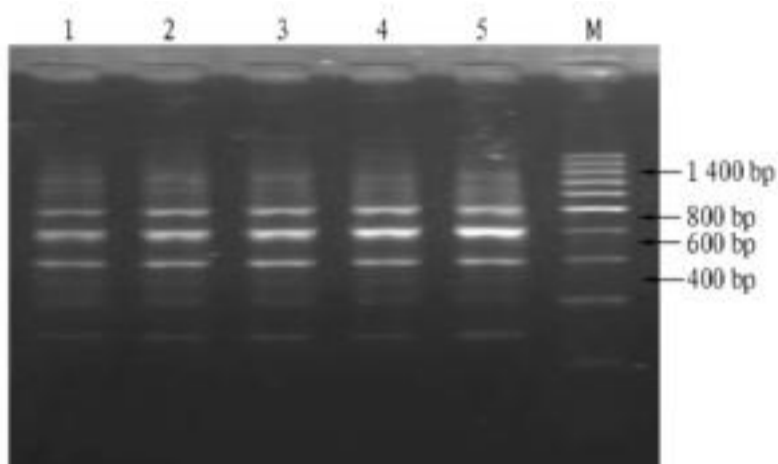


图1 高山红景天基因组DNA电泳检测结果

Fig.1 Electrophoresis result of the DNA from *Rhodiola sachalinensis*

DNA 浓度要求不严格,但 5 和 10 ng 扩增的谱带较弱,20、30 和 40 ng 的扩增结果无明显差异,因此,将模板 DNA 的用量定为 20 ng 比较理想(图2)。



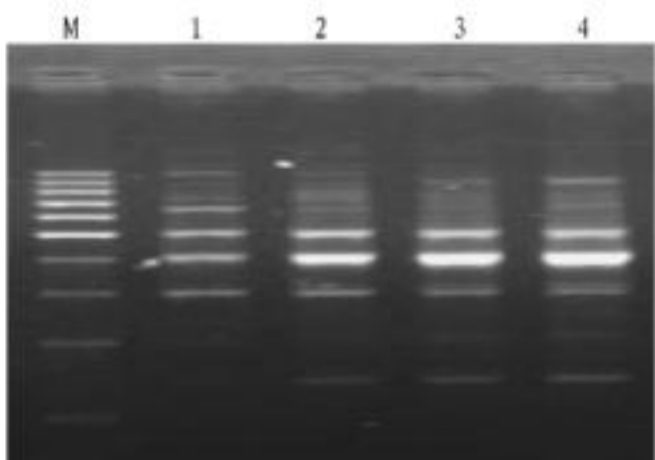
注:M为DNA marker;数字为DNA浓度梯度。

Note: Mis DNA marker; 1 to 5 mean concentration grades of template DNA.

图2 模板DNA浓度对RAPD反应的影响

Fig.2 Effects of template DNA concentration on RAPD reaction

2.2 引物浓度对RAPD扩增效果的影响 适合的引物浓度是对某一物种进行扩增所必需的,该试验设置4个引物浓度梯度(图中1~4号),分别为:5、10、20和30 pmol,进行PCR扩增。结果表明,引物浓度在5 pmol 时有条带缺失,10 pmol 条带增多且清晰,20和30 pmol 时条带弥散,因此,确定10 pmol 为最适引物浓度值(图3)。



注:M为DNA marker;数字为引物浓度梯度。

Note: Mis DNA marker; 1 to 4 stand for concentration grades of primer.

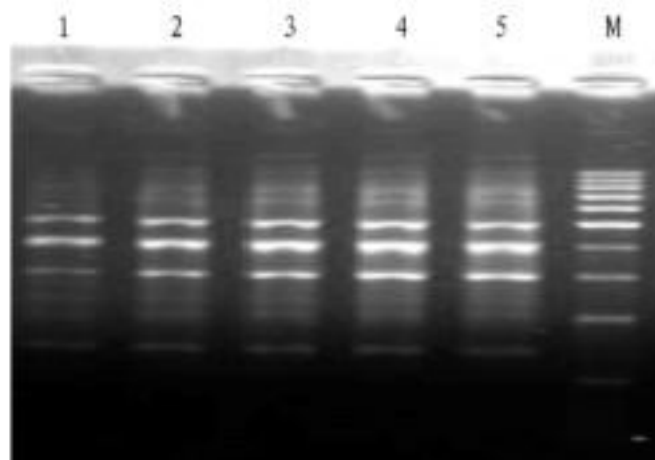
图3 引物浓度对RAPD反应的影响

Fig.3 Effects of primer concentration on RAPD reaction

2.3 Taq DNA 聚合酶浓度对RAPD扩增效果的影响 RAPD 扩增产物的质和量与 Taq DNA 聚合酶的活力密切相关,而酶浓度的高低直接影响着酶活力的发挥,影响扩增结果,浓度太低扩增效果差,浓度太高会引起非特异性扩增。

该试验设置 Taq DNA 聚合酶5个浓度梯度(图中1~5

号),分别为:0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 U 进行PCR扩增。结果表明,Taq DNA 聚合酶在0.5 U 时扩增条带较弱,1.0~2.5 U 条带清楚且基本一致,因此,认为1.0 U 为适宜的Taq DNA 聚合酶浓度(图4),且节约成本。

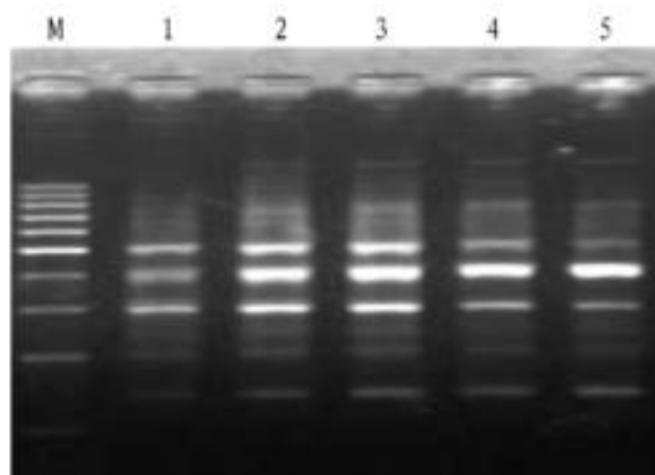


注:M为DNA marker;数字为Taq DNA酶浓度梯度。

Note: Mis DNA marker; 1 to 5 mean concentration grades of Taq DNA polymerase.

图4 Taq DNA 聚合酶浓度对RAPD反应的影响

Fig.4 Effects of Taq DNA polymerase concentration on RAPD reaction

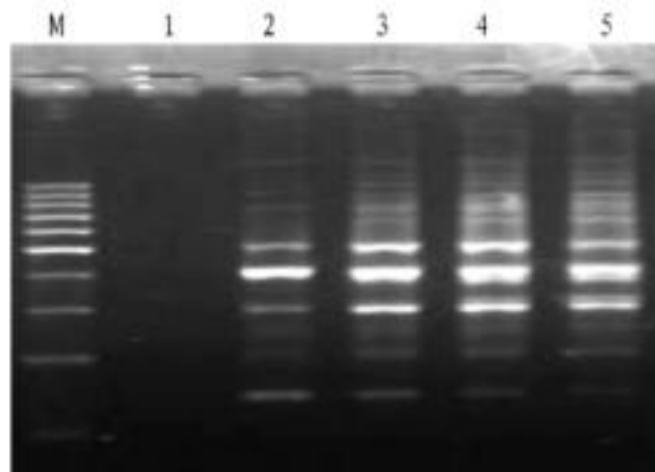


注:M为DNA marker;数字为dNTP浓度梯度。

Note: Mis DNA marker; 1 to 5 stand for concentration grades of dNTP.

图5 dNTP浓度对RAPD反应的影响

Fig.5 Effects of dNTP concentration on RAPD reaction



注:M为DNA marker;数字为MgCl2浓度梯度。

Note: Mis DNA marker; 1 to 5 stand for concentration grades of MgCl2.

图6 MgCl2浓度对RAPD反应的影响

Fig.6 Effects of MgCl2 concentration on RAPD reaction

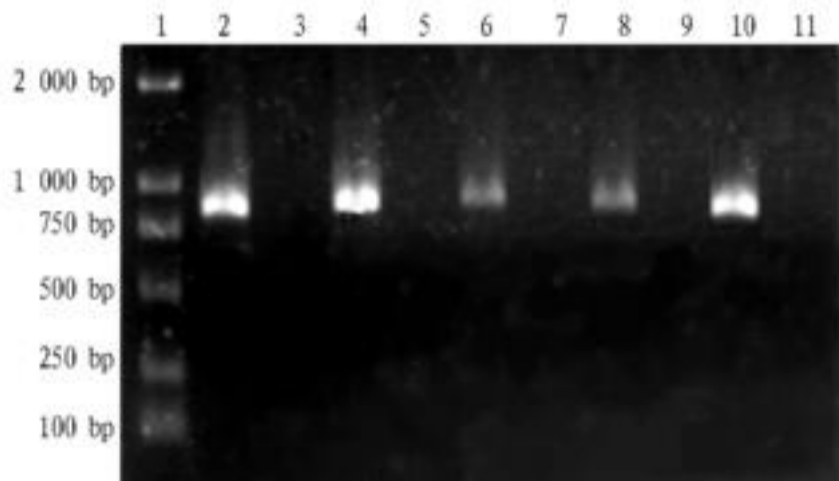
2.4 dNTP 浓度对RAPD扩增效果的影响 dNTP 是PCR反应的重要原料,浓度太高或过低都影响扩增效果。该试验设置了5个dNTP浓度梯度(图中1~5号),分别为:50、100、150、200和250 μmol/L 进行PCR扩增。结果表明,50 μmol/L 时扩

(下转第13063页)

## 2 结果与分析

**2.1 ESBLs 的质粒提取** 用微量质粒提取试剂盒对双纸片协同法检测产生 ESBLs 的大肠杆菌临床菌株进行 ESBLs 的质粒提取,都提取到了 ESBLs 质粒(图1)。

**2.2 ESBLs 的 PCR 扩增** 以 DNA 为模板进行 PCR 扩增,在所有材料中均扩增出 1 条与预期大小一致的 TEM 型 ESBLs 片断,而没有扩增出 SHV 型 ESBLs 片断(图2)。



注:1. Marker;2,4,6,10 分别为开封、山东、原阳、荥阳鸡大肠杆菌 TEM 引物 PCR 扩增产物;8. 洛阳猪大肠杆菌 TEM 引物 PCR 扩增产物;3,5,7,11 分别为开封、山东、原阳、荥阳鸡大肠杆菌 SHV 引物 PCR 扩增产物;9. 洛阳猪大肠杆菌 SHV 引物 PCR 扩增产物。

Note:1. Marker;2,4,6,10. PCR amplification products of avian *E. coli* by TEM primer in Kaifeng, Shandong, Yuanyang and Xingyang, respectively;8. PCR amplification product of swine *E. coli* by TEM primer in Luoyang;3,5,7,11. PCR amplification products of avian *E. coli* by SHV primer in Kaifeng, Shandong, Yuanyang and Xingyang, respectively;9. PCR amplification product of swine *E. coli* by SHV primer in Luoyang.

图2 ESBLs 质粒提取物的 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig 2 Electrophoretogram of PCR amplification products of ESBLs plasmid extracts

## 3 讨论

(1) 采用 PCR 方法检测 ESBLs 的基因型具有特异性强、敏感性高等特点。该研究利用 GenBank 上已公布的序列设计 TEM 型和 SHV 型引物,对不同地区分离的 5 株产 ESBLs 大肠杆菌进行了耐药基因扩增,结果均得到 TEM 型引物,与双纸片协同法检测结果一致,证明双纸片协同法检测 ESBLs

(上接第 13058 页)

扩增条带较弱,100 和 150  $\mu\text{mol/L}$  时扩增基本一致,且条带清楚,因此,确定以 100  $\mu\text{mol/L}$  为最佳浓度(图5)。

**2.5  $\text{MgCl}_2$  浓度对 RAPD 扩增效果的影响** Taq DNA 聚合酶需要  $\text{Mg}^{2+}$  激活, $\text{Mg}^{2+}$  对 RAPD 反应的扩增效果影响较大。该试验设置了 5 个  $\text{Mg}^{2+}$  浓度梯度(图中 1~5 号),分别为:0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5  $\text{mmol/L}$  进行 PCR 扩增。结果表明,0.5  $\text{mmol/L}$  时无扩增产物,1.0  $\text{mmol/L}$  时扩增产物不清晰,在 1.5  $\text{mmol/L}$  时带型清晰,因此,以 1.5  $\text{mmol/L}$  为最佳反应浓度(图6)。

## 3 结论与讨论

该试验以高山红景天雌性植株叶片为材料,利用 CTAB 法提取其基因组 DNA,结果 DNA 条带整齐、清晰且无降解现

的产生菌,具有较高的可靠性,与张春辉等报道的结果一致<sup>[7]</sup>。

(2) 该试验结果显示,从产生 ESBLs 细菌中都能扩增出 TEM 型 ESBLs,没有发现携带 SHV 型 ESBLs 的耐药基因,这可能与使用头孢菌素类药物的种类和频率有关。同时,也未发现同时携带 TEM 型和 SHV 型 ESBLs 耐药基因,说明目前国内畜禽产 ESBLs 大肠杆菌还未通过质粒进行细菌间耐药基因的交流。

(3) 细菌耐药性检测是临床细菌室的一项重要任务。兽医临床应用的第 3 代头孢类抗生素,抗菌活性强,药代动力学特征优良,毒、副作用小,残留低<sup>[8]</sup>,但水解它们的新的 ESBLs 不断涌现<sup>[9-11]</sup>。故应尽早检测 ESBLs,研究产生 ESBLs 的耐药基因并控制其流行和传播;研究其耐药质粒的消除;优化、设计出 - 内酰胺环类抗生素更为合理的给药方案,指导兽医临床合理用药。

## 参考文献

- [1] JACOBY GA, ARCHER GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agent[J]. *Emerg Med B*, 1991, 324: 601.
- [2] 胡功政, 张春辉, 梁军, 等. 猪鸡致病菌 - 内酰胺酶、超广谱 - 内酰胺酶检测与药敏试验[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 399 - 404.
- [3] 汪定成, 张青, 张惠中, 等. 大肠埃希氏菌和肺炎克雷伯菌 AmpC 酶及 ESBLs 酶的检测及耐药性分析[J]. *西南国防医药*, 2007, 17(6): 712 - 714.
- [4] 于燕, 李建华. 374 株革兰氏阴性杆菌超广谱 - 内酰胺酶检测及药敏试验[J]. *实用医技杂志*, 2004, 11(9): 1851 - 1852.
- [5] 杨滨, 孔祥圣. 产超广谱 - 内酰胺酶肺炎克雷伯菌与大肠埃希菌 qnrB 基因的检测[J]. *实用医学杂志*, 2007(24): 3945 - 3946.
- [6] 胡功政, 孙亚伟, 陈红英, 等. 鸡志贺氏菌产超广谱 - 内酰胺酶(ESBLs) 的分子进化[J]. *中国农业科学*, 2008(2): 593 - 598.
- [7] 张春辉, 张晓根, 张华. 兽医临床超广谱 - 内酰胺酶的表型检测方法[J]. *中兽医医药杂志*, 2006(6): 68 - 69.
- [8] 王付民, 胡功政, 苑丽. 新的第三代头孢菌素——头孢 吡[J]. *信阳农业高等专科学校*, 2001(4): 1 - 5.
- [9] HTOUT J D, GREGSON D B, CHURCH D L, et al. Community-wide outbreaks of dorally related CTX- M- 14 - actanase-producing *Escherichia coli* strains in the calgary health region[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6): 2844.
- [10] VIGNOLI R, VARELA G, MOYA MI, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER 2 and TEM116 extended-spectrum - lactanase isolated from children with diarrhea in Uruguay[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6): 2940.
- [11] HUANGI F, CHUC H, WANG M H, et al. Outbreak of dysentery associated with ceftiazoxone-resistant shigella sonnei first report of plasmid-mediated CMY - 2 - type AmpC - lactanase resistance in *S. sonnei*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6): 2608.

象,可以满足后续的各种试验的要求,说明 CTAB 法在高山红景天可获得质量较好的基因组 DNA。利用单因素梯度对 RAPD 反应体系进行了优化,建立了适合高山红景天 RAPD 扩增的 PCR 反应体系为:在 25  $\mu\text{l}$  体积中,DNA 模板 20 ng、 $\text{Mg}^{2+}$  1.5  $\text{mmol/L}$ ,引物 10 pmol,dNTP 100  $\mu\text{mol/L}$ ,Taq DNA 聚合酶 1.0 U。

## 参考文献

- [1] 金鑫, 许明子, 刘伟, 等. 高山红景天不同性别植株花器形态的比较研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 28(35): 8867 - 8868.
- [2] 董莉娜, 苏雪, 孙坤, 等. DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用[J]. *广西植物*, 2006, 26(1): 63 - 68.
- [3] 赵为, 邓科军, 杨足君, 等. 景天科植物基因组 DNA 的高效提取方法[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(22): 5804 - 5805.
- [4] 胡挺松, 陆一鸣, 马兰青, 等. 红景天属 4 种植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. *中草药*, 2004, 35(11): 1286 - 1289.