

卷丹百合 RAPD PCR 反应体系的单因素逐项优化研究

韩凌, 雷家军*

(1. 沈阳职业技术学院, 辽宁沈阳 110045; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的] 探索建立卷丹百合 RAPD PCR 反应的最适体系。[方法] 用 CTAB 法提取卷丹百合的基因组 DNA, 通过采用单因素逐项优化的方法, 对影响卷丹百合 RAPD PCR 扩增的反应组分浓度进行优化。[结果] 反应结果显示 RAPD 对模板的适应性很大; 体系中 Mg^{2+} 在 1.5 ~ 3.0 μ 都能产生较清晰的 RAPD 带; dNTP 较适合的浓度范围为 0.4 ~ 1.6 μ ; 引物较适合的浓度范围为 1.5 ~ 3.0 μ ; 体系中 Taq DNA 聚合酶在 0.1 ~ 0.8 μ 的浓度范围内均有良好的扩增效果。根据上述结果, 卷丹百合 RAPD PCR 反应最适的反应体系为: 20 μ 的反应体系中含基因组 DNA 2.0 μ , Mg^{2+} 2.0 μ , dNTP 1.2 μ , 引物 2.0 μ , Taq DNA 聚合酶 0.2 μ 。[结论] 该研究为在分子水平研究百合种质资源的分类及亲缘关系奠定了基础。

关键词 卷丹百合; RAPD; 体系优化

中图分类号 S682.2+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-14909-03

Study on Gradual Optimization of RAPD PCR Reaction System with Each Factor Design in *Lilium lancifolium* Thunb

HAN Ling et al (Shenyang Vocational Technical College, Shenyang, Liaoning 110045)

Abstract [Objective] The aim was to explore the establishment on the optimum system for the RAPD PCR reaction of *Lilium lancifolium*. [Method] The genomic DNA of *L. lancifolium* was extracted with the method of CTAB and the concn. of components effecting the RAPD-PCR amplification reaction of *L. lancifolium* was optimized by the method of the gradual optimization of single factor. [Result] The reaction result showed that RAPD had large adaptability on template; the system with the Mg^{2+} concn. between 1.5 μ and 3.0 μ could produce clearer RAPD bands; the suitable concn. range of dNTP was 0.4 ~ 1.6 μ ; the suitable concn. range of primer was 1.5 ~ 3.0 μ ; the system with the Taq DNA polymerase concn. between 0.1 μ and 0.8 μ had better amplification effect. According to the above result, the suitable reaction system of the RAPD PCR reaction of *L. lancifolium* was that 2.0 μ genomic DNA, 2.0 μ Mg^{2+} , 1.2 μ dNTP, 2.0 μ primer and 0.2 μ Taq DNA polymerase in the 20 μ reaction system. [Conclusion] The research laid the foundation for the study of the classification and the genetic relationship of the Lily germplasm conservation at the molecular level.

Key words *Lilium lancifolium*; RAPD; System optimization

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 是 1990 年在 PCR 基础上发展起来的分子标记技术, 因其具有简便、快速、灵敏、多态性检出率高、所需 DNA 量少、无需预先知道基因组 DNA 的序列、无需探针标记和杂交等特点, 已在植物亲缘关系、品种鉴定、遗传多样性检测、遗传图谱的构建与基因定位、突变体的鉴定以及育种材料的早期选择等方面得到了较多的应用, 但该技术易受外界因素的影响, 试验的重复性和稳定性较差。因此, 必须建立一个稳定的反应体系。笔者采用单因素逐项优化设计从模板、 Mg^{2+} 、dNTP、引物和 Taq DNA 聚合酶浓度 5 因素对卷丹百合 RAPD 反应体系进行优化, 以求最终获得最适反应体系, 为在分子水平研究百合种质资源的分类及亲缘关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 植物材料为卷丹百合, 取自沈阳农业大学花卉基地。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取。取卷丹百合的叶片, 用 CTAB 法提取 DNA^[1]。将样品稀释后用紫外可见分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 值, 估算样品的浓度, 并结合 0.8% 琼脂糖 (TaKaRa) 凝胶电泳确定其含量和完整性, 然后稀释至 40 ng/ μ 。

1.2.2 单因素逐项优化 RAPD 反应体系。对模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度和 Taq DNA 聚合酶浓度 5 种因素分别进行优化。模板浓度处理 (约 40 ng/ μ) : 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μ ; Mg^{2+} 浓度的处理 (25 mmol/L) : 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ ; dNTP 浓度的处理 (10 mmol/L) : 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ ; 引物浓度的处理 (20 ng/ μ) : 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ ; Taq 酶浓

度处理 (5 U/ μ) : 0.1、0.2、0.4、0.8 μ 。当某一因素设置不同浓度处理时, 其他成分浓度固定: 模板为 1.5 μ , Mg^{2+} 为 2.0 μ , dNTP 为 1.6 μ , 引物为 1.5 μ , Taq 酶为 0.1 μ 。所用试剂为 $MgCl_2$ 25 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 (Promega 公司) 5 U/ μ , dNTP (Biosharp 公司) 10 mmol/L, 引物 (SI383, 上海生工) 20 ng/ μ 。每管 PCR 反应体系中包含 2 μ buffer, 按各浓度处理加入各成分后, 用灭菌的超纯水补充总体积至 20 μ 。

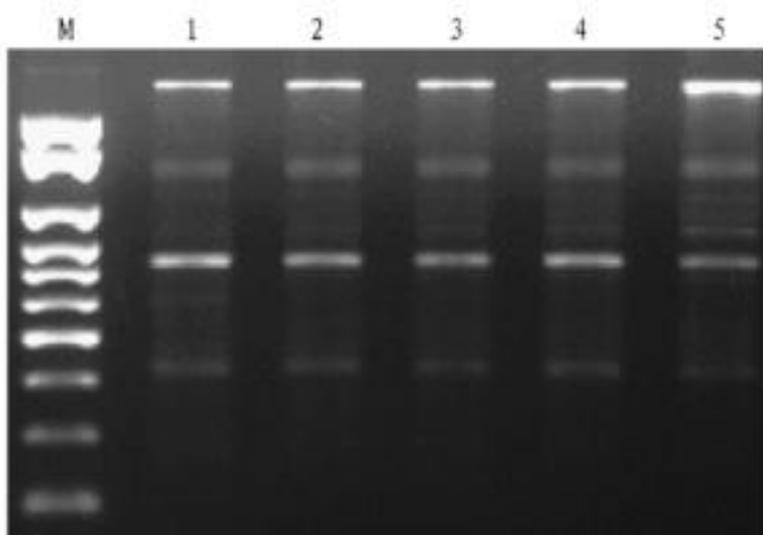
反应在 TC-512 PCR 仪中进行, 扩增程序为: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s; 38 退火 30 s; 72 延伸 1 min, 45 个循环; 72 延伸 10 min。扩增结束后, 在反应混合物中加入 5 μ 溴酚蓝, 混匀。取 10 μ 点入含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中, 于 1 \times TBE 电泳缓冲液中, 120 V 电场下电泳 90 min, 然后在 Gel Doc 凝胶成像系统 (Bio RAD) 中观察、照相。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响 在 20 μ 的反应体系中, 模板用量在 0.25 ~ 4.0 μ 设置 5 个浓度梯度, 其他成分固定: Mg^{2+} 2.0 μ , dNTP 1.6 μ , 引物 1.5 μ , Taq 酶 0.1 μ 。经 PCR 扩增后, 电泳谱带见图 1。反应结果显示模板 DNA 浓度在较宽的浓度范围内均能很好地扩增出清晰的条带, 说明 RAPD 对模板的适应性很强。浓度较高时, 出现了非特异性扩增带, 当 DNA 用量为 4.0 μ 时, 可见轻微的拖尾现象。因此, 浓度过高时, 可能出现严重拖尾现象, 甚至整个泳道一片白, 没有明显主带。说明 DNA 过量时, 引物过早被耗尽, 使扩增产物与模板 DNA 之间发生退火或在扩增产物之间发生退火, 导致出现弥散状背景, 这种现象可通过增加引物量和减少循环次数加以控制。

2.2 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 反应的影响 在 20 μ 的反应体系中, Mg^{2+} 用量在 0.5 ~ 3.0 μ 设置 6 个浓度梯度, 其他成分固定: 模板 1.5 μ , dNTP 1.6 μ , 引物 1.5 μ , Taq 酶 0.1 μ 。经 PCR 扩增后, 电泳谱带见图 2。反应结果显示, Mg^{2+} 在 1.5 ~

3.0 μ 能产生较清晰的 RAPD 带。 Mg^{2+} 浓度过低时, 无带或者带很不清晰; Mg^{2+} 浓度过高, 扩增带也不清晰。反应体系中, Mg^{2+} 的浓度显得非常重要。 Mg^{2+} 浓度主要是通过影响 Taq DNA 聚合酶的活性从而间接影响 PCR 扩增。 Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 不足时, Taq DNA 聚合酶的作用效率低, 因此, Mg^{2+} 浓度过低时, 无扩增条带或者条带不清晰; Mg^{2+} 浓度过高就易整合 dNTP, 当 dNTP 消耗殆尽, 无延伸反应, 扩增产物单链化, 因此, Mg^{2+} 浓度过高, 也会造成扩增带不清晰。最佳反应用量为 2.0 μ 。

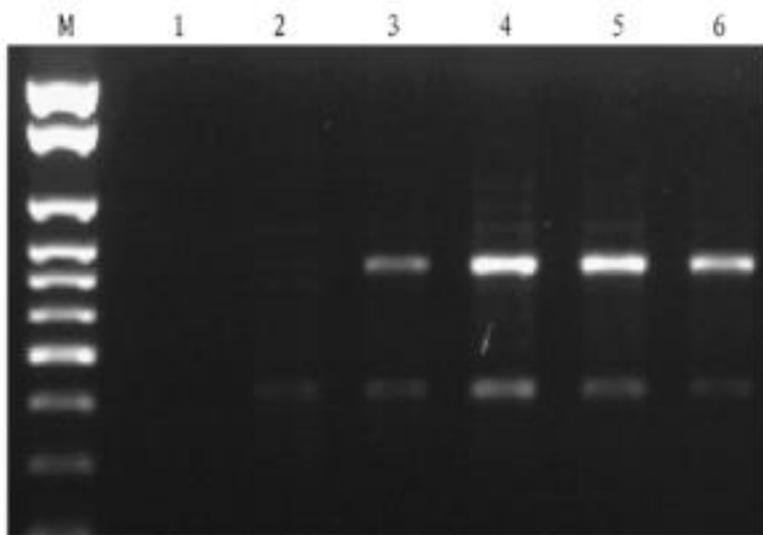


注: 泳道 1~5 的模板用量依次为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μ 。M 为 DL2000 Marker, 下同。

Note: The amount of template DNA in lane 1-5 are 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μ , respectively; M stands for DL2000 Marker; The same as below.

图1 不同模板 DNA 浓度的 RAPD PCR 反应体系的扩增结果

Fig.1 The amplification results of RAPD PCR system with different concentrations of template DNA



注: 泳道 1~6 的 Mg^{2+} 用量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ 。

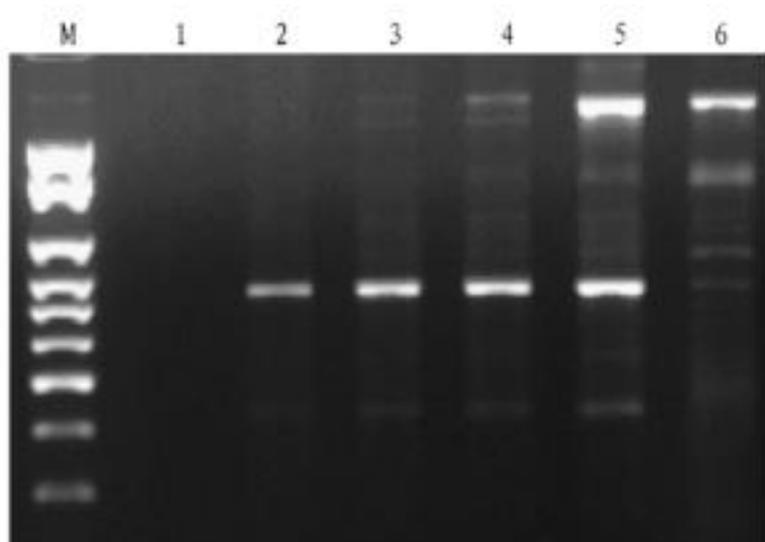
Note: The dosage of Mg^{2+} in lane 1-6 are 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μ respectively.

图2 不同 Mg^{2+} 浓度的 RAPD PCR 反应体系的扩增结果

Fig.2 The amplification results of RAPD PCR system with different concentrations of Mg^{2+}

2.3 dNTP 浓度对 RAPD 反应的影响 在 20 μ 的反应体系中, dNTP 用量在 0.1~3.2 μ 设置 6 个浓度梯度, 其他成分固定: 模板 1.5 μ , Mg^{2+} 2.0 μ , 引物 1.5 μ , Taq 酶 0.1 μ 。经 PCR 扩增后, 电泳谱带见图 3。由图 3 可以看出, dNTP 较适合的浓度范围为 0.4~1.6 μ 。dNTP 浓度过低, 电泳后出现无带或条带不很清晰等不良现象; dNTP 浓度过高, 条带弱或不清晰, 或者出现拖尾现象, 还有非特异性条带出现。当 dNTP 浓度过高时, 会从两方面影响 PCR 的扩增: 错误率增加; 同

Taq DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} , 从而使得反应体系中游离 Mg^{2+} 的量下降, Taq DNA 聚合酶活性受到影响。该试验中, dNTP 最佳用量为小于 1.6 μ 大于 0.8 μ 。



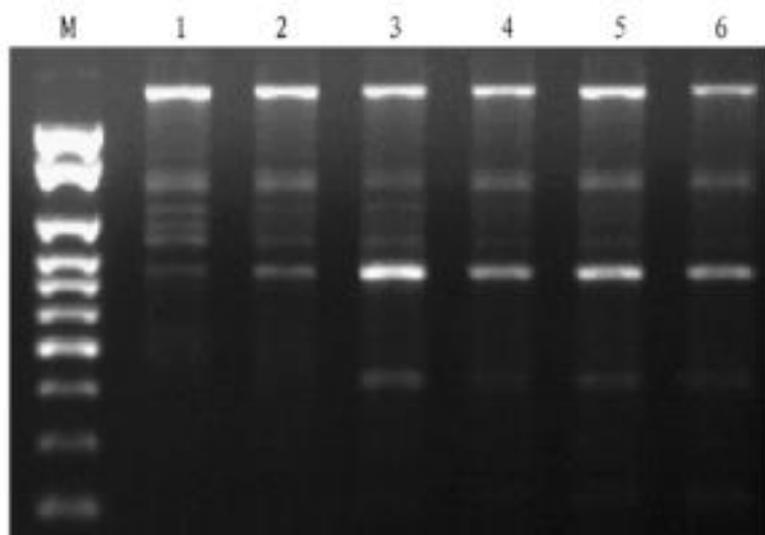
注: 泳道 1~6 的 dNTP 用量依次为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ 。

Note: The amount of dNTP in lane 1-6 are 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ , respectively.

图3 不同 dNTP 浓度的 RAPD PCR 反应体系的扩增结果

Fig.3 The amplification results of RAPD PCR system with different concentrations of dNTP

2.4 引物浓度对 RAPD 反应的影响 在 20 μ 的反应体系中, 引物用量在 0.5~3.0 μ 设置 6 个浓度梯度, 其他成分固定: 模板 1.5 μ , Mg^{2+} 2.0 μ , dNTP 1.6 μ , Taq 酶 0.1 μ 。经 PCR 扩增后, 电泳谱带见图 4。由 PCR 产物的电泳结果可见, 引物较适合的浓度范围为 1.5~3.0 μ 。引物浓度较低时, 与模板碰撞机会减少, 结合机率下降, 扩增反应过早终止, 扩增受到影响, 造成扩增条带过浅。当随机引物达到一定浓度时, 出现随机引物争夺模板 DNA 的情况, 这时只有部分位点可以和随机引物结合, 优先结合的是那些产生强带的位点, 会导致弱带的消失。当引物浓度偏高会引起错配和非特异性产物扩增, 也可增加引物之间形成二聚体或多聚体的机率。该试验中, 引物的最佳用量为 2.0 μ 。



注: 泳道 1~6 的引物用量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ 。

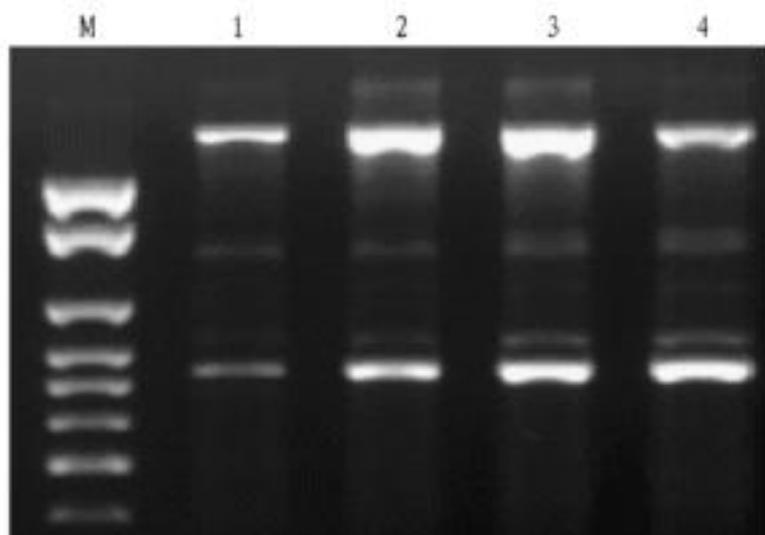
Note: The amount of primer in lane 1-6 are 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μ , respectively.

图4 不同引物浓度的 RAPD PCR 反应体系的扩增结果

Fig.4 The amplification results of RAPD PCR system with different concentrations of primer

2.5 Taq 酶浓度对 RAPD 反应的影响 在 20 μ 的反应体系中, Taq DNA 聚合酶用量在 0.1~0.8 μ 设置 4 个浓度梯度, 其他成分固定: 模板 1.5 μ , Mg^{2+} 2.0 μ , dNTP 1.6 μ , 引物 1.5 μ 。经 PCR 扩增后, 电泳谱带见图 5。由图 5 可知, Taq

DNA 聚合酶在所设置的浓度范围内均有良好的扩增效果。浓度较低时,效率降低,延伸不完全,扩增产物较少,可能是由于 Mg^{2+} 浓度恒定时, Taq 酶减少会使 Mg^{2+} 对酶的激活能力相对减弱造成的。因此,浓度过低可能不产生扩增产物;浓度过高时,可能非特异性会增加,出现弥散。该试验中, Taq 酶的最适用量为 0.2μ 。



注:泳道1~4的 Taq 酶用量依次为 $0.1, 0.2, 0.4, 0.8 \mu$ 。

Note: The amount of Taq polymerase in lane 1 - 4 are $0.1, 0.2, 0.4, 0.8 \mu$, respectively.

图5 不同 Taq 酶浓度的 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果

Fig 5 The amplification results of RAPD-PCR system with different concentrations of Taq polymerase

百合 RAPD-PCR 反应最适的反应体系为 20μ 的反应体系中含模板 DNA 2.0μ , Mg^{2+} 2.0μ , dNTP 1.2μ , 引物 2.0μ , Taq DNA 聚合酶 0.2μ 。

3 结论与讨论

(1) 该试验和有关资料均表明^[2-4], Mg^{2+} 浓度过高或过低均会影响扩增结果。 Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, Mg^{2+} 浓度过低,对 Taq 酶的活化作用不够,过高又会抑制该酶的活性。 Mg^{2+} 除直接影响 PCR 的特异性和效率外,还有利于引物和模板的结合及增加引物和模板结合后的稳定性,这对于使用非特异性引物的 RAPD 反应来讲, Mg^{2+} 显得更重要。但是反应体系中所示 Mg^{2+} 浓度并不一定是参加反应的游离 Mg^{2+} 浓度,因为反应体系中 DNA 模板的浓度、纯度、引物、dNTP 均会影响 Mg^{2+} 浓度。该试验中 Mg^{2+} 的最适浓度为 2.5 mmol/L 。

(上接第14908页)

- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 53 - 63.
- [4] 丁贵平, 袁建兴, 李利东, 等. 药食同源的百合[J]. 中国食物与营养, 2004(9): 51 - 52.
- [5] 陈心启, 梁松筠, 许介眉, 等. Liliaceae A.L. Jussieu[C]// 吴征镒, Raven P H. Flora of China. 北京: 科学出版社, 圣路易斯: 密苏里植物园出版社, 2000: 135.
- [6] 罗丽萍, 杨柏云, 蔡奇英, 等. 龙牙百合热处理及茎尖培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2005(1): 72 - 73, 104.
- [7] 童巧珍, 周日宝, 高彦宁, 等. 龙芽百合质量的研究[J]. 中医药导报, 2003, 12(6): 1 - 2, 10.
- [8] 李润根, 杨世平, 王小文. 万载百合及其栽培技术[J]. 中国蔬菜, 1995

dNTP 是作为 RAPD 扩增的反应底物, 它的用量直接影响扩增产物的多少、扩增特异性的高低以及合成的忠实性。dNTP 浓度过低会影响合成效率, 直接影响扩增产物的浓度, 甚至会因 dNTP 过早耗尽而使产物单链化而影响扩增效果; dNTP 浓度过高, 容易与 Mg^{2+} 结合, 降低 Mg^{2+} 浓度, 抑制 Taq 酶活性, 会使核苷酸错误掺入, 引起碱基的错配, 产生新的条带。 Taq 酶的活性与用量是关系到扩增能否正常进行的重要因素, 不同的生产厂家对酶浓度的标定可能不同, 因此在实验的过程中, 应针对所用的 Taq 酶确定用量。 Taq 酶浓度过低导致效率降低, 延伸不完全, 扩增产物减少; 使用高浓度的 Taq 酶, 不仅造成经济上的浪费, 而且容易产生非特异性扩增产物的积累, 影响实验结果^[5]。在该试验中, 从试验效果和经济角度考虑, Taq 酶适宜用量为 $1U$ 。

(2) 单因素逐项优化其表达方式直观, 能从几个水平中轻易择优; 但另一方面也忽略了各因素的相互作用。该研究单因素优化的结果与笔者之前所做的正交设计所得的结果是一致的, 也说明了单因素逐项优化设计的可行性。在反应条件一旦确定后, 整个试验过程中就应保持不变, 同时还应注意尽可能地使用同一厂家的药剂和同一 PCR 仪等设备, 以提高分析结果的重复性和可靠程度。

参考文献

- [1] 邹喻苹. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16 - 17.
- [2] 王跃进, LAMIKANRA OLUSOLA. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究[J]. 农业与生物技术学报, 1997, 5(4): 387 - 391.
- [3] 张彦萍, 刘海河. 西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 51 - 53.
- [4] 宋国立, 崔荣霞, 王坤坡. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 273 - 275.
- [5] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 1999: 35 - 36.
- [6] 刘湘丹, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合鳞叶总 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 12 - 14.
- [7] WANG S X, LIU Y, GENG X L, et al. Optimization of RAPD reaction system on genomic DNA of *Agropyre chaxingu* Huang[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 31 - 34.
- [8] 韩凌, 雷家军. 卷丹百合 RAPD-PCR 反应体系的正交优化[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 87 - 88.
- [9] YAN MM, WEI G C, PAN X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant—Modified CTAB method[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 39 - 41.
- [10] SHI K M, ZHOU Y F. An improved method of extracting *Atenisia abrotanum* Genomic DNA[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 36 - 38.
- [11] 刘湘丹, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合鳞叶总 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 12 - 14.
- [12] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tachiderms fasciatus* Heckel[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 37 - 39, 95.
- [13] 邓明文, 吴祝华, 席梦利, 等. 岷江百合 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 林业科技开发, 2007, 21(6): 6.