

荷包猪 RAPD-PCR 反应条件研究

赵艳¹, 刘伟¹, 朱雷² (1. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 辽宁沈阳 121001; 2. 锦州饲料监测中心, 辽宁锦州 121000)

摘要 [目的] 建立适合荷包猪 RAPD-PCR 反应的最佳反应体系。[方法] 以荷包猪为试验材料, 以 $MgCl_2$ 浓度、引物浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 用量、*Taq* DNA 聚合酶用量及退火温度为影响因子, 在保持其他影响因子一致的前提下, 变化单一因子, 筛选最优参数, 研究各影响因子对 RAPD-PCR 反应的影响。[结果] 最佳反应体系的总体积为 20.0 μ l, $MgCl_2$ 浓度为 2.5 μ mol/L, 引物浓度 2.0 μ mol/L, dNTP 浓度 400.0 μ mol/L, 模板 DNA 为 100 ng/ μ l, *Taq* DNA 聚合酶为 1.0 U。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min (94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 40 次), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。此反应体系所扩增出来的结果比较稳定, 带型清晰且亮度适中。[结论] 该研究为应用 RAPD 技术对荷包猪作进一步的遗传分析奠定了基础。

关键词 荷包猪; RAPD-PCR; 反应条件

中图分类号 S828 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)16-07353-02

Study on the RAPD-PCR Reaction Conditions for Hebao Pig

ZHAO Yan et al (College of Animal Husbandry and Veterinary, Liaoning Medical College, Shenyang, Liaoning 121001)

Abstract [Objective] The aim was to establish the optimum reaction system suitable for Hebao pig RAPD-PCR reaction. [Method] With Hebao pig as experimental material, Mg^{2+} concn., primers concn., dNTPs concn., template DNA amount, *Taq* DNA polymerase amount and anneal temperature as influential factors, single factor was changed under the condition of keeping other influential factors consistent, the optimum parameter was screened and the effect of each influential factor on RAPD-PCR reaction were studied. [Result] The total volume of the optimum RAPD system was 20.0 μ l, including 2.5 μ mol/L $MgCl_2$, 2.0 μ mol/L primers, 400.0 μ mol/L dNTP, 100 ng/ μ l template DNA and 1.0 U *Taq* DNA polymerase. The PCR reaction program was as follows: pre-denaturalization at 94 $^{\circ}$ C for 2 min, followed by 40 cycles, each cycle including denaturalization at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, anneal at 36 $^{\circ}$ C for 1 min, extension at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 5 min. The amplified result under the reaction system was more stable, the band was clear and the band brightness was moderate. [Conclusion] The research laid the foundation for further genetic analysis of Hebao pig by using RAPD technology.

Key words Hebao pig; RAPD-PCR; Reaction conditions

RAPD 即随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA), 是根据 PCR 技术, 以 1 条单一的、不同顺序随机排列碱基的单链 DNA (一般为 10 个碱基的寡核苷酸) 为引物, 对样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。

RAPD 技术是建立在 PCR 技术的基础上, 因此具有效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和易检测等优点。但由于 RAPD 技术对反应条件非常敏感, PCR 反应条件的改变会引起扩增结果的变化^[1], 但条件稳定可获得重复性好、稳定性好的结果。笔者对荷包猪^[2] RAPD-PCR 反应体系中的 $MgCl_2$ 浓度、引物浓度、模板浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量以及退火温度的影响进行了研究, 以建立适合荷包猪 RAPD-PCR 反应的最佳反应体系, 为应用 RAPD 技术对荷包猪作进一步的遗传分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料 荷包猪耳样采自辽宁省朝阳市喀左县。

1.2 主要仪器和试剂 RAPD 扩增仪 (美国 MJ. RESEARCH, INC 生产), 超速离心机, 电泳仪, 电泳槽, 凝胶成像系统。10 mmol/L Tris·Cl, pH 值 7.4, 10 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA。10% SDS, 蛋白酶 K (20 mg/ml 或粉剂), dNTP、引物 W06560 (序列 5'-3' 为 GCCTCTCTCT)、W05748 (序列 5'-3' 为 GAGCGTCGAA)、*Taq* DNA 聚合酶为上海生工生物工程技术有限公司产品。

1.3 模板 DNA 的提取 剪取 10 mg 猪耳组织置于 1.5 ml 离心管中, 用干净的眼科剪将组织块剪碎, 分别加入 600 μ l

的 STE、10 μ l 蛋白酶 K、75 μ l 10% SDS, 混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴消化过夜, 再用常规酚-氯仿-异戊醇抽提, 乙醇沉淀, TE 溶解 DNA, 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.4 模板 DNA 的检测 模板 DNA 的电泳检测结果见图 1。



图 1 荷包猪 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoretic detection results of Hebao pig DNA

由图 1 可见, 泳带带型均一旦亮度强, 无拖尾现象, $OD_{280nm/260nm}$ 值在 1.8 ~ 2.0, 符合扩增的要求。

1.5 PCR 反应试验设计 PCR 反应的基本条件: 20.0 μ l 反应体系, 2.0 μ l 10 \times Buffer, 1.0 μ l 25 mmol/L $MgCl_2$, 1.0 μ l 400 μ mol/L dNTP, 1.0 μ l 2 μ mol/L 引物, 0.2 μ l 1 U/ μ l *Taq* DNA 聚合酶, 1.0 μ l 100 ng/ μ l 模板 DNA, 不足的部分用灭菌双蒸水补足。在保持其他影响因子一致的前提下, 变化单一因子, 筛选最优参数。设计 35、36、37 $^{\circ}$ C 为退火温度, 影响因子梯度设置见表 1。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

作者简介 赵艳 (1972 -), 女, 辽宁锦州人, 副教授, 从事动物遗传育种研究。

收稿日期 2009-03-03

表1 PCR反应梯度设置

Table 1 The gradient design of PCR reaction

组分 Components	初始浓度 Initial concentration	终浓度 Final concentration	用量/ μl Amount
水			13.8
MgCl ₂	25.0 $\mu\text{mol/L}$	2.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0
dNTP	2.0 $\mu\text{mol/L}$	400.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0
引物	2.0 $\mu\text{mol/L}$	2.0 $\mu\text{mol/L}$	1.0
Buffer	10 \times	1 \times	2.0
Taq DNA 聚合酶	1 U/ μl	1 U/ μl	0.2
模板 DNA		100 ng/ μl	1.1

1.6 RAPD产物电泳检测 RAPD产物用1.0%琼脂糖凝胶(含0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的EB)电泳检测,凝胶成像系统观察拍照。

2 结果与分析

2.1 Mg²⁺浓度对扩增结果的影响 Mg²⁺是RAPD反应中的一个重要因素,Mg²⁺浓度为1.9 $\mu\text{mol/L}$ 时,仅见1条带,而且弱;浓度为2.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增带数增多,但带弱且亮度低;当浓度为2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增带数多且清晰;当浓度为2.8 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增带多但模糊,有拖尾现象;当浓度为3.1 $\mu\text{mol/L}$ 时,不见带。因此,选用2.5 $\mu\text{mol/L}$ Mg²⁺为最佳反应浓度。

2.2 dNTPs浓度对扩增结果的影响 当dNTPs浓度为100.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,仅扩增出1条带;浓度为200.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增出2条带,带少而弱;当浓度为400.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增的带数最多,而且带强;当浓度为500.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,有几条扩增带消失,其他的带变模糊且背景带浓。因此,选择400.0 $\mu\text{mol/L}$ 为适宜扩增浓度。

2.3 模板DNA浓度对扩增结果的影响 模板DNA的量对扩增结果的影响较大,但在一定范围内扩增的带型基本不变。当浓度过低时扩增无产物,浓度过高时,背景加强,出现弥散状。当浓度为100 ng/ μl 时,所扩增出来的带型最强,因此选择100 ng/ μl 为扩增浓度。

2.4 引物浓度对扩增结果的影响 引物浓度在1.2~2.8 $\mu\text{mol/L}$ 都有扩增产物,且带数和带型基本上无变化,当浓度为2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,带强且明亮,故选择该浓度为扩增浓度。

2.5 退火温度对扩增结果的影响 对于RAPD非特异性扩增来说,退火温度是一个很关键的因素。退火温度的高低直接影响引物与模板的结合,导致扩增产物在大小上的差异。通常,一个理想的退火温度需要通过试验来确定。该试验结果表明:当退火温度为36 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增带数最多,而在其他退

火温度下扩增带数较少或消失或模糊不清。因此选择36 $^{\circ}\text{C}$ 作为扩增的退火温度。

2.6 Taq DNA聚合酶用量对扩增结果的影响 Taq DNA聚合酶对RAPD的影响主要表现为高浓度下的非特异性扩增带增强,出现拖尾现象,背景带数增强;低浓度时扩增产物少。当用量为0.5 U时,扩增产物少;用量为1.0 U时,扩增产物增多,且背景清晰。

2.7 选定的RAPD反应体系稳定性的检测 扩增结果如图2所示,从电泳图片中可以看出,该反应体系所扩增出来的结果比较稳定,带型清晰且亮度适中。



图2 荷包猪DNA扩增结果

Fig.2 DNA amplified result of Hebao pig

3 讨论

由于RAPD反应非常灵敏,反应体系稍有变化就会导致扩增结果发生改变,RAPD的稳定性是其能否被广泛应用的关键问题。RAPD的产物没有确定的目标,要靠重复性来判断是否为阳性扩增^[3],不仅反应体系中的各个组分对扩增结果能够产生显著影响,而且其他外界因素对扩增结果也会产生比较大的影响,如PCR仪、操作技术与方法、反应体系组分的质量等。因此,RAPD研究结果在不同实验室之间难以进行重复和比较,给该技术的应用推广带来了不便。但是很多研究表明,只要条件适合,操作细心认真,提取高质量的模板DNA,选择理想的DNA浓度,合适的引物及引物数目,确定合适的聚合酶用量,其重复性是较高的。另外,具备稳定的扩增条件以及熟练的操作技术是提高扩增重复性的基础条件。

参考文献

- [1] 陈永久,张亚平.随机扩增多肽DNA影响因素的研究[J].动物学研究,1997,18(2):221-227.
- [2] 宋恒元.辽宁地方良种——荷包猪[N].中国畜牧报,2005-01-26.
- [3] 任军,黄路生,高军,等.家猪随机扩增多肽DNA最佳反应体系的探讨[J].江西农业大学学报,1999,21(2):269-272.