

## 香蕉 RAPD 分析初步研究

杜道林<sup>1,2</sup>, 苏杰<sup>1</sup>, 周鹏<sup>2</sup>, 罗素兰<sup>3</sup>, 黄秉智<sup>4</sup>, 郑学勤<sup>2</sup>

(1. 海南师范学院生物系, 海南海口 571158; 2. 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101;

3. 西北农业大学园艺系, 陕西西安 712100; 4. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640)

**摘要:** 比较了不同提取方法对香蕉植株不同部位组织提取 DNA 的质量及其 PCR 扩增结果, 对香蕉 RAPD 分析中引物种类和浓度、复性温度, dNTPs, TaqDNA 聚合酶浓度, 热循环数等因素进行了比较影响分析。结果表明, 虽然改良的 SDS 法、CTAB 法和 PVP 法提取的植株嫩叶和吸芽 DNA 提取量和纯度各不相同, 但其 PCR 扩增结果基本相同; 相同克隆不同植株的 DNA 其 PCR 扩增结果也基本相同; 建立了适合香蕉大规模 DNA 多态性分析 RAPD 反应体系: 25  $\mu$ L 反应液中, 含 1 倍缓冲液, 0.2 mM dNTPs, 0.32 pM 随机引物, 1 U Taq 酶, 20 ng 模板 DNA; 反应循环数为 45, 热循环条件为 94  $^{\circ}$ C, 1 min; 37  $^{\circ}$ C, 1 min; 72  $^{\circ}$ C, 1.5 min; 之前为 94  $^{\circ}$ C, 5 min; 之后为 72  $^{\circ}$ C, 10 min。在筛选的 249 个随机引物中, 有 18 个在 7 个品种上都能扩增出 3~10 条比较清晰条带。

**关键词:** 香蕉; RAPD; 影响因素

**中图分类号:** Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)03-0243-04

## Preliminary studies on the application of RAPD in *Musa*

DU Dao-lin<sup>1,2</sup>, SU Jie<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>2</sup>, LUO Shu-lan<sup>3</sup>,  
HUANG Bin-zhi<sup>4</sup>, ZHENG Xue-qin<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou 571158, China; 2. National Key Biotechnology

Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101, China; 3. Department of Horticulture,

Northwest Agricultural University, Xian 712100, China; 4. Pomology Research Institute of

Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effects of the DNAs, extracted from young leaves and buds (or sprouts) of *Musa* by modified SDS, PVP and CTAB methods, the primers and their concentrations, the concentrations of dNTPs, Taq DNA polymerase, annealing temperature and time, number of amplifying cycles, etc., on RAPD analysis in *Musa* were studied. The results showed that the amplified results were the same on the whole, although the quantitative and qualities of the DNAs of young leaves or buds extracted by modified SDS, PVP and CTAB methods were different, and the amplified results of different plants belong to the same clone were similar; and then the optimal amplification conditions for *Musa* were the following: 20 ng template DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.32 pM primer, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer in 25  $\mu$ L reaction volume. And 45 cycles of 94  $^{\circ}$ C for 1 min, 37  $^{\circ}$ C for 1 min and 72  $^{\circ}$ C for 1.5 min, then 72  $^{\circ}$ C for 10 min, 4  $^{\circ}$ C storing. In the 249 arbitrary primers used in experiment, only 18

收稿日期: 2000-02-28

作者简介: 杜道林(1970-), 男, 四川人, 博士, 副教授, 从事植物生态学、植物遗传学研究。

基金项目: 海南省教育厅项目(Hisk9909-1); 农业部生物技术重点项目; 海南省重点扶持学科“生态学”和海南师范学院科研启动基金资助项目。

primers were amplified 3~8 clear bands in all the 7 strains of *Musa*.

**Key words:** *Musa*; RAPD; effecting factors

基于 PCR (polymerase chain reaction) 技术的随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是 90 年代初发展起来的检测 DNA 多态性的分子标记技术<sup>[1,2]</sup>。由于其提供信息量大, 操作简便和没有放射污染而在种质遗传多样性、基因定位等方面得到了广泛应用<sup>[3]</sup>, 但许多研究者也发现, RAPD 技术并非理论上那么“简单易行”, 许多因素, 如以不同方法提取的不同植株不同部位的模板 DNA, 反应混合物组分 (DNA、dNTPs、Taq 酶、引物) 的浓度和相对比例等, 都可能影响 PCR 反应结果的准确性、稳定性和一致性<sup>[4~6]</sup>。

香蕉 (*Musa* spp.) 品种繁多, 遗传性状和背景比较复杂<sup>[7]</sup>, 所以尽管它在商业上具有重要价值 (为世界第四大水果), 但其杂交育种、性状改良等育种研究却很薄弱<sup>[8,9]</sup>。本研究试图以常见栽培种为材料, 研究其 DNA 多态性及分子标记, 为香蕉生物工程育种创造优良品种奠定基础。本文旨在阐明: (1) 获得适合于香蕉 RAPD 分析的 DNA (包括取材和 DNA 提取); (2) 获得稳定可靠的可大规模操作的香蕉 RAPD 反应体系和程序; (3) 筛选适合香蕉 DNA 多态性 RAPD 分析的随机引物, 以为大规模香蕉种质遗传多样性和分子标记研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

新鲜植物材料取自广东省农业科学院国家香蕉种质库。所有 RAPD 随机引物均为 10 个碱基的寡核苷酸, 242 个为 OPERON 公司产品, 7 个为设计并合成。Taq 酶、dNTPs、Buffer 等为华美公司产品; 琼脂糖为 Promega 公司产品; SDS、PVP、CTAB 为 Sigma 公司产品; 其他生化试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取植物嫩叶和吸芽, 分别采用改良的 SDS 法<sup>[10]</sup>、CTAB 法<sup>[11]</sup>和 PVP 法<sup>[12]</sup>提取其基因组 DNA。

(1) SDS 法。取 0.2 g 植物材料, 液氮快速研磨至粉末, 转入 1.5 mL 离心管中, 即加 3 倍体积提取缓冲液 (500 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM EDTA, 10% (v/v)  $\beta$ -巯基乙醇, 加冰冷 PVP (20%) 至终浓度为 6% 和 10% SDS 至终浓度为 2%

(W/V), 轻轻混匀后 65 °C 水浴 10 min, 加 1/10 倍体积 5 M KAc, 置冰上 30 min, 离心 (12 000 rpm, 15 min, 4 °C), 取上清液, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 沉淀 DNA, 真空干燥后溶于 200  $\mu$ L TE (pH8.0) 中 (含 Rnase (20  $\mu$ g/mL)), 37 °C 水浴 30 min, 用 1 倍体积饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 2 次, 异丙醇沉淀 DNA, 用 75% 酒精洗 2 次, 干燥后溶于 100  $\mu$ L TE (pH8.0) 中, 4 °C 保存备用。

(2) CTAB 法。取 0.2 g 植物材料, 液氮研至粉末, 转入 1.5 mL 离心管中, 加等体积 CTAB 提缓冲液 (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 20 mM EDTA (pH8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP, 20 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 2%  $\beta$ -巯基乙醇) 和氯仿: 异戊醇 (24: 1), 混匀后 65 °C 水浴 30 min, 离心 (12 000 rpm, 10 min, 室温), 取上清液, 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次, 异丙醇沉淀 DNA, 挑出絮状 DNA, 70% 酒精洗 2 次, 干燥后溶于 200  $\mu$ L 含 Rnase (20  $\mu$ g/mL) 高盐 TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA (pH8.0), 1 M NaCl) 中, 37 °C 水浴 30 min, 用 2 倍体积无水乙醇和 1/10 倍体积 3 M NaAc (pH5.2) 沉淀 DNA, 干燥后溶于 100  $\mu$ L TE (pH8.0), 4 °C 保存备用。

(3) PVP 法。取 0.2 g 植物材料, 液氮研磨至粉末, 转入 1.5 mL 离心管中, 加 3 倍体积提取缓冲液 (250 mM NaCl, 25 Mm EDTA, 0.5% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH8.0)), 轻轻混匀后, 置室温 1 h, 再加 PVP 至终浓度为 6%, 混匀后加 0.5 倍体积 7.5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 置冰上 30 min, 离心 (12 000 rpm, 10 min, 4 °C), 取上清液, 异丙醇沉淀 DNA, 干燥后溶于 200  $\mu$ L 含 Rnase (20  $\mu$ g/mL) TE (pH8.0) 中, 37 °C 水浴 30 min, 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 2 次, 异丙醇沉淀 DNA, 75% 酒精洗 2 次, 真空干燥后溶于 100  $\mu$ L TE (pH8.0), 置 4 °C 保存备用。

提取的 DNA 稀释后用紫外可见分光光度计 (BECKMEN DU-70) 测 OD 值和于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳, 观察 DNA 的纯度和分子量大小。

1.2.2 PCR 反应体系 在 25  $\mu$ L 反应体系中, 含 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 各 200  $\mu$ M, Primer 0.32 PM, 模板 DNA 20 ng, Taq 酶 1 U。某成分浓度变化以此为基础在个别实验中说明。

1.2.3 PCR 反应程序 将反应混合物混匀后, 加 25

$\mu\text{L}$  无菌液体石蜡油,  $94\text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min 后; 于  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min;  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.5 min, 45 个循环后,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存。复性温度变化, 变性和复性时间变化及循环数变化以此为基础在个别实验中说明。

1. 2. 4 随机引物筛选 共取 249 个随机引物进行筛选。PCR 扩增产物在含 EB 染色液的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳后, 在紫外检测仪上观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种 DNA 提取方法的比较

核酸的嘌呤、嘧啶中都有共轭双键, 对紫外光有强烈的吸收<sup>[3]</sup>, 天然双链 DNA 在 260 nm 处的吸收

值与 280 nm 处吸收值比值 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 应在 1.80 左右, 低则说明制剂中蛋白质可能未除尽, 高则说明制剂中还有 RNA<sup>[4]</sup>;  $A_{260}/A_{230}$  应  $\geq 2$ , 比值小说明制剂中可能残存核苷酸、氨基酸、酚、盐等小分子杂质<sup>[5,16]</sup>。3 种方法提取香蕉叶片 DNA 的结果比较见表 1, PVP 法和 SDS 法提取的 DNA 量较大 (其中 SDS 法最大), CTAB 法相对较小, 但 CTAB 法提取之 DNA 纯度较好, DNA 片段大小较一致 (图版 I-A)。3 种方法提取之 DNA 片段大都大于 23 kb, 分别以它们作模板进行 PCR 反应, 扩增结果基本相似 (图版 I-B), 说明此 3 种方法所提取之 DNA 都可直接用于 RAPD 分析。

表 1 三种方法提取香蕉 DNA 结果比较

Table 1 Comparison of DNAs extracted by three methods

项目 Items	PVP 法 PVP method		SDS 法 SDS method		CTAB 法 CTAB method	
	叶 leaf	芽 bud	叶 leaf	芽 bud	叶 leaf	芽 bud
DNA 外观形态 Exterior and form of DNA	白色沉淀 white sediment	白色沉淀 white sediment	白色丝状 white siliform	白色丝状 white filiform	白色絮状 white and resem- bling cotton	白色絮状 white and resem- bling cotton
OD230	0.164 8	0.175 7	0.275 0	0.280 7	0.052 6	0.054 7
OD260	0.242 7	0.261 4	0.520 4	0.532 7	0.104 9	0.112 1
OD280	0.148 3	0.158 1	0.295 9	0.301 9	0.058 0	0.062 5
OD260/OD280	1.636 5	1.653 7	1.758 9	1.764 3	1.808 6	1.792 4
OD260/OD230	1.472 4	1.487 6	1.892 1	1.897 6	1.992 6	2.048 5
提取率 ( $\mu\text{g/g}$ ) Extraction ratio	6.067 5	6.535 0	13.010 0	13.317 5	2.622 5	2.802 5
分子量大小 (kb) Molecular weight	>23	>23	>23	>23	>23	>23

### 2.2 不同植物体部位提取 DNA 比较

分别取香蕉嫩叶和吸芽, 采用以上 3 种方法提取其 DNA, 结果比较见表 1, 用之进行 PCR 反应, 结果见图版 I-C。表明吸芽 DNA 提取率要高于嫩叶, PCR 反应结果基本相同。考虑到采取吸芽不太容易和 DNA 提取程序的简捷性等原因, 取嫩叶以 CTAB 法提取 DNA 用于 RAPD 分析是可行的。

### 2.3 RAPD 反应体系和反应程序的优化

复性温度实验分别设计  $37$ 、 $42$ 、 $50$ 、 $55\text{ }^\circ\text{C}$ ; 当复性温度  $\geq 50\text{ }^\circ\text{C}$  时, 基本无明显条带; 复性温度为  $42\text{ }^\circ\text{C}$  时, 条带明显减少。循环中变性时间分别设计为  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 5、25、40、60 s, 复性时间均为  $37\text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 5 s 时无明显条带, 40 s 及以下时, 条带很少甚至没有。循环数设计为 5、20、35、40、45, 40 及以下时条带很少且弱甚至无。

dNTPs 浓度设计为 0.05、0.10、0.15 mM, 0.05 mM 时基本无明显条带, 0.10 mM 及以上时有较多条带 (但有的带很弱甚至无)。Taq 酶浓度设计为 0.25、0.5、1、1.5 U, 0.25 U 时基本无带, 1.5 U 时有

带纹拖尾。Primer 设计为 0.16、0.32、0.64、1.28 pM, 0.16 pM 时条带甚少, 而 1.28 pM 时条带多且有些模糊, 0.64 pM 和 0.32 pM 时结果相似。DNA 模板设计为 10、20、40、80 ng, 10 ng 时基本无带, 40 ng 及以上有带纹模糊拖尾现象。

综上所述, 建立香蕉 RAPD 反应体系为:  $25\text{ }\mu\text{L}$  反应液中含 1 倍缓冲液, 0.2 mM dNTPs, 0.32 pM 随机引物, 1 U Taq 酶, 20 ng 模板 DNA; 反应程序为:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min 后;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min;  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.5 min, 45 个循环; 然后  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

### 2.4 香蕉 RAPD 分析随机引物筛选

共取 249 个随机引物 (OPA、OPJ、OPH、OPO、OPV、OPQ (无 14)、OPU、OPW (无 03)、OPB、OPG (01、07、09、12、17)、OPS (01~07、12、17、18)、OPR (06~11、13、14)、OPP (11、15)、OPC (无 02、09、10、11、18) 及设计并合成的 7 个引物 (P1; 5'-CGC TGT CGT T-3', P2; 5'-GGG AGA GTG A-3', P3; 5'-GAG GAG TAC G-3', P4; 5'-CGC GTA CCA A-3', P5; 5'-GTG CTG GAT G-3', P6; 5'-GTC CGT ATG G-3',

P7:5'-GAG AGA CAG A-3'),用2个(品种)模板筛选后都能得到较清晰扩增条带共记62个引物,而用7种模板筛选后都能得到清晰扩增条带的引物共18个。

## 2.5 DNA多态性

所用引物不同,DNA扩增产物差别很大,扩增条带多达10多条,少则1~2条,很多都无,这说明可能在香蕉DNA链中的反应重复序列与随机引物序列存在着数量上差异。此外,同一引物对不同品种DNA扩增结果可表现出丰富的随机多态性(图版I-D),但一般都有1~3条共有带,说明供试品种既有遗传背景复杂性,又具同属种植物共性。

## 2.6 相同组培单元(clone)不同单株RAPD结果

取7个品种各相同克隆各2个不同单株进行RAPD分析,发现单株间DNA并不表现出明显的多态性,而是比较相似,但不同品种却表现出明显的多态性(图版I-E)。

## 3 讨论

本研究旨在为大规模香蕉RAPD分析奠定基础,包括解决模板DNA来源及准备、PCR反应系统和程序、引物筛选等问题。从结果分析,在对叶和芽DNA提取的3种方法中,由于PVP和SDS与CTAB法在原理上有差异,加之香蕉材料本身的特殊性,故PVP和SDS法虽产量稍高,但纯度不及CTAB法,所有提取方法获得的DNA片段都大于23 kb,可直用于RAPD分析。因为相同克隆的不同单株其DNA并不表现出明显多态性,故一般1个克隆(clone)取1个单株材料就可以了。

在筛选的249个引物中,有18个在7个品种的DNA模板中都能扩增出比较清晰条带,表现了香蕉基因组本身的特殊性。根据可扩增出清晰带的引物序列,我们设计并合成了7个引物,它们都能在7个品种上扩增出明显条带,这也说明在掌握较多随机引物扩增信息时,我们可以设计比较有效的特异引物来简捷地对香蕉DNA多态性进行分析,甚至它们可能成为极具商业价值的分子标记。

## 参考文献:

- [1] Mullis K B, Faloona F A, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro; the polymerase chain reaction[J]. *Cold Spring-Harbor Symp Quant Biol.* 1986, 51:263—273.
- [2] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18: 6531—6535.
- [3] 卢江. 随机放大多态性DNA[RAPD]——一种新的分子遗传标记技术[J]. *植物学报*, 1993, 35(增刊):119—127.
- [4] Deragon J M, Landry B S. RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extraction from small leaf disks[J]. *PCR Methods Appl.* 1992, 1: 174—180.
- [5] Dolye J J, Dolye J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, 12:12—15.
- [6] 戴思兰, 陈俊愉, 高荣孚, 等. DNA提纯方法对9种菊属植物RAPD的影响[J]. *园艺学报*, 1996, 23(2): 169—174.
- [7] Simmonds N W, Weatherup S T C. Numerical taxonomy of the wild banana (*Musa*)[J]. *New Phytol.* 1990, 115:567—571.
- [8] 贺竹梅, 李宝健. 香蕉生物技术现状与展望[J]. *生物工程进展*, 1997, 17(5):18—22.
- [9] Jack E Staub, Felix C Serquen. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding[J]. *HortScience*, 1996, 31(5):729—740.
- [10] 傅荣昭, 孙勇如, 贾土荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1994. 141—144.
- [11] Dolye J J, Dolye J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull.* 1987, 19:11—15.
- [12] Kim C S. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25(5):1085—1086.
- [13] 沈仁仅. 基础生物化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1980. 146—147.
- [14] 曹敬鸣. 核酸化学导论[M]. 厦门:复旦大学出版社, 1992. 28—35, 63—70.
- [15] Saito, Hand Miura. Preparation of transforming deoxy nucleic acid by phenol treatment[J]. *Biochemi Biophys Acta*, 1963, 72:619.
- [16] 姜泊. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 1995. 65—69.



*Machilus pauhoi* Kanehira 与 *M. Polyneura* H. T. Chang 比较图

1. Kanehira 认定的刨花 *M. pauhoi* Kanehira (据 H. H. Chung 2897, 福建延平); 2. 典型的 *M. polyneura* H. T. Chang (据 W. Y. Chun, IBSC No. 92889, 香港)。