

桔梗 RAPD 反应体系的优化

孙丽娜, 严一字*, 吴基日, 吴松权, 金东淳, 王立平

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要: 以通化桔梗为材料, 用改进的 CTAB 法提取桔梗叶片的总 DNA, 通过对不同镁离子浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 含量、引物浓度、DNA 聚合酶量条件下的 RAPD 扩增反应的效果, 建立了一个适合桔梗的比较稳定的 RAPD 反应体系, 用于桔梗遗传多样性分析。结果表明, 桔梗 RAPD 扩增反应的最佳体系为: 模板 DNA 20 ng, dNTP 150 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.3 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 Unit, $10\times$ Buffer 2.0 μL , PCR 反应总体积为 20 μL 。按此优化 RAPD 条件进行实验, 重现性良好。

关键词: 桔梗; 体系优化; CTAB; RAPD

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)03-0410-04

Optimization of RAPD conditions of *Platycodon grandiflorus*

SUN Li-Na, YAN Yi-Zi*, WU Ji-Ri, WU Song-Quan,
JIN Dong-Chun, WANG Li-Ping

(College of Agriculture, Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: The total DNA in young leaves of *Platycodon grandiflorus* from Tonghua was successfully extracted by using the developed CTAB method. The optimum reaction system of RAPD for the *P. grandiflorus* was established by RAPD analysis of the different Mg^{2+} , DNA templates, primers and DNA polymerase. The results show that the most optimal reaction system of RAPD is: 20 ng template DNA, dNTP concentration 150 μL , 0.3 $\mu\text{mol/L}$ primer, MgCl_2 2.0 mmol, 1 U Taq polymerase, $10\times$ Taq polymerase buffer at 2.0 μL in the 20 μL reaction volume. A high reproducibility was obtained with the optimized experiment condition.

Key words: *Platycodon grandiflorus*; system optimization; CTAB; RAPD

桔梗(*Platycodon grandiflorus*)系桔梗科桔梗属植物, 它既是一种资源植物, 又是一种药、食、观赏兼用的经济植物(刘德军等, 2001)。国内外对桔梗的化学成分和组织培养方面研究较多, 而在分子水平上对桔梗进行分类的研究还未见报道(舒变等, 2001)。随机扩增多态 DNA 是运用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段, 用以作为分子标记的一种分子生物学研究手段, 具有快速、简便等优点(赵喜

华等, 2005)。运用 RAPD 技术对桔梗进行遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系, 以保证 RAPD 结果的可靠性与重复性。为此, 本实验就桔梗 RAPD 反应中的 dNTP 浓度、镁离子浓度、Taq 酶用量、模板 DNA 浓度、引物浓度等因素对实验结果的影响进行探讨, 建立了重复性好、稳定的桔梗 RAPD 反应体系, 对桔梗运用 RAPD 技术进行探讨, 为进一步分析桔梗遗传多样性打下基础。

收稿日期: 2006-03-30 修回日期: 2006-12-03

基金项目: 吉林省科技厅资助(20040553); 延边大学校课题[延大科合字(03)第 07 号][Supported by Science and Technology Department of Jilin Province(20040533); Yanbian University(03)07]

作者简介: 孙丽娜(1979-), 女, 吉林镇赉县人, 在读硕士, 研究方向: 桔梗种质资源的比较研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail, yiziyian@yahoo.com.cn)

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 模板 DNA 制备材料取自吉林省延边大学农学院桔梗试验田,取干净的通化桔梗嫩叶,迅速放入封口袋密封,置于-70 °C 低温冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂 琼脂糖;CTAB、EDTA、dNTP、MgCl₂、Taq 酶、Tris、10×Taq 酶配套缓冲液、引物、β-巯基乙醇等。以上药品均由上海华美生物工程公司提供。

1.1.3 仪器 凝胶成像系统;紫外分光光度计(U-3010);三恒多用电泳仪(北京六一仪器);台式离心机(HERMLE2383K);PCR 仪(PCR System9700);超低温冰箱等。

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板的制备与定量 基因组总 DNA 的提取,采用改进的 CTAB 法(张吉宇等,2004)称取 0.1~0.3 g 幼叶,在液氮中研磨至粉末状,置于 1.5 mL 离心管中,加入 650 μL 预热到 65 °C 的 2×CTAB 提取缓冲液(2% CTAB;20 mM EDTA;100 mM Tris-HCl(pH8.0);1.4 M NaCl;1% pvp)和 10 μLβ-巯基乙醇,65 °C 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),剧烈振荡。室温下 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液置于 1.5 mL 离心管中,再加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)振荡混匀,在室温下 12 000 rpm 离心 5 min。取上清液置于新离心管中,加入 2/3 体积-20 °C 预冷的异丙醇,置-20 °C 冰箱中放置 30 min 至出现絮状沉淀,弃去上清液,用 70% 的酒精洗涤沉淀两次,将离心管倒置于吸水纸上干燥。加入 100 μL 1×TE 缓冲液溶解 DNA,加入 2 μL RNase 37 °C 保温 1 h 去除 RNA。紫外分光光度计检验 DNA 的浓度及纯度。将 DAN 浓度定为 10 ng/μL,于-20 °C 冰箱中保存、备用。

1.2.2 体系优化的试验设计 首先确立基本反应条件,即 PCR 反应总体积为 20 μL 体系,其中含模板 DNA 20ng,引物 0.2 μmol/L,TaqDNA 聚合酶 1 unit,dNTP 200 μmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L,10×PCR 缓冲液 2.0 μL,其余以重蒸馏水补充至 20 μL,在上面覆盖一薄层矿物油。在保持其它因素一致的条件改变单一因子,以 UBC320(CCG GCA TAG A)为引物对反应体系中的模板 DNA、引物、

dNTP、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶分别设置不同浓度梯度(表 1)进行优化并筛选出最优参数(张吉宇等,2004;常爱霞等,2004)。

表 1 RAPD 反应体系中的各成分用量

Table 1 Amount of components in RAPD reaction system

浓度梯度 Concentration grades	1	2	3	4	5	6
DNA (ng)	5	10	20	30	40	50
引物 Primer (μmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
dNTP (μmol/L)	50	100	150	200	250	300
MgCl ₂ (mmol/L)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Taq 酶 Taq DNAse (U)	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

1.2.3 PCR 程序与参数设定 PCR 反应在 System 9700 PCR 仪上进行,反应程序为预变性 94 °C 5 min,94 °C 变性 1 min、40 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 90 s 共循环 40 次,最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 1.4%(含有 0.5 μg/mL 溴化乙锭)的琼脂糖凝胶进行电泳,用 Dolphin 凝胶成像仪照相。

2 结果与分析

2.1 桔梗 DNA 的提取及分析

按照上述方法进行桔梗的 DNA 抽提,经紫外分光光度计检测,结果 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 分别为 0.452、1.092、0.587,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.86,说明所提取的 DNA 较纯、不含有蛋白质和酚;OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.4,说明 DNA 中没有残存的盐和核苷酸、氨基酸、酚等小分子杂质。

2.2 体系优化的分析

2.2.1 模板浓度筛选 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应影响极大(图 1)。DNA 用量在 5 ng 和 50 ng 之间均能扩出谱带,但在 5 ng 和 10 ng 下扩增出的带不太清晰;30、40 ng 和 50 ng 时缺失部分带;DNA 用量在 20 ng 时可得到好的扩增结果,模板 DNA 用量少且清晰。因此,将模板 DNA 的用量定为 20 ng 比较理想。

2.2.2 引物浓度筛选 引物浓度对 RAPD 反应影响也较大(图 2)。随着引物浓度的增加,扩增出的带较多且清晰,但从 0.3 μmol/L 以后带型基本一致,引物用量在 0.3 μmol/L 时,带型清晰且引物用量少。因此,本研究的引物用量以 0.3 μmol/L 为最适值。

2.2.3 Taq 聚合酶浓度筛选 Taq 聚合酶浓度对 RAPD 反应影响很大。Taq 聚合酶浓度过高或过低都出现缺失的带,图 3 中可以看出 Taq 聚合酶浓度

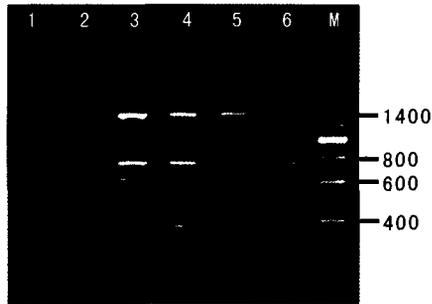


图 1 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响
Fig. 1 Effect of template DNA concentration on RAPD reaction

M: 200 bp 的 DNA 分子量标记; 数字为 DNA 浓度梯度(表 1)。下同。
200bp DNA ladder; lanes 1 to 6 correspond to concentration grades for template DNA listed in table 1. The same below.

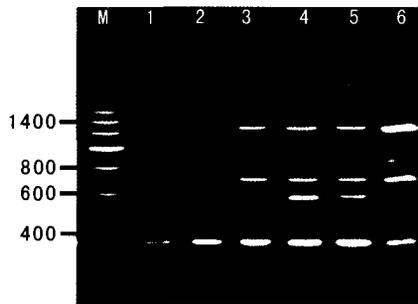


图 2 引物浓度对 RAPD 反应的影响
Fig. 2 Effect of primer concentration for RAPD reaction

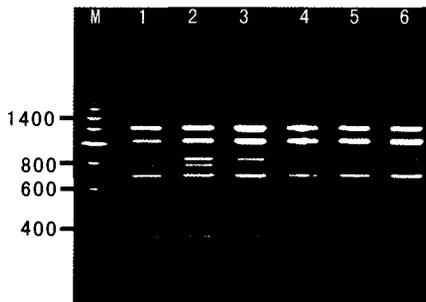


图 3 Taq 聚合酶浓度对 RAPD 反应的影响
Fig. 3 Effect of Taq DNase concentration on RAPD reaction

在 1.0 U 和 2.0 U 时扩增出较多、清晰的 DNA 带, 扩增产物数量没有变化, 从扩增效果和节约实验费用考虑, 认为 Taq 聚合酶浓度以 1U 为宜。

2.2.4 dNTP 浓度筛选 图 4 表明, dNTP 浓度在 100~250 $\mu\text{mol/L}$ 之间扩增产物条带清晰明亮。浓度过低和过高均有缺失的带, 浓度过高时缺失 1 050 bp 和 1 600 bp DNA 带(泳道 5、6)。从扩增效果和

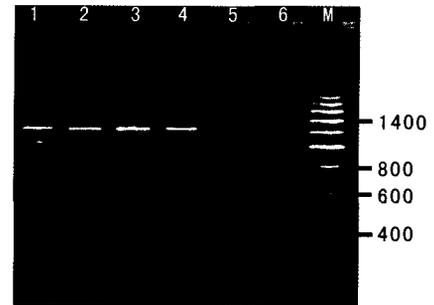


图 4 dNTP 浓度对 RAPD 反应的影响
Fig. 4 Effect of dNTP concentration on RAPD reaction

节约实验费用考虑, dNTP 浓度在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时是较合理的。

2.2.5 MgCl_2 浓度筛选 由图 5 看出, 除了 0.5 mmol/L 时没有扩增产物外, 在 1.0~3.0 mmol/L 内均有较清晰的谱带, 为避免 MgCl_2 浓度过低影响聚合酶活性而过高造成非特异性扩增, MgCl_2 浓度选择 2.0 mmol/L。

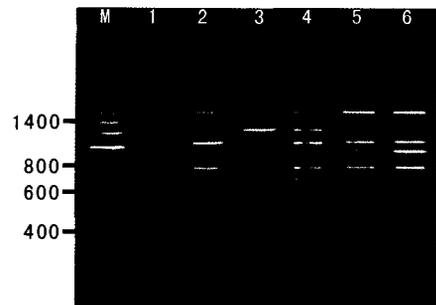


图 5 MgCl_2 浓度对 RAPD 反应的影响
Fig. 5 Effect of MgCl_2 concentration on RAPD reaction

2.3 优化后反应体系的扩增结果

采用优化后的反应体系, 用引物 OPD19 对 24 种桔梗种质资源进行扩增(图 6)。可以看出, 扩增谱带清晰, 说明优化后的反应体系均适合于桔梗的 RAPD 分析(陶钧等, 2005)。

3 结论

不同的材料, 不同的实验方法, 所需要的扩增条件也很不一样, 会对 RAPD 的图谱产生较大的影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性, 而 RAPD 谱带的准确性与稳定性是利用 RAPD 标记进行遗传多样性分析的前提条件, 而有关 RAPD 报道的文献非常多, 但没有统一的反应物用量尺度, 因此有必要对

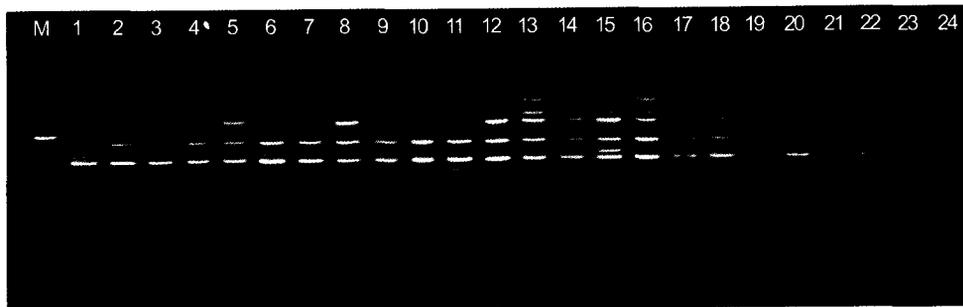


图 6 优化后反应体系的 RAPD 结果

Fig. 6 The result of optimized reaction system on RAPD analysis

RAPD 进行优化,而本实验经过多次重复,都能很好地反映以上结果。利用 UBC 公司(加拿大)引物优化的体系在对于华美公司合成的引物(如 OPD19)扩增时得到很好的 RAPD 图谱(图 6),这说明不同公司的引物可用于本文优化的 RAPD 体系。

因此本实验得出桔梗 RAPD 扩增反应的最佳体系为:在 20 μ L PCR 反应体积中,模板 DNA 20 ng, dNTP 150 μ mol/L,引物 0.3 μ mol/L, Mg^{2+} 为 1.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 Unit, 10 \times Buffer 2.0 μ L。按照优化的 RAPD 条件进行实验,重现性良好。

参考文献:

- 刘德军,冯维希. 2001. 桔梗[M]. 中国中医药出版社
- 舒雯,高山林. 2001. 桔梗研究进展[J]. 中国野生植物资源, 20(2):4-6,23
- Chang AX(常爱霞), Qu YS(瞿永生), Jia XH(贾兴华). 2004. Optimization of tobacco RAPD reaction system and studies on polymorphic marker of tobacco varieties(烟草 RAPD 反应体系优化及品种多态性标记研究)[J]. *China Tobacco Sci*(中国烟草科学), (2):9-13
- Tao J(陶钧), Luo ZY(罗志勇), Liu SP(刘水平), et al. 2005. Optimizing of RAPD amplifying condition and analysis of genetic DNA polymorphisms of *Gastrodia elata* Blume(RAPD 条件优化及天麻基因组 DNA 多态性分析)[J]. *Life Sci Res*(生命科学研究), 9(2):150-155
- Zhao XH(赵喜华), Wang MY(王曼莹). 2005. Optimization of RAPD conditions of *Rhododendron*(杜鹃花 RAPD 条件的优化)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 15(1):41-43
- Zhang JY(张吉宇), Yuan QH(袁庆华), Zhang WS(张文淑), et al. 2004. Genomic DNA extraction and optimizing RAPD procedure of *Lespedeza floribunda*(多花胡枝子基因组 DNA 提取与 RAPD 反应体系优化)[J]. *Acta Agrictir Sin*(草地学报), 12(3):219-222,230
- Li HS(李海生), Chen GZ(陈桂珠). 2004. Genetic diversity of *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) in China detected by intersimple sequence repeats(ISSR) analysis(中国卵叶海桑遗传多样性的 ISSR 研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(1):17-22
- Min ZD(闵知大), Zhong SM(钟守明). 1980. Studies on the alkaloids from *Stephania kwangsiensis*(广西地不容生物碱的研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 15(9):532-537
- Peng YT(彭云涛), Tang SQ(唐绍清). 2005. Genetic diversity of *Siraitia grosvenorii* detected by ISSR markers(野生罗汉果遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), 13(1):36-42
- Qian W(钱韦), Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSR(采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 42(7):741-750
- Qiu YH(邱英雄), Fu CX(傅承新), He YF(何云芳). 2002. Identification of *Michelia tosi* types using ISSR-PCR marker assays(乐昌含笑不同类型鉴定的 ISSR-PCR 分析)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), 38(6):49-52
- Shi LM(施立明). 1990. Genetic diversity and conservation(遗传多样性及其保护)[J]. *Biosci Inform*(生物科学信息), (2):158-164
- Wang SQ(王水琦), Lin YQ(林彦铨), Yang H(杨浩), et al. 2003. RAPD and ISSR analysis of germplasmic resources of chewing cane(果蔗种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi(Nat Sci)*(江西农业大学学报自然科学版), 3:412-417
- Wu W(吴卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈黎). 2003. Analysis on genetic diversity of germplasm resources of *Cordate houttuynia* by ISSR marker(利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性)[J]. *World Sci Tech Modern Trad Chin Medicine Mat Med*(世界科学技术-中医药现代化), 1:70-77
- Zietkiewicz, Rafalskia, Labudad. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20:176-183

(上接第 409 页 Continue from page 409)