

# 采用正交设计和响应曲面设计法优化芦苇 随机扩增多态 DNA体系

## Optimal of RAPD Reaction System on *Phragmites australis* by Orthogonal Design and Response Surface Design

刘金文 沙伟 滕兆岩

Liu Jinwen Sha Wei Teng Zhaoyan

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院 黑龙江齐齐哈尔 161006)

(The Life Sci. and Engineering College, Qiqihaer Univ., Qiqihaer, Heilongjiang, 161006, China)

**摘要** 采用正交设计和响应曲面设计(RSD)优化适合于芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud] 随机扩增多态 DNA(RAPD)的反应体系,结果确定芦苇 RAPD反应体系的最佳方案为:在 PCR扩增程序,冷启动,94℃变性 1 min,36℃复性 90 s,72℃延伸 2 min,40个循环;72℃延伸 7 min,4℃保存;25 $\mu$ l反应体系包括模板 DNA 60 ng 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP) 7.5 mmol Taq酶 1.5 u 引物 5 pmol

**关键词** 芦苇 RAPD 正交设计 响应曲面设计 条件优化

中图分类号 Q943

**Abstract** The optimum reaction systems of RAPD were obtained by orthogonal design and response surface design (RSD). The RAPD reaction system of *Phragmites australis* were determined. For a 25 $\mu$ l reaction, the optional composition included 60ng of template DNA, 7.5 mmol of dNTP, 1.5 u of taq DNA, 5 pmol of primer. The program for efficient amplification included 40 cycles of denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, annealing at 36 $^{\circ}$ C for 1.5 min, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 2 min(7 min for the final cycle).

**Key words** *Phragmites australis*, RAPD, orthogonal design, response surface design, RAPD optimal

芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud] 属禾本科芦苇属,也称普通芦苇,广泛分布于全国各地的湖泊、浅水洼地、河流沿岸、滨海滩涂和河口等各种生境。长期适应不同地区气候和生境,我国的芦苇分化出一些地方变种<sup>[1]</sup>。除了张淑萍<sup>[2]</sup>用 RAPD方法检测黄河下游芦苇的遗传变异外,国内关于芦苇遗传多样性的研究很少。

随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技术是以多聚酶链式反应(PCR)为基础,用随机排列的寡聚脱氧核苷酸单链扩增基因组中不同位点的 DNA,进而获得等位位点的多态性<sup>[3]</sup>。RAPD技术已被广泛应用于基因定位、构建遗传图谱、寻找特定基因连锁标记、研究植物分类和进化以及种群遗传变异性等<sup>[4]</sup>。本研究以芦苇为研究对象,在正交设计结果的基础上,进一步应用统计学方法中的响应曲面设计(Response Surface Design,

RSD)进行 RAPD反应体系优化,目的在于得到适合芦苇 RAPD的扩增条件,为今后研究芦苇遗传变异奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 芦苇 本试验所用芦苇取自黑龙江扎龙自然保护区。野外采集幼芽,立即放入冰壶中带回实验室,冷藏于-75 $^{\circ}$ C中,用于提取 DNA

1.1.2 试剂 引物序列为 5-TGTCTGGGTG-3,三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)、Taq DNA 聚合酶、Buffer 和琼脂糖凝胶由北京鼎国生物公司提供

1.1.3 仪器 PCR仪为德国产 PE-480,紫外凝胶成像系统 UVP-8000

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 模板 DNA的提取

取 0.3 g 芦苇嫩芽,加入少许抗坏血酸钠和 $\beta$ -ME,在液氮中迅速研磨成细粉末状,迅速移入 1.5

ml的 Eppendorf tube 中,立即加入 750  $\mu$ l 预热 (60 $^{\circ}$ C)的 CTAB提取液 60 $^{\circ}$ C水浴保温 40 min,每隔 3~ 5 min轻轻混匀 冷却至室温后,加入等体积的 CI 提取液,颠倒混匀 10 min,10000 rpm 离心 8 min,缓慢吸取上清液到一新的 Eppendorf tube 中。重复 CI 抽提 2~ 3次,直至界面无蛋白质沉淀出现 上清液中 加入 2.5倍体积的无水乙醇,混匀,可见絮状沉淀,用 玻璃棒挑取,用 75%的乙醇溶解沉淀与一新的 Eppendorf tube 中。用 75%的乙醇漂洗 DNA 2次,室 温下风干,溶于 100 $\mu$ l 的无菌水中备用

### 1.2.2 反应体系的组成及扩增条件

RAPD的反应总体积为 25 $\mu$ l 扩增条件<sup>[2]</sup>(经改良):冷启动;94 $^{\circ}$ C变性 1 min,36 $^{\circ}$ C复性 90 s,72 $^{\circ}$ C延 伸 2 min,40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸 7 min 1个循环;4 $^{\circ}$ C保 存。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,3 V/cm,3 h, EB染色,紫外凝胶成像系统观察并照相分析

### 1.2.3 RAPD反应体系优化的正交设计

由于我们所用的 Buffer 内含 Mg<sup>2+</sup>,因此其它的 4个因素:模板 DNA, dNTP, Taq 酶和引物为试验的 表 2 4因素 3水平响应曲面设计

Table 2 Determination of three levels from four factors in response surface design

反应因素 Response factor	反应因素的浓度 Response factor concentration												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
模板 DNA Template DNA(ng)	20	60	20	60	60	60	100	20	100	100	100	60	20
dNTP (m/M)	7.5	10	5	10	10	7.5	7.5	10	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Taq 酶 Taq polymerase(2u $\mu$ l)	0.3	0.3	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	0.5	0.7	0.3	0.5	0.3	0.5
引物 Primer (10Pmol $\mu$ l)	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	1.0	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.5

反应因素 Response factor	反应因素的浓度 Response factor concentration													
	14	15	16	17	18	19	20	20	22	23	24	25	26	27
模板 DNA Template DNA(ng)	60	100	60	60	60	60	20	60	60	100	100	60	60	60
dNTP (m/M)	7.5	7.5	7.5	7.5	5	10	7.5	5	5	7.5	5	5	7.5	10
Taq 酶 Taq polymerase(2u $\mu$ l)	0.5	0.5	0.3	0.7	0.3	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5
引物 Primer(10Pmol $\mu$ l)	0.75	1.0	1.0	0.5	0.75	1.0	1.0	1.0	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75

注:模板浓度为 25 $\mu$ l 体系的总含量 Note The concentration of every factor is in 25 $\mu$ l reaction system.

## 2 结果和分析

### 2.1 RAPD反应体系优化的正交设计

从图 1中可以看到,在正交设计的 16组中出现 条带的组合有第 3 4 7 8 9 10组合,其他各组合没 有出现条带。同时在 25 $\mu$ l 的 RAPD反应体系中模板 DNA 的浓度为 120 ng 的各组合中均没有条带,说明 在 25 $\mu$ l 芦苇 RAPD反应体系中最高模板浓度不能高

主因素 采用 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)正交表,设计 4因素 4水平(表 1)的正交试验,共设 16个处理组合,每组重复 2次, 先找到适合芦苇 RAPD反应所要求的各个因素的范 围

表 1 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)正交设计各因素的水平设计

Table 1 Determination of levels from each factor in L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) orthogonal design

水平数 Level	模板 DNA Template DNA (ng)	dNTP (10 Mm)	Taq 酶 Taq polymerase (2 u $\mu$ l)	引物 Primer (10 Pmol $\mu$ l)
1	20	0.25	0.2	0.25
2	40	0.5	0.3	0.5
3	80	0.75	0.5	0.75
4	120	1	0.7	1

注:模板浓度为 25 $\mu$ l 体系的总含量 Note The concentration of every factor is in 25 $\mu$ l reaction system.

### 1.2.4 RAPD反应体系优化的响应曲面设计

基于正交设计的结果,进一步应用统计学方法中 的响应曲面设计,采用 4因素 3水平的 RSD进行 RAPD反应体系优化。应用 SAS软件计算出响应曲 面设计通用表。表 2列出响应曲面设计的 27组组合 的各因素浓度。

于 120 ng 一般认为 RAPD的模板浓度在一定范围 内(0.4~ 25 mmol/L<sup>-1</sup>)并不会影响扩增条带的增 减,即不会导致扩增位点的增减,但对扩增产量有影 响,模板浓度越高,扩增产量越多<sup>[4-7]</sup>。但浓度过高, dNTP消耗完,无延伸反应,扩增产物链化,电泳后染 色强度低,出现扩增效果差的现象<sup>[8]</sup>。模板浓度直接 影响扩增产物的再现性,特异性和产量,过量的模板 会增加错配的机会,从而增加非特异性的程度<sup>[9]</sup>。浓

度过高,影响了产物的再现性,这可能是过高的模板浓度没有出现条带的原因。因此在 RSD的 25 $\mu$ l 体系中模板 DNA 的最高浓度设为 100 ng。dNTP Taq 酶、引物的范围适合与芦苇的 RAPD 的反应体系。

### 2.2 RAPD 反应体系优化的响应曲面设计

图 2 的 RAPD 结果显示;在 RSD 的 27 组设计中除了 1 16 和 27 组合中没有出现条带外,其余的各组

均出现了 3~8 条清晰的条带。RAPD 反应体系是各组分协同作用的结果,第 1 16 27 组合中没有出现条带的可能的原因是复杂的,很难确定,需要在以后的研究中进一步探索。说明适合芦苇 RAPD 体系的各因素的范围还是较大的。其中第 17 个组合的条带数最多,而且清晰。它的各因素水平为模板 DNA 60ng dNTP 7.5 mM Taq 酶 1.5 u  $\mu$ l 引物 5 mol  $\mu$ l

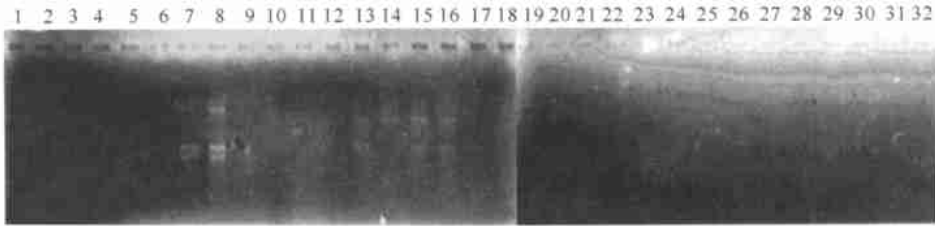


图 1 正交设计的 RAPD 结果 (2 个加样孔为一个组合,共 16 组)

Fig. 1 RAPD results from orthogonal design (The two lane is one combination and all is 16 combinations)



图 2 响应曲面设计的 RAPD 结果 (1~27 为组合数)

Fig. 2 RAPD results from response surface design (The number represents combinations)

### 2.3 RAPD 反应体系的稳定性

第 17 个组合用 16 个不同的引物重复 16 次,得到的 RAPD 结果均较好(图 3 4 5 6 是 4 个引物的 RAPD 图谱),显示 RSD 优化反应体系具有良好的稳定性。

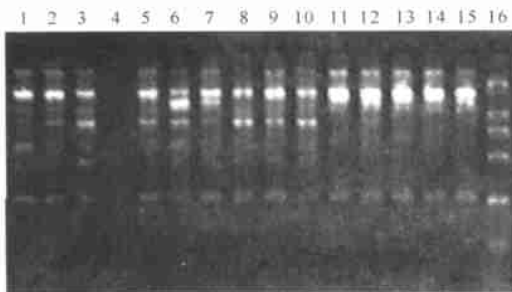


图 3 引物 OPA4 扩增芦苇的 RAPD 图谱

Fig. 3 RAPD profess of reed by OPA4 primer



图 4 引物 OPA11 扩增芦苇的 RAPD 图谱

Fig. 4 RAPD profess of reed by OPA11 primer

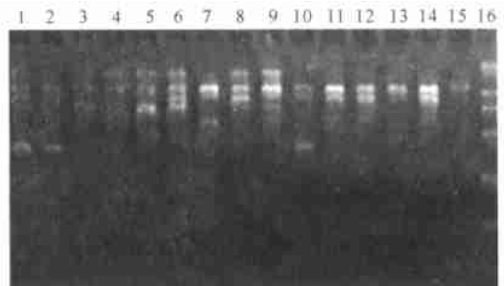


图 5 引物 OPD1 扩增芦苇的 RAPD 图谱

Fig. 5 RAPD profess of reed by OPD1 primer



图 6 引物 OPP12 扩增芦苇的 RAPD 图谱

Fig. 6 RAPD profess of reed by OPP12 primer

## 3 讨论

RAPD 遗传标记技术具有快速、简便、通用好、对 DNA 的需求量小、质量要求低等优点<sup>[10]</sup>,一经问世就受到广泛的关注。但在某些方面由于稳定性和可重

(下转第 160 页 Continue on page 160)

性的指示者

蝗虫群落多样性指数从低海拔到高海拔依次降低,以海拔 400~800 m 区域最高 ( $H=0.928$ );而海拔在 1200~1600 m 区域最低 ( $H=0.774$ )。这主要是因为低海拔处气候温暖湿润,植被类型多样,随着海拔增加,气温逐渐降低,植被类型也相对单一,故多样性指数逐渐下降。可能由于一些适于较高海拔的蝗虫存在,中海拔区域物种数反而高于低海拔区域,但其均匀度 (0.645) 与后者 (0.740) 有较大的差距,致使多样性指数相对较低。海拔 1200~1600 m 区域的物种数远低于中、低海拔区域的物种数,以致指数最低。其优势种与中海拔区域的基本相同。值得注意的是在 1600 m 以上没有调查到任何蝗虫物种,这可能是该区域的年均温太低,达不到蝗虫生长发育所需的有效积温,从而限制了蝗虫在该区的分布。

在 4 个月份中,蝗虫群落多样性从低到高依次为:7月 ( $H=0.676$ ),10月 ( $H=0.879$ ),8月 ( $H=0.936$ ),9月 ( $H=0.941$ ),8月份蝗虫的物种数虽高于 9 月份,但由于其均匀度 (0.647) 不及 9 月份

(0.682),故多样性反而比后者低,反映出其群落结构还未达到稳定

## 参考文献

- 1 郑哲民.蝗虫分类学.西安:陕西师范大学出版社,1993.
- 2 张永强,尤其傲,蒲天胜,等.广西昆虫名录.南宁:广西科学技术出版社,1994.17~26.
- 3 蒋国芳,郑哲民.广西蝗虫.桂林:广西师范大学出版社,1998.
- 4 傅鹏,郑哲民.广西苗儿山自然保护区蝗虫二新种.昆虫分类学报,2002,24(1):21~26.
- 5 钱迎倩,马克平主编.生物多样性研究的原理与方法.北京:中国科学技术出版社,1994.
- 6 Pielou E C. An introduction to mathematical ecology. New York: John Wiley & Sons, 1969.
- 7 黄春梅,杨龙龙.西双版纳热带雨林环境变化对蝗虫区系成分和物种多样性的影响.生物多样性,1998,6(2):122~131.
- 8 Williamson M. Island populations. Oxford, UK: Oxford University Press, 1981.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 150 页 Continue from page 150)

复性较差,在很大的程度上限制了该技术的应用。所以在做 RAPD 实验时,都要进行体系的优化

(1) RAPD 体系的优化的方法有多种,一般的均采用多次单因素设计的方法<sup>[11~13]</sup>,但由于单因素客观地存在多因素交互作用的影响,这是影响 RAPD 反应稳定性的主要因素。正交设计是从复因子实验的结果中,挑选几个处理进行实验,得到代表性的结果。本文先采用了正交设计方法确定了 RAPD 各因素的范围。正交设计相对与单因素设计减少了许多处理组合,从而节省了许多的人力和物力。

(2) RSD 是将若干个实验因素(自变量)通过合理的实验设计来科学地安排各因素水平的组合,以确定各实验因素取值的趋向,使反应变量取得最佳的效果<sup>[14]</sup>。它完全克服了交互作用的影响,从稳定性和工作量来看,RSD 比多次单因素设计更简易、科学、合理

(3) 在正交设计和 RSD 的基础上得出了芦苇 RAPD 最佳反应体系。25  $\mu$ l 反应体系包括:模板 DNA 60 ng, dNTP 7.5 mM, Taq 酶 1.5 u, 引物 5  $\mu$  mol, 循环参数为:冷启动;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 复性 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 1 个循环;4 $^{\circ}$ C 保存。

## 参考文献

- 1 杨允菲,郎惠卿.不同生态条件下芦苇无性系种群调节分

析.草业学报,1998,7(2):1~9.

- 2 张淑萍.芦苇分子生态学研究(博士学位论文).哈尔滨:东北林业大学,2001.4.
- 3 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting of the PCR program for RAPD analysis. Nucleic Analysis in Allium, Theor Appl Genet, 1990, 86, 497~504.
- 4 季维智,宿兵.遗传多样性研究的原理和方法.杭州:浙江科学技术出版社,1999.25~27.
- 5 裴颜龙,邹喻萍,尹蓁,等.矮牡丹与紫特丹 RAPD 分析初报.植物分类学报,1995,33(4):350~356.
- 6 邹继军,董伟,张志永,等.大豆 RAPD 影响因素的探讨.大豆科学,1998,17(3):197~201.
- 7 李晋涛.水稻幼苗单株 DAN 的提取及其 PCR-RAPD 反应体系的建立.生物技术,1998,8(4):13~16.
- 8 张忠廷,李松涛,王斌. RAPD 在水稻温敏核不育研究的应用.遗传学报,1994,21(5):373~378.
- 9 C W 迪芬巴赫, G S G 德维克斯勒. PCR 技术实验指南.北京:科学出版社,2002.
- 10 邹喻萍,葛颂,王晓东.系统与进化植物中的分子标记.北京:科学出版社,2001.41~45.
- 11 朱玲,宋林生.栉孔扇贝 RAPD 反应体系的优化.内蒙古民族大学学报(自然科学版),2002,17(3):234~236.
- 12 刘春林,阮颖,官春云,等.油菜 RAPD 反应体系的优化研究.湖南农业大学学报(自然科学版),2001,27(6):432~433.
- 13 赵萌莉,韩冰,张红梅,等.针茅属植物 RAPD 条件优化.干旱区资源与环境,2003,17(1):96~99.
- 14 叶明亮,王全立,胡良平,等.随机扩增多态性 DNA 反应体系优化设计方案的比较.中华检验医学杂志,2001,24:342~345.

(责任编辑:邓大玉)