

蓝萼香茶菜随机扩增多态 DNA (RAPD) 反应体系优化*

Optimization of RAPD System of *Isodon japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara

金忠民 沙伟 孙天国 孙雪巍
Jin Zhongmin Sha Wei Sun Tianguo Sun Xuewei

(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 Science and Engineering College, Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang, 161006, China)

摘要 试验以香茶菜属植物的蓝萼香茶菜 [*Isodon japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.)] 为材料, 采用改进的 CTAB 法提取基因组 DNA, 首次建立适合于蓝萼香茶菜的 RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性) 分析的 PCR 反应体系。通过对 RAPD 条件优化分析, 确定蓝萼香茶菜 RAPD 的最佳方案为: 25 μ l 反应体系中包括三磷酸脱氧核苷酸 (dNTPs) 0.1 mmol/L, 引物 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 90ng, Taq 酶 (Sangon) 3u, 2.5 \times 10 \times buffer 缓冲液 (含 20mmol/L Mg $^{2+}$), 其余部分用无菌超纯水补齐; PCR 扩增循环为 93 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 93 $^{\circ}$ C 变性 45s, 36 $^{\circ}$ C 复性 75s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min

关键词 蓝萼香茶菜 RAPD 优化

中图分类号 Q943.3 Q37

Abstract The total DNA from the young leaves of *I. japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara was successfully extracted by using the developed CTAB method and a steady system of PCR reaction for *I. japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara was built. The optimal PCR system for RAPD analysis was as follows 0.1 mmol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L random primer, 90ng DNA template, 3u Taq polymerase in 25 μ l reaction solution. The reaction program was devised for one cycle at 93 $^{\circ}$ C 4 minutes and followed by 40 cycles, each with 45 seconds at 93 $^{\circ}$ C, 75 seconds at 37 $^{\circ}$ C, 2 minutes at 72 $^{\circ}$ C, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 minutes.

Key words *Isodon japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara, RAPD, optimization

香茶菜属 (*Isodon* sp.) 植物全世界大约有 150 种, 已研究品种达 80 种^[1]。香茶菜属约有 30 种原植物在民间作药用, 具有清热解毒、活血化瘀、抗菌消炎、抗肿瘤、治疗各种肝炎、乳痛和蛇虫咬伤等功效^[2,3]。对于香茶菜属植物的研究国内报道较多, 但大多为对其化学结构、化学成分及药用功效的研究, 有关其遗传多样性的研究未见报道。

RAPD 是 1990 年 Williams 等^[4]建立起来的一种分子标记技术, RAPD 具有简单、快速和试验费用较低, 不需预知研究对象的基因组序列等优点, 是目前众多分子标记技术中应用最广的技术, 被广泛地应用于个体和品系鉴定、基因定位、构建遗传图谱、遗

传多样性检测、标记辅助选择和种间遗传分析^[5]等研究领域。但是 RAPD 在某些方面由于稳定性和可重复性较差, 实验时, 需要进行体系的优化。本文用含 20 mmol/L Mg $^{2+}$ 的 buffer 缓冲液, 就 RAPD 反应中三磷酸脱氧核苷酸 (dNTPs) 的浓度, Taq 酶用量, 模板 DNA 浓度, 引物浓度及退火温度等因素对实验结果的影响进行蓝萼香茶菜 [*I. japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara] 实验, 建立重复性强、稳定性好的蓝萼香茶菜 RAPD 反应体系, 为进一步研究蓝萼香茶菜的遗传多样性, 利用和开发药用植物资源提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

材料: 实验的材料是采自生长在扎兰屯东山阴

坡、东山阳坡和秀水的蓝萼香茶菜幼叶。采摘幼叶后立即放入冰盒,带回实验室于 -80°C 冰箱中保存,备用。

试剂:引物购于北京赛百盛公司,dNTPs Taq DNA聚合酶 Buffer和琼脂糖由北京鼎国公司提供

仪器:PCR仪为德国产 PE-480,紫外凝胶成像系统 UVP-8000

1.2 基因组 DNA的提取及含量测定

提取方法是根据 Murray Thompson^[6]、Saghai-Maroo等^[7]的方法修改而成。提取的 DNA溶于 $50\times$ TE中备用。纯化后的 DNA用紫外吸收法和琼脂糖电泳双重检测 DNA浓度和纯度。用于 PCR反应的模板用 $0.1\times$ TE稀释为统一的浓度

1.3 RAPD扩增

1.3.1 RAPD条件优化

实验设计在其它因子保持不变的情况下,按一定梯度变化单一因子,确定适合蓝萼香茶菜 RAPD反应所要求的各个因素的浓度范围。反应体系的因素设置梯度水平为:模板 DNA浓度为 30 ng 60 ng 90 ng 120 ng 150 ng 180 ng; TaqDNA 酶的浓度为 0.5 u 1.0 u 1.5 u 2.0 u 2.5 u 3.0 u; dNTPs 的浓度为 0.06 mmol/L 0.08 mmol/L 0.10 mmol/L 0.12 mmol/L 0.14 mmol/L 0.16 mmol/L; 引物浓度为 $0.1\mu\text{mol/L}$ $0.2\mu\text{mol/L}$ $0.4\mu\text{mol/L}$ $0.6\mu\text{mol/L}$ $0.8\mu\text{mol/L}$ $1.0\mu\text{mol/L}$; 退火温度为 35°C 、 36°C 、 37°C 。

在单因子试验基础上,对 RAPD影响因素设置不同的梯度水平,进行正交实验,筛选最优条件再进行 PCR扩增分析。采用 $L_{16}(4^4)$ 正交表,设计 4因素 4水平(表 1)的正交试验,对出带的组合进行重复实验,确定最佳反应体系。

表 1 $L_{16}(4^4)$ 正交设计各因素的水平设计

Table 1 Determination of levels from each factor in $L_{16}(4^4)$ orthogonal design

水平数 Levels	dNTPs (mmol/L)	Taq酶 Taq polymerase (u)	引物 Primer ($\mu\text{mol/L}$)	模板 DNA Template DNA (ng)
1	0.10	1.5	0.4	30
2	0.12	2.0	0.6	60
3	0.14	2.5	0.8	90
4	0.16	3.0	1.0	120

1.3.2 PCR扩增体系建立

$25\mu\text{L}$ 反应体系中包括: dNTPs 0.1mmol/L ,引物 $0.4\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 90ng , Taq酶 3u, $2.5\times 110\times$ buffer缓冲液(含 20mmol/L Mg^{2+}),其余部分用

无菌超纯水补平,以确保实验的准确性和可比性。PCR扩增循环为 93°C 预变性 4 min, 93°C 变性 45 s, 36°C 退火 75 s, 72°C 延伸 2 min, 40个循环,最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶($0.5\mu\text{g/ml}$ EB)电泳,在紫外凝胶成像系统上观察电泳结果并照相。

2 结果与分析

2.1 模板浓度对 RAPD的影响

汪小全等^[8]曾提出模板 DNA的量对 RAPD的条带影响不大,但对扩增产物的量可有不同程度的影响。蓝萼香茶菜叶片中含有大量的酚类物质,在 DNA提取过程中极易氧化变成褐色,与 DNA结合很难抽提排除,可能影响 TaqDNA聚合酶的活性,进而影响扩增结果。实验中发现未经纯化的 DNA扩增条带少或模糊,经过纯化的 DNA扩增效果好,其原因是多次提取 DNA时残存的乙醇、异丙醇、蛋白质沉淀剂 CI或 CTAB等小分子影响 TaqDNA聚合酶的活性,因此应尽量保证模板纯度的一致性,以排除人为误差。本实验 DNA模板浓度在 30~180 ng时都有扩增,且都为稳定扩增,90 ng时条带最清晰,条带的亮度最大,确定扩增的最佳量为 90 ng。

2.2 引物浓度对 RAPD的影响

引物浓度过低,无法与所有的模板 DNA结合位点结合,导致扩增结果不理想;引物浓度过高时,会促使引物错误地引导非特异性产物——引物二聚体的合成,非特异性产物和引物二聚体亦均是 PCR反应的底物,与靶序列竞争 DNA聚合酶和底物 dNTPs,均使靶序列的扩增量降低,而出现非特异条带。本实验结合费用和效果等因素考虑,引物浓度采用 $0.4\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 dNTPs浓度对 RAPD的影响

dNTPs为 $60\mu\text{mol/L}$ 和 $80\mu\text{mol/L}$ 时,无条带产生,在 $100\mu\text{mol/L}$ 时条带最清晰。随着 dNTPs浓度增加,RAPD谱带变模糊,可能由于 dNTPs过多,可与游离的 Mg^{2+} 结合,导致 Mg^{2+} 浓度的降低,反而使 RAPD谱带变模糊。

2.4 Taq酶浓度对 RAPD的影响

TaqDNA聚合酶在低浓度(0.5u)下也有扩增结果,只是条带稍少且不稳定; TaqDNA聚合酶的用量与反应体系中的其它成分的纯度、含量有关。在 $25\mu\text{L}$ 反应体系中, Taq DNA聚合酶为 3u时扩增带型清晰。另外,试验中发现不同批次购买的 Taq酶活性有差异,导致扩增结果不一致,因此,建议购买大剂量分装的 Taq酶,以获得较好的重复效果。

2.5 退火温度对 RAPD的影响

退火温度对 RAPD带的数量和强弱影响较大。当改变退火温度时, RAPD带谱发生明显的变化。退火温度为 35℃时,无扩增产物或量少,退火温度为

37℃时,条带模糊不清(图 1)。退火温度为 36℃时,扩增条带清晰。建议对香茶菜采用 36℃的退火温度(图 2)。

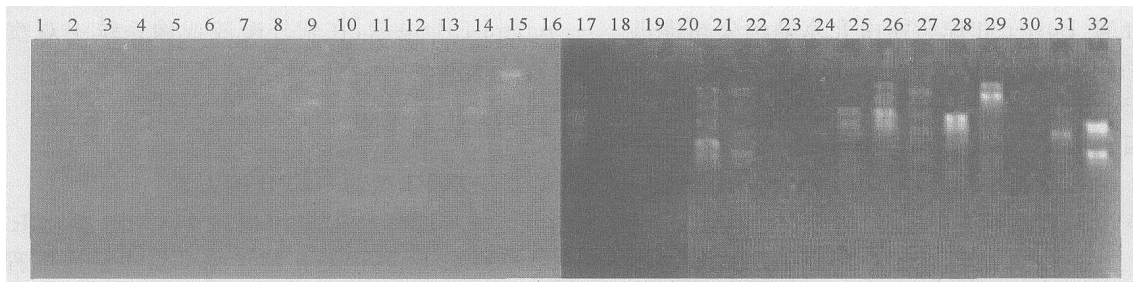


图 1 以 SBS-P-12为引物的正交电泳图谱(1~ 16泳道为 35℃; 17~ 32泳道为 37℃)

Fig. 1 Electrophoresis of orthogonal with random primer SBS-P-12(1~ 16 lane at 35℃; 17~ 32 lane at 37℃)

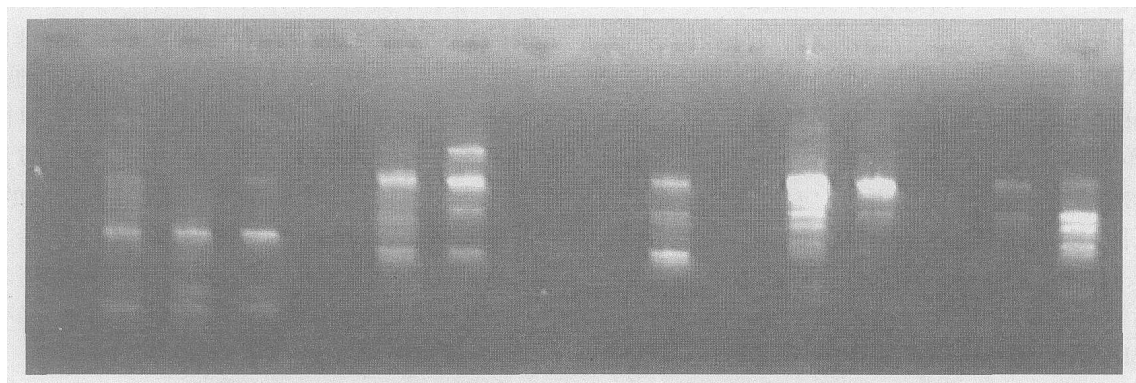


图 2 以 SBS-P-12为引物 36℃时的正交电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of orthogonal with random primer SBS-P-12 at 36℃

3 结束语

参考文献

(1)由实验结果可知,扩增条件的变化会对 RAPD图谱产生较大的影响,从而影响 RAPD分析的准确性。而 RAPD带谱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,因此为了获得重复性和可靠性较高的 RAPD带谱,在进行某一物种的 RAPD分析前,筛选最适宜的 RAPD条件是十分必要的。在 RAPD实验进行中更换所用的药品、仪器时,有必要对实验条件重新进行摸索。任何条件的变化都可能引起扩增带型的变化,为保证实验的精确性和可重复性,对于特定物种的同一批 RAPD实验,应在优化实验参数的前提下,尽可能地保持条件恒定。

(2)蓝萼香茶菜 RAPD的最佳方案为 25μl反应体系中包括: dNTPs 0.1 mmol/L,引物 0.4μmol/L,模板 DNA90 ng, Taq酶 3U, 2.5μl 10× buffer缓冲液(含 20 mmol/L Mg²⁺),其余部分用无菌超纯水补平。PCR扩增循环为 93℃预变性 4 min, 93℃变性 45 s, 36℃退火 75 s, 72℃延伸 2 min, 40个循环,最后 72℃延伸 10 min。

- 1 孙汉董,许元龙,姜北. 香茶菜属植物二萜化合物. 北京:科学出版社, 2001.
- 2 吕惠珍. 广西香茶菜属药用植物资源及其开发利用前景. 时珍国医国药, 1999, 10(9): 13.
- 3 金永日,桂明玉,王宝珍. 蓝萼香茶菜根化学成分研究. 中国中药杂志, 2000, 11: 678~ 679.
- 4 Williams J G K, Kubelic A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531~ 6535.
- 5 赵锦,刘孟军,吕增仁. RAPD技术在植物遗传多样性研究中的应用. 河北农业大学学报, 2000, 1: 25~ 28.
- 6 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321~ 4325.
- 7 Saghai-Marouf M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014~ 8018.
- 8 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38(12): 954~ 962.

(责任编辑: 邓大玉)