

文章编号: 1001-1498(2003)05-0554-06

麻竹 RAPD 反应条件的优化

邢新婷, 傅懋毅

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 以麻竹 DNA 为模板, 对影响麻竹 RAPD 扩增的重要参数进行了优化试验, 以期建立麻竹 RAPD 反应的最适体系。最终得出的麻竹 RAPD 反应体系为: 20 μ L 反应体系, 2 μ L 10 倍反应缓冲液, 模板含量为 50 ng, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 Mg²⁺, 1.5 U 的 Taq 酶, dNTP 为 1.75 mmol \cdot L⁻¹, 引物浓度为 0.4 μ mol \cdot L⁻¹。优化后的 RAPD 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min \rightarrow [94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 37.5 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec] 40 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 8 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保持。

关键词: 麻竹; DNA; RAPD; PCR; 优化

中图分类号: S795.9 文献标识码: A

麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro) 是我国主要笋材两用竹种之一, 分布在福建、台湾、广东、海南、广西、贵州、云南等省。麻竹笋期长、产量高、笋味美, 是夏秋季的优良蔬菜。在福建、广东南部和台湾溪流两岸、村旁、路旁排水良好的沃土上, 麻竹的笋用林相当普遍。经过长期栽培经营, 形成了许多栽培类型, 这些栽培类型该如何区分, 不同栽培类型之间的遗传变异与产量是否相关有待研究。

目前在林木遗传研究中, RAPD 标记是使用最广泛的一种分子标记。根据竹子的分子生物学研究基础, 可供选择的主要为没有种属特异性、可通用的分子标记技术, 如 RAPD 和 AFLP 等。Gielis 等^[1] 对刚竹属(*Phyllostachys*) 的竹种进行了 RAPD 分析, Lao 等^[2] 将 RAPD-PCR 技术应用于台湾重要经济竹种的无性系鉴定及遗传分析上, Loh 等^[3] 利用 AFLP 技术对 15 个竹种的遗传变异和种的相互关系作了有益的尝试。方伟等^[4]、师丽华等^[5] 分别对雷竹(*Phyllostachys praecox* C. D. Chu et C. S. Chao) 不同栽培类型和毛竹(*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* (Mazel) Ohwi) 种下等级变型或栽培类型进行了 RAPD 研究, 李淑娴等^[6] 尝试利用水稻(*Oryza sativa* L.) 微卫星(SSR) 引物对竹子分子系统学进行研究, 而对于南方诸省普遍栽培的笋材两用丛生经济竹种麻竹的分子标记研究还未见报道。

RAPD 标记技术虽然原理简单, 操作方便, 但随着 PCR 条件的变化, 会出现不同的扩增结果, 且一些实验也发现 RAPD 反应的不稳定性^[7]。这些问题可以通过控制实验条件而加以避免^[8]。本研究对麻竹 DNA 的 RAPD 反应条件优化作一探讨, 以期建立麻竹 RAPD 反应的稳定体系, 为从分子水平深入研究麻竹不同地理群体的亲缘关系、遗传多样性和无性系鉴定提供技术手段。

收稿日期: 2002 12 19

基金项目: 国家林业部指南项目“竹类植物遗传多样性研究和遗传连锁图谱的构建”(项目编号 190)

作者简介: 邢新婷(1972-), 女, 河北藁城人, 博士生。

1 材料与方法

表 1 麻竹材料来源

采集地点	胸径/cm	秆长/m	采集数量/丛
福建连江	8.70	11.92	15
福建泉州	9.73	14.75	10
福建南靖	6.67	10.30	12
广东揭东	7.69	12.62	15
广东清新	7.24	11.29	15
广东广宁	8.47	15.46	15
广东封开	8.80	13.01	15
广西凭祥	11.58	17.74	13
广西田林	11.03	17.34	15
贵州兴义	9.38	13.82	15
云南弥勒	10.13	14.14	15

1.1 实验材料

供试麻竹材料取自福建连江、泉州、南靖,广东揭东、清新、广宁、封开,广西凭祥、田林,贵州兴义,云南弥勒,共计 11 个地点 155 丛野生麻竹叶片(见表 1)。每一丛各取 10 g 新鲜嫩叶片,除去灰尘等杂物和水分,然后密封于干燥硅胶瓶中带回实验室备用。

1.2 实验方法

1.2.1 麻竹 DNA 提取

采用 SDS 方法提取 DNA。称取麻竹干叶片 1.5 g 于预冷研钵中,

加入液 N 迅速磨成粉末,装入 100 mL 离心管内,加入提取缓冲液(1 000 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ EDTA, w = 1.5% SDS, w = 1% β-C₂H₅SH, w = 2% PVP) 20 mL, 65 °C 水浴保温提取至少 2 h, 提取过程中摇动数次。取出后加入 20 mL 氯仿:异戊醇(24:1)抽提液,在振荡器上振荡 20 min(混匀), 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清液,加入等体积预冷异丙醇缓缓摇匀,置冰箱内冷藏过夜,次日用玻璃钩捞出絮状沉淀物,用 70% 乙醇冲洗,晾干放入装有 2 mL 1 倍 TE(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 溶液的 10 mL 离心管,待完全溶解后加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 摇匀后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清液,加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液, 2 倍体积的无水乙醇, 摇匀并置冰箱中过夜。捞出沉淀晾干,放入 3 mL 离心管内,加入适量 1 倍 TE 使之完全溶解。

1.2.2 DNA 纯度检测方法

取 15 μL 左右 DNA 溶液,加入 5 μL 溴酚蓝混匀后,在 1.5% 的琼脂糖凝胶上加入样品,于 5 V·cm⁻¹ 下电泳,EB 染色,利用 FR-200 紫外可见分析成像系统观察拍照,记录 DNA 降解和 RNA 消化情况。

取 100 μL DNA 溶液,用 1 倍 TE 稀释 20 倍,用日本岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计在 260、280 nm 处测定光吸收值,若 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.7 \sim 1.8$ 时,即表明 DNA 纯度符合要求。

DNA 质量浓度计算: $DNA \text{ 质量浓度}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$

DNA 提取率($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) = DNA 浓度 × 体积 / 取材量(g)

1.2.3 RAPD 条件优化

退火温度:为了确定最佳的退火温度,设 35.0、35.5、36.0、36.5、37.0、37.5、38.0、38.5、39.0、39.5、40.0、42.0、45.0、48.0、50.0、55.0 °C 共 16 个退火温度值。

Mg²⁺ 浓度: Mg²⁺ 浓度是影响 PCR 反应的重要因子,设定 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol·L⁻¹ 6 个浓度梯度。

Taq 酶的含量:为确定 Taq 酶最佳含量,设定 7 个用量:0.60、0.75、0.90、1.05、1.20、1.35、1.50 U。

dNTP 的浓度:0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、2.75 mmol·L⁻¹ 10 个浓度。

不同的引物浓度:分别设定为 0.075、0.100、0.125、0.150、0.175、0.200、0.250、0.300、0.350、0.400、0.450、0.500 μmol·L⁻¹。

DNA 模板含量:设定每反应体系中分别加入 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、

90、100、110、120 ng 的梯度来确定 DNA 模板用量。

上述 PCR 反应体系为 20 μ L, PCR 反应在 GeneAmp PCR System PE9600 DNA 扩增仪上进行。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min \rightarrow [94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow (35~ 55 $^{\circ}$ C) 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec] 40 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 8 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保持。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度的检测

2.1.1 DNA 提取物凝胶电泳检测 对 11 个地点提取的 DNA 随机进行电泳检测, 其琼脂糖凝胶电泳图谱如图 1 所示。本实验所提取的 DNA 成白色絮状沉淀, 电泳显示 DNA 模板有一定的降解, 且含有一定量的杂质, 如 RNA, 这可以通过使用 RNA 降解酶除去, 但亦可进行 RAPD 分析, 因在大多数 RAPD 反应中, 对 DNA 模板的要求并不十分严格, 这与 Wilkie 等^[9]对葱属的研究和彭锁堂等^[10]对水稻的研究结果一致。

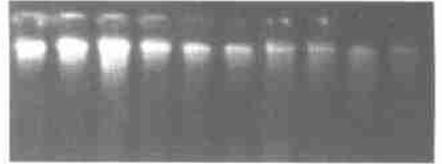


图 1 部分模板电泳检测

2.1.2 DNA 提取物质量的比较 从实验结果(表 2) 可以看出, DNA 在紫外波长 260 nm 和 280 nm 处的光吸收值比值基本都在 1.8~ 2.0 之间, 可以直接用来做 RAPD 分析。DNA 提取率变动在 823.8~ 1 448.0 μ g. g^{-1} 之间, 提取率还是很高的。

表 2 SDS 法提取麻竹 DNA 的质量

采集地点	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度/ (μ g \cdot mL ⁻¹)	DNA 提取率/ (μ g \cdot g ⁻¹)
福建连江	2 117	1. 101	1.92	2 117. 11	1 411. 4
福建泉州	2 172	1. 126	1.93	2 172. 03	1 448. 0
福建南靖	1 825	0. 945	1.92	1 825. 02	1 216. 7
广东揭东	1 780	0. 997	1.78	1 779. 51	1 186. 3
广东清新	1 531	0. 857	1.79	1 530. 80	1 020. 5
广东广宁	1 236	0. 683	1.80	1 235. 76	823. 8
广东封开	1 243	0. 676	1.83	1 243. 16	828. 8
广西凭祥	1 456	0. 792	1.84	1 456. 47	971. 0
广西田林	1 606	0. 863	1.86	1 605. 99	1 070. 7
贵州兴义	1 269	0. 715	1.78	1 269. 21	846. 1
云南弥勒	1 908	1. 046	1.83	1 907. 92	1 271. 9

2.2 麻竹 RAPD 反应条件的优化

2.2.1 不同退火温度对麻竹 RAPD 的影响 在 PCR 循环条件中, 以退火温度最为重要。本实验从 35~ 55 $^{\circ}$ C 分别设定了 16 个退火温度, 利用两个引物分别

对麻竹叶片 DNA 进行 RAPD 扩增。结果见图 2、3。可见 2 个引物在 36~ 37.5 $^{\circ}$ C 之间扩增的条带较多, 在 37.5 $^{\circ}$ C 时扩增效果最好, 条带清晰, 多态性丰富, 重复性好。

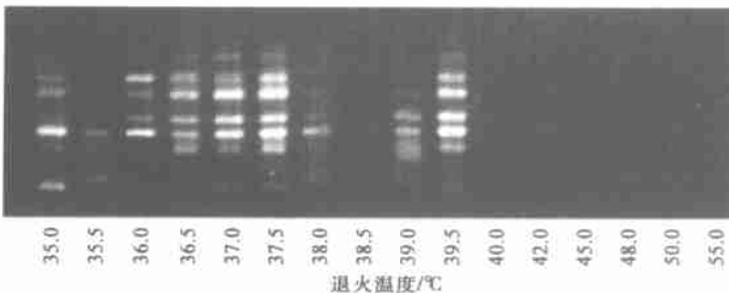


图 2 退火温度优化(引物 S76)

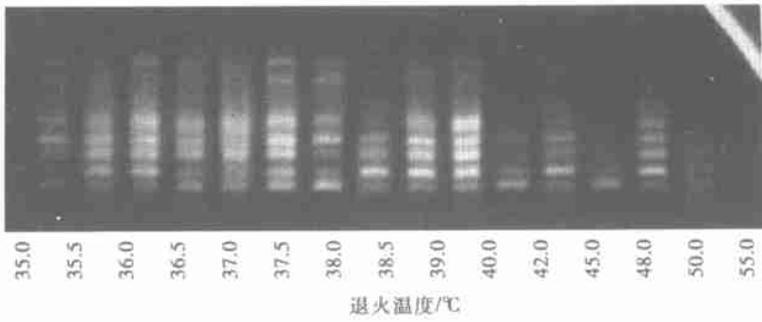


图3 退火温度优化(引物S88)

2.2.2 Mg^{2+} 浓度的影响 PCR 反应体系中 2 价阳离子的存在至关重要,其中 Mg^{2+} 浓度对反应的特异性和 PCR 产率影响较大。本实验设定了 6 个浓度梯度,结果发现(图 4),从 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增结果基本一致,但在浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增的最好。

2.2.3 随机引物浓度的影响 随机引物是 PCR 反应中的影响因素。本实验设置了 12 个浓度梯度,结果如图 5。随着引物浓度的提高特异性增加,但当浓度超过 $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时特异性又降低,引物浓度在 $0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增条带较清晰,确定为本实验的最佳浓度。

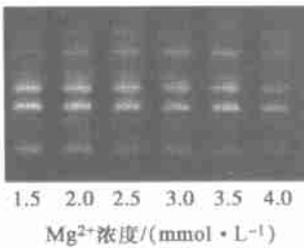
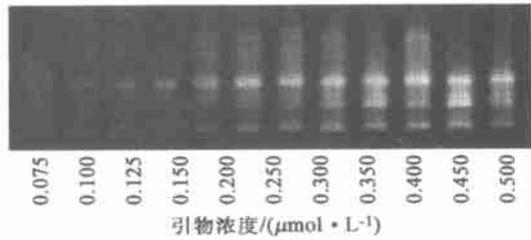
图4 Mg^{2+} 浓度优化

图5 引物浓度的优化

2.2.4 DNA 模板含量的影响 DNA 模板含量是 PCR 扩增的重要影响因素,含量过高会出现非特异性扩增,过低则得不到所需的扩增产物。从图 6 可以看出,DNA 含量在一个较大的范围内均能扩增出清晰的条带,说明对于麻竹来说模板含量对扩增结果影响不大,微量的 DNA 便可扩增,为了保证每个模板均能扩增出清晰的条带,参考普遍用量($25 \mu\text{L}$ 反应体积中有 50 ng),根据本实验结果,每个反应体系以加 50 ng 为宜。

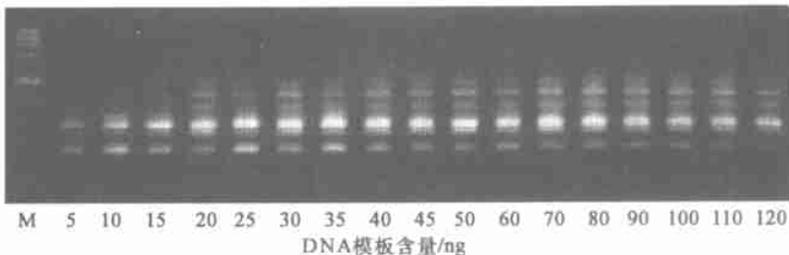


图6 DNA 模板含量的优化(M 为标准 DNA 即 Marker)

2.2.5 dNTP 浓度的影响 dNTP 作为 PCR 反应的原料,其量的多少直接影响产物的多少。实

验结果(图7)表明,随着 dNTP 浓度的提高,扩增条带数和亮度增加,但扩增效果几乎没有明显差异,说明在麻竹 PCR 反应中 dNTP 不是一个非常重要的因素,考虑满足 PCR 要求与经济成本,本实验选定 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为较佳浓度。

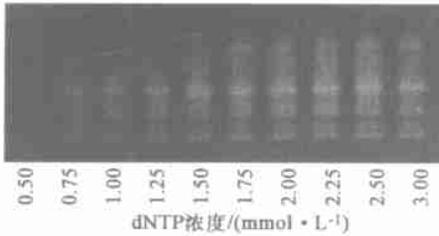


图7 dNTP 浓度的优化

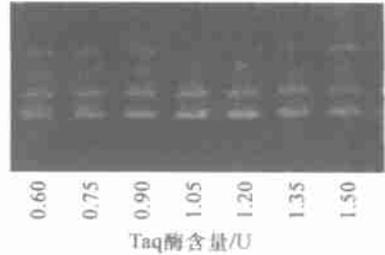


图8 Taq 酶含量对扩增的影响

2.2.6 Taq 酶含量的影响 Taq 酶的种类和含量会影响 PCR 扩增反应。本实验设置了 0.60, 0.75, 0.90, 1.05, 1.20, 1.35, 1.50 U 共 6 个梯度,从图 8 中可以看出,随着 Taq 酶含量的提高,扩增条带亮度增强,在 1.5 U 时带型较丰富,条带也较清晰。

3 结论与讨论

尽管 RAPD 对模板 DNA 质量要求不高,但高质量 DNA 是实验结果可靠并具有良好重复性的保证。一般的 SDS 法、CTAB 法制备的 DNA 均可满足实验要求,但在 DNA 制备过程中需防止样品间的交叉污染。本实验提取的 DNA 有少量的降解,可能原因是在干燥过程中叶片内一些成分发生变化造成的,建议有条件可以尝试新鲜叶片来提取 DNA 或者进行限制酶酶切,另外还可以考虑采用 CTAB 法。

模板浓度是 PCR 反应的一个制约因子,其浓度过低扩增产物无或不稳定,其浓度过高会相应增加非专一性扩增产物。本实验每一反应体系中 DNA 模板含量在 10~120 ng 范围内均扩增出清晰条带,说明麻竹模板含量的高低在相当大的范围内不会影响 RAPD 反应结果。引物浓度低时,与模板碰撞机会减少,不足以扩增出供 EB 染色的 DNA,引物浓度过高时,又会引起错配,因此应根据需要加入适量为好。 Mg^{2+} 是 Taq 酶不可缺少的辅助因子,它不仅影响 Taq 酶的活性,还会影响引物与 DNA 模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[11]。如果 Mg^{2+} 不足时, Taq 酶作用效率低,产物减少;而过量的 Taq 酶,会使非特异性扩增产物增加,出现带纹模糊现象,本实验结果表明 Mg^{2+} 在 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增最好,带型没有变化。dNTP 是合成 DNA 的原料^[12],其浓度可以略高一些,保证 PCR 扩增反应的完全,因在浓度低于 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可以看出扩增的条带明显减少。

退火温度在 PCR 扩增程序中是最重要的影响因素,本实验采用单引物对设定的 16 个退火温度进行了重复扩增,同一引物扩增的结果是一致的,而且不同的引物均在 $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时扩增效果最好,具有一定的稳定性,因此将该温度作为最佳的退火温度;温度超过 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 时特异性降低,在 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 时均未扩增出条带,说明较高的温度不适合进行麻竹 PCR 的扩增。由于 PCR 扩增程序也受到变性温度、延伸温度和相应时间的影响,应该同时对这些条件进行进一步的摸索。

本实验采用单引物进行 PCR 扩增,可以获得较好的结果,在预实验中曾采用双引物进行

了重复扩增,但结果较差。以本实验建立的 PCR 扩增程序及反应体系进行麻竹引物筛选和扩增,可以有较高的稳定性。

参考文献:

- [1] Gielis J, Everaert I, Loose M. Analysis of genetic variability and relationships in phyllostachys using random amplified polymorphic DNA [A]. In: Chapman G P. The Bamboos. Proceedings of an International Symposium, London 25—29 March 1996, Linnean Society Symposium Series No. 19[C]. London: Academic press, 1996. 107~ 124
- [2] Lai C C, Hsiao J Y. Genetic variation of *phyllostachys pubescences* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan based on DNA polymorphisms [J]. Botanical Bulletin Academia Sinica, 1997, 38: 145~ 152
- [3] Loh Jin Phang, Ruth Kiew, Ohn Set, et al. A study of Genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism[J]. Annals of Botany, 2000, 85: 607~ 612
- [4] 方伟,何祯祥,黄坚钦,等.雷竹不同栽培类型 RAPD 分子标记的研究[J].浙江林学院学报,2001,18(1):1~ 5
- [5] 师丽华,杨光耀,林新春,等.毛竹种下等级的 RAPD 研究[J].南京林业大学学报,2002,26(3):65~ 68
- [6] 李淑娴,尹佟明,邹慧渝,等.用水稻微卫星引物进行竹子分子系统学研究初探[J].林业科学,2002,38(3):42~ 48
- [7] 刘星辉,郑家基,潘东明,等.木奈的栽培[M].福州:福建科技出版社,1992.5~ 8
- [8] Lowe A J. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of gemplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in plant genetic resources [J]. Newsletter, 1996(107): 50~ 54
- [9] Wilkie S E, Isaac P G, Slater R J. RAPD markers for genetic analysis in *Allium* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 86: 497~ 504
- [10] 彭锁堂,颜启传,王学德,等.水稻单粒种子 DNA 提取及 RAPD 程序优化研究[J].上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(1): 34~ 41
- [11] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002 8
- [12] Skov E. Are RAPD markers reproducible between different laboratories? [J]. Silvae Genetica, 1998, 47(5~ 6): 282~ 287

Study on the Optimization of RAPD Conditions of *Dendrocalamus latiflorus* Munro

XING Xin-ting, FU Maoyi

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Based on the genomic DNA of *Dendrocalamus latiflorus*, some essential factors that might affect the results of RAPD were compared and the optimal RAPD reaction system for *D. latiflorus* was established. The optimized condition for 20 μ L reaction system were 2 μ L 10 diploid buffer, 50 ng template DNA, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1.5 U Taq DNA polymerase, 1.75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP and 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Random primer. The optimized reaction program was initially at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min, followed by 40 cycles at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, at 37.5 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min 20 sec, and then held at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 8 min, and finally kept at 4 $^{\circ}\text{C}$.

Key words: *Dendrocalamus latiflorus*; DNA; RAPD; PCR; optimization