

卷丹百合 RAPD-PCR反应程序的优化研究

韩 凌¹, 雷家军² (1. 沈阳职业技术学院, 辽宁 沈阳 110045; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用 CTAB法提取卷丹百合的基因组 DNA。采用正交设计和单因素试验相结合的方法, 对卷丹百合 RAPD-PCR反应程序中各影响因素进行了优化。结果表明: 卷丹百合最佳的 RAPD-PCR扩增程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s、39 退火 40 s、72 延伸 1 min, 45个循环; 72 延伸 10 min。
关键词: 卷丹百合; RAPD; 正交设计; 单因素试验; 程序优化
中图分类号: S680.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1631 (2009) 02-0052-03

Optimization of RAPD-PCR Procedure in *Lilium lancifolium* Thunb.

HAN Ling¹, LEI Jia-jun²
(1. Shenyang Polytechnic College, Shenyang 110045, China; 2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Genomic DNA of *Lilium lancifolium* Thunb. was extracted with the method of CTAB. Some influencing factors in the RAPD reaction procedure were studied with orthogonal design and single factor experiment. The results showed that the optimum RAPD-PCR procedure was one cycle of denaturing at 94 for 4 min, 45 cycles of denaturing at 94 for 30 s, annealing at 39 for 40 s, extending at 72 for 1 min, one cycle of final extension extending at 72 for 10 min.
Key words: *Lilium lancifolium* Thunb.; RAPD.; Orthogonal design; Single factor design; Procedure optimization

RAPD (随机扩增多态性 DNA, Random Amplified Polymorphic DNA) 是 1990年在 PCR基础上发展起来的分子标记技术, 具有简便、快速、灵敏、多态性检出率高、所需 DNA 量少、无需预先知道基因组 DNA 序列、无需探针标记和杂交等特点, 已在植物亲缘关系、品种鉴定、遗传多样性检测、遗传图谱的构建与基因定位、突变体的鉴定以及育种材料的早期选择等方面得到广泛应用。但 RAPD 技术易受外界因素的影响, 试验的重复性和稳定性较差。因此, 必须建立 1 个稳定的反应程序。采用正交设计和单因素试验相结合的方法, 对卷丹百合 RAPD 反应程序中各影响因素进行优化, 以期建立最佳的 RAPD 反应程序, 为在分子水平研究百合种质资源的分类及亲缘关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为卷丹百合, 叶片取自沈阳农业大学花卉基地。

试剂为 MgCl₂ 25 mmol/L, dNTP (Biosharp 公司) 10 mmol/L, 引物 S1383 (由上海生工合成) 20 ng/μL, Taq DNA 聚合酶 (Promega 公司) 5 U/μL。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取卷丹百合的 DNA^[1]。将 DNA 稀释后用紫外可见分光光度计测

定 OD 260/OD 280 值, 估算样品的浓度, 并结合 0.8% 琼脂糖凝胶电泳确定其含量和完整性, 然后稀释至 40 ng/μL。

1.2.2 正交设计优化 RAPD 反应程序 选择退火时间、延伸时间和循环次数 3 种因素, 每种因素选定 4 个水平 (表 1)。采用正交设计表 L₁₆ (4³) 安排试验 (表 2)。同时设置退火梯度 36、37、38、39、40 和 42。20 μL 反应体系中包含 buffer 2.0 μL, 模板 DNA 2.0 μL, Mg²⁺ 2.0 μL, dNTP 1.2 μL, 引物 2.0 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL。

1.2.3 单因素逐项优化 RAPD 反应程序 对退火温度和时间、延伸时间和循环次数进行单因子试验, 逐项优化。其梯度处理和反应体系同 1.2.2, 其他因素固定为退火时间 50 s、延伸时间 100 s 和循环次数 45 次。

反应在 TC-512 PCR 仪中进行, 扩增结束后, 在反应混合物中加入 5 μL 溴酚蓝, 混匀。取 10 μL 点入 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭), 于 1 × TBE 电泳缓冲液中、120 V 电场下电泳 90 min, 然后在 GelDoc 凝胶成像系统 (BD-RAD) 中观察、照相。

表 1 RAPD-PCR 反应程序中各影响因素水平
Table 1 Levels of the factors in RAPD-PCR reaction procedure

水平	因素		
	退火时间 (s)	延伸时间 (s)	循环次数 (次)
1	30	60	35
2	40	80	40
3	50	100	45
4	60	120	50

收稿日期: 2008-11-28
作者简介: 韩 凌 (1981 -), 女, 助教, 硕士, 主要从事花卉遗传育种与生物技术的科研和教学工作。

表 2 L₁₆ (4³) RAPD-PCR 反应程序正交试验设计表
Table 2 RAPD-PCR Orthogonal design [L₁₆ (4³)]

处理组合	因素		
	退火时间 (s)	延伸时间 (s)	循环次数 (次)
A	30	60	35
B	30	80	40
C	30	100	45
D	30	120	50
E	40	60	40
F	40	80	35
G	40	100	50
H	40	120	45
I	50	60	45
J	50	80	50
K	50	100	35
L	50	120	40
M	60	60	50
N	60	80	45
O	60	100	40
P	60	120	35

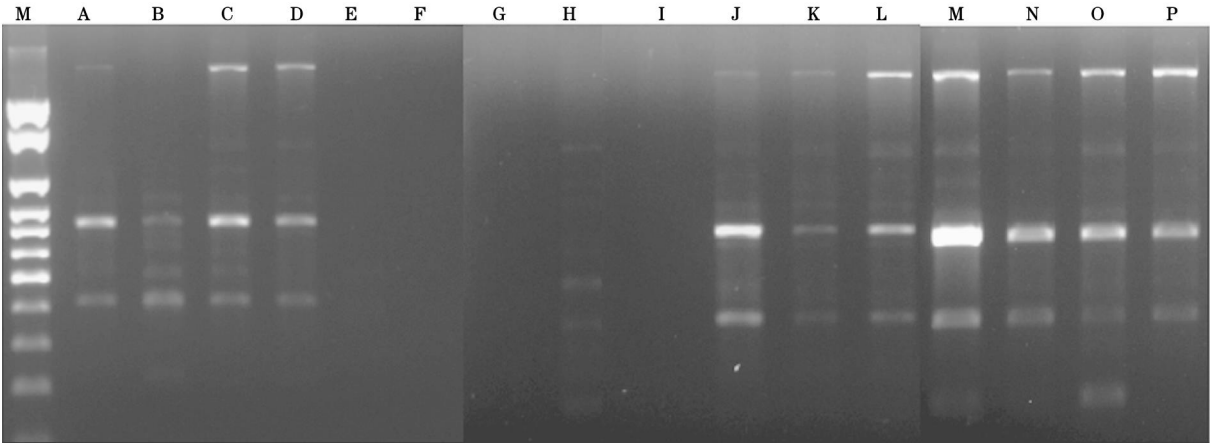


图 1 正交设计反应程序的 PCR 产物电泳结果
Fig.1 Electrophoresis result of different RAPD-PCR procedure with orthogonal design

2.2 单因素逐项优化 RAPD 反应程序

从图 2 可以看出，退火时间为 30 s 时，扩增条带较弱，可能由于时间过短，引物同变性后的单链 DNA 结合不充分；退火时间在 40 ~ 60 s 内，对 RAPD 反应的影响不大。从图 3 可以看出，延伸时间 60 ~ 100 s 已经能够充分延伸，当延伸时间为 120 s 时，产生了非特异性扩增条带。退火温度对 RAPD 特异性十分关键。退火温度低，引物和模板结合特异性较差，引起扩增的特异性

下降；退火温度高，引物和模板结合特异性增加。也有研究认为，退火温度过高，会使引物和模板结合不上；过低，会导致引物与模板非特异性结合，引起特异性下降^[2]。分别采用 36 、 37 、 38 、 39 、 40 和 42 6 种退火温度进行扩增，结果表明，退化温度为 39 时扩增条带最好（图 4）。从图 5 可以明显看出，当循环次数为 35 次时，反应不完全，PCR 产物少，条带很弱；当反应进行了 45 个循环时，已经反应完全；之后

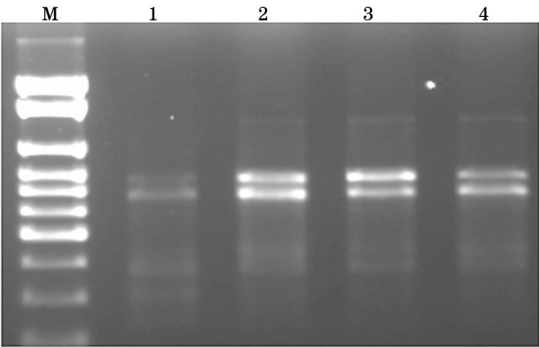


图 2 不同退火时间下 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果
(注：1 ~ 4 的退火时间依次为 30、40、50 和 60 s)
Fig.2 The result of RAPD-PCR system with different annealing time

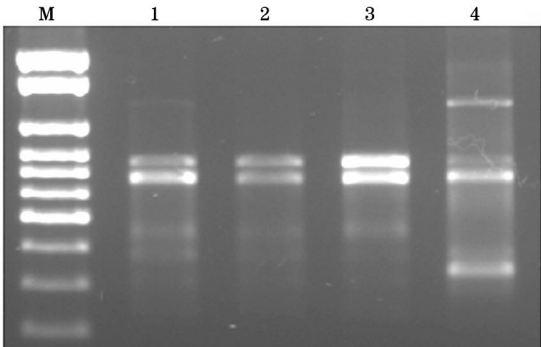


图 3 不同延伸时间下 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果
(注：1 ~ 4 的延伸时间依次为 60、80、100 和 120 s)
Fig.3 The result of RAPD-PCR system with different elongation time

进入了平台期。平台效应是由于酶的限制和化学计量的限制引起的, 酶因被反复加热到 94 而活性降低, 并且有活性的酶分子在延伸期相对于 DNA 模板在不断减少。

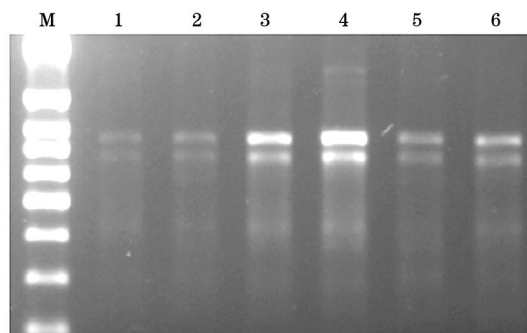


图 4 不同退火温度下 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果
(注: 1~6 的退火温度依次为 36、37、38、39、40 和 42 °C)
Fig. 4 The result of RAPD-PCR system with different annealing temperatures

3 讨论

RAPD-PCR 扩增反应主要分为变性、复性和延伸 3 步, 每 1 步温度和时间的微小变化都会导致实验结果发生较大变化。模板充分变性是获得良好扩增结果的前提条件。变性温度过低, 不能使靶基因模板和 PCR 产物完全变性, 导致 PCR 扩增失败。高温变性时间过长会导致 Taq 酶活力降低。引物复性所需的温度取决于引物的碱基组成、长短和浓度。在 RAPD 分析中, 扩增反应的引物长度一般是 10 bp, 常用复性温度一般为 35 ~ 45 °C, Williams 等^[3]认为 40 °C 以上的复性温度会使引物和模板结合不上而抑制 RAPD 扩增; 温度过低会使引物和模板非特异结合, 增加产生错配的可能性, 形成大量的非特异性条带。由于现有的 Taq 酶最适的活性温度是 72 °C, 连续保温 30 min 仍具有相当的活性, 而且在比较宽的温度范围内保持着催化 DNA 合成的能力, 因此在扩增反应中, 延伸温度采用 72 °C^[4]。延伸时间过短, 产物片段大小不稳定; 延伸时间过长, 会导致非特异性带的出现。RAPD 一般采用 35 ~ 45 个循环进行扩增, 通过对 4 个循环次数的扩增产物的比较, 认为在

综上所述, 卷丹百合 RAPD-PCR 反应最适的扩增程序为: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s; 39 退火 40 s; 72 延伸 1 min, 45 个循环; 72 延伸 10 min。

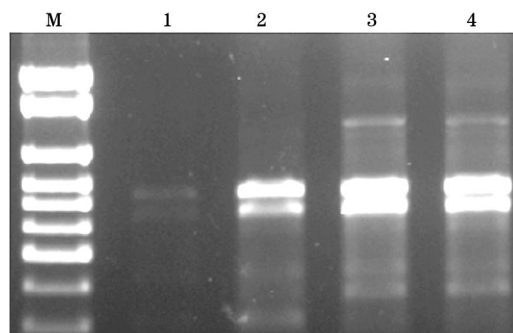


图 5 不同循环次数下 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果
(注: 1~4 的循环次数依次为 35、40、45 和 50 次)
Fig. 5 The result of RAPD-PCR system with different cycles

RAPD 反应中, 由于引物短、随机性强, 循环次数较多扩增结果较为可靠, 进行 45 个循环时已反应完全, 之后进入平台期, 因此选用 45 个循环。

RAPD 反应涉及的任何 1 种因素的微小变化, 都可能影响整个扩增结果。因此, 利用 RAPD 进行遗传研究时要在条件允许的情况下尽量纯化模板 DNA, 测定模板 DNA 的浓度与纯度, 一旦反应条件和反应参数确定, 应尽量保持反应的一致性。只有建立最佳反应程序, 才能准确、稳定地反映不同模板的遗传差异, 使结果更可靠。

参考文献:

- [1] 邹喻苹. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] 黄子锋. 新铁炮百合 RAPD 反应体系及自交初代遗传分化研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2003.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers [J]. Nucleic Acid Res, 1990, (18): 6531 - 6535.
- [4] 魏群. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

(上接第 37 页)

(3) 采用综合防除方法。以三叶草等为优势种的草坪, 可用阔叶净、使它隆和苯达松等茎叶处理除草剂于杂草 3 ~ 5 叶期进行防除^[5]。对难以防除的恶性杂草如蒲公英等, 于播前 10 ~ 15 d 用灭生性除草剂农达 4.5 ~ 6.0 kg/hm² 进行防除^[6]。对混杂大量 1 a 生和 2 a 生双子叶杂草的草坪, 在其开花前进行多次低茬修剪, 高大散生杂草可人工挖除。施用化学除草剂、低茬修剪及人工除草相结合是防除草坪杂草的有效方法。

参考文献:

- [1] 顾向明. 草坪杂草的综合防治 [J]. 北方园艺, 2006, (5): 127.

- [2] 魏左平, 魏金平, 李青丰. 北方半干旱地区草坪主要杂草生态学特征及其生长发育动态研究 [J]. 环境科学研究, 2007, 20 (4): 92 - 96.
- [3] 白莹莹, 魏松红, 刘大, 等. 辽宁省草坪杂草调查初报 [J]. 杂草科学, 2007, (2): 38 - 39.
- [4] 马国胜, 毛安元, 陈娟. 不同区域优势草坪杂草及其防除 [J]. 农药, 2006, 45 (11): 730 - 733.
- [5] 强胜, 李广英. 南京市草坪夏季杂草分布特点及防除措施研究 [J]. 草业学报, 2000, 9 (1): 48 - 54.
- [6] 于凤芝. 冷季型草坪主要杂草发生规律及化学防除研究 [J]. 草业科学, 2000, 17 (2): 39 - 42, 49.