

温郁金 RAPD-PCR 反应体系建立及条件优化

王晓慧¹, 汤晓闯¹, 杨恩秀¹, 姜程曦¹, 李敏², 李校堃^{1,2}

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 在提取纯化温郁金 DNA 的基础上, 利用 PCR 扩增技术, 对 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物、Taq 聚合酶等反应条件进行优化, 建立温郁金基因组 DNA 的 RAPD-PCR 最佳反应体系。结果表明: 最佳条件是总体积为 25 μ L, 其中 Mg^{2+} (25 mM) 2 μ L, Taq 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 引物浓度 (20 μ M) 1.0 μ L, 模板 DNA (5 ng/ μ L) 1.0 μ L, dNTP (2.5 mM) 2.0 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 复性 1.5 min, 共 42 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 该研究得出的体系是温郁金 RAPD-PCR 的最适宜反应体系, 具有省时、经济、简便以及扩增条带较清晰、稳定等特点, 为今后温郁金的遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 温郁金; 基因组 DNA; RAPD-PCR 反应体系

中图分类号: S 682.2⁺ 63; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)04-0226-04

姜科植物温郁金 (*Curcuma wenyujin*) 是浙江省著名道地药材, 为中国药典多版收载品种。根茎干燥后为温莪术, 是我国常用名贵中药材, 其性味辛、苦、温, 归肝、脾经。具行气破血, 消积止痛功效。临床用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭, 食积胀痛, 早期宫颈癌等症。药理研究显示, 其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗早孕、抗菌、升高白细胞、保肝、抑制血小板聚集和抗血栓形成等作用。含有挥发油、姜黄素类、有机酸、树脂和淀粉等^[1,2]。并且作为一种抗肿瘤、抗病毒、抗炎的重要药材^[3], 临床用量和工业化生产用量十分巨大。但是由于温郁金道地性强, 农民连年种植, 再加上长期过度采收, 野生资源急剧减少, 导致遗传变异逐渐减少。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是 1990 年由 Williams J G 等^[4] 和 Welsh J 等^[5] 同时推出的一种分子标记技术, 是以 PCR 反应为基础, 以随机碱基寡核苷酸为引物, 对基因组 DNA 进行扩增而显示出多态性的 DNA 指纹技术。因操作简单、反应迅速、成本低和 DNA 用量少等优点而被广泛应用于药用植物种内或种间亲缘关系和遗传多样性方面的研究, 已成为一种广泛的分子标记技术^[6]。然而, RAPD 技术采用的引物较短, 退火温度较低, 对反应条件比较敏感, 应用 RAPD 标

记时, 对其反应体系进行优化十分必要^[7], 只有通过优化试验来建立最佳反应体系, 才能获得较为稳定而重复性好的试验结果。现对温郁金 RAPD-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度、Taq 聚合酶量以及退火温度进行优化, 以期建立一个较为稳定而可靠的反应体系, 为探索温郁金遗传多样性分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采自于温州不同居群的温郁金叶片, 样品采集后, 立即密封, 放入冰桶内, 回到实验室后, 及时清洗, 并存放于 -70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱, 备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 叶片用液氮研磨, 采用改良的 CTAB 法提取^[8]。

1.2.2 DNA 样品的检测 所提取的 DNA 用紫外可见分光光度计, 在 A_{260} 与 A_{280} 的比值计算样品 DNA 纯度, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.7 ~ 1.9 之间, 符合 PCR 对 DNA 纯度的要求。然后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和凝胶自动成像系统检测所提 DNA 的完整性, PCR 扩增检测 DNA 提取的效果。DNA 浓度定为 5 ng/ μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存、备用。

1.2.3 RAPD 反应体系主要因素用量筛选 将 RAPD-PCR 反应体系的 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物、Taq 聚合酶量以及退火温度等因素分别设置若干水平, 并进行优化筛选。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 不同温度退火, 72 $^{\circ}$ C 复性 1.5 min, 共 42 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延 10 min。25 μ L 反应终产物中, 吸取 6 μ L 反

第一作者简介: 王晓慧 (1981-), 女, 博士, 主要从事作物生物技术研究。E-mail: nongdawxh@yahoo.com.cn.

基金项目: 浙江省重大科技资助项目 (No. 2005C13019); 瑞安市重大科技资助项目 (20052005); 温州市科技计划资助项目 (S2005B001)。

收稿日期: 2008-01-17

应液与 2 μ L 6 * 加样缓冲液混合, 扩增产物在含 0.5 μ g/ μ L 溴化乙锭(EB)的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 1 * TAE, 电泳强度为 5 V/cm, 电泳完毕, 凝胶成像系统下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 温郁金叶片基因组 DNA 的质量

按方法所述对温郁金叶片 DNA 进行抽提, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪中分析结果见图 1, 结果显示温郁金 DNA 分子量在 15 kb 以上, 确定为基因组 DNA, 提取的 DNA 只有 1 条带, 说明其具有良好的完整性, 经紫外分光光度计检测, 其 OD_{260/280} 的值在 1.8 左右, 可用作 RAPD 的模板。

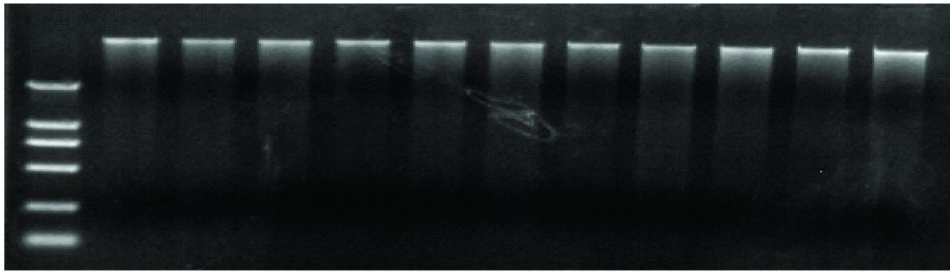


图 1 部分温郁金叶片基因组 DNA 的质量图谱

2.2 引物的筛选

从 50 条随机引物中筛选出 31 条引物能扩增出片断, 对 31 条引物进一步检测表明, 有 10 条能在所有的温郁金材料中扩增出片断多、亮度大的条带, 可用于 RAPD

分析。用已经筛选好的引物对所有的温郁金材料扩增。从扩增结果图谱来看(如图 2 和图 3), 各样品间的差异既表现出了种内的遗传稳定性, 又反映出了品种之间的遗传差异。

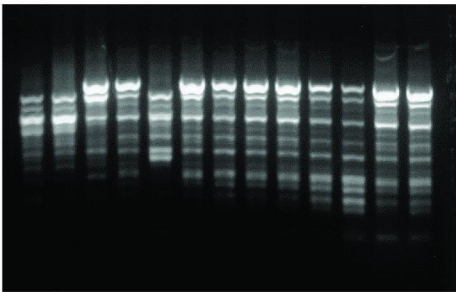


图 2 引物 0176 的 PAPD 扩增图谱

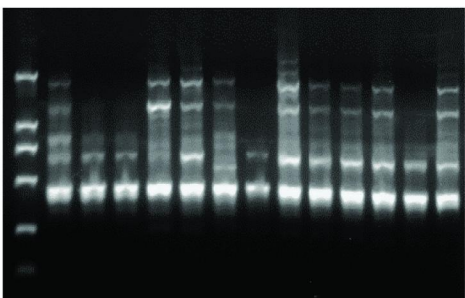


图 3 引物 0165 的 PAPD 扩增图谱

表 1 RAPD 扩增引物筛选结果			
引物	核苷酸碱基序列 5'-3'	RAPD 标记数	多态性标记数
0163	TGCTCTGCCC	8	6
0165	GAGAGCCAAC	10	8
0172	ACCCGGTCAC	5	3
0176	AATCGGGCTG	15	12
0181	AGCCAGCGAA	4	4
0188	AAAGCTGCGG	7	6
0194	GGAGGGTGT	8	5
0196	AGGTGACCGT	10	7
0201	GTTGCGATCC	5	4
0212	GGACACCACT	11	9

2.3 Mg²⁺ 浓度对 RAPD 反应的影响

不同 Mg²⁺ 浓度对 RAPD 扩增结果的影响如图 4 所示。由图 4 可知, Mg²⁺ 浓度过低扩增的条带数非常少, Mg²⁺ 浓度高于 2.0 时, 扩增带的条数减少, 亮度也

有所降低, 部分条带没有出现或有些模糊。Mg²⁺ 是 Taq 聚合酶实现聚合反应所必须的一种二价阳离子, 选择合适的 Mg²⁺ 浓度, 对 RAPD 反应至关重要。根据试验结果, Mg²⁺ 浓度确定为 2.0 μ L。

2.4 Taq 聚合酶浓度对 RAPD 反应的影响

图 5 是不同浓度 Taq 聚合酶的扩增结果。25 μ L 反应体系中, Taq 聚合酶浓度为 0.75 U 时, 只有 2 个扩增条带。Taq 聚合酶浓度为 1~2U 时, 都有条带出现并且亮度也很好。浓度为 2.5 U 时, 由于 RAPD 反应中高浓度 Taq 聚合酶容易产生非特异扩增产物, 其产生的大量弥散使电泳背景过深, 不利于遗传多态性分析。从经济角度和试验结果看, Taq 聚合酶 1.5 U 为合适。

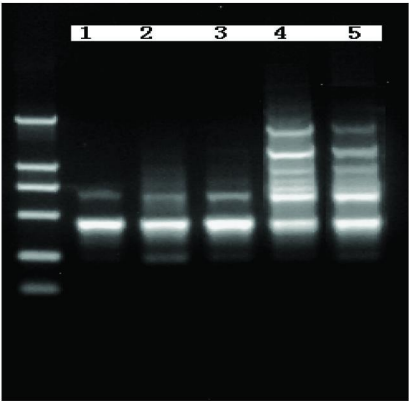


图4 Mg^{2+} 浓度梯度的 RAPD 扩增结果

注: Mg^{2+} (25 mM) 浓度分别为: 1. 2、1.5、1. 8、2. 0、2.5 μL ; Taq 聚合酶浓度分别为: 2.5、2. 0、1. 5、1. 25、1. 0、0. 75 U.

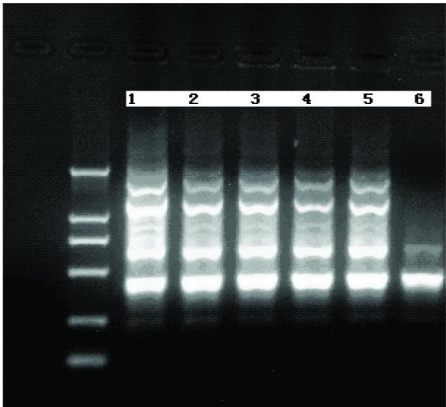


图5 Taq 聚合酶浓度梯度的 RAPD 扩增结果

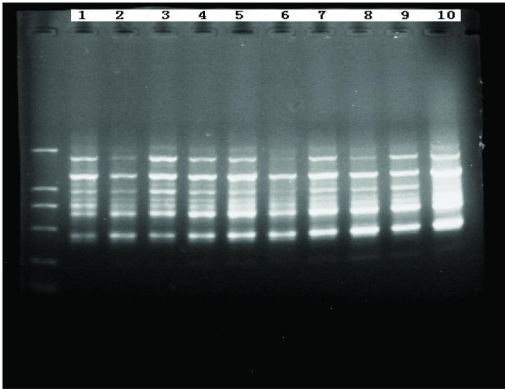


图6 引物和模板的 RAPD 扩增结果

注: dNTPs(2.5 mM) 浓度分别为: 1. 5、1. 8、2. 0、2. 2、2.5 μL .

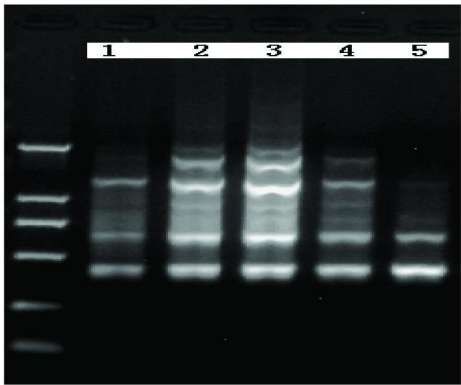


图7 dNTPs 浓度梯度的 RAPD 扩增结果

表2 不同模板和引物的浓度配比

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
模板浓度/ μL	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0
引物浓度/ μL	0.5	1	0.5	1.0	1.5	2.0	1.5	2.0	1.0	2.0

2.5 引物浓度和模板 DNA 用量对 RAPD 反应的影响

引物浓度和模板 DNA 用量也是影响 PCR 反应的重要因素, 表2 是不同模板和引物的浓度配比。不同引物浓度和模板 DNA 用量的组合对 RAPD 扩增结果的影响如图6 所示, 可以看出随着引物和模板浓度的增加, 条带逐渐清晰, 但引物和模板用量过大时, 背景也随之加深, 当引物和模板浓度分别都为 2 μL 时, 条带模糊, 不易做统计。最终确定引物浓度和模板 DNA 用量分别为 1.0 μL 和 1.0 μL 。

2.6 dNTPs 对 RAPD 的影响

dNTPs 是 PCR 反应的原料, 必须达到一定的浓度才能满足要求, 但过高也会与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} , 对扩增

反而不利。许多结果证明, dNTPs 浓度对 PCR 扩增影响较大。其浓度过高时, 会与 Mg^{2+} 整合, 抑制扩增反应或导致核苷酸错误参入。如图7 所示, 当 dNTPs 浓度过低或过高时, 条带数较少, 都不能扩增出较好的条带。根据试验结果, 可以确定 dNTPs 的浓度为 2.0 μL 。

2.7 退火温度的选择

退火温度是影响 DNA 特异性扩增的主要原因之一, 不同的退火温度可以导致扩增产物多少的差异^[9]。退火温度越高, 扩增的特异性也越高、条带也越清晰, 但是条带数也越少。退火温度越低, 虽然条带数会增加, 但是非特异性扩增的增加会影响结果的统计。不同的退火温度同时也影响着扩增的稳定性。因此选择一个条带数较多且清晰、稳定性好的退火温度非常关键。试验设置了 32 $^{\circ}C$ 、34 $^{\circ}C$ 、36 $^{\circ}C$ 、37 $^{\circ}C$ 、38 $^{\circ}C$ 、40 $^{\circ}C$, 共 6 个退火温度梯度。经过大量的试验摸索, 温郁金的 PCR 反应在 36 $^{\circ}C$ 时, 结果较好, 并且对多数的引物都合适。

3 讨论

RAPD 分析具有简便、灵敏度高、不需要 DNA 的序列材料等优点, 但不同的材料适合的引物不一样, 因此在 RAPD 多态性分析前需要筛选引物^[11]。研究筛选出了 10 条在所有的温郁金材料上均能扩增出清晰条带的引物, 为以后的试验打下了坚实的基础。

RAPD 反应的影响因子较多, PCR 反应体系中各因子浓度直接影响着试验结果的准确性、重复性, 只有建立起最适合的反应体系, 才能获得稳定的、信息量大的标记信息。除了 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物、Taq 聚合酶等因素外, 提取分离 DNA 的实验室环境也会影响试验效果^[10]。实践证明, 在较为稳定的实验室环境中, 采用上述反应体系, 能够获得非常满意的 PCR 扩增效果。该反应体系是否适合于其他药用植物基因组 DNA 的分子标记分析, 还有待于进一步研究。

通过分析对各因素不同浓度对 PCR 的扩增结果, 发现 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 聚合酶的浓度对反应体系的影响较大。当浓度过低时, PCR 条带比较弱、不清楚, 不利于统计; 当浓度过高时, 会产生非特异性条带, 使背景过高, 因此, 寻找出合适的 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 聚合酶浓度极为重要。退火温度对反应的影响也非常大。退火温度过高, 扩增的特异性越高, 但是条带数也越少; 退火温度过低, 扩增的非特异性越高; 退火温度也会影响到 PCR 的稳定性。因此, 寻找出一个合适的退火温度也非常重要。

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 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^[12], 从试验结果可以看出温郁金 RAPD 分析较适宜的扩增条件为: 总体积 25 μ L 时, Mg^{2+} (25 mM) 2 μ L, Taq

聚合酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 引物浓度 (20 μ M) 1.0 μ L, 模板 DNA (5 ng/ μ L) 1.0 μ L, dNTP (2.5 mM) 2.0 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 复性 1.5 min, 共 42 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

参考文献

- [1] Hui Cao, Yohei S, Hirotohi F, et al. Molecular analysis of medicinal y-used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and trnK gene sequences [J]. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24(12): 1389-1394.
- [2] Huang Mou-Tuan, Ma Wei, Patricia Y, et al. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA based in mouse epidermis [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(1): 83-88.
- [3] 肖小河, 钟国跃, 舒光明, 等. 国产姜黄属植物的数值分类学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(1): 15-24.
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531-6535.
- [5] Welsh J, McClell M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213-7219.
- [6] Sha W, Li J, Cao T, et al. Establishment of RAPD reaction system on the mos [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2004, 24(4): 482-485.
- [7] 常爱露, 瞿永生, 贾兴华. 烟草 RAPD 反应体系优化及品种多态性标记研究 [J]. *中国烟草科学*, 2004(2): 9-13.
- [8] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列 (SSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. *热带亚热带学报*, 2003, 11(1): 15-20.
- [9] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. *果树学报*, 2006, 23(1): 138-141.
- [10] 白音, 包英华, 王文全, 等. 美花石斛 RAPD-PCR 反应体系的建立 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(3): 521-523.
- [11] 朱元娣, 李光晨, 张文, 等. 苹果 RAPD 标记的引物筛选与 RAPD 校正. *中国农业大学学报*, 2003, 8(3): 7-10.
- [12] 王国鼎, 文晓鹏, 季祥彪, 等. 11 种兰属植物 DNA 的提取及 RAPD-PCR 实验体系的建立与优化 [J]. *种子*, 2007, 26(3): 24-27.

Optimization of RAPD Reaction systems for *Curcuma wenyujin*

WANG Xiao-hui¹, TANG Xiao-chuang¹, YANG En-xiu¹, JIANG Cheng-xi¹, LI Min², LI Xiao-kun^{1, 2}

(1. Ministry of Education, Engineer Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Pharmacy School, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract: Some reaction condition was optimized by amplifying technology and method of PCR based on isolating genomic DNA from *Curcuma wenyujin*, to establish the best reaction condition of RAPD-PCR amplification system of *Curcuma wenyujin*. Results showed that the best amplification system for *Curcuma wenyujin* was as follows: total reaction volume 25 μ L, including Mg^{2+} (25 mM) 2.0 μ L, Taq polymerase (5 U/L) 0.3 μ L, random primer (20 M) 1.0 μ L, template DNA 1.0 μ L, dNTP (2.5 mM) 2.0 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; the amplification procedure conditions were pre-denature at 94 $^{\circ}$ C for 5 min followed by denature at 94 $^{\circ}$ C for 35 s, annealing at 36 $^{\circ}$ C for 1 min, extension at 72 $^{\circ}$ C for 1.5 min, cycling 42 times, last extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 min. This amplification system was very economical, convenient and the band was clear and stable. It was the most appropriate system, based for the genetic diversity of *curcuma wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin*; Genomic DNA; RAPD-PCR amplification system