

# 利用正交设计建立洋桔梗 RAPD 最佳反应体系

王 轶, 陈崇顺, 曹伟杰, 王转梅

(南京师范大学 生命科学学院 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210046)

**摘 要:** 利用正交设计法对影响洋桔梗 RAPD 反应的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物和模板等主要因素的作用进行了比较分析, 建立了洋桔梗 RAPD 的最佳反应体系: 即在 25  $\mu$ L 反应体积中, 10 $\times$  PCR buffer 为 2.5  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.4 mmol/L, 引物浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, 模板浓度为 50 ng/ $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U; 在此基础上, 比较了不同退火温度对 RAPD 扩增产物的影响, 退火温度经筛选选定为 41  $^{\circ}$ C; 最后再将该反应体系应用于不同引物, 结果表明该优化结果具有较好的稳定性和通用性。

**关键词:** 洋桔梗; RAPD; 正交设计

中图分类号: S 682.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)05-0197-03

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)是由 Williams<sup>[1]</sup> 和 Welsh<sup>[2]</sup> 两个研究小组分别提出的一种分子标记技术, 具有快速、简便、灵敏、通用性好、多态性检出率高、所需 DNA 量少、且无需了解物种基因组相关分子生物学信息等优点, 可用于植物(包括观赏植物)的系统发育进化分析、种质资源遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、品种鉴定、目标性状基因标记以及遗传图谱快速构建等方面的研究<sup>[3]</sup>。

洋桔梗 (*Eustoma grandiflorum*), 又名草原龙胆或土耳其龙胆, 是龙胆科龙胆属的 1.2 a 生草本观赏植物。洋桔梗花姿优美, 花色丰富, 是国际上十分流行的切花和盆花种类之一。目前洋桔梗产量列切花第 7 位, 是切花生产中上升最快的种类<sup>[4]</sup>。

一般栽培观赏植物品种间因亲缘关系比较近, 仅靠花色、花型、叶色、叶型等传统的形态指标有时难以区分, 这样既影响品种的正确识别, 也给新品种的注册登记和法定保护等带来困难, 而分子标记技术可有效地用于品种鉴定等<sup>[5]</sup>。但迄今还未见有关洋桔梗 RAPD 分子标记的研究报导。

由于 RAPD 技术是基于 PCR 的一种分子标记技术, 其扩增结果易受  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 等因素的影响, 因此, 在将该技术应用于一个新的植物材料之前, 应先建立一个合适的反应体系, 以期获得可靠的结果。为此, 研究利用正交试验设计法, 对上述各因素的最佳反应条件进行了优化, 这样

既可更好地考虑各因素间的交互作用, 又可更快地建立适合于洋桔梗的 RAPD 反应体系, 为进一步进行洋桔梗品种分子鉴定和遗传变异分析等研究奠定重要技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材与试剂

植物试材为 Double Mariachi Pink' 洋桔梗, 其种子购于昆明缤纷园艺有限公司。10 $\times$  buffer、 $MgCl_2$ 、Taq DNA 聚合酶购于大连 Takara 公司; 随机引物购于上海生工公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒、dNTPs、DNA 分子量标记(MDI09)购于北京天根公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取洋桔梗无菌苗幼嫩叶片, 在液氮中研成粉末, 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取高质量的模板 DNA; 将所提模板 DNA 稀释后, 用紫外分光光度计测定其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值, 估算样品的纯度, 并结合浓度 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳结果, 确定其含量和完整性, 然后将其稀释至 20 ng/ $\mu$ L 备用。

表 1 RAPD 反应体系的 5 个因素与 4 个水平

水平	$Mg^{2+}$ / mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	dNTPs / mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	Taq DNA 聚合酶/ U	引物 / $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	模板/ ng
1	1.0	0.1	0.5	0.2	10
2	1.5	0.2	1.0	0.4	30
3	2.0	0.3	1.5	0.6	50
4	2.5	0.4	2.0	0.8	70

1.2.2 RAPD 反应体系各主要影响因素的正交试验设计 经过初步筛选, 将引物 S73 (5' AAGCCTCGTC 3'; Tm: 32  $^{\circ}$ C) 作为正交试验的引物。以  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物和模板为 5 个试验因素, 每个因素分设 4 个水平, 具体见因素水平表(表 1); 采用正交试验设计表 L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) 安排试验(见表 2), 每管 RAPD 反应体系中

第一作者简介: 王轶(1983-), 女, 江苏南京人, 在读硕士, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: 1x1999@tom.com。  
通讯作者: 陈崇顺。E-mail: chenchongshun@njnu.edu.cn。  
收稿日期: 2008-01-05

包含 2.5  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$  buffer, 在按表 2 所列的量加入各成分后, 以无菌水补充总体积至 25  $\mu\text{L}$ 。每个处理设 2 次重复。RAPD 反应在 PTC-200TM 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)中进行, 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 41 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。取 6  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物点入含有 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶加样孔, 于 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液中, 设定 5 V/cm 稳压电泳 1 h。置电泳结果于紫外分析仪上观察, 并通过 UVP 紫外凝胶成像系统采集图像。

表 2 RAPD 反应体系因素水平正交试验设计( $L_{16}(4^5)$ )

水平	$\text{Mg}^{2+}$ / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTPs / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Taq DNA 聚合酶/ $\text{U}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板/ $\text{ng}$
1	1.0	1.0	0.1	0.25	0.5
2	1.0	2.0	0.2	0.50	1.5
3	1.0	3.0	0.3	0.75	2.5
4	1.0	4.0	0.4	1.00	3.5
5	1.5	1.0	0.2	0.75	3.5
6	1.5	2.0	0.1	1.00	2.5
7	1.5	3.0	0.4	0.25	1.5
8	1.5	4.0	0.3	0.50	0.5
9	2.0	1.0	0.3	1.00	1.5
10	2.0	2.0	0.4	0.75	0.5
11	2.0	3.0	0.1	0.50	3.5
12	2.0	4.0	0.2	0.25	2.5
13	2.5	1.0	0.4	0.50	2.5
14	2.5	2.0	0.3	0.25	3.5
15	2.5	3.0	0.2	1.00	0.5
16	2.5	4.0	0.1	0.75	1.5

1.2.3 退火温度的确定 在以正交试验设计法确定的 RAPD 最佳反应体系基础上, 按 35、38、41 和 44 $^{\circ}\text{C}$ 共 4 个退火温度梯度进行试验, 以比较分析不同退火温度对 RAPD 扩增结果的影响。

1.2.4 RAPD 最佳反应体系稳定性和通用性的检验 将前述以 S73 为引物优化得到的 RAPD 最佳反应体系, 应用于随机选择的 S1005(5' TTGCAGGCAG 3'), S1238(5' GTTGCGCAGT 3'), S1383(5' TTAGCGCCCC 3'), S287(5' AGAGCCGTCA 3'), S5(5' TGCGCCCTTC 3')等 5 个 RAPD 引物, 以检验该 RAPD 优化反应体系的稳定性和通用性。退火温度选定为大多数 RAPD 引物通用的 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系的正交优化

对利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的模板进行琼脂糖凝胶电泳, 检测结果显示 DNA 条带较亮, 谱带整齐, 可作为 RAPD 扩增反应的模板 DNA。

图 1 为根据表 2 安排的正交试验设计 RAPD 的扩增结果。从图 1 可以看出, 由于  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物和模板等 5 个影响因素浓度组合的不同, 16 个处理组合得到不同效果的扩增。从 1 号到 4 号

组合条带数量增多, 清晰程度加强, 显示了在  $\text{Mg}^{2+}$  浓度一定的情况下, 扩增效果随其它 4 个组分浓度提高而增强的变化趋势。但由于  $\text{Mg}^{2+}$  浓度比较低, 大多数条带很弱不清晰。第 5、6、13、14 号组合, 背景较暗, 条带弥散, 可能与 dNTPs 的不足有关。而 7、8、9、10 号虽然背景较亮, 但均出现了非特异性扩增, 使背景模糊, 原因可能是 Taq DNA 聚合酶浓度较高。1、6、11、16 条带较少, 多态性低, 可能是由于 Taq DNA 聚合酶浓度过低。理想组合应具备谱带清晰、多态性高和重复性好的特点。只有第 12 号组合谱带多而清晰, 无弥散和拖尾现象, 因此确定其为正交优化的最佳体系, 即在 25  $\mu\text{L}$  反应体积中含  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.4 mmol/L, 引物浓度为 0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 模板浓度为 50 ng/ $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U。

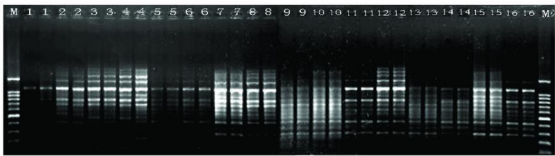


图 1 RAPD 正交设计各处理的扩增结果  
注 1~16 为表 2 的处理组合编号。

2.2 退火温度的确定

退火温度是影响 RAPD 的重要条件之一, 温度降低会降低特异性而增加扩增条带数, 温度升高会增加扩增特异性而减少扩增条带, 温度过高则会抑制扩增。所以还需对退火温度进行优化。根据正交试验结果, 选择最佳的 12 号体系进行退火温度试验。由图 2 看出, 退火温度过低(35 $^{\circ}\text{C}$ )则扩增特异性差, 背景深, 条带不清晰; 当退火温度逐渐升高时(38、41 $^{\circ}\text{C}$ ), 扩增的特异性升高, 杂带减少, 弥散背景减少; 退火温度过高(44 $^{\circ}\text{C}$ ), 则引物与模板结合差, PCR 产物丰度低, 电泳条带亮度小。试验的退火温度在 41 $^{\circ}\text{C}$ 较为适宜, 谱带清晰且数目较多, 因此, 确立最佳退火温度为 41 $^{\circ}\text{C}$ 。

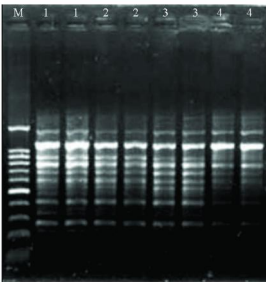


图 2 不同退火温度下 RAPD 反应体系的扩增结果  
注: 1~4 分别为 35、38、41、44 $^{\circ}\text{C}$ 。

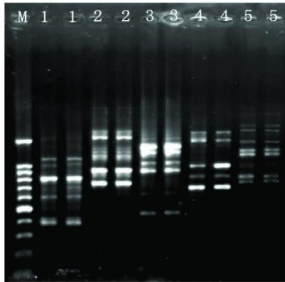


图 3 不同 RAPD 引物用优化的 RAPD 体系的扩增结果  
注 1~5 为引物编号, 分别为 S1005、S287、S1238、S1383、S5。

2.3 RAPD 最佳反应体系稳定性和通用性的检验

随机选择了 S1005、S287、S1238、S1383、S5 等 5 个 RAPD 引物来检验 12 号体系的稳定性和通用性, 结果如图 3。从图 3 可以看出, 5 个引物均能扩增出较清晰的条带, 这表明优化的反应体系具有良好的稳定性, 可适用于其它的 RAPD 随机引物。不过由于各引物退火温度的不同, 因此在应用上述引物进行 RAPD 分析前, 仍需对各引物的退火温度进行筛选优化。

3 讨论

有关 RAPD 反应条件的优化研究大多采用单因素试验的方法<sup>[68]</sup>, 试验次数比较多、工作量比较大。近年来, 正交设计开始用于各种 PCR 反应体系的优化<sup>[91]</sup>。该方法是根据统计学原理, 从多因素实验的结果中, 挑选几个处理进行部分试验, 即可了解全部试验因素水平以及因素之间的相互作用, 较快地找到最优的因素水平组合。试验利用正交设计大大简化了试验过程, 节约了时间和经费。

在试验范围内, 不同的组分浓度组合扩增出的片段数量和亮度不同。如 Taq DNA 聚合酶显著地影响到凝胶上显示的扩增片段数量; dNTPs 对扩增片段的亮度有显著影响, 这些结果与前人研究结果一致<sup>[81]</sup>。但试验结果中, dNTPs、引物和模板浓度对扩增片段数量无显著影响, 引物和模板浓度对扩增片段亮度也无显著影响, 这与许多单因素试验结果不同<sup>[6-7]</sup>。其原因可能是: 单因素试验中, 某组分对扩增结果的影响是通过固定其它组分浓度, 单一变化其浓度获得的; 而在正交试验中, 某组分对扩增结果的影响是通过综合该组分不同浓度与其它各组分多种浓度相互作用而获得的。显然, 正交设计的结果包含了更多的信息, 反映了反应体系中各因素间存在的相互影响。

另外, 试验结果还表明, 对于同一引物, 其实际合适的退火温度与理论上计算出的值可能不同, 这与文献中

的报道是一致的<sup>[12]</sup>。所以对于不同的 RAPD 引物, 其合适的退火温度, 更应通过实际试验来优化确定。

通过试验研究得出, 虽然影响 RAPD 反应稳定性的因素较多, 但是如果严格规范实验操作, 并注意在仪器设备、试剂来源等方面尽可能保持一致, 还是能获得较稳定的结果的。试验获得的优化体系稳定性好、重复性高、通用性强, 为进一步进行洋桔梗的 RAPD 分析及相关分子生物学研究奠定了良好基础。

参考文献

[ 1 ] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[ J ]. Nucleic Acids Res. 1990 18: 6531-6535.  
[ 2 ] Welsh J M, Acclelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[ J ]. Nucleic Acids. Res. 1990 18: 7213-7218.  
[ 3 ] 管晓庆, 王奎玲, 刘庆华 等. RAPD 技术在我国观赏植物中的应用[ J ]. 北方园艺. 2007(4): 75-77.  
[ 4 ] 金凤, 陈崇顺, 邹爱兰 等. 月季 ISSR 反应体系的优化[ J ]. 江苏农业科学. 2006(1): 72-75.  
[ 5 ] 桂敏, 莫锡君, 吴昊 等. 洋桔梗切花栽培管理技术[ J ]. 中国种业. 2005(8): 53-54.  
[ 6 ] 孙敏, 乔爱民, 王和勇 等. 黄瓜 DNA 提取及其 RAPD-PCR 反应体系的优化[ J ]. 种子. 2004, 23(6): 9-14.  
[ 7 ] 杨友才, 周清明, 尹晗琪. 烟草 RAPD 反应体系的建立与优化研究[ J ]. 中国农学通报. 2005 21(5): 97-100.  
[ 8 ] 鄢东海, 郑道君, 梁远发, 等. 粗壮女贞 RAPD-PCR 实验体系优化的研究[ J ]. 贵州科学. 2007 25(2): 56-64.  
[ 9 ] 张彦萍, 刘海河. 西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[ J ]. 河北农业大学学报. 2005, 28(4): 51-53.  
[ 10 ] 张建军, 司龙亭, 姜晶. 优化萝卜基因 DNA RAPD-PCR 反应体系的正交设计法[ J ]. 植物生理学通讯. 2006 42(2): 293-295.  
[ 11 ] 张丽, 周兰英, 肖千文, 等. 正交试验设计在建立杜鹃花 RAPD-PCR 反应体系中的应用[ J ]. 北方园艺. 2007(5): 124-126.  
[ 12 ] 王佳, 胡永红, 张启翔. 牡丹 ISSR-PCR 反应体系正交优化设计[ J ]. 安徽农业科学. 2006, 34(24): 6465-6466, 6484.

Establishment of *Eustoma grandiflorum* Optimal RAPD Reaction System Using Orthogonal Design

WANG Yi, CHEN Chong-shun, CAO Wei-jie, WANG Zhuang-mei

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity & Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** The essential factors of the RAPD reaction system for *Eustoma grandiflorum*, such as:  $Mg^{2+}$ , dNTPs, Taq DNA polymerase, primer and DNA template were optimized by using the method of orthogonal design. The optimal RAPD reaction system was set as follows:  $10\times$  PCR buffer  $2.5\mu\text{L}$ ,  $Mg^{2+}$   $2.0\text{ mmol/L}$ , dNTPs  $0.4\text{ mmol/L}$ , random primers  $0.2\mu\text{mol/L}$ , DNA template  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$  and Taq DNA polymerase  $1.0\text{ U}$ , in a total  $25\mu\text{L}$  reaction volume. Then the effects of different annealing temperatures to the amplified products of RAPD were also investigated. The annealing temperature was selected as  $41^{\circ}\text{C}$ . Finally the optimized system was successfully applied to different random primers, indicating that the optimal system was stable and adapted.

**Key word:** *Eustoma grandiflorum*; RAPD; Orthogonal design