

干用辣椒 RAPD-PCR 反应体系及扩增程序的优化

王伟¹, 郑根昌¹, 闫光照¹, 刘鹏¹, 陈炳艳¹, 包凤利²

(1. 内蒙古民族大学 农学院, 内蒙古 通辽 028043; 2. 北京德农种业 北京 100101)

摘要:以干用辣椒叶片为材料,研究了干用辣椒 RAPD 分析过程中的影响因素,包括 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板 DNA 浓度、退火温度、退火时间及循环次数等,建立适合干用辣椒 RAPD 反应的 PCR 体系,即 25 μ L 反应体系中含有 Taq 酶 1.5 U、 Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTPs 0.6 mmol/L、引物 0.8 μ mol/L、模板 DNA 60 ng。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 40 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。该优化体系在干用辣椒 RAPD 分析中获得较理想的扩增结果,为应用 RAPD 技术对干用辣椒遗传多样性奠定基础。

关键词:干用辣椒; RAPD-PCR; 反应体系; 扩增程序

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)02-0045-04

辣椒(*Capsicum frutescens* L.)是茄科辣椒属常异花授粉作物,原产于中南美洲热带地区,在温带地区为 1 a 生草本植物^[1],果实内含有丰富的维生素 C、蛋白质、糖类营养物质。干用辣椒的经济价值较高,辣椒红素是国家标准 GB2760-86 规定可以安全使用的红色色素,因其色泽鲜艳、稳定性好、安全可靠,并兼有药用价值^[2]。所以干用辣椒被广泛应用于日化和医药行业中。近年来随着新品种的推广、农业耕作制度的改变及环境恶化等方面的原因,辣椒种质资源在不断丧失。随着信息技术的飞速发展,地方品种之间的交流也越来越频繁,对地方辣椒品种资源的搜集、评价与鉴定工作变得相当重要^[3]。

随机扩增多态性 RAPD 技术是 1990 年由 Williams^[4]、Welsh^[5] 等人建立的。它是利用一系列 10 个碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物在未知序列的 DNA 上进行随机扩增。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离、EB 染色来检测 DNA 的多态性。RAPD 具有检测效率高、灵敏,对材料要求不高,取材少、成本低等特点,已被广泛应用于遗传学、分子进化学和生物分类学诸领域^[6]。但由于 RAPD 技术采用的引物较短,反应快速、灵敏、高效;退火温度低,导致对其反应条件很敏感,稳定性较差,且不同物种对反应的要求也存在差异^[7]。因此试验以干用辣椒为材料对 RAPD-PCR 反应条件正交优化研究,寻找一种适应地方品种体系优化方法,为应用 RAPD 技术对干用辣椒遗传多样性奠定基础^[8]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用干用辣椒由开鲁县红干椒协会提供,主要品种有金塔系列、朝天椒、道德椒、益都椒等品种。在开花期进行田间取样,放自封袋中并做好标记,在 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存。

1.2 试剂和仪器

用于 RAPD-PCR 扩增反应的 RAPD 随机引物 (10 μ mol/L)由上海生工公司提供 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), $MgCl_2$ (20 mM), dNTPs (10 mM) 以及 DL-2000Marker 等购置 TaKaRa 公司; RAPD 扩增反应于 Biometra 梯度 PCR 仪上进行;凝胶成像系统由珠海 Hema 仪器公司生产。经过初步筛选,把引物 S₁₇ 作为此次正交试验的引物。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取 用 CTAB 法从供试材料的幼嫩叶片提取基因组 DNA^[9],在紫外分光光度计下测出 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值,比值在 1.8~2.0 之间的较好。把每个供试材料的基因组稀释成统一浓度为 50 ng/ μ L,并构建基因池为 PCR 体系优化做准备。

1.3.2 RAPD-PCR 体系正交优化设计 试验设计 RAPD 反应体系为 25 μ L,试验以 50 ng/ μ L 的工作液为模板,扩增引物为 S₁₇,选择模板 DNA 量、Taq 酶量、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物浓度 5 个因素,每个因素设置 4 个水平。正交试验因素和水平的处理组合见表 1 和表 2。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,电泳胶片在 Hema 凝胶分析系统上拍照分析。

第一作者简介:王伟(1983-),男,在读硕士,研究方向为辣椒分子生物学。E-mail: wangwei_c@163.com.

通讯作者:郑根昌。

收稿日期:2008-10-18

表 1 各组分浓度水平

水平	处理				
Table 1	The level of concentration every part				
	MgCl ₂ /μL	dNTPs/μL	TaqDNA/μL	DNA/μL	Primer/μL
1	1.20	0.16	0.04	1.60	0.24
2	1.60	0.20	0.05	2.00	0.28
3	2.00	0.24	0.06	2.40	0.32
4	2.40	0.28	0.07	2.80	0.36

表 2 RAPD-PCR 正交优化试验设计表 L₁₆(4⁵)

处理号	MgCl ₂ /μL	dNTPs/μL	Taq/μL	DNA/μL	Primer/μL
Table 2	The test of series of orthogonal design table				
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	1
3	3	3	3	3	1
4	4	4	4	4	1
5	2	1	3	4	2
6	1	2	4	3	2
7	4	3	1	2	2
8	3	4	2	1	2
9	3	1	4	2	3
10	4	2	3	1	3
11	1	3	2	4	3
12	2	4	1	3	3
13	4	1	2	3	4
14	3	2	1	4	4
15	2	3	4	1	4
16	1	4	3	2	4

2 结果与分析

2.1 正交体系优化最佳浓度配比的筛选

图 1 表明, 25 μL 体系中, 各组分经过 3 次重复试验均有扩增产物产生。但 14 号组合扩增产物趋于稳定, 约在 250 bp 谱带较其他组合清晰, 特异性较强。因此, 当反应体系中引物 0.8 μmol/L、dNTPs 0.6 mmol/L、MgCl₂ 2.5 mmol/L、1.5 U Taq 聚合酶、60 ng DNA 模板为干用辣椒品种 RAPD 反应的最佳配比。

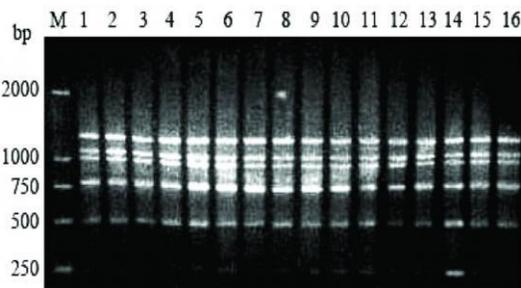


图 1 RAPD-PCR 的体系正交优化试验

Fig. 1 The test of series of orthogonal design Optimization

2.2 扩增程序优化

2.2.1 不同退火温度的单因素优化 在优化好的 DNA 模板、Mg²⁺、dNTPs、引物及 TaqDNA 酶浓度的基础上, 最后对退火温度进行优化, 扩增结果较为理想。由图 2

可知, 在预设定的 6 个不同退火温度 2 次重复下均得到了扩增谱带。但不同的退火温度谱带差异较大。当 T_m 值为 40 °C 和 41 °C 时, 随着退火温度的增加, 扩增谱带逐渐减弱; T_m 值为 36、37、38 和 39 °C 时谱带趋于稳定, 但 37 °C 谱带在 500 bp 左右的谱带较其他谱带更清晰, 并且在大约 250 bp 左右的产生特异带。所以, 为获得稳定有效的谱带, 综合多方面因素, 退火温度选择 37 °C 为理想。在具体使用多个引物扩增时, 参考各引物实际的 T_m 值, 不同的引物在此温度基础上稍有调整。

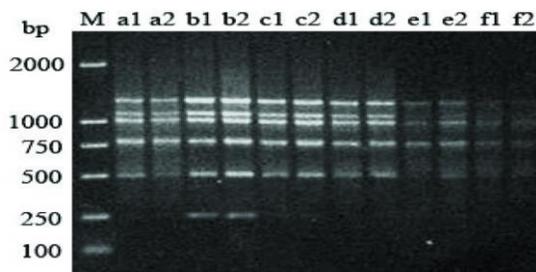


图 2 RAPD-PCR 退火温度优化试验

注: a~f 分别为退火温度 36、37、38、39、40、41 °C。

Fig. 2 The test of series of annealing temperatures in the RAPD-PCR

Note: The annealing temperatures a 36 °C; b 37 °C; c 38 °C; d 39 °C; e 40 °C; f 41 °C.

2.2.2 不同退火时间的单因素优化 退火温度的优化

在整个 RAPD-PCR 反应体系中具有举足轻重的作用, 因为它影响着模板与引物是否很好的结合。而退火时间的长短能够促使在适宜的退火温度下扩增出更好的带型。由图 3 结果表明, 在预设定的 4 个不同退火时间 3 次重复下均得到了较为清晰的扩增带, 但当延伸时间在 1 min 时, 在 500 bp 左右的谱带较其他延伸时间谱带更加清晰稳定。由此, 在 37 °C 退火温度的基础上, 选择延伸时间为 1 min 更为理想。

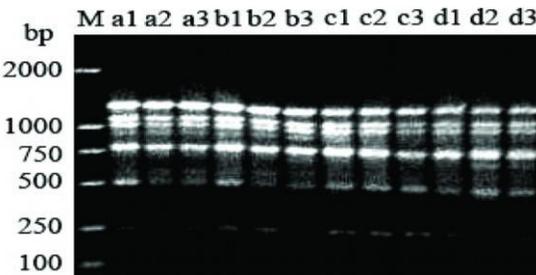


图 3 PCR-RAPD 退火时间梯度试验

注: a~d 分别为不同退火时间 30 s、45 s、1 min、1.5 min。

Fig. 3 The test of series of annealing hours in the PCR-RAPD

Note: The annealing hours: a, 30 s; b, 45 s; c, 1 min; d, 1.5 min.

2.2.3 不同变性时间的单因素优化试验 变性时间的

长短关系到基因组 DNA 双链的解离程度, 最终影响到 PCR 扩增产物的效率。图 4 结果表明, 不同延伸时间均得到扩增产物, 随着变性时间的延长, 在 760 bp 左右片段的扩增强度逐渐增强, 在 480 bp 逐渐减弱, 但在变性时间为 1 min 时, 分子量片段较其他变性时间多。因此, 在 1 min 的变性时间下更为理想。

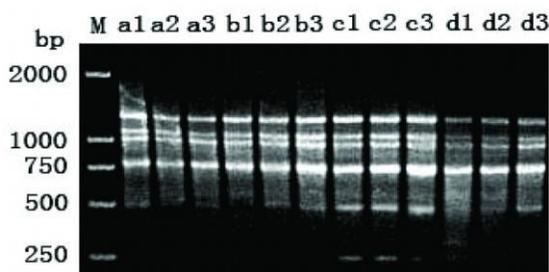


图 4 PCR-RAPD 变性时间梯度试验

注 a~d 分别为不同变性时间 30 s, 45 s, 1 min, 1.5 min.

Fig. 4 The test of series of hours in the PCR-RAPD

Note: The hours: a 30 s; b 45 s; c 1 min; d 1.5 min.

2.2.4 不同延伸时间的单因素优化试验 在对变性时间优化完的基础上, 进行延伸时间的优化对整个 PCR 热循环参数有重要的意义。因为延伸时间的长短直接影响到模板与引物的结合效率, 延伸时间适当延长, 目的基因产量高, 但时间过长或过短, 非特异性基因增多, 影响 PCR 扩增的真实性。图 5 表明, 在预设的 4 个不同延伸时间均得到扩增谱带。当延伸时间在 1.5 min 时, 在 250~500 bp 片段谱带更加清晰。

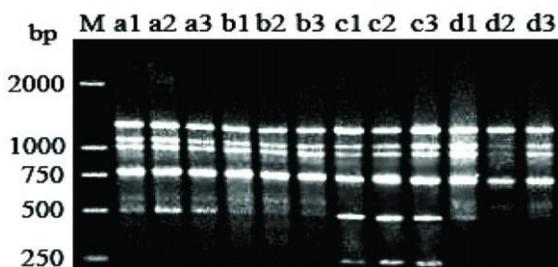


图 5 PCR-RAPD 延伸时间梯度试验

注 a~d 分别为不同延伸时间 30 s, 45 s, 1 min, 1.5 min.

Fig. 5 The test of series of extending hours in the PCR-RAPD

Note: The extending hours: a, 30s; b, 45s; c, 1min; d, 1.5min.

3 讨论

RAPD 技术简单快捷, 试验成本低, 无须预先了解 DNA 序列的信息。该技术使用的引物较短, 要求退火温度较低, 提高了引物和模板的配对几率和随机性, 因而大大的提高了基因组分析的效率和多态性的检出, 但也会导致标记的稳定性和可重复性差等缺点, 因此

RAPD 试验条件的标准化十分重要。建立相对稳定的 RAPD 反应体系及扩增程序是该技术应用的基础。关于 RAPD 反应体系的优化在许多物种上均有报道, 但不同物种之间或同一物种不同种属间存在一定差异^[1]。从已往的报道可以看出, 大多数学者把研究的重点放在反应体系而忽略了扩增程序上。试验的创新之处在于优化变性、退火、延伸时间并且把它们设置不同的梯度进行, 使其结果真实性和重复性更好。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交优化的方法确定最佳的反应体系, 其中 Taq 酶用量是重要的因子, 它直接影响多态性的检出率和扩增结果的重复性及真实性; Mg^{2+} 浓度是影响 Taq 酶活性的主要因子, 不同物种对 Mg^{2+} 浓度的要求不同, 从已有的报道看, Mg^{2+} 浓度范围大多在 1.5~3.0 mmol/L 的报道, 试验结果以 2.5 mmol/L 时扩增产物均较清晰; 一般认为模板 DNA, 引物和 dNTPs 等 3 种因素适宜用量的范围较宽^[2], 试验结果也印证了这一点。热循环参数的优化主要是对退火温度、时间和变性及延伸时间的优化, 在已往的报道中, 干用辣椒的变性温度都在 35~41℃ 范围内波动, 根据这个范围, 采用单因素的试验方法设置 6 个不同梯度进行优化, 得到的 37℃ 退火温度条带清晰、数量多。

文献资料所报道的 RAPD 反应变性、退火、延伸温度参数大体一致, 而各自的反应时间则不尽相同, 长短不一, 因此在优化退火温度完毕后把各反应时间设置不同梯度参数, 最后结果表明退火时间、延伸时间对 RAPD 的扩增结果影响较大。此外, 还需要对总循环参数进行优化, 从 35~45 区间设 6 个梯度, 结果差别不十分明显, 最后以 40 个循环作为此次试验的总循环次数。同时试验也应注意尽可能地使用同一厂家的药剂和同一 PCR 仪等设备, 以提高 RAPD 分析结果的重复性和可靠性。

参考文献

- [1] 邹学校. 中国辣椒 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002(1): 12-13.
- [2] 刘蓉, 刘志敏. 辣椒红色素提取方法研究进展 [J]. 山东蔬菜学报 2006(3): 47-48.
- [3] 蒋向辉, 余朝文, 张玲玲. 湖南地方辣椒品种 RAPD 体系的正交优化研究 [J]. 北方园艺 2007(9): 7-9.
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic acids Res 1990 22(18): 6531-6535.
- [5] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 7213-7218.
- [6] 潘新法. RAPD 技术在果树遗传育种研究中的应用 [J]. 生物学杂志 2002, 18(2): 26-28.
- [7] 蒋向辉. 湖南地方辣椒品种 RAPD 体系的正交优化研究 [J]. 北方园艺, 2007(9): 7-9.
- [8] 杜晓云, 罗正荣. 部分柿属植物 IRAP 反应体系的建立和指纹图谱构建 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 931-936.
- [9] 王珍, 方宣均. 植物 DNA 分离 [J]. 分子植物育种, 2003(2): 278-294.
- [10] 盖均益. 试验统计方法 [M]. 1 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 278-

高寒地区荷兰豆栽培技术

郭又奇

(化隆县农业技术推广中心, 青海 化隆 810900)

中图分类号: S 643.3 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2009)02-0048-01

荷兰豆属豆科豌豆属一、二年生草本植物, 具有直根系和根瘤菌, 以嫩梢、嫩荚和籽粒为食用蔬菜。由于质嫩清香, 富有营养, 为人们所喜食佳蔬。

1 选地整地和施肥

荷兰豆的种植地块应选择平整、浇水方便, 富含有机质, 土层深厚的地块。结合深翻, 1 hm²施有机肥 45 000 ~ 60 000 kg, 尿素 150 kg, 二铵 225 ~ 300 kg, 普钙 750 kg, 耙平后起垄, 垄距 80 cm, 垄宽 60 cm, 垄高 15 ~ 20 cm。

2 播种

播种前精选种子, 选粒大、整齐、健壮和无病虫害的种子播种(103 小荚荷兰豆)。播种时间: 4 月下旬播种。播种方式: 双行穴播 株行距 40 cm × 40 cm, 播种后覆土压实, 下种量 150 ~ 250 kg/hm²。

3 田间管理

作者简介: 郭又奇(1978-), 女, 本科, 助理农艺师, 现从事农业技术推广工作。

收稿日期: 2008-08-21

中耕除草: 出苗整齐后中耕除草 1 ~ 2 次, 以促进根系发育, 培育壮苗。

搭架: 株高 20 ~ 30 cm 时进行搭架, 使其通风透光, 便于采摘。

水肥管理: 荷兰豆抽蔓开花时开始灌水, 灌水 2 ~ 3 次后, 即可采收嫩荚。结荚盛期进行叶面追肥, 用 0.4% 磷酸二氢钾或化肥精、施丰乐等喷施 2 次, 以促进嫩荚生长。

摘除病残叶: 在生长后期, 摘除茎基部病残叶, 创造通风透光条件, 以减少病虫害发生。

采收: 103 小荚荷兰豆荚长 6 ~ 8 cm, 无鼓粒、无病、无虫斑点时采收。

4 病虫害防治

荷兰豆的病害有根腐病和褐斑病, 播种前用 1% 福尔马林浸种 20 min, 或在褐斑病蔓延前, 用 50% 多菌灵 500 倍液喷雾防治。根腐病用粉锈宁 500 倍液进行灌根。虫害主要有潜叶蝇和蓟马, 田间在初花期发生, 在初花期前用一遍净 450 g/hm² 进行喷雾防治, 共喷 2 ~ 3 次, 每隔 7 d 喷 1 次。

294

[11] Ballard R, Rajapakse S, Abbott, et al. DNA markers in rose and their use for cultivar identification and genome mapping[J]. Acta Horticulture

1996(2): 265-268.

[12] 李振江, 葛会波, 张学英. 山杏 RAPD 反应体系条件的优化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 169-172.

Optimization for RAPD-PCR Reaction System and Amplified Program of Dry Peppers

WANG Wei¹, ZHENG Gen-chang¹, YAN Guang-zhao¹, LIU Peng¹, CHEN Bing-yan¹, BAO Feng-li²

(1. Inner Mongolia University for Nationalities Tongliao, Inner Mongolia 028043, China; 2. Denong Need Co. LTD, Beijing 100101, China)

Abstract: The factors influencing RAPD analysis, including Taq polymerase, Mg²⁺, dNTPs primers, template DNA concentration, denaturing time and thermal cycles in Dry peppers were studied. An optimal PCR system for RAPD in fresh leaves of Dry peppers had been found in 25 μL reaction solution, contained Taq polymerase 1.5 U, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTPs 0.6 mmol/L, primers 0.8 μmol/L, template DNA 60 ng. The amplification program was devised: initial denaturing at 94 °C for 4 min; denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 37 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1.5 min, 40 cycles; final extension at 72 °C for 5 min. Steadily and realibly profile was obtained in the dry Pepper using the optimal system and amplification program, basic job for studing dry pepper genetic diversity.

Key words: Dry pepper; RAPD-PCR; Reaction system; Amplified program