

枸杞 RAPD 反应体系的优化

任 贤, 张 磊, 罗才洁, 马岩涛, 张 鹏

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 现以枸杞基因组 DNA 为模板, 对其 RAPD 反应体系 进行优化以 确定最佳反应体系。结果表明: 在总体积 25 μ L 中 Mg^{2+} (2.5 mM)、模板 DNA (25 ng)、引物浓度 (0.6 μ M)、dNTPs (0.25 mM) 和 *Taq* DNA 聚合酶 (2.0 U) 时, PCR 扩增效果 最好并能 获得较清晰 的枸杞 DNA 指纹图谱。

关键词: 枸杞; 体系优化; RAPD

中图分类号: S 567.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2010)19—0140—03

枸杞是茄科枸杞属多分枝灌木植物, 国内外都有分布, 枸杞一般高 0.5~1 m, 人工栽培时可达 2 m 多。现代研究发现, 枸杞子有降低血糖、抗脂肪肝、抗动脉硬化等作用。除此之外, 枸杞还可用作园林盆栽以及作水土保持树种等。

RAPD 技术的各个反应条件都必须严格控制, 引物种类繁多, 不同的材料也需要不同的引物, 因此, 反应条件都需要各自优化才能提高试验的稳定性。现主要对影响枸杞 RAPD 反应体系中 Mg^{2+} 、模板 DNA、引物、dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶浓度进行单因素试验, 以确定枸杞最适的 RAPD 扩增体系, 旨在为以后 RAPD 分子标记技术在枸杞研究中的应用奠定基础。

表 1 枸杞 RAPD 反应体系优化的各因子设计

试验因子	因子处理											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mg^{2+} /mM	0.6	0.8	1.0	1.2	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0	6.0
模板 DNA/ng	6.0	8.0	10	12	15	20	25	30	35	40	50	60
引物/ μ M	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
dNTPs/mM	0.02	0.06	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	1.00
<i>Taq</i> 酶/U	0.5	0.8	1.0	1.2	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0	6.0

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 反应的影响

Mg^{2+} 在 RAPD 反应中可以激活 *Taq* DNA 聚合酶活性。由图 1 可看出, 当 Mg^{2+} 的浓度为 0.6~1.0 mM (泳道 1~3) 时, PCR 扩增基本可以看到条带, 但不够清晰, 说明 Mg^{2+} 浓度偏低没能激活 *Taq* DNA 聚合酶的活性; 浓度为 1.2~2.5 mM (泳道 4~7) 时, 扩增条带亮度

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料采自银川育新枸杞种业有限公司农场的“宁杞 1 号”的枸杞叶片, 采摘后于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待用。

1.2 试验方法

利用改良的 CTAB 法提取枸杞基因组 DNA, 获得较纯的 DNA 用于研究 RAPD 体系优化, 对影响反应体系的 Mg^{2+} 、模板 DNA、引物、dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶的浓度及循环次数和退火温度进行单因素试验研究, 试验设计(表 1)。

逐渐增加且清晰; 浓度为 3.0~6.0 mM (泳道 8~12) 时, 又因 Mg^{2+} 浓度过高, 导致非特异性产物将大大增加, 所以得不到有效的扩增; 因此 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mM (泳道 7) 是枸杞 RAPD 扩增的最适浓度。

2.2 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响

如图 2 所示, 模板 DNA 浓度为 6~60 ng (泳道 1~12) 均能看到扩增条带, 但很明显的能看出模板 DNA 浓度为 6~20 ng (泳道 1~6) 时, RAPD 反应的条带不够亮且有弥散现象; 其浓度为 25 ng (泳道 7) 时, 条带最为清晰且亮度高; 浓度为 30~60 ng (泳道 8~12) 时, 条带逐渐变得不清晰且亮度明显降低; 当模板的 DNA 浓度为 25 ng (泳道 7) 时, 是枸杞 RAPD 反应的最适浓度。

第一作者简介: 任贤(1957-), 男, 宁夏平罗人, 教授, 现从事植物生物学研究工作。

通讯作者: 张磊(1983-), 男, 安徽滁州人, 在读硕士, 研究方向为分子生态学。E-mail: 15490634@qq.com.

收稿日期: 2010-06-12

2.3 引物浓度对 RAPD 反应的影响

引物浓度对 RAPD 扩增反应也有至关重要的影响,当引物浓度过高则会导致非特异性产物增多影响试验结果,当引物浓度过低则会使得 RAPD 反应不能有效的扩增。如图 3 所示,引物浓度为 0.05 ~ 0.60 μM (泳道 1~5)时,扩增条带逐渐变得清晰且亮度增加。浓度为 0.8 ~ 6.0 μM (泳道 6 ~ 12)时,扩增条带逐渐增多且有弥散现象,同时条带亮度逐渐减弱,过高的引物浓度导致非特异性扩增产物增加。试验结果表明,引物浓度为 0.6 μM (泳道 5)是反应的最适浓度。

2.4 dNTPs 浓度对 RAPD 反应的影响

dNTPs 是反应中磷酸根的主要来源,反应中过高的 dNTPs 浓度会同 Taq DNA 聚合酶竞争 Mg²⁺,从而使反应体系中 Mg²⁺ 总量下降,抑制 Taq DNA 聚合酶的活性,同时也会使错配率大大增加,浓度太低则会使 PCR 产物减少^[2]。如图 4 所示,当 dNTPs 浓度为 0.02 mM (泳道 1)时,未能扩增出条带;浓度为 0.06 ~ 0.25 mM (泳道 2 ~ 6)时,条带由基本可以看见到逐渐变得清晰,浓度达到 0.25 mM (泳道 6)时,条带最亮;浓度为 0.3 ~ 1.0 mM (泳道 7 ~ 12)时,明显的可知条带的亮度且清晰逐渐减弱,浓度为 1.0 mM (泳道 12)时,基本看不清

条带;因此,当 dNTPs 浓度为 0.25 mM (泳道 6)是 RAPD 反应扩增的最适浓度。

2.5 Taq DNA 聚合酶浓度对 RAPD 反应的影响

图 5 所示,当 Taq DNA 聚合酶浓度为 0.5 ~ 6.0 U (泳道 1 ~ 12)时,均能看到条带,但明显看出,当 Taq DNA 聚合酶浓度为 0.5 ~ 1.5 U (泳道 2 ~ 5)时,条带不够亮且均有拖尾现象;浓度为 2.0 U (泳道 6)时,条带清晰可见无拖尾现象;浓度为 2.5 ~ 5.0 U (泳道 7 ~ 11)时,条带亮度逐渐增加,但伴有拖尾现象;浓度为 5.0 ~ 6.0 (泳道 12)时,条带亮度有降低且伴有拖尾现象。从经济的角度考虑, Taq DNA 聚合酶浓度为 2.0 U (泳道 6)时是枸杞 RAPD 扩增反应的最适浓度。

2.6 反应程序的优化

试验对 PCR 扩增过程中循环次数和退火温度进行研究,分别设 20、25、30、35、40、45、50 个循环,退火温度分别设 32、34、36、38、40、42、44、46、48、50℃。结果表明,当循环次数和退火温度分别为 40 个循环、36℃退火时,扩增条带最好。因此,枸杞的 RAPD-PCR 扩增反应程序为:预变性(94℃)3 min;变性(94℃)50 s;退火(36℃)1 min;延伸(72℃)1 min;40 个循环;延伸(72℃)10 min;保温(4℃)10 min。

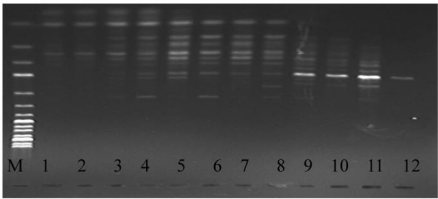
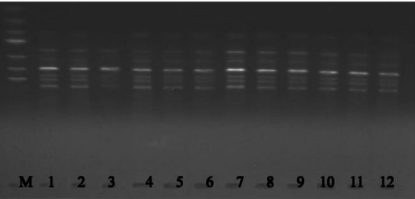
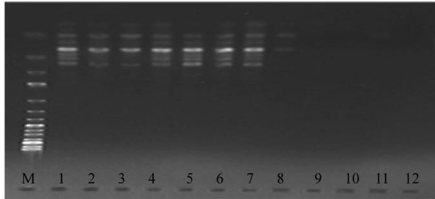


图 1 Mg²⁺ 浓度对 RAPD 反应的影响

图 2 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响

图 3 引物浓度对 RAPD 反应的影响

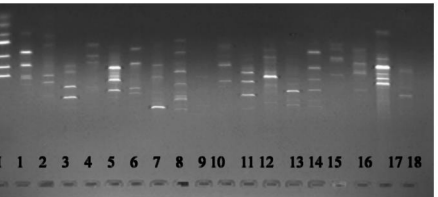
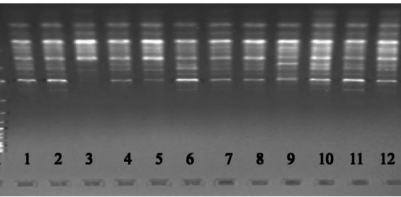
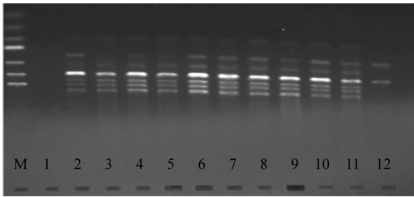


图 4 dNTPs 浓度对 RAPD 反应的影响

图 5 Taq DNA 聚合酶浓度对 RAPD 反应的影响

图 6 优化体系在筛选引物中的应用

注:图 1、3、5 中 M 为 Marker DL5000,图 2、4、6 中 M 为 Marker DL1000。

3 结论与讨论

试验得出枸杞 RAPD 最佳反应体系为总体积 25 μL, Mg²⁺ (2.5 mM)、模板 (25 ng)、引物 (0.2 μM)、dNTPs (0.25 mM)和 Taq DNA 聚合酶 (2.0 U)、循环次数 40 个、退火温度 36℃。如图 6 所示 (其中 1 ~ 18 泳道为不同的引物),优化的体系在筛选引物的过程中能够得到很清晰的扩增图谱。该试验通过在其它反应条件不变的情况下对 RAPD 反应体系进行单因素的研究,从而逐渐筛选出反应因子的最佳用量,以达到确立最优体

系的目的。要使试验顺利进行,首先获得高纯度的模板 DNA 是试验成败的关键。模板 DNA 浓度轻微变化不影响扩增产物的带型,但扩增的强度略有不同,总体来说 DNA 浓度可允许在一定范围内变动^[3]。Taq DNA 聚合酶的浓度选择也是试验是否成功的关键因素之一,从经济的角度考虑,选择适合的 Taq DNA 聚合酶极为重要,在 Taq DNA 聚合酶浓度太高时则会引起非特异性扩增;Mg²⁺ 是 Taq DNA 聚合酶的激活剂,浓度过高或过低直接影响着试验的研究;同样反应程序也极为重要,

‘黄金冠’桃组织培养的初步研究

郭伟伟¹, 孟庆杰¹, 黄 勇¹, 王光全¹, 高菲娅²

(1. 聊城大学 生命科学院, 山东 聊城 252059; 2. 扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

摘 要: 分别以‘黄金冠’桃的未萌发芽、幼叶、幼茎为外植体, 研究了不同培养基对芽诱导和生根诱导的影响。结果表明: ‘黄金冠’黄桃的最佳基本培养基为 WPM 培养基, pH 6.0; 最佳生芽培养基为 WPM+NAA 0.1 mg/L+KT 2.5 mg/L, 蔗糖 30 g/L; 最佳生根培养基为 WPM+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.3 mg/L, 蔗糖 15 g/L。

关键词: ‘黄金冠’黄桃; 组织培养; 激素

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)19-0142-03

‘黄金冠’桃新品种是聊城大学生命科学学院从‘锦绣黄桃’自然杂交实生种中选出来的黄桃优系, 于 2006 年 9 月通过山东省科技厅组织的专家鉴定^[1]。‘黄金冠’

抗干旱, 耐瘠薄, 抗穿孔病强, 果肉黄色, 不溶质, 不褐变, 香气浓, 果实抗挤压耐贮存, 罐藏加工性能好^[2]。该品种自选育以来, 在山东、江苏等地已推广 1 400 hm², 产值 2 亿元以上^[1], 创造了较大的经济效益。但桃子的常规繁殖方法为嫁接, 繁殖系数较低, 而组织培养作为分子水平研究的基础技术, 可加快桃的育种进程, 筛选优良品种, 提高育种效率等。该试验通过筛选‘黄金冠’桃的多种外植体, 得到发芽率较高的最佳外植体, 进而筛选黄桃组织培养的最佳基本培养基、生芽培养基和生根培养基。

第一作者简介: 郭伟伟(1985-), 女, 山东聊城人, 在读硕士, 研究方向为资源植物与演化植物。E-mail: qdwwguo@126.com。

通讯作者: 王光全(1957-), 男, 本科, 教授, 研究方向为园艺植物种质资源。E-mail: wgq@lcu.edu.cn。

基金项目: 山东省“十一五”农业科技成果转化基金和山东省科技攻关资助项目(2009GG10009031); 聊城大学重点科研基金资助项目(X071006)。

收稿日期: 2010-06-10

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℃, Williams 等^[4]认为 40℃以上的复性温度会使引物和模板结合不上而抑制 RAPD 扩增。引物、dNTPs 以及循环次数都是影响反应体系的关键, 各个反应因子都制约着 PCR 扩增结果。确立最佳 RAPD 反应体系才能更准确更稳定的用于枸杞相关的遗传分析研究。

参考文献

- [1] McClendon T. Nitrogen and phosphorus effects on secondary succession dynamic on a semiarid sagebrush site [J]. Ecology, 1991, 72(6): 2016-2024.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 彭建营, 宋怀瑞, 孙仲序, 等. 中国枣种质资源的 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 2000, 27(3): 171-176.
- [4] 白莹莹, 魏松红, 刘大旻, 等. 辽宁省草坪杂草调查初报 [J]. 杂草科学, 2007(2): 38-39.

The Optimization of RAPD Reaction System in *Lycium barbarum* L.

REN Xian, ZHANG Lei, LUO Cai-jie, MA Yan-tao, ZHANG Peng

(College of Life Science and Engineering, The North University for Ethnic, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking the genomic DNA of *Lycium barbarum* L. as template, we optimized and establish the best RAPD reaction system of *Lycium barbarum* L. The result showed that in the system of 25 μL amplification, the best result of RAPD amplification and clear DNA fingerprinting, concluding the reaction condition of 2.5 mmol/L Mg²⁺, 25 ng template DNA, 0.6 μM primer, 0.25 mmol/L dNTPs and 2 U *Taq* DNA polymerase.

Key words: *Lycium barbarum* L.; optimization system; RAPD