

应用正交设计优化江南牡丹 RAPD-PCR 反应体系

范庆君¹, 吕 慧¹, 范义荣¹, 郑彦伟²

(1. 浙江农林大学 园林学院, 浙江 临安 311300 2 上虞市公路管理段 浙江 上虞 312300)

摘 要:以牡丹品种“云芳”基因组 DNA 为模板,采用正交实验设计 $L_{25}(5^5)$ 对影响牡丹 RAPD-PCR 反应的 5 因素 (模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq 酶)在 5 个水平上进行优化试验。结果表明:最佳的 RAPD-PCR 的反应体系为:20 μ L 体系中含有 25 ng 的模板 DNA,0.2 μ mol/L 的引物, Mg^{2+} 1.0 mmol/L,1 \times buffer 反应缓冲液,dNTPs 各为 0.2 mmol/L,1.0 U 的 TaqDNA 聚合酶。

关键词:正交设计;牡丹;RAPD-PCR;反应体系

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)05-0185-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属亚灌木,别名“富贵花”、“百两金”。花朵雍容华贵,富丽端庄,是中国的传统名花。自古以来,牡丹就被尊为“国色天香”、“花中之王”,深受全国各族人民的喜爱。近年来,随着分子标记技术的发展,分子标记也被广泛应用在牡丹种和栽培品种的亲缘关系的研究、遗传多样性研究、指纹图谱构建、品种鉴定等方面^[1]。

RAPD(随机扩增多态性 DNA, Random Amplified Polymorphic DNA)是 20 世纪 90 年代在 PCR 基础上发展起来的分子标记技术,因其具有简便、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 的序列、无需探针标记和杂交等特点,已在植物遗传多样性检测、亲缘关系、品种鉴定、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了较多的应用^[2-3]。我国牡丹种质资源丰富,但对牡丹的 RAPD 分子标记多集中于中原牡丹、西北牡丹等品种群的牡丹种或栽培品种,针对江南牡丹的 RAPD 分子标记尚未见报道。由于 RAPD 技术易受外界因素的影响,不同品种的试验材料 RAPD-PCR 反应体系不同,现以江南牡丹植物为试材,采用正交设计对影响江南牡丹 RAPD-PCR 反应的因素进行研究,以期建立江南牡丹最佳的 RAPD-PCR 的反应体系,为江南牡丹的 RAPD 分子标记奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介:范庆君(1988),男,在读硕士,研究方向为园林植物良种选育。
通讯作者:范义荣(1948),男,浙江天台人,教授,硕士生导师,研究方向为植物良种选育及园林植物应用。E-mail: yrfan@zjfc.edu.cn
收稿日期:2010-12-13

1.1.1 供试植物 试验于 2010 年 8~10 月在亚热带森林培育国家重点实验室培育基地进行。试材选用江南牡丹品种“云芳”(Yun fang’)、“玉楼”(Yu lou’)、“西施”(Xi shi’)、“黑楼紫”(Hei louzi’)、“昌红”(Chang hong’)、“呼红”(Hu hong’),采自浙江慈溪江南牡丹园人工繁育基地。在采样地每个品种选 3~5 株,摘取 3~5 片健康幼嫩叶片,用纱布擦去叶片污物和灰尘,迅速放入塑料自封袋中并置于装有冰块的采样盒中。然后带回实验室,放于-70℃超低温冰箱保存备用。

1.1.2 主要试剂与仪器 10 \times buffer、 Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs 购于上海博彩生物科技有限公司;标准分子量(Marker)DL2000、6 \times loading buffer 购自大连 TaKaRa 公司;经初步筛选的引物为 S191 即 (AGTCGGGTGG)由上海生工公司合成,作为此次正交实验的固定引物;PCR 反应在德国 Biometra 生产的 T-GRADIENT 型 PCR 循环仪上进行;DNA 纯度和含量的测定是在美国 NanoDrop 公司生产的 ND-1000 型分光光度计上进行;电泳仪、电泳槽以及凝胶成像系统由 Bio-Rad 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 模板 DNA 的制备与检测 采用改良 CTAB 法^[4-5]提取牡丹叶片 DNA,稍做改良。(1)由于试验是在 9 月份采集的牡丹叶片,其组织中含有较多的酚类和多糖等次生物质,所以增加了去除叶片中多糖的步骤。将 0.2 g 牡丹叶片放入预冷的研钵中,加入液氮研磨。牡丹叶片将粉末转入 1.5 mL 离心管中,并加入 1 mL 提取缓冲液(2% CTAB,2% PVP-K30,100 mL Tris-HCl(pH 8.0),25 mM EDTA,2.0 M NaCl),涡旋混匀,65℃冰浴保存 30 min,8 000 r/min 离心 10 min;(2)于沉淀中加入 1.0 mL 65℃预热的裂解缓冲液,涡旋混匀,65℃水浴 30 min (期间轻柔搅动 2~3 次,然后冷却至室温)后 12 000 r/min 离心 10 min(8 500 r/min,15 min),取上清;(3)加入等体

积的氯仿：异戊醇(24：1)，翻转混匀，12 000 r/min 离心 10 min，将上清转至离心管中；(4) 重复 3 步骤 1~3 次；(5)在上清液中加入 2/3 体积的异丙醇，轻缓颠倒混匀，室温静置 15 min，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，于沉淀中加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀 2 次，倒掉上清，通风干燥 20 min；(6) 然后将风干的 DNA 小团溶于 20~50 μ L TE 缓冲液(已加入适量的 RNase A)中，37℃保温 1 h(或室温过夜)后保存于-20℃冰箱中备用。DNA 检测采用凝胶自动成像系统和分光光度计测定 DNA 纯度和含量，A260/A280 于 1.8 左右为适，可用于试验分析，所得 DNA 浓度为(mg/L)=OD 值 A₂₆₀×50 稀释倍数^[9]。

1.2.2 扩增反应程序 对影响牡丹 RAPD-PCR 扩增的 *Taq* DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、引物的浓度等 5 个因素在 5 个水平上进行正交优化试验^[7](表 1)，3 次重复。采用 20 μ L PCR 反应体系，PCR 反应程序为：94℃预变性 4 min；94℃变性 1 min；38℃复性 90 s；72℃延伸 2 min；循环 45 次；然后 72℃延伸 7 min；最后置 4℃保存，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据分析

参照李雪峰等^[8]的方法，依据琼脂糖电泳条带的强弱及杂带的多少依次打分，然后利用统计分析软件 SPSS 系统对不同处理和评分结果进行方差分析。

表 1 RAPD-PCR 扩增体系正交设计 L₂₅(5⁵)

| 编号 | 引物 / μ mol·L ⁻¹ | 模板 DNA /ng | Mg ²⁺ /mmol·L ⁻¹ | dNTPs / μ mol·L ⁻¹ | <i>Taq</i> 酶 /U |
|----|-----------------------------------|---------------|---|--------------------------------------|--------------------|
| 1 | 0.2 | 25 | 1 | 0.2 | 1 |
| 2 | 0.2 | 50 | 2 | 0.4 | 2 |
| 3 | 0.2 | 75 | 3 | 0.6 | 3 |
| 4 | 0.2 | 100 | 4 | 0.8 | 4 |
| 5 | 0.2 | 125 | 5 | 1 | 5 |
| 6 | 0.4 | 25 | 2 | 0.6 | 4 |
| 7 | 0.4 | 50 | 3 | 0.8 | 5 |
| 8 | 0.4 | 75 | 4 | 1 | 1 |
| 9 | 0.4 | 100 | 5 | 0.2 | 2 |
| 10 | 0.4 | 125 | 1 | 0.4 | 3 |
| 11 | 0.6 | 25 | 3 | 1 | 2 |
| 12 | 0.6 | 50 | 4 | 0.2 | 3 |
| 13 | 0.6 | 75 | 5 | 0.4 | 4 |
| 14 | 0.6 | 100 | 1 | 0.6 | 5 |
| 15 | 0.6 | 125 | 2 | 0.8 | 1 |
| 16 | 0.8 | 25 | 4 | 0.4 | 5 |
| 17 | 0.8 | 50 | 5 | 0.6 | 1 |
| 18 | 0.8 | 75 | 1 | 0.8 | 2 |
| 19 | 0.8 | 100 | 2 | 1 | 3 |
| 20 | 0.8 | 125 | 3 | 0.2 | 4 |
| 21 | 1 | 25 | 5 | 0.8 | 3 |
| 22 | 1 | 50 | 1 | 1 | 4 |
| 23 | 1 | 75 | 2 | 0.2 | 5 |
| 24 | 1 | 100 | 3 | 0.4 | 1 |
| 25 | 1 | 125 | 4 | 0.6 | 2 |

2 结果与分析

2.1 PCR 正交实验结果直观分析

对 PCR 扩增结果进行电泳(图 1)，依据琼脂糖电泳条带的强弱及杂带的多少依次打分。扩增性强、清晰度高、背景低的最佳产物记为 20 分，与此相反，最差的记为 1 分，评分结果依次为：20, 19, 18, 17, 16, 17, 15, 8, 9, 17, 9, 6, 7, 16, 15, 6, 10, 12, 16, 1, 2, 3。从图 1 可看出，牡丹 RAPD-PCR 反应体系的最佳组合，即在 20 μ L 反应体系中，含 1×PCR buffer 2 μ L、MgCl₂ 1.0 mmol/L、dNTPs 0.2 μ mol/L、引物 0.2 μ mol/L、模板 DNA 25 ng、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。

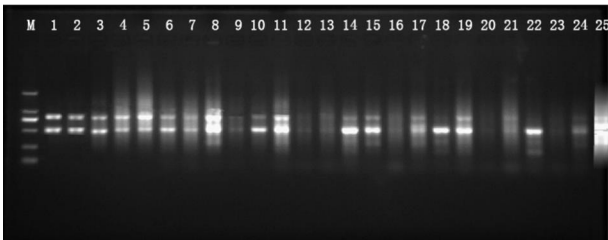


图 1 RAPD-PCR 反应体系正交实验设计结果
注：1-25 试验编号同表 1；M：标准分子量 DL2000。

2.2 PCR 正交实验结果方差分析

利用统计分析软件 SAS 系统对上述处理和评分结果进行方差分析，结果见表 2。由表 2 可知，引物浓度对反应结果影响最大，模板 DNA 浓度影响最小，各因素水平变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为：引物浓度、Mg²⁺、dNTPs、模板 DNA、*Taq* 酶。引物浓度、Mg²⁺ 2 个因素在不同水平间的差异达到了极显著水平，这与前人的研究结论基本相同^[9-12]。

表 2 正交实验结果方差分析

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 均方差 | F 值 | P |
|------------------|-----------|-----|---------|--------|-------|
| 模型 | 3 854.160 | 21 | 183.531 | 28.410 | 0.003 |
| 引物 | 563.440 | 4 | 140.860 | 21.805 | 0.006 |
| Mg ²⁺ | 202.640 | 4 | 50.660 | 7.842 | 0.035 |
| 模板 DNA | 27.840 | 4 | 6.960 | 1.077 | 0.472 |
| dNTPs | 94.240 | 4 | 23.560 | 3.647 | 0.119 |
| <i>Taq</i> 酶 | 6.640 | 4 | 1.660 | 0.257 | 0.892 |
| 误差 | 25.840 | 4 | 6.460 | | |
| 总计 | 3 880.000 | 25 | | | |

注：α=0.05。

2.3 最佳反应体系的验证

应用试验得出的最佳反应体系，采用引物 S191 对 5 份江南牡丹品种的模板 DNA 进行了 RAPD 扩增，结果如图 2。5 份样品 DNA 均能扩增出清晰可辨的 DNA 片段，说明该反应体系能够稳定可靠，能较好得应用于牡丹 RAPD-PCR 反应，可为牡丹 RAPD 分子标记提供试验基础。

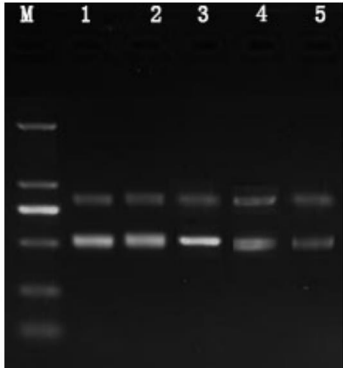


图 2 应用最佳反应体系对 5 份牡丹模板 RAPD 扩增结果
注: M: 标准分子量 DL2000 1. 玉楼; 2. 西施; 3. 黑楼紫; 4. 昌红; 5. 呼红。

3 结论与讨论

RAPD 技术易受外界因素的影响, 试验的重复性和稳定性较差, 其谱带对试验程序和条件的变化很敏感。该正交实验的结果也表明, 采用不同的体系组合水平其结果差异很大, 每个因素水平都会对其产生影响。因此, 在利用 RAPD 分子标记时, 为了保证结果的稳定性和可重复性, 必须建立一个稳定的反应体系。即便是同一反应体系还应注意尽可能地使用同一厂家的试剂和同一型号的 PCR 仪等设备, 以提高 RAPD 分析结果的重复性和可信度。另外, 采用正交实验设计的均衡分散、综合可比以及可伸缩、效用明确的特性^[15-20], 对影响 RAPD 反应条件的主要因素进行筛选, 可以避免单一因素试验结果的不足之处, 较快地找到最优的水平组合。因此, 对不同试验条件下的 PCR 反应体系进行优化, 正交实验设计是一种很好的方法。

该试验利用正交实验设计方法, 优化了江南牡丹 RAPD-PCR 反应体系。试验结果表明, 利用正交实验设计优化江南牡丹 RAPD-PCR 反应体系是一种有效、实用而且简便的方法, 能较好地识别 RAPD 反应体系中的关键影响因素, 并优化反应条件。最终确定江南牡丹 RAPD-PCR 优化反应体系为: 20 μ L 体系中含有 25 ng 的模板 DNA, 0.2 μ mol/L 的引物, Mg^{2+} 1.0 mmol/L, 1 \times buffer 反应缓冲液, dNTPs 各为 0.2 mmol/L, 1.0 U 的 Taq DNA 聚合酶。

参考文献

[1] 艾侠, 王莲英. 分子标记技术在牡丹研究中的应用[J]. 陕西农业科学, 2007(2): 85-87.
[2] Beebe S, SkrochPW, Tohme J, et al. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle american origin based on correspondence analysis of rapd[J]. Crop Science, 2000, 40: 264-273.
[3] Freitas H, Brehm A. Genetic diversity of the macaronesian leafy liverwort porella canariensis inferred from rapd markers[J]. Heredit, 2001, 92: 339-345.
[4] 宋国立, 崔荣露, 王坤坡. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA [J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 273-275.
[5] Clark M S. 植物分子生物学—实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉 译. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1998: 1-12.
[6] 高燕会, 朱玉球, 黄华宏, 等. 杨梅 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J]. 生物技术, 2006, 16(3): 55-56.
[7] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988: 65-79.
[8] 李雪峰, 张含国, 贯春雨, 等. 利用正交设计优化兴安落叶松 RAPD-PCR 反应体系[J]. 植物研究, 2009, 29(1): 80-85.
[9] 孙晋科, 罗淑萍, 李疆, 等. 巴旦杏 RAPD-PCR 反应体系的正交优化[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(5): 715-719.
[10] 侯大斌, 范理章, 邓国涛, 等. 正交设计在梨基因组 RAPD 优化体系中的应用[J]. 乐山师范学院学报, 2006, 21(12): 54-56.
[11] 刘素霞, 洪达, 高武军, 等. 石榴 RAPD 反应体系优化及亲缘关系研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(36): 11775-11777.
[12] 欧阳蒲, 苏应娟. 极度濒危植物猪血木 RAPD 反应体系的优化[J]. 吉首大学学报, 2007, 28(1): 95-97.
[13] 宋国华, 刘田福. 中国地鼠 RAPD 分析体系的优化[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2): 84-87.
[14] 沈程文, 罗军武, 刘春林. 茶树 RAPD 技术分析的优化[J]. 生命科学研究, 2002, 6(2): 179-182.
[15] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 79-130.
[16] 蔡从利, 王建波, 朱英国. 山羊草属二倍体物种亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 遗传, 2002, 23(3): 229.
[17] 何正文, 刘运生, 陈立华. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1988, 23(4): 403-404.
[18] 林萍, 张含国, 谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 34-38.
[19] 王家保, 王令霞, 刘志媛, 等. 芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 38-42.
[20] 姜同川. 正交试验设计[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1985: 1-71.

Optimization of the RAPD-PCR Reaction System of *Peaonia suffruticosa* by Orthogonal Design

FAN Qing-jun¹, LV Hui¹, FAN Yi-rong¹, ZHENG Yan-wei²

(1. Zhejiang Agricultural and Forestry University School of Landscape Architecture, Lin'an, Zhejiang 311300; 2. Highway Management Part of Shangyu City, Shangyu, Zhejiang 312300)

Abstract: Taking genomic DNA of *Peaonia species* 'Yunfang' as the template, optimization experiments on some important parameters affecting *Peaonia* RAPD-PCR amplification was conducted, to establish an optimum system suitable for *Peaonia* RAPD-PCR. L₂₅ (5⁵) orthogonal design was used to optimize RAPD amplification system of peony with five factors (DNA templet, primer, Mg^{2+} , dNTP, Taq polymerase) at five levels, respectively. The results showed that the deep analysis, a suitable RAPD-PCR reaction system was established, namely 20 μ L reaction system containing 25 ng DNA template, 0.2 μ mol/L primer, 1.0 mmol/L Mg^{2+} , 1 \times PCR buffer, 1.0 U Taq DNA polymerase, 0.2 mmol/L dNTP.

Key words: orthogonal design; *Peaonia suffruticosa*; RAPD-PCR; reaction system