

正交试验设计在建立杜鹃花 RAPD-PCR 反应体系中的应用

张 丽, 周兰英, 肖千文, 吴开志

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

摘 要: 利用正交试验对影响 RAPD-PCR 反应体系的各种因素进行研究, 从而建立适合杜鹃花 RAPD 反应的最佳反应体系, 最终选择杜鹃基因组 RAPD-PCR 的最佳扩增反应体系, 即模板 DNA 80ng、随机引物 0.5 μ mol/L、dNTPs 1.1mmol/L、MgCl₂ 2.5mmol/L、1.2 μ mol/L Tag 一DNA 聚合酶, buffer 2 μ L, 总反应体系 20 μ L。试验设计的 6 个因子、5 个水平中, Mg²⁺、dNTPs 和引物的浓度是主要因子, 其中 Mg²⁺ 的浓度对试验的影响最大, dNTPs 和引物浓度在较低的水平就可满足需要, 高浓度并没有显著提高试验效果。

关键词: 杜鹃花; RAPD-PCR; 正交试验设计

中图分类号: S 685.21; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0124-03

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术是近年来发展起来的一种 DNA 多态性检测技术, 它可在对物种从未进行过任何分子生物学研究的基础上开展 DNA 多态性分析, 具有检测效率高、简捷、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^[1-2]。但此项技术过于敏感, 反应体系的微小变化均可影响扩增结果, 如果把条件优化可获得好的试验结果。目前文献报道均采用单因素设计, 即对 RAPD-PCR 反应体系中的主要因素进行优化, 最后确定出最佳组合。不同物种的反应体系不尽相同, 主要体现在 PCR 反应体系中各组分的用量上。为了降低试验成本和弥补上述的不足, 试验利用正交试验对影响 RAPD 反应体系的各种因素进行研究, 以寻求一种经济、快速、可行的 RAPD-PCR 条件优化方法, 为应用 RAPD 技术对杜鹃花遗传多样性的研究奠定基础^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用杜鹃属植物分别采自中国科学院华西亚高山植物园以及四川西昌、昭觉、会理、德昌、宝兴、荃经、汉源、冕宁、马尔康等县。每种从 4 个单株分别采样后混合, 与硅胶密封于塑料袋中干燥, 在 4℃ 条件下保存。

提取试剂: Tris-HCl、NaCl、EDTA (乙二胺四乙酸)、SDS (十二烷基硫酸钠)、乙酸铵、CTAB (十六烷基三甲基溴化胺)、 β -巯基乙醇、0.3% PVP (聚乙烯吡咯烷酮)、KAc (醋酸钾)、氯仿-异戊醇 (24:1)、异丙醇、乙醇、TE (Tris-HCl、EDTA) 缓冲液。

扩增试剂: RAPD 随机引物 (由成都赛百盛公司生产)、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、10 \times PCR buffer、MgCl₂ (均由成都博瑞克公司提供)。

电泳试剂: 1 \times TBE (Tris-HCl、硼酸、EDTA) 缓冲液、琼脂糖、染料、溴酚蓝。

1.2 正交试验设计

试验设计 RAPD 反应体系为 20 μ L, 试验以 20ng/ μ L 的工作液为模板, 扩增引物为 SBS-19, 选择模板 DNA 量、Tag 酶量、镁离子、dNTPs、引物浓度和 buffer 缓冲液 6 个因素, 每个因素选择 5 个水平, 设计因素水平表 (见表 1) 和 L₁₆(5⁶) 的正交试验, 正交试验的因素和水平的处理组合见表 2。RAPD 反应在 Mastercycler gradient (eppendorf) 上进行, 扩增程序为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 1min, 36℃ 退火 39s, 72℃ 延伸 1min, 共 41 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳后在 BIO-RAD 凝胶分析系统上拍照分析。

表 1 各组分浓度水平

水平	buffer (10 \times)	MgCl ₂ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Tag DNA 聚合酶 (U)	模板 (ng)	引物 (μ mol/L)
1	2	1	0.2	0.3	20	0.2
2	4	1.5	0.5	0.6	40	0.3
3	6	2	0.8	0.9	60	0.4
4	8	2.5	1.1	1.2	80	0.5
5	10	3	1.4	1.5	100	0.6

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系的优化结果

由图 1 可见, 不同的模板 DNA 量、Tag 酶量、镁离子、dNTPs、引物浓度和 buffer 扩增出的结果是不同的。除 1、3、4、5、6、8、10、14、15、18 组合有扩增谱带外, 其余均无扩增带, 其中 1、3、6、10、15、18 有扩增带, 但谱带少或模糊; 4、5、8、14 组合扩增带较多, 谱带清晰且均匀。

第一作者简介: 张丽 (1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种的研究。

通讯作者: 周兰英。

收稿日期: 2007-01-10

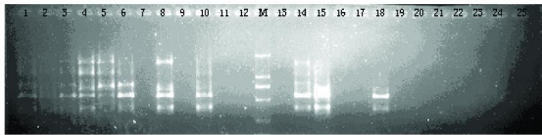


图 1 各组分浓度正交设计的电泳图

表 2 各组分浓度的 PCR 正交实验设计

水平	buffer (10×)	MgCl ₂ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Tag DNA 聚合酶 (U)	模板 (ng)	引物 (μmol/L)
1	2	1	0.2	0.3	20	0.2
2	2	1.5	0.5	0.6	40	0.3
3	2	2	0.8	0.9	60	0.4
4	2	2.5	1.1	1.2	80	0.5
5	2	3	1.4	1.5	100	0.6
6	4	1	0.5	0.9	80	0.6
7	4	1.5	0.8	1.2	100	0.2
8	4	2	1.1	1.5	20	0.3
9	4	2.5	1.4	0.3	40	0.4
10	4	3	0.2	0.6	60	0.5
11	6	1	0.8	1.5	40	0.5
12	6	1.5	1.1	0.3	60	0.6
13	6	2	1.4	0.6	80	0.2
14	6	2.5	0.2	0.9	100	0.3
15	6	3	0.5	1.2	20	0.4
16	8	1	1.1	0.6	100	0.4
17	8	1.5	1.4	0.9	20	0.5
18	8	2	0.2	1.2	40	0.6
19	8	2.5	0.5	1.5	60	0.2
20	8	3	0.8	0.3	80	0.3
21	10	1	1.4	1.2	60	0.3
22	10	1.5	0.2	1.5	80	0.4
23	10	2	0.5	0.3	100	0.5
24	10	2.5	0.8	0.6	20	0.6
25	10	3	1.1	0.9	40	0.2

2.2 正交试验结果分析

对各组分浓度搭配的正交试验结果进行了统计分析(见表 3)。

表 3 正交试验结果分析

	buffer	MgCl ₂	dNTPs	聚合酶 (U)	模板	引物
T ₁	12	3	10	1	8	1
T ₂	8	0	5	2	2	9
T ₃	8	8	2	9	4	5
T ₄	2	10	9	10	7	5
T ₅	0	9	4	8	9	8
X ₁	2.4	0.6	2	0.2	1.6	0.2
X ₂	1.6	0	1	0.4	0.4	1.8
X ₃	1.6	1.6	0.4	1.8	0.8	1.2
X ₄	0.4	2	1.8	2	1.4	1.2
X ₅	0	1.8	0.8	1.6	1.8	1.6
R	2.4	2	1.6	1.8	1.4	1.6

表 3 中, T 值代表某水平下某因子参与反应所产生的扩增条带的总和; X 为某因子在某水平参与反应所产生的扩增条带的平均值; R 为某因子的极差, 即某因子在不同水平下最大平均值与最小平均值之差 |X_{max} - X_{min}|。R 值的大小反应了该因子对试验结果影响的大小。从表中可以看出, buffer 的最适量为 2μL, 在试验范围内, 其余 5 个因子中以 Mg²⁺ 的浓度影响最大; 其次为 Tag DNA 聚合酶; dNTPs 和引物的浓度对试验的影响程度相当, 以模板 DNA 量对试验的影响最小。

从反应因子的组合上看, 扩增较好的 4、14 组合中 Mg²⁺ 的浓度均为 2.5mmol/L; 而无扩增带的 2、7、12、17、22 组合 Mg²⁺ 的浓度为 1.5mmol/L; 有扩增带但很少或

模糊的第 1、3、6、8 组合中 Mg²⁺ 的浓度分别为 1mmol/L、2mmol/L, 可见 Mg²⁺ 的浓度对试验影响极大。无扩增带或多或谱带极弱的组合, 它们的 dNTPs 浓度为 0.2mmol/L、0.5mmol/L、0.8mmol/L, 而在这些组合中其它因子的浓度都较高, 这表明 dNTPs 的浓度偏低, 影响了扩增。在 7、13、19、25 组合中引物浓度为 0.2μmol/L, 而其它因子的浓度处于中、高水平, 两个组合均无扩增带, 这说明 0.2μmol/L 引物浓度偏低, 影响了扩增。从扩增较好的 4、5、14 组合看, Tag 酶的量分别为 1.2μmol/L、1.5μmol/L、0.9μmol/L, 说明 Tag 酶在 0.9μmol/L 时就能扩增达到实验要求。从扩增较好的 4、5、8 组合看, 模板 DNA 的量分别为 80ng、100ng、20ng, 说明模板 DNA 量的适用范围较广。由此可见, 就试验设计的 6 个因子、5 个水平而言, Mg²⁺、Tag 酶、dNTPs 和引物的浓度是主要因子, 其中 Mg²⁺ 的浓度对试验的影响最大, Tag 酶在较低的水平就可满足需要, 高浓度并没有显著提高试验效果。

3 结论

综合考虑试验的效果和成本, 最终选择第 4 组合为杜鹃基因组 RAPD-PCR 的最佳扩增反应体系, 即模板 DNA 80ng、随机引物 0.4μmol/L、dNTPs 1.1mmol/L、MgCl₂ 2.5mmol/L、1.2μmol/L Tag-DNA 聚合酶, 总反应体系 20μL。

试验中除 2、7、9、11、12、13、16、17、19、20、21、22、23、24、25 组合不能有效扩增外, 其余组合都得到不同效果的扩增, 说明 PCR 反应的各成分之间的浓度比例是一个动态过程, 反应体系中改变某成分的浓度时相应改变其它成分的浓度才能有效扩增, 正交试验得到多组有效组合, 有利于根据试剂情况选用不同组合。

在进行 RAPD 条件优化试验时, 如果按 PCR 条件依次优化的方法来优化 RAPD-PCR 各反应条件, 即在模板 DNA、Tag 酶、镁离子、dNTPs、引物和 buffer 缓冲液 6 种组分中, 逐一变化其中 1 种组分浓度而固定其余 5 种, 从中分析得到每一组分的最佳浓度, 最后组合为最佳反应体系。试验次数比较多、劳动量比较大, 试验利用正交设计只进行 25 次试验就得到了满意的结果, 大大简化了试验过程, 节约了经费和时间。

参考文献:

[1] 王建湘, 钟晓红. RAPD 技术在果树遗传育种中的应用[J]. 落叶果树, 2003(5): 24-28.
[2] 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.
[3] 陈国良, 王熙法, 庄镇泉, 等. 遗传算法及其应用[M]. 人民邮电出版社, 1999.
[4] Wen Xiaopeng, Deng Xiuxin. Characterization of Genotypes and Genetic Relationship of Cili(Rosa roxburghii) and Its Relatives Using RAPD Markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(6): 605-611.
[5] A Comparative study of GA and orthogonal experimental design[M]. Hidetoshi Tanaka, IEEE 1997.

香石竹切花保鲜方法研究进展

焦晋川, 潘远智

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

摘要: 香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)是四大商品切花之一,对其保鲜技术的研究蕴涵着巨大的经济价值。现从化学方法和生物方法两个方面对近年来香石竹切花保鲜技术的研究成果做了系统的回顾和总结,并对其未来发展前景进行了展望。认为广泛的适用性、可靠的安全性和系统的控制性是未来保鲜技术的三大发展方向。

关键词: 香石竹;切花;衰老;保鲜

中图分类号: S 681.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0126-03

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.),又名康乃馨,是石竹科(*Caryophyllaceae*)多年生草本花卉,其观赏价值高,是四大商品切花之一,在切花生产、贸易和消费中占有重要地位^[1]。为了提高香石竹切花的观赏价值和经济效益,国内外学者对其保鲜方法进行了大量深入的研究^[2~3]。但是,目前大多数关于香石竹切花保鲜技术研究的实验处理方法都比较单一,往往局限于某一个方面,各种不同类型处理方法间的比较更是尚未见报道,这使得众多研究成果在市场生产应用过程中受到了一定的限制。为此,对近年来关于香石竹保鲜技术的研究成果进行总结回顾,旨在为香石竹切花保鲜技术的市场应用与未来发展提供一定的参考。

1 影响香石竹切花萎蔫的因素

切花在离开母体后就意味着开始走向衰老,这主要是由植物呼吸代谢和细胞成分水解这两个代谢决定

的^[4]。大量研究证明,乙烯在切花的衰老过程中起到非常重要的作用^[5]。朱建华^[6]认为,乙烯对香石竹作用非常明显,它作为成熟激素诱导并加速香石竹这种跃变型花的花朵开放,在呼吸跃变上升时,乙烯又自我催化并继续大量产生,进一步促进花朵开放至衰老,最后使花朵萎蔫。另有报道认为GA能够加速香石竹的开放,但保鲜效果不好^[7]。Woodson^[8]认为,在植物萎蔫过程中,蛋白质降解可能起着重要的作用,但姜微波^[9]研究显示,当乙烯处理花瓣使之发生不可逆转的衰老时,蛋白质降解水平并未发生显著变化,表明蛋白质降解在乙烯诱导花瓣衰老的起始过程中不是主导因素,由此认为蛋白质降解不是花瓣衰老过程的起动力因子,而是衰老过程中的继发事件。黄娇等^[10]对微生物与香石竹切花萎蔫的关系研究表明,切口的微生物感染是切花衰老的因素之一,导致其萎蔫的病原菌为植物棒形杆菌(*Clavibacter*)。由于香石竹品种繁多,不同环境条件下导致其萎蔫的因素更是多种多样。这些因素之间可能存在着某些相互促进或相互抑制的关系,弄清楚它们的关系以及其交互作用下对植物的影响仍是以后重要的研究方向。

2 化学物质对香石竹切花的保鲜

目前对香石竹切花保鲜方法的研究较多,早期的研

第一作者简介: 焦晋川(1984),男,现就读于四川农业大学,主要从事园林、生态方面的学习和研究,E-mail:jjd19841201@yahoo.com.cn.

通讯作者: 潘远智。

基金项目: 四川省教育厅基金项目(2005A002)。

收稿日期: 2006-12-12

Application of Orthogonal Design in Rhododendron RAPD Reaction System

ZHANG Li, ZHOU Lan-ying, XIAO Qian-wen, WU Kai-zhi

(College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014)

Abstract: Essential factors affecting the result of Rhododendron RAPD-PCR were studied with orthogonal design. And the optimal RAPD-PCR were built as follow: 80ng DNA template, 0.4 μ mol/L Random primer, 1.1mmol/L dNTPs, 2.5mmol/L MgCl₂ and 0.9 μ mol/L in 20 μ L reaction solution. By analyzing the 6 factors and 5 levels, the results showed that the concentration of Mg²⁺, dNTPs and Random primer were the main factors, the concentration of Mg²⁺ had the greatest effect on the experiment. Low concentration of dNTPs and random primer can reach the requirement.

Key words: Rhododendron; RAPD-PCR; Orthogonal design