

岩虱子 RAPD 反应体系的研究

田士林, 李 莉

(黄淮学院 农林科学系, 河南 驻马店 463000)

摘 要: 利用 RAPD(随机扩增多态 DNA)技术对濒危植物岩虱子进行了 RAPD 反应体系的研究。以岩虱子叶片为材料, 采用改良的 CTAB 法提取其基因组 DNA, 进行 RAPD 反应条件的优化试验。通过单因子试验分别研究了模板 DNA 用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶的用量和引物浓度对 RAPD 反应的影响, 建立了适于岩虱子 RAPD 分析的有效的稳定的反应体系, 即在 25 μ L 总反应体系中, 模板 DNA 的最适用量为 10 ng、 Mg^{2+} 的适宜浓度为 2.0 mmol/L、dNTPs 的适宜浓度 2.2 mmol/L、Taq 酶的用量以 1 U、随机引物的浓度以 2.5 μ mol/L 为佳。

关键词: 岩虱子; RAPD; DNA 提取; 优化

中图分类号: S 793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)08-0194-04

岩虱子 (*Euptelea pleiosperma*) 为昆栏树科 (Trochodendraceae) 领春木属 *Euptelea* Sieb. & Zucc., 学名: 多子领春木。系落叶灌木或小乔木。通过摸索岩虱子 RAPD-PCR 最适反应条件, 系统探讨反应条件对扩增结果的影响。利用 RAPD 技术对岩虱子的 RAPD-PCR 反应条件进行优化, 探讨扩增程序和反应条件对扩增结果的影响。为岩虱子的分类研究、品种鉴定、多样性保护、遗传图谱构建、基因定位, 进而为其种质资源的保存工作的开展提供技术保障和分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

岩虱子, 采自甘肃麦积山林区。

1.2 方法

用改良的 CTAB 法^[7,8] 提取岩虱子基因组。

1.2.1 引物的筛选 一般认为, 随机引物序列中 G+C 含量大于 60% 对 RAPD 形成有较好作用, 信号较强的带明显增加。试验所用的 100 条引物购自 BIOASIA 公司 (上海博亚生物技术有限公司), 从中筛选出与岩虱子基因组亲和力强, 条带清晰的 3 条引物分别为 BA0031 (CAATCGCCGT), BA0077 (TTCCCCCAG), BA0091 (TGCCCGTCGT)。

1.2.2 RAPD 反应体系的优化设计 RAPD 反应受多种因素的影响, 是一个比较复杂的生物化学反应, 反应体系中各组分的相互作用相当复杂, 各个组分的配比直接影响到试验结果, 因此欲使 RAPD 技术得到广泛应用, 需建立标准化的反应体系。在对珍稀濒危植物岩虱

子遗传多样性研究过程中, 为了使扩增产物产量高, 条带丰富, 对影响 RAPD 反应的主要因素进行了系统的研究, 以建立适合于岩虱子 RAPD 分析的可靠性和重复性好的反应体系, 以用于该种植物的遗传操作分析。RAPD 反应梯度设计见表, 每个梯度做了 2 个重复。

RAPD 反应系统优化设计表

项目	1	2	3	4	5	6
Template DNA/ng	0.5	5	10	20	40	60
MgCl ₂ /mmol · L ⁻¹ · μ L ⁻¹	0.5	1.0	2.0	2.2	2.6	3.5
dNTPs /mmol · L ⁻¹ · μ L ⁻¹	1.0	1.4	1.6	1.8	2.2	2.8
TaqDNA polymerase/U	0.5	1	1.5	2	2.5	3.8
Primer/ μ mol · L ⁻¹	0.5	1.0	1.5	2.5	3.5	4.5

1.2.3 RAPD 扩增产物的检测 取 25 μ L 扩增产物 10 μ L, 加入溴酚蓝, 混匀, 进行点样。在 1.5% 的琼脂糖凝胶上, 电压为 5 V/cm 的情况下电泳 1.5 h 取出凝胶放进 EB 溶液中染色 20 min, 然后通过凝胶成像系统拍下 RAPD 扩增图谱并保存在计算机硬盘中。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

用改良的 CTAB 法提取岩虱子基因组 DNA, 采用琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1, 岩虱子基因组 DNA 电泳得到的条带比较整齐, 清晰, 基本无降解, 完整性较好。说明所提取的 DNA 的质量和产量都较高。

2.2 模板 DNA 用量

模板 DNA 用量试验结果见图 2, 当模板量为 0.5 ~ 80 ng 时, 都有扩增带产生。但是 0.5 ~ 5 ng 只有 5 条带, 当模板量大于等于 10 ng 时产生 6 条带, 用量为 10 ng 时, 可以得到清晰条带, 因此模板用量为 10 ng 是合适的。

2.3 Mg^{2+} 浓度

Mg^{2+} 浓度试验结果见图 3, 当 Mg^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时没有扩增产物, Mg^{2+} 浓度大于 2.2 mmol/L

第一作者简介: 田士林 (1973-), 男, 河南西平县人, 讲师, 硕士, 主要从事园艺方面的教学与研究。E-mail: tian730513@163.com。

收稿日期: 2007-03-28

L 时, 虽有扩增出条带, 但很弱, 模糊不清; 当 Mg^{2+} 浓度为 1.0~2.0 mmol/L 时条带一致, 但相比较而言, Mg^{2+}

浓度为 2.0 mmol/L 时更加清晰, 并且条带跑的分开一些, 因此 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时是比较理想的。

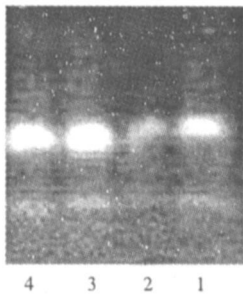


图 1 改良的 CTAB 法提取 DNA 图谱
注: 泳道 1~4 均为岩虱子总 DNA。

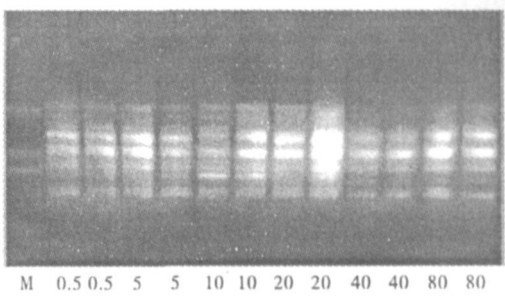


图 2 模板 DNA 用量对扩增结果的影响(引物 91)
注: 模板 DNA 用量分别为 0.5, 0.5, 5, 5, 10, 10, 20, 20, 40, 40, 80, 80 ng; M: D2000 DNA Ladder Marker.

2.4 dNTPs 浓度

dNTPs 浓度试验结果见图 4, 当 dNTPs 的浓度在 1.0~2.8 mmol/L 时, RAPD 反应都有扩增产物, 当 dNTPs 的浓度低于 2.2 mmol/L 时, 条带很弱, 个别条带模糊不清; 当 dNTPs 的浓度为 2.2 mmol/L 和

2.8 mmol/L, 扩增效果最佳, 有 5 条带, 并清晰可见。虽然浓度为 2.2 mmol/L 时条带亮度不及 2.8 mmol/L, 但是用于遗传多样性分析其清晰度已经足够, 考虑到节约 dNTPs 用量和它与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} , 因此优化的体系中选用 2.2 mmol/L。

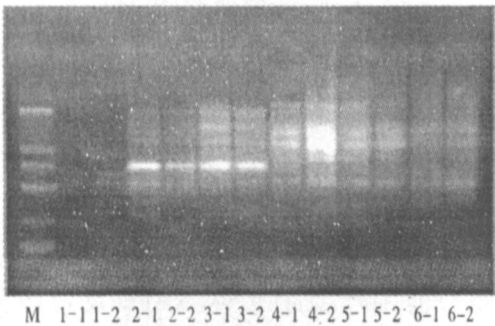


图 3 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响(引物 91)
注: 1~6 2 mg^{2+} 浓度分别为 0.5, 0.5, 1.0, 1.0, 2.0, 2.0, 2.2, 2.2, 2.6, 2.6, 3.5, 3.5 mmol/L; M: D2000 DNA Ladder Marker

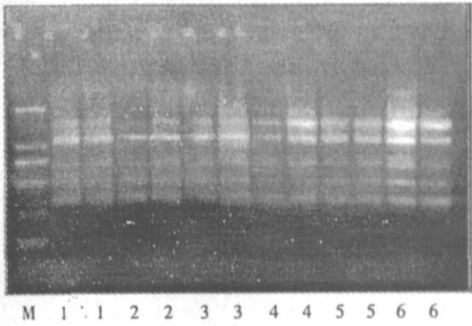


图 4 dNTPs 浓度对扩增结果的影响(引物 31)
注: 1~6 dNTPs 浓度分别为 1.0, 1.4, 1.6, 1.8, 2.2, 2.8 mmol/L; M: D2000 DNA Ladder Marker.

2.5 TaqDNA 聚合酶浓度

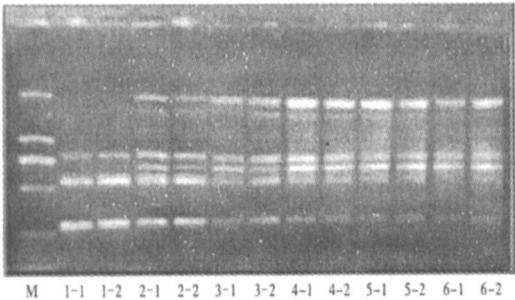


图 5 Taq 酶用量对扩增结果的影响(引物 77)
注: 1~6 2 Taq 酶用量分别为 0.5, 0.5, 1.0, 1.0, 1.5, 1.5, 2.0, 2.0, 3.8, 3.8, 3.8 U; M: D2000 DNA Ladder Marker.

TaqDNA 聚合酶浓度试验结果见图 5, TaqDNA 聚合酶用量为 0.5 U 时, 有的带扩不出来。当用量为 1.0 U 时, 扩出的 DNA 带型和强度都较好。当 Taq 聚合酶的用量大于 1.0 U 时, 条带比较一致, 但是渐渐变弱, 个别条带变得模糊不清。因此采用 1.0 U 的 Taq 聚合酶作为最优反应条件, 这样既取得了良好的扩增条带, 又节约了酶试剂。

2.6 引物浓度

引物浓度试验结果见图 6, 试验结果在试验范围内基本都能扩增出清晰且带型一致的图谱。0.5~2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 条带渐渐变强, 2.5~4.5 $\mu\text{mol/L}$ 时条带又渐渐变弱。但在引物浓度 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增的图谱最

佳条带丰富, 并且非常清晰, 故引物的最优浓度为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 。

3 结论与讨论

3.1 采用液氮提取 DNA

采用液氮并且加入适量(叶片质量的 1% ~ 6%)的 PVP 粉末快速研磨, 研磨后应立即加入提取液。这样既减少了植物叶子与空气接触的时间, 防止酚类物质被氧化变成棕褐色, 又防止了植物叶片受到伤害后活性增加的 DNase 降解 DNA, 保证了基因组的完整性。

3.2 选择幼叶作为 DNA 的提取材料

一般植物组织中的多糖及其他一些次生代谢产物, 如酚、脂、萜等, 会对 DNA 的提取造成很大的困难, 而且这些物质的含量随植物组织器官的生长而增加。因此, 在试验中选用幼叶作提取材料。

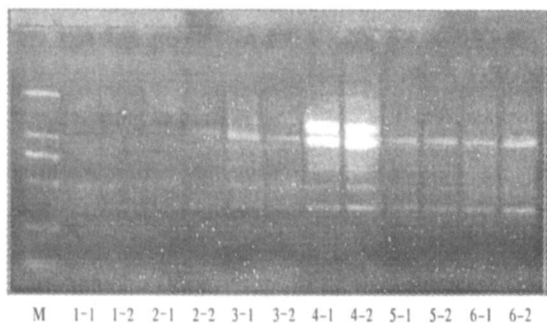


图 6 引物浓度对扩增结果的影响(引物 31)

注: 1-1 ~ 6-2 引物浓度分别为 0.5、0.5、1.0、1.0、1.5、1.5、2.5、2.5、3.5、3.5、4.5、4.5 $\mu\text{mol/L}$; M: D2000 DNA Ladder Marker。

3.3 模板 DNA 用量对 RAPD 反应的影响

模板 DNA 是制约 RAPD 扩增产量和特异性的一个主要因素。模板中残留的微量氯仿、SDS、CTAB、异丙醇以及一些多糖、小分子有机物等往往影响扩增产物, 因此, 在 DNA 模板不很纯的情况下, 可用有效范围内的最低极限, 使抑制 Taq 酶活性的因子的影响降到最小。因此在该反应体系中 DNA 模板最适用量为 10 ng。

3.4 Mg^{2+} 对 RAPD 反应影响

Mg^{2+} 的浓度对 RAPD-PCR 反应的特异性和扩增效果有着显著的影响, 在试验中, 岩虱子的 RAPD 反应, 在一定浓度范围内, 随着 Mg^{2+} 浓度的增高, 并不出现非特异性条带, 当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时, 可以得到很清晰的扩增条带, 而当 Mg^{2+} 浓度高于 2.0 mmol/L 时, 背景开始渐渐变得模糊起来。因此, Mg^{2+} 浓度最适浓度为 2.0 mmol/L。

3.5 dNTPs 对 RAPD 反应影响

dNTPs 浓度过高导致扩增产物的错误渗入率增加, 且与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} , 抑制酶的活性; 浓度过低, 在反

应过程中被过早的用尽, 使扩增的谱带数少, 产率低下, 甚至会因 dNTPs 过早消耗而使产物单链化, 从而影响扩增效果。试验发现 dNTPs 在 RAPD 反应浓度为 2.2 mmol/L 时, 取得了较理想的效果。

3.6 Taq 酶对 RAPD 反应影响

Taq DNA 聚合酶在 PCR 反应中的用量受到反应体积、酶的活性、酶的耐热性等因素的制约。在试验 6 种酶梯度中, 在用量为 0.5 U 时, 谱带少, 这可能由于 Taq 酶减少, 降低了引物与模板的结合能力, 导致 DNA 条带产量下降; 当用量为 1.0 U 时, 扩出的 DNA 带型和强度都较好。在试验的范围内, 随着用量增加, 没有出现非特异性条带, 反而个别条带变弱, 或者扩增不出来。

3.7 引物对 RAPD 反应影响

引物浓度的变化实质上是改变了引物与模板配对机率, 从而影响扩增效率。引物浓度过低, 模板量大, 引物与模板的结合机率降低, 有许多应该结合的位点未结合, 即使结合了的位点也未达到最佳的状态, 造成扩增产物的强带变弱或消失, 弱带模糊而不能反映扩增的真实情况; 引物浓度过高, 引物与模板非特异性配对, 出现非特异性扩增, 不稳定弱带增加。试验中发现, 引物终浓度 0.5 mmol/L 时, 条带微弱; 引物浓度在 0.5 ~ 2.5 mmol/L 时, 条带渐强。当引物终浓度为 2.5 mmol/L 时, 扩增效果最佳。试验范围内, 引物浓度大于 2.5 mmol/L 时, 未出现非特异扩增条带。

通过以上的试验, 岩虱子优化的反应体系为: 25 μL 反应体系中, 含模板 DNA 10 ng, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, 引物浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 浓度为 2.2 mmol/L, Taq 聚合酶 1U。总的来说, RAPD 反应条件严格, Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 及等因素均能影响扩增结果, 已有的 RAPD 反应体系不能适合所有的物种。在试验中 Mg^{2+} 与 dNTP 对扩增反应影响最显著, 尤其是 Mg^{2+} 浓度稍微变化就会影响扩增效果, 有的条带变弱, 甚至整个泳道的条带模糊。

参考文献

- [1] 关克俭. 中国植物志[M]. 北京: 科学技术出版社, 1979.
- [2] 杨得坡, 张晋豫, 张铭哲, 等. 珍稀濒危保护植物领春木(*Euptelea pleiosperm* $\mu\text{mol/L}$) 的生态调查研究[J]. 河南科学, 1999, 17(2): 174-177.
- [3] 朱升起, 颜立红. 珍稀濒危植物领春木群落调查初报[J]. 湖南林业科技, 1997, 24(2): 67-69.
- [4] 李红芳, 任毅. 领春木茎次生木质部中导管穿孔板的变异[J]. 植物分类学报, 2005, 43(1): 1-11.
- [5] 田先华, 李红芳, 庞承义, 等. 领春木(领春木科) 导管穿孔板中纹孔膜残余的观察[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1345-1349.
- [6] 邢世海, 陈娜. 珍稀濒危植物领春木愈伤组织的培养[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(1): 69-71.
- [7] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东, 等. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16-17, 39.

目前, 关于刺槐的组织培养^[1]及影响培养的因素^[2]已有报道 特别是关于饲料型四倍体刺槐的组织培养技术研究较多^[3-5]。在研究中, 主要针对宁夏暖泉农场从东北引进栽植的绿化刺槐进行了研究, 观察发现在栽植的 50 多棵树中, 其中有 3 棵变异株 在 6 a 生长时间中树高达 10 m 以上, 树径达 15 cm, 达到速生树种的要求^[6]。因此, 对 3 种变异株的植物组织培养技术进行了研究 利用刺槐变异的特殊株 即生长速度快, 树干笔直无刺、高大粗壮, 树枝分叉多, 叉上刺密, 无种子(28 号)或种子极少(24、34 号)等特点, 进行组织培养快速繁殖, 以便保持变异株的特征特性, 为生产提供优良的速生树种种苗, 并为大规模工厂化育苗提供科学的理论配方。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 从宁夏暖泉农场的刺槐林中, 选择树干高大、粗壮、无病虫害、树干上无刺, 而且树枝分叉多、刺密、种子极少或无种子、生长速度快的特殊变异种, 于 2003 年 5 月上旬取实际栽植顺序为第 24 棵、第 28 棵、第 34 棵的嫩芽作为接种材料共 3 株, 分别编为

第一作者简介: 曹君迈(1964-), 女, 现就职于西北第二民族学院生命科学系, 主要从事细胞工程教学与科研工作, 发表论文 20 余篇。E-mail: junmaicao@163.com。

基金项目: 国家林业局 948 资助项目(2004-4-10)。

收稿日期: 2007-03-19

绿化刺槐突变株的离体组织培养

曹君迈¹, 陈彦云², 高艳明

(1. 西北第二民族学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 宁夏 银川 750021)

摘 要: 对刺槐的 3 种变异株进行了离体组织培养研究, 结果表明: MS+BA 1 mg/L+IBA 0.05 mg/L+sugar 30 g/L 均适合 3 个变异品种刺槐芽分化, 其分化率为 93.3%~100%, 且理想的增殖培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+IBA 0.05 mg/L+KT 0.5 mg/L+sugar 30 g/L, 繁殖系数为 4.5~8.02, 最适的生根培养基为 1/2MS+IAA 0.05 mg/L+sugar 30 g/L+0.1%活性炭, 生根率为 100%; 练苗成活率 49.5%~72%, 其中 28 号变异株表现优良, 有利于组培快繁。

关键词: 刺槐变异株; 离体培养

中图分类号: S 792.27 文献标识码: A

文章编号: 1001-0009(2007)08-0197-02

24 号、28 号和 34 号。

1.1.2 试剂 试验试剂均为分析纯。BA 购于 Zewland, 其余为上海植生所生产。

1.1.3 培养基 诱导分化培养基为 4 种: 即: 1. MS+BA 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+sugar 30 g/L; 2. MS+BA 2 mg/L+IBA 0.5 mg/L+sugar 30 g/L; 3. MS+BA 1 mg/L+IBA 0.05 mg/L+sugar 30 g/L; 4. MS+BA 0.5 mg/L+IBA 0.05 mg/L+sugar 30 g/L。增殖培养基为 2 种: 即: 5. MS+BA 1 mg/L+IBA 0.05 mg/L+sugar 30 g/L; 6. MS+BA 1 mg/L+IBA 0.05 mg/L+KT 0.5 mg/L+sugar 30 g/L。

1.2 方法

把取回的嫩芽及时用洗洁精漂洗一遍, 在自来水下冲洗至无泡沫, 然后将外植体带入接种室, 把嫩芽夹

[8] 曲士松, 刘宪华, 黄宝勇 等. CTAB 法提取大蒜、白菜基因组 DNA

[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000 31(4): 427-429.

Research on RAPD Reaction System of *Euptelea pleiosperma* Hook. f. &Thoms

TIAN Shi-lin, LI Li

(College of Agriculture and Forestry Sciences, Institute of Huanghua; Henan 463000, China)

Abstract: RAPD technology was first employed to study the rare and endangered plant *Euptelea pleiosperma* Hook. f. &Thoms. In this experiment, modified CTAB methods were used to extract DNA from the leaves of *Euptelea pleiosperma* Hook. f. &Thoms to optimize RAPD reaction system. An efficient and stable RAPD reaction system was established through the investment of factors of: template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, Taq DNA polymerase and primers which will influence the results of RAPD. The results showed that the optimized RAPD reaction conditions were 10ng template DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 2.2 mmol/L dNTPs, 1 unit Taq polymerase and 2.5 μ mol/Lol/L primer in a total of 25 μ l reaction mixture.

Key words: *Euptelea pleiosperma* Hook. f. &Thoms; RAPD; DNA extraction; Optimization