

三叶草 RAPD 反应条件的优选^{*}

韩微波¹, 唐凤兰¹, 张月学¹, 张弘强¹, 姜艳喜¹, 李道明¹, 刘杰淋¹, 蒿若超¹,

白 晶², 李集临², 徐香玲², 杨冬鹤²

(1. 黑龙江省农科院作物育种所, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080)

摘要: 以红三叶(*Trifolium pretense* L.)、白三叶(*Trifolium repens* L.) 和杂三叶(*Trifolium Hybridum* L.) 三种三叶草为材料, 对 RAPD 反应条件中的 dNTP 浓度、随机引物浓度、模板 DNA 用量、Taq DNA 聚合酶用量、退火温度以及预变性时间分别进行梯度试验。结果表明, 该反应体系体积为 25 μ L; ddH₂O, 19.1 μ L; 10 \times Buffer, 2.5 μ L; Primer, 200 nM; dNTP, 200 μ M; Taq DNA 聚合酶, 1U; Template DNA 1ng/ μ L。通过试验建立了一套稳定的 RAPD 反应体系, 该反应体系扩增效果良好。

关键词: 苜蓿; RAPD; 扩增反应; 优化

中图分类号: S 541.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2006)01-0010-03

Optimalization of RAPD Reaction System for Clover

HAN Wei bo¹, TANG Feng lan¹, ZHANG Yue xue¹, ZHANG Hong qiang¹, JIANG Yan xi¹,

LI Dao ming¹, LIU Jie lin¹, HAO Ruo chao¹, BAI Jing², LI Ji lin², XU Xiang ling², YANG Dong he²

(1. Institute of crop breeding, Heilongjiang Academy of agricultural sciences, Harbin 150086; 2.

Biology department, Harbin Normal University, Harbin 150080)

Abstract: Three species of clover were used as the materials of extracting DNA in this experiment, they were *Trifolium pretense* L., *Trifolium repens* L. and *Trifolium Hybridum* L.. The experiment step to the concentration of dNTP, random primers, template DNA, Taq DNA polymerase, annealing temperature and preheat denaturalization time on RAPD were conducted. Then a stable reaction system of RAPD was set up. In the optimalization of RAPD system with totale volume of 25 μ L: ddH₂O, 19.1 μ L; 10 \times Buffer, 2.5 μ L; Primer, 200nM; dNTP, 200 μ M; Taq DNA E, 1U; Template DNA 1ng/ μ L. The effect of amplifying with the reaction system was the most optimal.

Key words: clover; RAPD; amplified reaction; optimalization

三叶草是优良的豆科牧草, 具有营养丰富、适应性强、适口性好等特点。随着近些年的频繁引种, 三叶草分布越来越广泛, 但对三叶草的研究目前还停留在形态学和细胞学的水平上, 这样给三叶草的种质划分、扩大栽培、育种等方面带来不便。随着分子生物学的发展, 特别是 RAPD 技术的应用, 为更深入研究其内在规律提供了有效的技术手段。RAPD 可以在一次反应中, 利用不同引物检测出基因组的

多个位点, 进而可以快速找到两组 DNA 样品间的多态性差异。RAPD 技术的优越性是所需 DNA 样品少; 不需要预先设计探针和对基因组进行测序; 不需要 Southern 杂交、银染等复杂步骤; 操作安全。但由于其结果稳定性较差, 因此, 必须对反应条件进行筛选优化, 以提高反应结果的稳定程度, 最大限度地降低其随机性。本实验以红三叶(*Trifolium pretense* L.)、白三叶(*Trifolium repens* L.) 和杂

* 收稿日期: 2005-10-19

第一作者简介: 韩微波(1979-), 男, 陕西兴平人, 硕士, 实习研究员, 主要从事牧草诱变突变与生物技术育种研究。

通讯作者: 唐凤兰, 女, 研究员, E-mail: nkypzk@163.com

三叶(*Trifolium Hybridum* L.) 三种三叶草为材料, 旨在建立一个稳定的 RADP 反应体系, 为后续实验结果的稳定性、可信性提供保证。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用材料为红三叶(*Trifolium pretense* L.)、白三叶(*Trifolium repens* L.) 和杂三叶(*Trifolium Hybridum* L.)。试验中所用的随机引物为 OPEROR 公司产品。三叶草均由黑龙江省农科院作物育种研究所牧草研究室提供。

1.2 试验仪器及药品

四种脱氧核苷酸(dNTP)、Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)、SE Perfect 1Kb DNA ladder(上海申能博彩生物科技有限公司), 低温冷冻离心机(BECKMAN ALLegra 21R, 美国); PCR 扩增仪(PTC-100, MJ Rearch, 美国); 电泳系统(1100-型, DYY-A 型, DYY-III型, 国产); 电泳槽(DYCP-34A 型)。

1.3 DNA 提取

随机取样, 剪取幼嫩叶片分装并标记好, 置于-80℃保存。用改进 CTAB 法提取三叶草的

DNA^[1,2]。提取的基因组用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 不降解、无杂质用于扩增。

1.4 RAPD 扩增反应

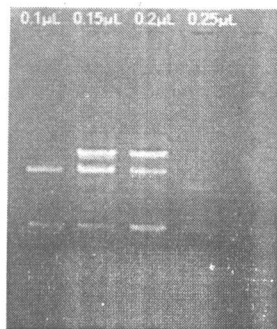
25 mM dNTP 分别设置 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μ L 进行比较筛选; Taq DNA 聚合酶分别设置 0.5, 1, 1.5, 2 U; 2.5 mMol/ μ L 引物分别加 1, 1.5, 2 μ L 进行扩增比较。热循环状态中, 预变性时间分别设置 0, 1, 2, 3, 4, 5 min; 变性时间设置 15, 30 s; 1 min; 退火温度分别为 35, 36, 37, 38, 39, 40℃。

2 结果与分析

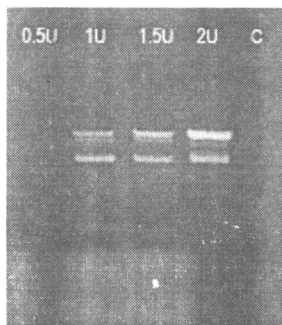
2.1 三叶草 RAPD 反应体系组成的优选

25 mM 的 dNTP 分别设置 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μ L 进行比较筛选(见图版 I-1), 其中 0.1 μ L 和 0.25 μ L 的 dNTP 扩增带形较弱, 且不丰富, 而 0.15 μ L 和 0.2 μ L 所扩增出的带形稳定, 可重复性好。可见, 在 0.15 ~ 0.2 μ L 的 dNTP 范围内对扩增影响不大, 但 0.2 μ L 的 dNTP 扩增出的谱带清晰些, 另外, 较高浓度的 dNTP 扩增产物稍多些, 利于图片分析, 同时, dNTP 浓度过高, 错误掺入率大大提高。所以 dNTP 确定为 0.2 μ L。

Taq DNA 聚合酶是影响反应的关键要素之一,



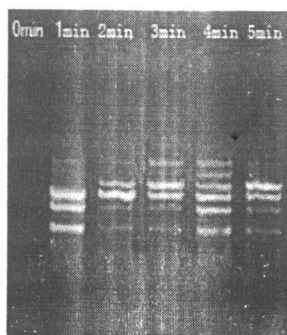
I-1 dNTP 浓度对反应条件的优化



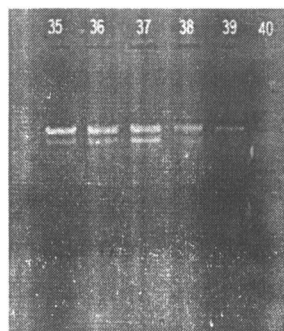
I-2 Taq 酶浓度对反应条件的优化



I-3 引物浓度对反应条件的优化



I-4 预变性时间对反应条件的优化



I-5 退火温度对反应条件的优化

图版 I RAPD 稳定的试验体系的建立

合理用量至关重要。分别设置 0.5, 1, 1.5, 2 U。0.5 U Taq DNA 聚合酶无扩增产物(见图版 I - 2), 1, 1.5, 2 U 用量扩增相似, 但 2 U 的 Taq DNA 聚合酶尽管主带很亮, 但小片断的带很弱。在正常反应条件下, 经 25~30 个扩增循环(即扩增倍数达到约 106)后, Taq DNA 聚合酶的用量便成为制约反应进行的因素, 加酶过量有可能导致非靶序列的扩增。1 U 和 1.5 U 扩增结果相同, 为了经济节省, 选用 1 U Tag DNA 聚合酶。

引物分别加 1, 1.5, 2 μ L 进行扩增比较(见图版 I - 3), 1 μ L 和 1.5 μ L 引物扩增产物带形不丰富, 可重复性差, 故引物的用量确定为 2 μ L。寡核苷酸引物这一浓度足以完成 30 个循环的扩增反应, 更高的浓度可能导致异位引导, 其结果是出现意外的非靶序列的扩增。反之, 如果引物浓度不足, 则 PCR 效率极低。

2.2 三叶草 RAPD 反应热循环状态的优选

预变性时间分别设置 0, 1, 2, 3, 4, 5 min(见图版 I - 4)。0 min 预变性时模板没有解链, 引物无法结合到模板上, 没有扩增带。预变性时间短, 模板没有充分解链, 引物无法完全结合到模板上, 则条带少或有减弱的趋势, 在 3min 时得到了丰富、清晰的条带。虽然 4 min 和 5 min 也有较好带形, 但 94℃预变性时间过长会影响 Taq DNA 聚合酶活力, 因此, 选用 3 min 预变性。

变性时间设置 15, 30 s 和 1 min。1 min 的变性

时间过长, 扩增效果不好, 仅有一条带。15 s 和 30 s 变性时间扩增带形清晰, 为节省时间, 变性时间确定为 15 s。

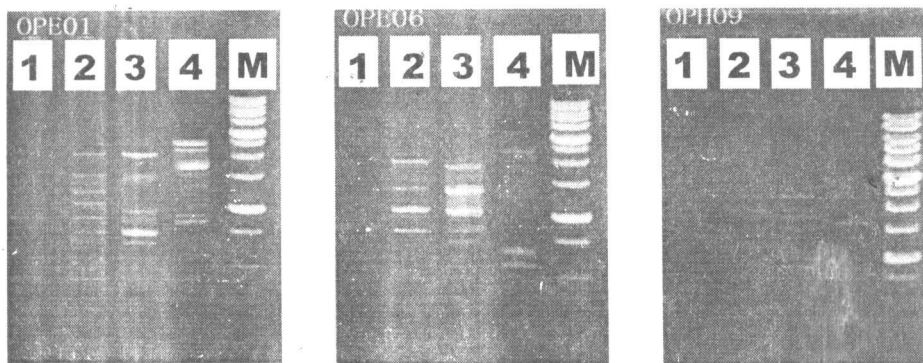
退火温度分别为 35, 36, 37, 38, 39, 40℃(见图版 I - 5)。温度高于或低于 36℃, 都不能得到满意的扩增结果, 一方面是无扩增产物或量少, 另一方面是非特异性产物多。因此采用 36℃的退火温度。

延伸温度一般设置为 72℃, 以利于 Taq DNA 聚合酶发挥其最佳活性。

2.3 优选的 RAPD 反应体系及扩增效果

经过优选最终确定 RAPD 反应体系: ddH₂O, 19.1 μ L; 10× Buffer, 2.5 μ L; Primer, 200 nM; dNTP, 200 μ M; Taq E, 1U; Template DNA 1ng/ μ L; 体系共 25 μ L。RAPD 反应程序: (1) 1cycle 预变性 94℃, 3 min; (2) 45cycle 变性 94℃, 15 s; 退火 36℃, 30 s; 延伸 72℃, 1 min; (3) 延伸 72℃, 10 min; 保存 4℃。

应用优选的体系和反应程序, 扩增得到的条带清洗, 多态性高(见图版 II)。OPE-01 扩增时, 虽然三种三叶草无单态性带, 但红三叶与白三叶有四条共有带, 而红三叶与杂三叶仅有一条共有带, 白三叶与杂三叶无共有带; OPE-06 扩增无单态性带, 红三叶与白三叶有三条共有带, 二者所有的扩增带与杂三叶的扩增带无一重复; OPH-09 扩增时, 红三叶与白三叶在 2 500~2 000 bp 之间有两条共有带, 二者所有的扩增带与杂三叶的扩增带无一重复。



图版 II 三叶草扩增图片

OPE01: Primer OPE01 扩增结果; OPE06: Primer OPE06 扩增结果; OPH09: Primer OPH09

扩增结果; 1: 空白对照; 2: 红三叶; 3: 白三叶; 4: 杂三叶; M: Marker

3 讨论

在 PCR 反应各组分稳定的情况下, 模板 DNA 的纯度对扩增的特异影响很大。资料显示, 在同为豆科牧草的苜蓿基因组 DNA 的 RAPD-PCR 反应

体系中, 模板浓度在一定范围内对扩增结果影响较小^[3], 模板 DNA 的纯度对扩增的特异性影响很大^[4], 模板 DNA 的用量宁可少, 但要纯些^[5]。汪小泉等^[6]认为模板 DNA 中的 RNA 对扩增结果无

亚麻种质资源的研究与利用^{*}

路 颖

(黑龙江省农科院经济作物研究所, 哈尔滨 150086)

摘要: 报道了亚麻种质资源的收集、保存、评价和创新利用现状, 讨论了亚麻种质资源繁种更新的关键技术和经验, 并对亚麻种质资源工作的发展提出了一些设想和建议。

关键词: 亚麻; 种质资源; 繁种更新; 创新; 利用

中图分类号: S 563. 202. 4 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 2767(2006)01 - 0013 - 03

Studies and Utilization on Germplasm Resource of Flax Germplasms

LU Ying

(Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: This paper summarized the status of collection, conservation, evaluation, enhancement and utilization of flax germplasms, the key techniques and experiences of regeneration of flax germplasm and discussed. It also discusses some ideas and constructive suggestions of creation of germplasm for flax in the future.

Key words: flax; germplasm; regeneration; enhancement; utilization

亚麻是世界上最古老的纤维作物之一。亚麻在我国有悠久的栽培历史, 是特色经济作物, 在五大麻

纺工业原料作物中效果最佳, 有“麻中皇后”之美誉, 产品出口创汇能力强, 农业经济效益比较高, 有较强

* 收稿日期: 2005 - 10 - 17

基金项目: 国家攻关项目(2001BA511B05)

作者简介: 路颖(1963 -), 女, 呼兰县人, 副研究员, 主要从事亚麻种质资源的研究

影响, 但本试验中加入 RNA 酶, 使三叶草基因组 DNA 纯些。本试验表明, 在使用同一供应商的试剂及相同的 PCR 扩增仪的前提下, 高质量 DNA 模板是保证 RAPD 反应稳定进行的必要条件。

为此, 本试验对三叶草 DNA 的提取选用了改良的 CTAB 法。提取 DNA 时, 容易残留蛋白质和酚, 而这两种物质容易干扰 RAPD 反应, 稳定性也会降低。本试验方法去除蛋白质是先用酚: 氯仿, 然后再用氯仿 - 异戊醇混合液(24 : 1)抽提。这一流程的原理是氯仿不仅对蛋白质具有变性作用, 且与水不相溶, 不会带走基因组 DNA^[7]。使用两种不同的有机溶剂去除蛋白质比用单一有机溶剂效果更好, 继而氯仿抽提则可去除残留的痕量酚。加入异戊醇能减少抽提过程中的气泡产生。各种提取液配制时, 严格控制 pH 值, 以保证一定的渗透压, 这样可保证细胞核基本保持完整, 防止基因组 DNA 降解^[8]。

参考文献:

- [1] JIANG Yan - xi, ZHANG Yue - xue, TANG Feng - lan, et al. . The Genetics Study of Alfalfa Irradiated in Magnetic Field Free Space[J]. china biotechnology, 2005, 25(增): 148 150.
- [2] LI Dao - ming, ZHANG Yue - xue, TANG Feng - lan, et al. . Study on the Genetic Diversity of Lfalfa Using RAPD. The Genetics Study of Alfalfa Irradiated in Magnetic Field Free Space[J]. china biotechnology, 2005, 25(增): 100 105.
- [3] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62 67.
- [4] 卢江. 随机放大多态性 DNA[J]. 植物学报, 1993, 35(增): 119 127.
- [5] 杨英军, 李学强. RAPD 的原理及其操作[J]. 洛阳农业高等专科学校学报, 1999, 19(3): 27 30.
- [6] 汪小泉, 邹喻苹, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 434 441.
- [7] 袁庆华, 桂枝, 张文淑. 苜蓿基因组 DNA 提取和 RAPD 反应条件优选[J]. 草地学报, 2001, 9(2): 99 105.
- [8] [美]J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著, 等. 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1999.