

亚麻 RAPD 的反应体系优化及引物筛选

黄文功

(黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 对亚麻 RAPD 反应条件进行了优化, 在 25 μ L 反应体系中, 含 10 \times Buffer, Mg^{2+} (1 mmol \cdot L $^{-1}$), Taq 酶 1 U, Genome DNA 50 ng, dNTP 0.25 mmol \cdot L $^{-1}$, RAPD primer 1.5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。同时利用 3 个有代表性的亚麻品种从 70 条引物中筛选出 12 条多态性好、重复性高的引物, 为亚麻的分子鉴定奠定了基础。

关键词: 亚麻; 基因组 DNA; RAPD 反应; 筛选

中图分类号: S563.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2009)02-0004-03

Optimizing the RAPD Reaction System of Flax and Screening Primers

HUANG Wen-gong

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

Abstract: This experiment optimized the RAPD reaction conditions of flax. During 25 μ L reaction system, it contained 10 \times Buffer, Mg^{2+} (1 mmol \cdot L $^{-1}$), Taq enzyme 1 U, Genome DNA 50 ng, dNTP 0.25 mmol \cdot L $^{-1}$ and RAPD primer 1.5 μ mol \cdot L $^{-1}$. The process of PCR were 94 $^{\circ}$ C predenatalizing for 4 min, 40 cycles (94 $^{\circ}$ C denatalizing for 40 s, 37 $^{\circ}$ C annealing for 1 min, 72 $^{\circ}$ C extending for 90 s), 72 $^{\circ}$ C extending for 10 min. Meanwhile the experiment used 3 typical flax varieties to screen 12 primers which had high level polymorphism and repeatability from 70 primers. This research made the foundation for the molecular identification of flax.

Key words: flax; genome DNA; RAPD reaction; screen

亚麻是优良的纺织和油料作物, 是我国重要的经济作物之一。作物种质资源的收集和鉴定是作物育种的基础性工作, 目前亚麻育种以品种间杂交为主, 亚麻资源传统的评价方法多偏重于形态、生化等方面, 受环境或人为因素影响大, 因此, 对亚麻种质资源的正确评价是育种的关键, 分子技术能直接从 DNA 水平上反映各材料间的遗传差异, 进而消除环境或人为因素造成的误差。RAPD 是 Williams 和 Welsh 领导的两个研究小组几乎同时独立发展起来的一种 DNA 技术^[1-2]。RAPD 技术能直接从 DNA 水平上反映各材料间的遗传差异, 是研究遗传多样性的有力工具。RAPD 技术具有简单、快速、安全的特点, 被广泛用于遗传图谱的构建、品种鉴定和遗传多样性的研究。

遗传丰富的种质资源是实现培育亚麻新品种育种目标的前提和基础。我国现已收集保存国内外亚麻资

源 4 000 多份, 通过本实验筛选出的引物并利用本研究优化的适宜亚麻 RAPD 的 PCR 条件, 能快速准确地鉴定这些资源的亲缘关系, 可以为建立亚麻核心种质库提供准确的分子依据, 还可以为我们从国外引进亚麻种质资源的入库和分类提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 Diane (法国)、FANY (荷兰)、黑亚 12 (中国) 均由黑龙江省农业科学院经济作物所提供。

1.1.2 酶与试剂 rTaq DNA 聚合酶、dNTP、100 bp ladder、琼脂糖等购于天根生化科技 (北京) 有限公司; DL2000 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 常规试剂均购于天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.1.3 PCR 引物 70 条 RAPD 引物购于上海生工。引物标号分别为: S1~S50, S61~S64, A1~A16, S 字母开头的网上可以查到序列, A1~A16 的序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 亚麻总 DNA 提取与检测 亚麻总 DNA 提取参照王关林、方宏筠的方法^[3]。分别取 0.2 g 4 个品种的叶片提取总 DNA, 提取的 DNA 分装贮于 -20 $^{\circ}$ C; 亚麻总 DNA 的浓度检测采用琼脂糖凝胶电泳法, 琼脂糖凝

收稿日期: 2008-05-27

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目; 黑龙江省农业科技创新工程青年基金项目

作者简介: 黄文功 (1980-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 研究实习员, 主要从事亚麻分子育种方面研究。Tel: 0451-8667743Q E-mail: huangwengong1736@yahoo.com.cn.

胶电泳方法参照萨姆布鲁克的方法^[4], 取 1 μL 所提取的各 Genome DNA 在 0.8% Agarose 上进行电泳, 和标准分子量 $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$ 比较, 进而检测所提取各 Genome DNA 的浓度和完整性。

表 1 引物 A1~A16 的序列

标号	序列	标号	序列	标号	序列
A1	GGGCACGCGA	A7	TAGACAGAGG	A13	CCGCCCACTG
A2	GAGTAAGCGG	A8	GAATGCGAGG	A14	CCCACACCAC
A3	CGCGAGCAC	A9	GGAAGGCTGT	A15	GGTTTGTTGG
A4	CGGTGGCGAA	A10	GGTCAGGGCT	A16	GGGTGTGTT
A5	GCCACGAGA	A11	GTAATGGGC		
A6	TCCCGAACCG	A12	CCGGTTCAG		

1.2.2 RAPD 反应条件 为确定最佳的 PCR 反应体系, 设置 4 个 Taq 酶浓度: 0.5、1、1.5、2 U; 4 个 dNTP 浓度: 0.2、0.25、0.3、0.35 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选用 A5 引物, 其浓度设 4 个: 0.5、1、1.5、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 退火温度设 3 个: 35、36、37 $^{\circ}\text{C}$ 。根据扩增结果, 选择出最佳的 PCR 反应体系。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 35、36、37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应优化

2.1.1 不同 Taq 酶浓度对扩增结果的影响 试验 Taq 酶浓度选用 0.5、1、1.5、2 U 共 4 个梯度, 从图 1 中可以看出 0.5 U 时仅扩增出一条带, 当增加到 1 U 时扩增效果较好, 因此确定 1 U 是最佳浓度。

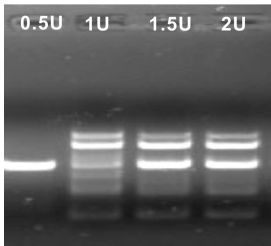


图 1 Taq 酶浓度对 PCR 反应的影响

2.1.2 不同 dNTP 浓度对扩增结果的影响 本试验 dNTP 浓度设了 4 个梯度分别为 0.2、0.25、0.3、0.35 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 图 2 中 dNTP 浓度为 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增条带少, 当 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增的条带数目多而且清晰, 当 dNTP 浓度为 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.35 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带数量又减少, 因此 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最佳浓度。

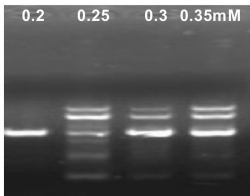


图 2 dNTP 浓度对 PCR 反应的影响

2.1.3 不同引物浓度对扩增结果的影响 本试验

引物浓度设 4 个梯度: 0.5、1、1.5、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 图 3 中显示 0.5 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增的条带不清晰, 1.5 和 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增的效果好, 但二者没有明显区别, 因此确定 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最佳浓度。

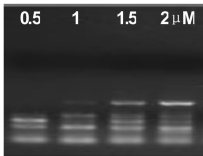


图 3 引物浓度对 PCR 反应的影响

2.1.4 不同退火温度对扩增结果的影响 从所设的 35、36、37 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度的三个梯度可看出 (见图 4), 37 $^{\circ}\text{C}$ 是最佳温度。

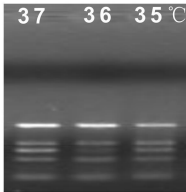


图 4 退火温度对 PCR 反应的影响

2.2 优化后亚麻最佳 RAPD 反应条件及 PCR 程序

通过 Mg^{2+} 浓度优化、dNTP 浓度优化、引物浓度优化、基因组 DNA 浓度优化、Taq 酶浓度优化, 最终确定如下优化后的 PCR 体系。优化出适宜亚麻 RAPD 的 PCR 反应体系 PCR 体系 (25 μL): 10 \times Buffer, Mg^{2+} (1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), dNTP (0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), primer (1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Genome DNA (50 ng), Taq1 U。优化出适宜亚麻 RAPD 的 PCR 程序通过退火温度梯度试验, 确定优化后的 PCR 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.3 筛选出适宜亚麻 RAPD 的引物

筛选出适宜亚麻 RAPD 的引物 12 条, 其序列见表 2。

表 2 筛选出的引物序列

标号	序列	标号	序列	标号	序列
S7	GGTGACGCAG	S28	GTGACGTAGG	A5	GCCACGGAGA
S10	CTGCTGGGAC	S43	GTCGCCGTCA	A10	GGTCAGGGCT
S21	CAGGCCCTTC	S48	GTGTGCCCCA	A13	CCGCCCACTG
S24	AATCGGGCTG	S61	TTGAGCCAG	A15	GTTTGGTGG

从 70 条引物中选取扩增结果较好的引物如图 5、图 6 和图 7, 综合 Diane、FANY、黑亚 12 三个品种为模板的结果, 70 条引物中有 12 条引物 (序列见表 2) 扩增出的条带清晰, 多态性好, 重复性好。

3 讨论

利用 RAPD 标记进行种质资源多样性分析的效果因不同作物、试验材料和所选引物而异。种质资源的遗传多样性研究不仅可以为新品种选育策

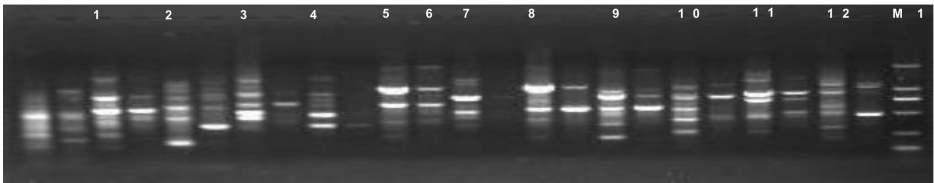


图5 Diane 为模板进行 PCR 所筛选引物

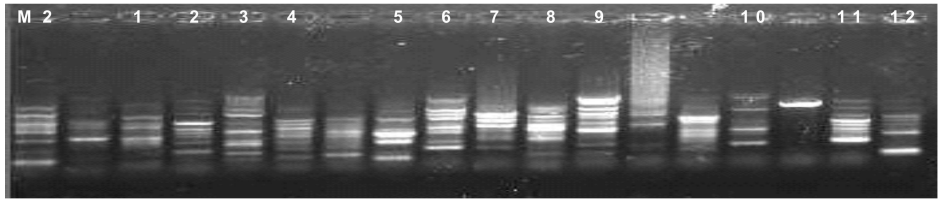


图6 FANY 为模板进行 PCR 所筛选引物

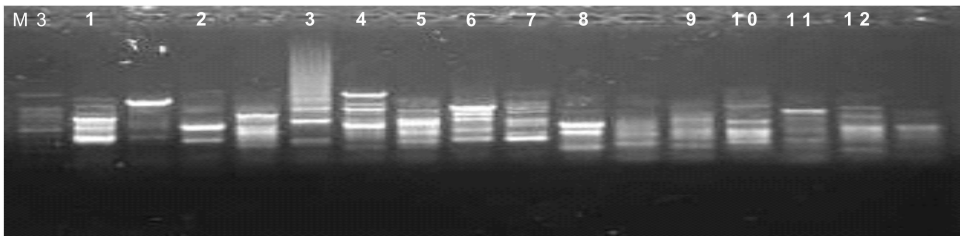


图7 黑亚 12 为模板进行 PCR 所筛选引物

略的制定提供依据,还可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性指导。

通过本研究优化的适宜亚麻 RAPD 的 PCR 体系和程序,并利用本研究筛选出的适宜亚麻 RAPD 的引物可以对亚麻种质资源进行分子鉴定,可以弥补传统方法的缺陷,能更快速更准确地鉴定亚麻种质资源的亲缘关系,更好地为亚麻育种和资源的保存提供依据。

参考文献:

[1] Williams J G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J] . Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.

[2] Welsh J, McClelland M. Genome fingerprinting using PCR with arbitrary primers[J] . Nucleic Acids Res, 1990, 8: 7213-7218.

[3] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M] .北京:科学出版社,1998:598-599.

[4] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M] .北京:科学出版社,2002.

中央一号文件 28 条推进农村改革发展之二

- 二、稳定发展农业生产
- 5.加大力度扶持粮食生产。稳定粮食播种面积,优化品种结构,提高单产水平,不断增强综合生产能力。
- 6.支持优势产区集中发展油料等经济作物生产。加快实施新一轮优势农产品区域布局规划。落实国家扶持油料生产的各项政策措施,加强东北和内蒙古优质大豆、长江流域“双低”油菜生产基地建设。
- 7.加快发展畜牧水产规模化标准化健康养殖。采取市场预警、储备调节、增加险种、期货交易等措施,稳定发展生猪产业。
- 8.严格农产品质量安全全程监控。抓紧出台食品安全法,制定和完善农产品质量安全法配套规章制度,健全部门分工合作的监管工作机制,进一步探索更有效的食品安全监管体制。
- 9.加强农产品进出口调控。健全高效灵活的农产品进出口调控机制,协调内外贸易,密切政府、协会、企业之间的沟通磋商。
- 三、强化现代农业物质支撑和服务体系
- 10.加快农业科技创新步伐。加大农业科技投入,多渠道筹集资金,建立农业科技创新基金,重点支持关键领域、重要产品、核心技术的科学研究。
- 11.加快高标准农田建设。大力推进土地整治,搞好规划,统筹安排土地整理复垦开发、农业综合开发等各类建设资金。
- 12.加强水利基础设施建设。加强大江大河和重点中小河流治理,建成一批大中型水利骨干工程。
- 13.加快推进农业机械化。启动农业机械化推进工程,重点加强示范基地、机耕道建设,提高农机推广服务和安全监理能力。
- 14.推进生态重点工程建设。巩固退耕还林成果,继续推进京津风沙源治理等重点工程,增加天然林保护投资。
- 15.加强农产品市场体系建设。加大力度支持重点产区和集散地农产品批发市场、集贸市场等流通基础设施建设。
- 16.推进基层农业公共服务机构建设。按照 3 年内在全国普遍健全乡镇或区域性农业技术推广、动植物疫病防控、农产品质量监管等公共服务机构的要求,尽快明确职责、健全队伍、完善机制、保障经费,切实增强服务能力。