

芫荽 RAPD 体系优化

李小梅^{1,2}, 栾杰¹, 张景涛^{1,2}, 张丽苗², 张立微², 董守坤¹

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:以芫荽基因组 DNA 为模板, 对 RAPD 扩增反应条件进行优化, 以期建立适合芫荽的 RAPD 的最优反应体系, 结果表明: PCR 扩增体系(总体积 20 μL)为: 模板 DNA 1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, dNTP 0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 随机引物 1.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Taq 酶 0.6 U, Mg^{2+} 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 退火温度 39 $^{\circ}\text{C}$, 循环次数 40。

关键词:芫荽; DNA; RAPD; 反应体系

中图分类号: S636.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)06-0009-05

芫荽又名香菜、胡荽、香荽, 学名为 *Coriandrum sativum* L., 英文名为 Coriander, 属伞形科一年或二年生的草本绿叶蔬菜, 原产地中海沿岸, 汉代经“丝绸之路”传入我国。根据考古学文献和

种间多样性观察, 芫荽是一种栽培植物, 有时视为一种杂草。关于芫荽最早的考古学文献是公元前 6000 年在以色列^[1]。芫荽在各地的文献都有记载, 埃及 3200BC, 南欧 1500BC, 印度 300BC, 中国 400AD, 中欧 100AD, 北欧是 1 400 a 后, 美国是 1 670 a 后^[2-4]。它虽非主菜, 却是人们日常生活中不可缺少的调味香料^[5], 是人类历史上用于调味食品上最古老的芳香蔬菜之一^[6-7], 中医以全草入药, 可治麻疹诱发不快, 食物积滞, 感冒风寒等症^[7-8]。

收稿日期: 2011-03-25

基金项目: 东北农业大学博士启动基金资助项目

第一作者简介: 李小梅(1982-), 女, 黑龙江省绥化市人, 硕士, 农艺师, 从事蔬菜育种研究。E-mail: xmlynn@yahoo.cn。

通讯作者: 张景涛(1963-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 研究员, 从事蔬菜育种研究。E-mail: chiillii@126.com。

Study on the Techniques of Tissue Culture and Rapid Propagation of Introduced Foreign Blueberry Varieties

Tsvetkov Yordan¹, ZHAO Yan-li², WANG Chun³, DONG Xuan⁴, YANG Fan¹

(1. Heilongjiang Center for Agricultural Scientific and Technological Cooperation between China and Russia, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Harbin Staff and Workers Medical College, Harbin, Heilongjiang 150020; 3. Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 4. Harbin Kerui Seed and Seedlings Biotechnology Research Institute, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Dormant shoot of introduced blueberry varieties of B91 and B92 from Bulgaria were used as experimental materials to carry out a study on techniques of budding and dissimilating of apical bud, stem apex and stem segments, regeneration and fast propagation of stem segments, rooting and transplanting of seedlings in test tube. The results showed that the pre-treatment on dormant shoot has significantly increased efficiency of inoculation; WPM+ZEA 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was a suitable medium for stem segment inoculation; WPM+ZEA 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was a fast propagation medium producing a large number of clusters; 1/2 WPM+IBA 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was the ideal medium for rooting. In the greenhouse peat, river sand and garden soil mixed at 1:1:1 ratio, and treated with sulphur powder after acid was a comparatively good substrate for transplantation of seedlings produced in test tube; Transplanted seedlings performed vigorous growth in the demonstrate orchard.

Key words: blueberry; tissue culture; fast propagation techniques

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 标记是由 Williams 等和 Welsh 等在 PCR 技术基础上发展起来的一种分子标记, 是一种运用随机引物扩增基因组寻找多态性 DNA 片段的技术, 该技术具备简单、快速、不需预先知道目的基因的碱基顺序, 仅需少量模板 DNA 就可获得丰富 DNA 多态性的优点。现已广泛应用于遗传多样性分析、物种进化、品种鉴定、分类等研究领域。目前芫荽的分子生物学研究尚未见报道, 为了更好地利用 RAPD 技术对芫荽进行聚类分析, 确定品种间亲缘关系, 进而为芫荽育种提供理论指导, 该试验在成功提取芫荽基因组 DNA 的情况下, 对其 RAPD 扩增反应条件进行了优化, 最终建立了适合于芫荽的 RAPD 最佳反应体系, 以为进一步的 RAPD 研究奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试验材料采自哈尔滨市农业科学院薛家试验基地, 将采取的叶片封存于液氮中带回实验室。

1.1.2 试验试剂 dNTP 购自天泽基因工程有限公司, Buffer (10×PCR Buffer)、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; RNaseA、DNAMarker DL 2000 购自宝生物公司; 随机引物购自上海生工; CTAB、EDTA、Tris、HCl、NaCl、PVP、β-巯基乙醇、无水乙醇、氯仿、异戊醇等均为国产分析纯试剂; 电泳仪及电泳槽均由北京六一厂生产。

1.2 方法

1.2.1 芫荽 DNA 提取方法 芫荽基因组 DNA 提取利用 CTAB 法, 将叶片于液氮中迅速研磨至粉状, 转入 1.5 mL 离心管, 加入 65℃ 预热的 CTAB 抽提缓冲液 600 μL, 65℃ 恒温水浴 1 h (每隔 10 min 摇荡 1 次)。取出待冷却至室温后加入 600 μL 氯仿: 异戊醇 (24:1), 轻摇至有机相为绿色, 静止 10 min。4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液转至 1.5 mL 新管, 加入 600 μL 氯仿: 异戊醇, 轻轻摇匀静止 10 min。4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液至事先预冷的无水乙醇中, 轻摇至有絮状沉淀, -20℃ 冰冻 30 min 后, 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 倒掉液体, 留下沉淀。加 80% 乙醇洗涤后将 DNA 吹干, 加入 300 μL 去离子水、1 μL RNase A 酶溶

液 (10 mg·mL⁻¹), 摇晃均匀于 37℃ 下温浴 1 h (每隔 10 min 摇荡 1 次)。取出后加入 600 μL 氯仿: 异戊醇, 颠倒均匀, 静置 10 min, 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清至事先预冷的无水乙醇中, 轻轻摇匀, -20℃ 中冰冻 30 min。取出后 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。弃上清, 用 80% 乙醇洗涤 DNA, 吹干后加入适量 TE 或去离子水溶解。4℃ 过夜使 DNA 溶解, 分装, 置于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 DNA 检测 (1) 用紫外分光光度仪 (DU640, Beckman) 测定 DNA 浓度, 检测 DNA 样品在 260、280 nm 的吸光值 (OD), 由此计算 DNA 的浓度, DNA 的浓度/ng·μL⁻¹ = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数, 纯度按 A₂₆₀/A₂₈₀ 值判断^[7]。(2) 凝胶电泳检测以 1% 琼脂糖凝胶 (1.00 g 琼脂糖、100 mL TAE 电泳缓冲液, 0.5 μL EB) 电泳检测 DNA 完整性, 电压 100 V, 电泳时间约 30 min, 在凝胶成像仪下拍照观察。

1.2.3 芫荽 RAPD-PCR 反应体系的建立 随机扩增多态 DNA 分析影响 RAPD 试验的因素众多, 且多对试验条件敏感, 在 RAPD 反应体系中, 各种试验参数都会影响到试验结果。但可以通过对试验条件的严格控制和试验操作流程的规范加以避免, 而影响 RAPD-PCR 扩增效果的反应体系则需通过试验进行探索来建立。该试验主要通过单因素试验法对模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Taq 酶用量及 Mg²⁺ 浓度 5 个主要影响因素进行了比较, 从而寻找适合芫荽 RAPD-PCR 扩增反应的最佳反应条件。

表 1 各因素水平设计

| 水平 | 模板浓度 /ng·μL ⁻¹ | 引物浓度 /μmol·L ⁻¹ | dNTP 浓度 /mmol·L ⁻¹ | Mg ²⁺ 浓度 /mmol·L ⁻¹ | Tag 酶用量/U |
|----|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|--------------|
| 1 | 0.5 | 1.0 | 0.25 | 1.0 | 0.2 |
| 2 | 0.8 | 1.3 | 0.35 | 1.5 | 0.4 |
| 3 | 1.0 | 1.6 | 0.45 | 2.0 | 0.6 |
| 4 | 1.5 | 2.0 | 0.60 | 2.5 | 0.8 |

PCR 反应总体积为 20 μL, 于 Eppendorf 基因扩增仪中进行扩增。采用普遍使用的循环体系进行各因素优化: 94℃ 预变性 4 min, 之后 38 个循环 (94℃ 30 s, 37℃ 30 s, 72℃ 90 s), 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 终止反应。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像分析仪上观察结果并照相。

退火温度及循环次数对 RAPD-PCR 扩增结果也很重要, 根据这些试验所获结果, 选取各因素最佳反应组合, 设置 10 个退火温度梯度及扩增循

环数进行单因素 RAPD 反应条件优化。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度检测结果

提取的 DNA 用紫外分光光度计进行检测,根据在 260 nm 和 280 nm 的读数比值可以估计核酸的纯度。经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 条带整齐清晰,无断裂和降解,所提取的样品 DNA 能够满足 RAPD 扩增的要求(见图 1)。

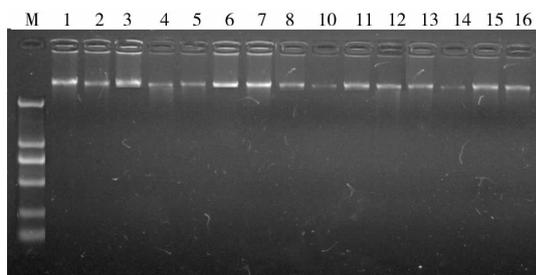


图 1 基因组 DNA 电泳

M:DL2000;1~16:所提取的芫荽叶片 DNA

2.2 RAPD 反应体系的优化

2.2.1 模板浓度优化 试验设计了 0.5、1.0、1.5 和 2.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度,结果表明:4 个浓度均有扩增产物,以 DNA 模板为 1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时的扩增效果最好,条带清晰、稳定。同时从图 2 中可以看出随着模板浓度的升高,扩增产物有弥散现象。因此,芫荽的 RAPD 反应体系中 DNA 模板最佳用量为 1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (见图 2)。

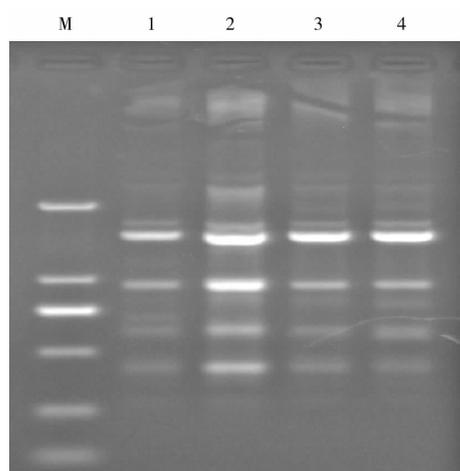


图 2 模板浓度对扩增结果的影响

M:DL2000;1:0.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;2:1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;
3:1.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;4:2.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

2.2.2 dNTP 浓度优化 dNTP 的浓度对 PCR 反应有较大影响。其浓度过高会降低扩增反应的准确率;浓度过低则会造成扩增产物率太低,从而

导致条带模糊。试验设计了 0.25、0.35、0.45 和 0.60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度。从图 3 可见,4 个浓度均有条带产生,但在 dNTP 浓度为 0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,扩增出来的条带比较清晰。因此,20 μL 的芫荽 RAPD 扩增反应体系中最佳 dNTP 浓度为 0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (见图 3)。

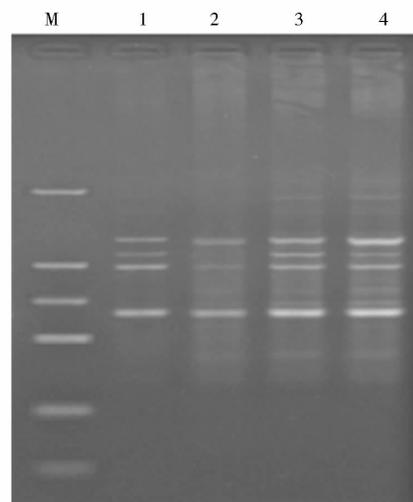


图 3 dNTP 浓度对扩增结果的影响

M:DL2000;1:0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;2:0.35 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;
3:0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;4:0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2.3 引物浓度优化 在 RAPD 反应中,引物浓度太低,会导致扩增反应无法进行;浓度太高,则会产生新的扩增条带。试验设计了 1.0、1.3、1.6 和 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度,结果表明,引物浓度为 1.3、1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时扩增出来的条带带型稳定、清楚,而随着引物浓度的升高,扩增出来的产物条带变弱。故芫荽的 RAPD 扩增反应体系

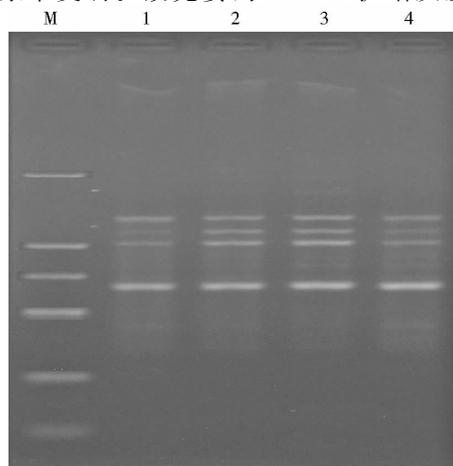


图 4 引物浓度对扩增结果的影响

M:DL2000;1:1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;2:1.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
3:1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;4:2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

中最佳随机引物浓度为 $1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (见图 4)。

2.2.4 Taq 酶用量优化 试验设计了 0.2、0.4、0.6 和 0.8 U 4 个浓度梯度,结果表明,浓度为 0.6、0.8 U 的 Taq 酶用量扩增效果较好,条带清晰、稳定。Taq 酶用量少,会影响扩增产物量;Taq 酶用量过多,可能会产生非特异性扩增。综合成本考虑,芫荽的 RAPD 扩增反应体系中最佳 Taq 酶用量为 0.6 U (见图 5)。

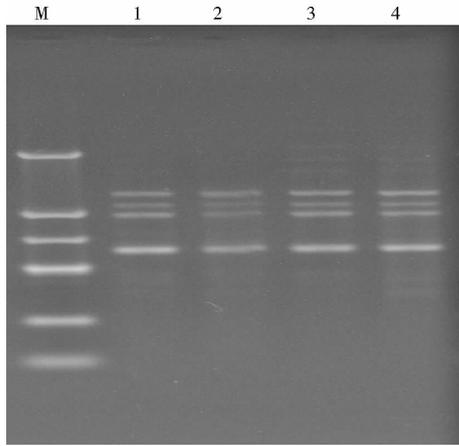


图 5 Taq 酶浓度对扩增的影响

M:DL2000;1:0.2 U;2:0.4 U;3:0.6 U;4:0.8 U

2.2.5 Mg^{2+} 浓度优化 试验设计了 1.0、1.5、2.0 和 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度,结果表明,当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时条带最为清晰; Mg^{2+} 浓度为 1.0、1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时扩增条带有些暗; Mg^{2+} 浓度为 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时扩增片段有弥散现象,因此芫荽 RAPD 扩增反应的最佳 Mg^{2+} 浓度为 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (见图 6)。

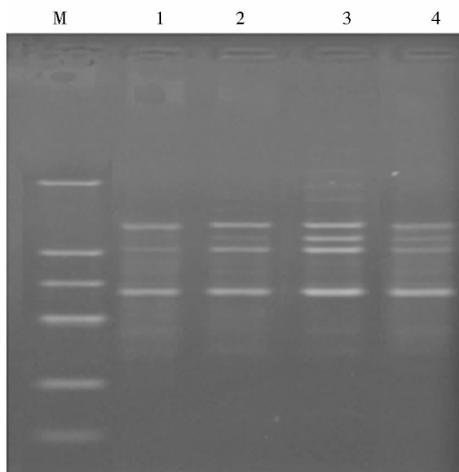


图 6 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响

M:DL2000;1:1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;2:1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;
3:2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;4:2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2.6 退火温度的优化 在 RAPD 扩增反应中,退火温度也是一个重要的影响因子,它具有一定的灵活性,是 RAPD 扩增反应的重要控制条件。在上述试验确定的各因子的最适条件下,对退火温度作单因子试验,设置了 10 个温度梯度,依次为:36、37、38、39、40、41、42、43、44、45 $^{\circ}\text{C}$ (见图 7),结果表明,30~41 $^{\circ}\text{C}$ 都有条带出现,39 $^{\circ}\text{C}$ 较为适宜,谱带清晰。

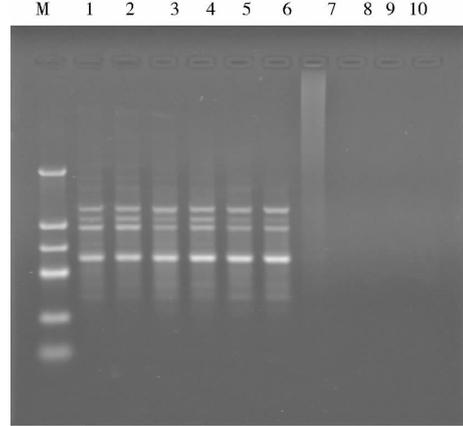


图 7 退火温度对扩增结果的影响

M:DL2000;1~10:36~45 $^{\circ}\text{C}$

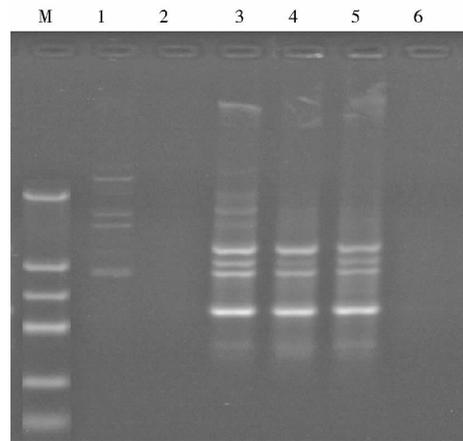


图 8 循环次数对扩增结果的影响

M:DL2000;1~6:30、34、36、38、40、44 次循环

2.2.7 循环次数对扩增结果的影响 RAPD 分析一般采用 35~45 个循环进行扩增,为了提高效率节省时间,需要摸索一个最佳循环数。该试验设循环次数为 30、34、36、38、40、44 次 6 个水平,试验结果表明,30~34 次扩增效果不太好,由于过少的循环次数,未能获得明显的扩增产物;36~40 次循环扩增条带的确认较容易,但 36 次扩增产物较多,谱带背景非常浓,非特异性扩增较为明显,因此试验确定循环数为 40 次 (见图 8)。

3 结论与讨论

通过各因素的优化试验,最终确定了芫荽 RAPD-PCR 扩增的最佳反应体系:20 μL PCR 反应体系中,模板 DNA 为 $1.0 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,dNTP 浓度为 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,随机引物浓度为 $1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,Taq 酶浓度为 0.6 U , Mg^{2+} 浓度为 $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过对退火温度及循环数的单因素试验,确定热循环参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,之后进行 40 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,39 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

RAPD 反应的结果受到很多因素影响。Smith 和 Caetano-Anolles 等发现,当 DNA 模板的最适浓度确定后,各种方法提取的 DNA 均能获得一致的扩增结果,模板中少量的蛋白质和 RNA 对扩增结果无影响,该试验也发现模板中一定量的蛋白质不影响扩增结果,模板降解程度不大。由此可见,RAPD 对模板 DNA 的质量要求不高。但是在 DNA 提取过程中应严格避免影响 Taq 酶活性的有机溶剂的残留,如酚、三氯甲烷等。

模板 DNA 的用量有一个适宜的变动范围,所以,制备模板 DNA 时,在开始就将其达到各样本之间浓度的统一,在正式 PCR 扩增之前,做 DNA 模板浓度梯度试验,以选取最佳的模板浓度。dNTP 是 RAPD 反应的原料,从试验可以看出,浓度太低会造成产物率过低,导致条带模糊;浓度过高易与 Mg^{2+} 结合降低游离 Mg^{2+} 浓度,从而影响 Taq 酶的活性。 Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂,可以说是一个重要影响因素^[9]。 Mg^{2+} 浓度过低时,酶活力显著降低;过高时扩增产物有弥散现象,背景模糊。Taq 酶的活性与用量关系到扩增能否正常进行,是 PCR 反应中最重要的因子。酶

用量过低,会导致无扩增产物或扩增产物少,但量过多会导致非特异性扩增产物含量增高,同时成本升高。在 RAPD-PCR 扩增反应体系中,引物与模板 DNA 的浓度比率是十分重要的,如果引物浓度太低,DNA 模板则不能被引物所饱和^[10],在琼脂糖凝胶上就会出现模糊的扩增带,因此只有确定引物与模板在体系中的最佳浓度才会得到重复性好的扩增产物。

总之,RAPD 反应中,各反应参数都是保持其稳定性的重要因素,只有反复摸索,建立最佳反应条件才能准确、稳定地反映不同模板的遗传差异,使结果更可信。

参考文献:

- [1] Zohary D, Hopf M. Domestication of plants in the old world [M]. Oxford. P. :Clarendon Press,1993.
- [2] Laufer B. Sino-Iranica. Field museum of natural history publication 201, anthropological series[J]. Blackstone Expedition,1919,15:3.
- [3] Schultze-Motel J. Literature on archaeological remains of cultivated plants[J]. Vegetation History and Botany,1993,4(1):51-66.
- [4] Sinskaja E N. Historical geography of cultivated plants(Russ.)[M]. Leningrad:Kolos,1969.
- [5] 郭红转,陆占国,李健. 芫荽的研究开发现状[J]. 食品研究与开发,2005,26(2):104-106.
- [6] 紫玉花. 美味良药话香菜[J]. 蔬菜,2002(1):40.
- [7] 唐庭栋. 大兴安岭药用资源[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,2001.
- [8] 李良松,刘懿,杨丽萍. 香药本草[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000.
- [9] 盛丽,王蒂,司怀军. 当归 RAPD 反应条件的优化[J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(5):591-595.
- [10] 冯薪硕,朴敬淑,吕龙石. 长白山林下参基因组 DNA 提取及 RAPD 体系的优化[J]. 延边大学学报,2009,31(1):16-20.

Optimization of RAPD Reaction Conditions for *Coriander sativum*

LI Xiao-mei^{1,2}, LUAN Jie¹, ZHANG Jing-tao^{1,2}, ZHANG Li-zhuo², ZHANG Li-wei², DONG Shou-kun¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: Taking the DNA of *Coriander sativum* as the template, the amplification system was optimized to set up the optimal reaction system. The results showed that the optimum conditions were as follows: 20 μL PCR reaction volume, $1.0 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ template DNA, $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primer, 0.6 U Taq DNA polymerase and $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 39 $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature and 40 cycles.

Key words: *Coriander sativum*; DNA; RAPD; reaction system