

白菜 RAPD 反应条件的优化

S634.103

Q75

张鲁刚¹, 王 鸣², 陈 杭³, 刘 玲³, Samuel S. M. Sun⁴

(1 西北农林科技大学蔬菜花卉研究所, 陕西杨陵 712100)

(2 西北农林科技大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

(3 国家蔬菜技术工程中心, 北京 100089)

(4 香港中文大学生物系, 香港新界)

[摘 要] 以芜菁、大白菜及其杂交 1 代为试材, 系统分析了 $MgCl_2$ 浓度、dNTP 浓度、随机引物浓度、模板 DNA 用量、Taq DNA 聚合酶浓度以及不同来源扩增缓冲液对 RAPD 反应的影响, 建立了一套稳定的 RAPD 反应体系。该体系反应体积为 20 μL , $MgCl_2$ 浓度为 1.5 mmol/L, dNTP 浓度为 200 $\mu mol/L$, 随机引物浓度为 0.4 $\mu mol/L$, 模板 DNA 为 20 ng, Taq DNA 聚合酶为 6.67 $\mu mol/(L \cdot min)$ 。在 8 种热循环条件下, 该体系具有稳定的重现性, 其扩增程序为: 94℃/1'→36℃/20"→72℃/10"预扩增 2 循环; 94℃/10"→36℃/15"→72℃/70"扩增 38 循环; 72℃/4' 延伸效果最好。

[关键词] 大白菜; RAPD; 反应条件; Taq DNA 聚合酶**[中图分类号]** S634.1**[文献标识码]** A

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是基于 PCR (Polymerase Chain Reaction) 的一种 DNA 分子标记。此方法自 Williams^[1] 创立以来, 已广泛地应用于生物多样性检测^[2~4]、基因定位^[5~7]、遗传作图^[8~10]、QTL 分析^[11~13]、外源基因跟踪^[14]及品种真实性检测^[15~17]等领域。但由于 RAPD 技术采用的引物比较短(通常为 10-核苷酸单链 DNA 分子), 退火温度比较低(常低于 45℃), 导致 RAPD 标记对反应条件比较敏感。因此在应用 RAPD 标记时, 对 RAPD 反应条件进行优化十分必要。本研究以芜菁、大白菜及其杂种的 DNA 为模板, 对 RAPD 反应的各种因素进行全面比较分析, 建立了稳定的 RAPD 反应体系。

1 材料与方法

1.1 材 料

欧洲芜菁 (*Brassica campestris* L. ssp. *rapifera* Metzg.)、中国大白菜 (*B. campestris* L. ssp. *penkinsis* (Lour) Olsson) 及其二者的杂交 1 代均由北京市蔬菜研究中心白菜组余阳俊先生提供。欧洲芜菁自交了 2 代, 中国大白菜 98-148 是自交 8 代以上的自交系, 它们代表了 *B. campestris* 的 2 个极端变种。

[收稿日期] 1999-06-24**[基金项目]** 高等学校博士学科专项科研基金资助项目(960701); 北京市蔬菜种质改良重点实验室资助项目**[作者简介]** 张鲁刚(1963-), 男, 副研究员, 博士

1.2 试剂和仪器

随机引物购自上海 Sangon 公司;dNTP 购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶购自中国科学院遗传研究所;100 bp DNA ladder 购自 GibcoBRL 公司。电泳仪为 Bio-RAD 500/200 型,电泳槽为北京六一仪器厂生产的 DYY-N 型电泳槽,PCR 仪为 PE9600 型。

1.3 基因组总 DNA 的提取

取白菜叶片 5 g,液氮研磨,倒入 50 mL 离心管中,同时加入 20 mL 预热 60℃的 CTAB 提取液(2 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.2 mL/L 巯基乙醇,20 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris-HCl)缓慢混匀,置于 60℃水浴中缓慢振荡 30~60 min。取出,待冷却至室温,加入 20 mL 的氯仿-异戊醇混合液(体积比为 24:1),缓慢来回颠倒 10 min,于 8 000 r/min,室温下离心 10 min。将上清液移入另一干净的离心管中,加入 15 mL 的冷异丙醇,慢慢混匀沉淀 DNA(或置 4℃过夜)。然后在 10 000 r/min,4℃下离心 30 min 沉淀 DNA。小心倒去上清液,在冰冻干燥器中冻干 DNA,加入 500 μ L TE 溶解,电泳检查 DNA 浓度、纯度。亲本、 F_1 的 DNA 分别编号为 Y11(芜菁)、Y12(F_1)、Y22(大白菜)。

1.4 试验设计

在保持其他因素一致的条件下,变化单一因子,筛选最优参数。热循环采用 8 号程序(见表 1)。反应体积为 20 μ L,扩增缓冲液为 G-2B,模板 DNA 为 20 ng,引物浓度用 0.4 μ mol/L,dNTP 浓度用 200 μ mol/L,MgCl₂ 浓度用 1.5 mmol/L。

表 1 8 种热循环的基本参数

编号	预变性(预扩增)	扩增	延伸
1	—	94℃/10"→36℃/15"→72℃/70",38C(Cycle)	—
2	91℃/1'→42℃/15"→72℃/70",2C	91℃/15"→42℃/15"→72℃/70",38C	72℃/4'
3	94℃/1'→37℃/10"→72℃/20",2C	94℃/2"→37℃/10"→72℃/70",38C	72℃/4'
4	95℃/3'30"	95℃/30"→35℃/30"→72℃/70",40C	—
5	94℃/2'→35℃/2'→72℃/2',3C	94℃/30"→35℃/30"→72℃/2',40C	94℃/30"→35℃/30"→72℃/10',1C
6	94℃/2'	94℃/10"→36℃/15"→72℃/70",38C	72℃/5'
7	94℃/10'→36℃/20"→72℃/10",5C	94℃/10"→36℃/15"→72℃/70",38C	72℃/4'
8	94℃/1'→36℃/20"→72℃/10",2C	94℃/10"→36℃/15"→72℃/70",38C	72℃/4'

MgCl₂ 浓度筛选 设置 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 mmol/L 6 个终浓度梯度。2 个引物为 E15,H12。2 个模板 DNA 为 Y11,Y22。

模板 DNA 用量筛选 模板 DNA 为 Y12,引物为 H12 和 H04。模板 DNA 处理为 2,20,100 和 200 ng。

dNTP 浓度筛选 随机引物为 H12,F15。模板 DNA 为 Y12(F_1)。dNTP 处理为 100,150,200,250 和 300 μ mol/L。

随机引物浓度筛选 模板 DNA 为 Y11,Y22。引物为 F15。随机引物处理为 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 和 1.0 μ mol/L。

Taq DNA 聚合酶浓度筛选 引物为 H09,H04,H12,F15。模板 DNA 为 Y11,Y12。Taq DNA 聚合酶处理为每反应 1.67,3.33,6.67,10.00,13.33 μ mol/(L·min)。

不同来源扩增缓冲液比较 引物为 H04,F15。模板 DNA 为 Y12,扩增缓冲液来源分

别为中国科学院遗传所(G-2B)、华美公司(SABC)、Promega 公司(Promega)、原平、同正和鼎国。

MgCl₂ 与 dNTP 互作对 PCR 反应的影响 用相同引物、相同模板,对 3 个 MgCl₂ 浓度(1, 2, 3 mmol/L)和 3 个 dNTP 浓度(100, 200, 300 μmol/L)随机组合 9 个处理的 RAPD 结果进行比较,分析两者间的互作效应。

反应体系的稳定性检查 用 2 个引物 G03 和 G04, 2 种模板 DNA Y11 和 Y22, 对优化的 RAPD 反应体系,在 8 种循环条件(表 1)下的扩增结果进行比较。同时分析了该反应体系对 MgCl₂ 浓度的敏感性。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增体系的单因子筛选分析

2.1.1 Mg²⁺ 浓度筛选 图 1 是以双亲(Y11, Y22)DNA 为模板,引物 E15 和 H12 在 6 种不同镁离子浓度下的 PCR 扩增结果。

可以看出 Mg²⁺ 浓度为 1.0 mmol/L 时,无 RAPD 扩增产物(泳道 1, 11, 14);在 1.0~3.0 mmol/L 时,随 Mg²⁺ 浓度增加, RAPD 产物增加(泳道 3, 5, 9 较泳道 2, 4, 8 增加)。Mg²⁺ 浓度在 3 mmol/L 以上时扩增产物基本不变(如泳道 9, 10)。并且不同模板下,引物同镁离子浓度表现不同的互作反应。模板 Y22 和引物 E15 的组合(4, 5, 6 泳道),随镁离子浓度提高扩增产物在逐渐增加。模板 Y11 和引物 H12 的组合(8, 9, 10 泳道),镁离子为 2.5 mmol/L(9 泳道)时扩增产物达最大。综合分析认为镁离子浓度为 1.5~2.0 mmol/L 时较为合适。

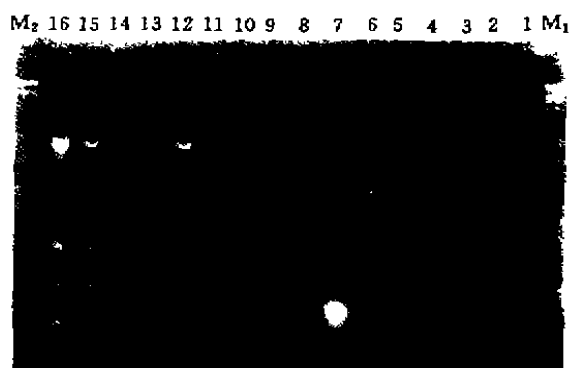


图 1 引物 E15 和 H12 在不同镁离子浓度下的 PCR 扩增结果

2.1.2 模板 DNA 用量试验 对同一引物 4 个不同量的 2 种模板 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明(图 2),在 2 ng 的模板 DNA 条件下扩增产物明显减少,100 ng 的模板 DNA 时扩增产物浓度增加,200 ng 的模板 DNA 时,扩增产物背景模糊。由此可见,20 ng 较为合适,在 100 ng 以内不影响扩增结果。

2.1.3 dNTP 浓度比较 同一模板,2 种引物(F15, H12),5 个 dNTP 浓度下的 PCR 反应(图 3)表明,在 100, 150 μmol/L 时,随 dNTP 浓度变小,扩增带明显减少。200 μmol/L 以下时,扩增产物丰富、清晰、带浓。大于 200 μmol/L 时扩增产物出现迷散(smear)状态。

2.1.4 引物浓度对 RAPD 的影响 用 2 个模板 DNA,6 种不同浓度的同一随机引物进行 PCR 扩增。结果(图 4)表明,当引物浓度低于 0.2 μmol/L 时扩增产物很少,在 0.4~0.8 μmol/L 时扩增结果相似。>0.8 μmol/L 时,扩增产物减少,但有些扩增带加强。

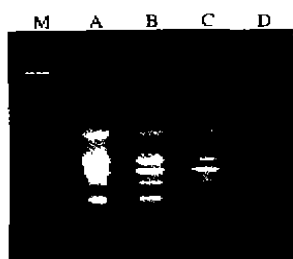


图 2 模板 DNA 用量对 RAPD 的影响

A, B, C, D 分别代表 200, 100, 20, 2 ng 的模板 DNA Y12, 引物 H04, M 为 λ -DNA/*Hind* III

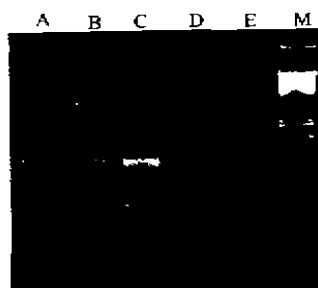


图 3 dNTP 浓度对 RAPD 的影响

A, B, C, D, E 分别代表 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 dNTP, 引物 F15, 模板 Y12 DNA, M 为 λ -DNA/(*Hind* III + *EcoR* I)

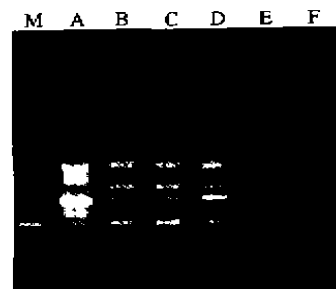


图 4 不同引物浓度对 RAPD 的影响

A, B, C, D, E, F 分别为 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的引物, M 为 100 bp DNA Ladder, 引物: F15, 模板 DNA: Y22

2.1.5 Taq 酶浓度对 PCR 的影响 用 4 种引物、同一模板对 5 个 Taq DNA 聚合酶浓度的扩增结果(图 5)表明, Taq 酶在 6.67~10.00 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 时扩增效果相似, 在 13.33 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 下扩增背景出现迷散状。低于 6.67 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 时, 扩增产物减少, 因此选择 6.67 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 的低浓度酶用量, 既可节约 Taq DNA 聚合酶的耗, 又可得到好的结果。

2.1.6 扩增缓冲液对 PCR 的影响 对同 1 种 Taq DNA 聚合酶和 2 个引物在 G-2B, Promega, SABC, 原平, 鼎国, 同正等不同来源的扩增缓冲液下的 RAPD 产物的比较(图 6)表明, SABC 与 G-2B 的扩增缓冲液均扩出相同的带型, 且清晰, 可见这 2 种扩增缓冲液可以通用。而 Promega, 原平, 同正的扩增缓冲液扩增的产物少, 并且浓度低, 鼎国的扩增缓冲液扩增的产物略有增加, 但扩增产物浓度降低, 本研究以 G-2B 为最佳选择。

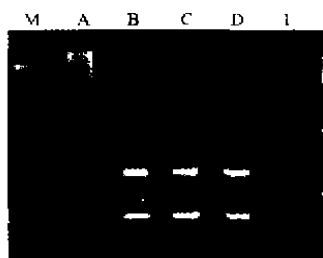


图 5 Taq 酶浓度对 RAPD 的影响

A, B, C, D, E 分别为 13.33, 10.00, 6.67, 3.33, 1.67 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 的 Taq DNA 聚合酶, M 为 λ -DNA/*Hind* III, 引物: F15, 模板 DNA: Y22

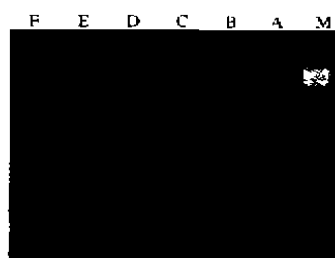


图 6 不同扩增缓冲液对 RAPD 的影响

A, B, C, D, E, F 分别为 G-2B, SABC, Promega, 原平, 同正, 鼎国的扩增缓冲液, 引物: F15, 模板 DNA Y12, M 为 λ -DNA/(*Hind* III + *EcoR* I)

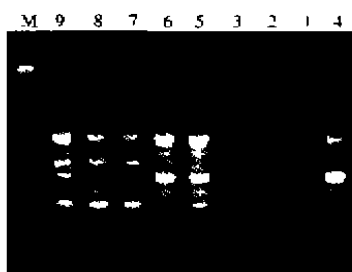


图 7 MgCl_2 和 dNTP 互作对 RAPD 的影响

引物为 F15, 模板 DNA 是 Y12, M 为 λ -DNA/(*Hind* III + *EcoR* I)

2.1.7 MgCl_2 与 dNTP 互作对 PCR 的影响 用相同引物、相同模板 DNA 比较了 3 个 MgCl_2 浓度与 3 个 dNTP 浓度完全随机组合的 9 个处理的 PCR 结果, 研究了 MgCl_2 与

dNTP 的互作效应(图 7,1~9 泳道分别代表 MgCl_2 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)/dNTP ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的浓度为 1/0.1,1/0.2,1/0.3,2/0.1,2/0.2,2/0.3,3/0.1,3/0.2,3/0.3)。结果表明, MgCl_2 在低浓度时,过量的 dNTP 对 Mg^{2+} 的螯合作用明显,表现为降低 MgCl_2 的酶催化作用(泳道 2,3),而低量的 dNTP 螯合作用较小(泳道 1),随着 MgCl_2 浓度增加,dNTP 的抑制作用减小,PCR 扩增产物增多。在高 MgCl_2 浓度下,dNTP 无抑制效果(泳道 7~9)。在相同 MgCl_2 浓度和足量的 dNTP 时,扩增产物相似(泳道 5,6)。

综合分析确定了优化的 RAPD 反应体系,反应体积为 20 μL ,其中 DDH_2O ,10 $\times$ 的扩增缓冲液,2 mmol/L 的 dNTP,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的随机引物,6.67 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 的 Taq DNA 聚合酶和 20 mg/L 的模板 DNA 分别为 13.8,2.2,2.0,0.2 和 1 μL 。

2.2 优化的 RAPD 反应体系的稳定性检测

2.2.1 对 MgCl_2 浓度的敏感性 在 6 种 MgCl_2 浓度,同一模板(Y12),同一引物(F15)下,按优化的 RAPD 反应体系扩增,结果(图 8)可以发现,在 1.0~3.5 mmol/L 浓度内均扩出了产物,并且带型相似,说明该体系对 MgCl_2 的敏感性较低。其中 1.5,2 mmol/L 浓度下的带型丰富、均匀。

2.2.2 不同热循环条件下的扩增效果 用引物 G03, G04 和 2 个模板 Y11, Y22,按照优化的 RAPD 反应体系在 8 种热循环条件下(表 1)的扩增结果,在 5 个循环条件下(编号为 3~4,6~8,下同)扩增出完全相同的带谱,2 个循环(2,5)下表现为迷散状(smear),在 1 个循环条件(1)下多扩出 1 条带。由此说明该反应体系是比较稳定的。

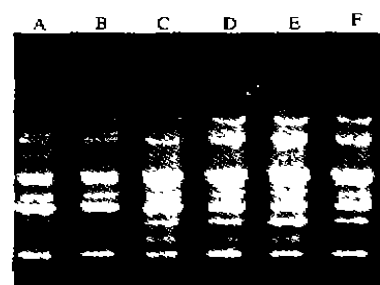


图 8 MgCl_2 浓度对优化的 RAPD 反应体系的影响
A,B,C,D,E,F 分别为 3.5,3.0,2.5,2.0,1.5,1.0 mmol/L 的 MgCl_2 ;引物 F15,模板 DNA Y12,扩增缓冲液为原平

3 讨 论

RAPD 是基于 PCR 反应,反映 DNA 多态性的一种分子标记技术,因此影响 PCR 反应的各种因素,诸如 Mg^{2+} , dNTP, 引物, Taq DNA 聚合酶, 模板 DNA, 热循环等同样影响 RAPD 的扩增结果。

1) Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶。本研究中, Mg^{2+} 浓度低于 1 mmol/L 时,其催化作用几乎丧失,不产生扩增产物,随着 Mg^{2+} 浓度的增加催化作用逐渐增强,扩增产物增多,产物浓度增大,但到了一定程度,则易出现非特异性扩增。综合认为 Mg^{2+} 为 1.5~2 mmol/L 对大多数引物适宜。同时还发现 Mg^{2+} 的最终反应浓度还受到 dNTP, 引物, 模板及扩增缓冲体系中各种组成成分的制约, Mg^{2+} 浓度的确定应同时考虑这些因素。

2) dNTP 是 RAPD 扩增的反应底物。当 dNTP 的量太低时,直接影响扩增产物的浓度,一般认为在 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下的 dNTP 能够满足正常 RAPD 反应的要求。但不同引物扩增的 RAPD 产物的数量不同,对反应体系中 dNTP 量的要求也不同。过多的 dNTP 对 Mg^{2+} 会产生拮抗作用,特别在 Mg^{2+} 浓度较低时, dNTP 的拮抗作用特别显著。

1) Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶。本研究, Mg^{2+} 浓度低于 1 mmol/L 时, 其催化作用几乎丧失, 不产生扩增产物, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加催化作用逐渐增强, 扩增产物增多, 产物浓度增大, 但到了一定程度, 则易出现非特异性扩增。综合认为 Mg^{2+} 为 1.5~2 mmol/L 对大多数引物适宜。同时还发现 Mg^{2+} 的最终反应浓度还受到 dNTP, 引物, 模板及扩增缓冲体系中各种组成成分的制约, Mg^{2+} 浓度的确定应同时考虑这些因素。

2) dNTP 是 RAPD 扩增的反应底物。当 dNTP 的量太低时, 直接影响扩增产物的浓度, 一般认为在 200 μ mol/L 条件下的 dNTP 能够满足正常 RAPD 反应的要求。但不同引物扩增的 RAPD 产物的数量不同, 对反应体系中 dNTP 量的要求也不同。过多的 dNTP 对 Mg^{2+} 会产生拮抗作用, 特别在 Mg^{2+} 浓度较低时, dNTP 的拮抗作用特别显著。

3) 随机引物是 RAPD 反应中的起始点, 只有同模板 DNA 稳定结合的引物, 才能扩增产生 RAPD 产物。由于不同引物同模板的结合能力存在差异, 因而对 Mg^{2+} , dNTP 的浓度都有不同的要求, 因此, 确定 Mg^{2+} , dNTP 浓度时, 应同时对 3~4 个扩增产物不同的引物进行筛选, 这样确定的反应体系才具有普遍性及通用性。随机引物的浓度对 RAPD 也有一定影响, 过多的引物会增加错配的机会, 适当低浓度引物是合适的选择。

4) Taq DNA 聚合酶是 RAPD 扩增中的关键因素。本研究还发现不同来源甚至同一来源不同批次的 Taq 酶, 其活性也有差异, 在 RAPD 扩增中尽可能采用同一种 Taq DNA 聚合酶, 避免中途更换, 这点很重要。Taq DNA 聚合酶浓度对 RAPD 扩增的影响主要表现为在高浓度下的非特异性扩增增加, 出现迷散状, 低浓度时扩增产物减少。另外值得注意的是在初始摸索反应条件时 RAPD 反应数较少, 特别是单管加酶时, 由于 Taq DNA 聚合酶附着力强, 实际用酶量往往大于微量加样器显示的刻度量, 在随后的大批量检测时, 应适当加大用酶量, 才能保持前后结果的一致。

5) 模板 DNA 用量。对于某一特定的 RAPD 扩增, 模板 DNA 是确定的, 即不可选择的。但是模板 DNA 的提取与稀释等也会影响 RAPD 扩增, 模板 DNA 的提取方法直接影响着 DNA 片段的大小, 迷散状的 DNA 不适于 RAPD 扩增。模板 DNA 稀释时 TE 缓冲液中 EDTA 的浓度会影响反应体系中 Mg^{2+} 的实际浓度。在批量分析中应保持各 DNA 样品稀释液中 TE 浓度一致。一般而言模板 DNA 在 5~100 ng 均有 RAPD 产物, 但不同物种 DNA 结构不同, 具体的最适 DNA 用量也有差异。

总之, RAPD 扩增体系的优化应经过单因子筛选与复因子检测两步完成, 在单因子筛选中应保证非筛选因子处于足量或最适条件下进行。复因子检测, 主要是分析 $MgCl_2$ 与 dNTP 的互作及 Taq DNA 聚合酶与扩增缓冲液的互作, 最后确定的 RAPD 反应体系应以对 $MgCl_2$ 及热循环有较少的敏感性为佳。

[参考文献]

- [1] Williams J C K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531~6535.
- [2] 曹家树, 曹寿椿, 易清明. 白菜及其相邻类群基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1995, 22(1): 47~52.
- [3] Famham M W. Genetic variation among and within United States collard cultivars and landraces as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers [J]. J Am Soc Hort Sci, 1997, 21 (3): 374~379.
- [4] Margale E, Herve Y, Hu J, et al. Determination of genetic variability by RAPD markers in cauliflower, cabbage

- and kale local cultivars from France[J]. *Journal Genetic Resources and Crop Evolution*, 1995, 42(3): 281~289.
- [5] 涂金星, 郑用琰, 傅廷栋. 甘蓝型油菜核不育材料育性基因的 RAPD 标记[J]. *华中农业大学学报*, 1997, 16(2): 112~117.
- [6] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记[J]. *园艺学报*, 1998, 25(2): 197~198.
- [7] Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *TAG*, 1994, 88: 741~748.
- [8] 陈洪, 朱立煌, 许吉臣, 等. RAPD 标记构建水稻分子连锁图[J]. *植物学报*, 1995, 37(9): 677~684.
- [9] Reiter R S, John G K W, Kenneth A, et al. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant in bred lines and RAPDs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1477~1481.
- [10] Rowland L J, Levi A. RAPD based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species[J]. *TAG*, 1994, 87: 863~868.
- [11] 李春丽, 郑康乐. 应用 RAPD 标记检测与水稻株高和抽穗期有关的 QTLs[J]. *遗传学报*, 1998, 25(1): 34~39.
- [12] Jourdain C, Barret P, Horvais R, et al. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic level in rapeseed[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 61~67.
- [13] Tanhuanpaa P K, Vilkki J P, Vikki H J, et al. Identification of a RAPD markers for palmitic acid concentration in the seed oil of spring turnip rape[J]. *TAG*, 1995, 91(3): 477~480.
- [14] Foolad M R, Chen F Q. RAPD markers associated with salt tolerance in an interspecific cross of tomato[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 306~312.
- [15] 鲍晓明, 黄百渠, 李松涛, 等. 用 RAPD 技术鉴定两个小冰麦易位系[J]. *遗传学报*, 1993, 20(1): 81~87.
- [16] 栾雨时, 苏乔, 李海涛, 等. 利用 RAPD 技术快速鉴定蕃茄杂种纯度[J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 247~251.
- [17] Hu J, Quiros C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers[J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 10: 505~511.

Optimization of RAPD reaction system for *Brassica campestris*

ZHANG Lu-gang^{1,2}, WANG Ming², CHEN Hang³, LIU Ling³, Samuel S. M. Sun⁴

(1 Vegetable and Flower Institute, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(3 National Vegetable Technique Engineering Center, Beijing, 100089, China)

(4 Chinese University of Hong Kong, Shatin, N. T. Hong Kong, China)

Abstract: In this paper, the effects of concentration of $MgCl_2$, dNTP, random primers, template DNA, Taq DNA polymerase and different buffers on RAPDs were analyzed with turnip, Chinese cabbage and their hybrid F_1 . An optimized RAPD system with total volume of 20 μ L including $MgCl_2$ at 1.5 mmol/L, dNTP at 200 μ mol/L, random primer at 0.4 μ mol/L, 20 ng template DNA, and 6.67 μ mol/(L · min) (unit) of Taq DNA polymerase was set up. This system showed stable repetition at 8 temperature cycle condition, in which one program with pre-amplification $94^\circ C/1' \rightarrow 36^\circ C/20'' \rightarrow 72^\circ C/10''$ for 2 cycles; amplification $94^\circ C/10'' \rightarrow 36^\circ C/15'' \rightarrow 72^\circ C/70''$ for 38 cycles; and extension at $72^\circ C$ for 4 min presented a better result.

Key words: Chinese cabbage; RAPD; amplification condition