

13 65-69

第28卷 第5期
2000年10月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 5
Oct. 2000

[文章编号]1000-2782(2000)05-0065-05

苹果 RAPD 反应体系的研究

张今今, 王跃进

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

S661.103.2
Q75

[摘要] 对苹果基因组 DNA 的 RAPD 扩增体系各参数进行筛选比较, 建立的最佳反应体系为: 模板 DNA 1.0 mg/L, 引物 1.5 mg/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.1 mol/(L·min), Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L。

[关键词] 苹果; 基因组 DNA; RAPD 反应体系、遗传规律

[中图分类号] S661.1 **[文献标识码]** A

苹果是我国重要果树品种之一。由于它属于多年生木本果树, 树体占地面积大, 遗传背景复杂, 采用传统的方法进行遗传育种研究有相当的局限性^[1]。近年来, 分子生物技术迅速发展, 极大地改进了探索果树遗传规律的方法和手段, 为果树学研究提供了新的途径。以 PCR (Polymorase Chain Reaction 聚合酶链式反应) 为基础的 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA) 技术, 以操作简便、反应迅速、无放射性污染等特点, 已经在果树的分类研究、基因标记、遗传图谱构建等方面得到了广泛的应用^[2~5]。RAPD 反应因素较多, 各反应因子的优化组合, 是获得清晰、可重复的扩增产物的前提, 也是扩增反应成功的关键^[6]。为了保证反应结果的稳定性和可靠性, 降低反应成本, 本研究探讨了苹果基因组 DNA 的 RAPD 反应体系中, 各种因素变化对扩增结果的影响, 建立了苹果 RAPD 反应的最佳体系, 以期为苹果的遗传研究提供可靠方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为苹果品种红星, 取自西北农业大学果树站苗圃。

1.2 基因组 DNA 的提取

1 年生幼嫩枝条刮去表皮, 取韧皮部约 0.06 g, 液氮研磨均匀, 置入预先加好 500 μ L 高盐缓冲液 (Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L; EDTA 70 mmol/L; NaCl 2 mmol/L; $Na_2S_2O_4$ 20 mmol/L) 的 1.5 mL 离心管, 混匀。再加入 100 μ L 50 g/kg 肌氨酸钠, 充分混合。65 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min。13 000 r/min 离心 8 min, 转移提取缓冲液。重复 2 次。转移上清, 加入与上清等体积氯仿-异戊醇, 抽提 2 次。取上清, 加入上清 1/2 体积的 10 mmol/L NH_4Ac 和等体积的预冷异丙醇, -20° C 静置 30 min 以上。13 000 r/min 离心 15 min, 得到 DNA 沉淀。室温干燥, 溶于 TE 缓冲液 (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 0.1

[收稿日期] 1999-10-21

[基金项目] 咸阳市科委资助项目(K9601)

[作者简介] 张今今(1973-), 女, 在读博士。

mmol/L, pH 8.3), 加入 1 μ L RNase, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h, -20 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

1.3 RAPD 扩增条件

10 μ L 反应体系中 Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.0~4.5 mmol/L, 明胶 0.01 g/L, 牛血清白蛋白 5.0 μ g, dNTPs 0~0.8 mmol/L, 引物 0~1.5 mg/L, Taq DNA 聚合酶 0~1.0 μ mol/L, 模板 DNA 0.05~1.2 mg/L。

对每个参数进行筛选时, 其他参数取值按 RAPD 引物生产厂家 Operon 公司所建议的扩增条件: Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 明胶 0.001 g/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTPs 分别为 0.1 mmol/L, 引物 0~0.6 mg/L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ mol/min, 模板 DNA 1.0 mg/L^[7]。

该体系可作为苹果基因组 RAPD 多样性分析的参考体系。PCR 反应在 Idaho Technology 公司生产的 1605 型气浴式毛细管 PCR 仪上进行。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 斜率 3, 2 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 斜率 3, 50 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4 电泳

扩增产物用 14 g/kg 琼脂糖凝胶电泳分离。每 100 mL 凝胶中加 1% 溴化乙锭 (EB) 储备液 0.05 mL。电泳缓冲液为 1 \times TAE, 电压 4~5 V/cm。紫外透射仪观察照相。

2 结果与分析

2.1 模板质量浓度对扩增结果的影响

图 1 表明, 模板质量浓度在 0.6~1.0 mg/L 时, 扩增产物无显著差异。当浓度从 0.6 mg/L 逐渐降至 0.02 mg/L, RAPD 产物的强度也相应减弱, 分子量大的片段表现尤为明显。模板质量浓度在 1.2 mg/L 或更高时, 出现某些片段缺失 (箭头所示)。浓度达 2.0 mg/L 时, 甚至无扩增产物。因此, 选择 1.0 mg/L 为最适宜模板质量浓度。

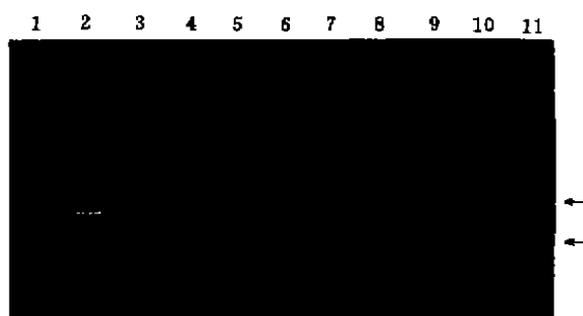


图 1 模板质量浓度对 RAPD 扩增结果的影响 (引物 OPJ11)

1. 2.0 mg/L; 2. 1.5 mg/L; 3. 1.2 mg/L; 4. 1.0 mg/L; 5. 0.8 mg/L; 6. 0.6 mg/L;
7. 0.4 mg/L; 8. 0.2 mg/L; 9. 0.1 mg/L; 10. 0.05 mg/L; 11. 0.02 mg/L

2.2 随机引物对扩增结果的影响

图 2 表明, 引物浓度低于 0.75 mg/L 时, 无扩增产物。浓度为 0.75, 1.5, 2.25 mg/L 时, 扩增片段的产率随之增加。为了保证反应结果的稳定性和特异性, 引物浓度以 1.5 mg/L 左右为宜。

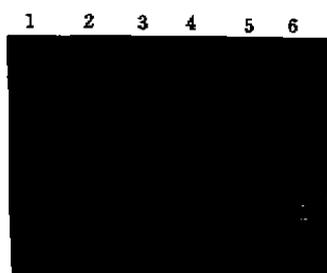


图2 随机引物质量浓度对 RAPD 扩增结果的影响(引物 OPJ04)

1. 0; 2. 0.1 mg/L; 3. 0.5 mg/L; 4. 0.75 mg/L; 5. 1.5 mg/L; 6. 2.25 mg/L.

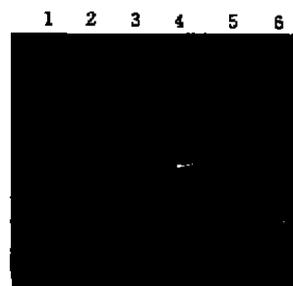


图3 *Taq* 酶浓度对 RAPD 扩增结果的影响(引物 OPQ07)

1. 0; 2. 0.02 mol/(L·min); 3. 0.05 mol/(L·min); 4. 0.1 mol/(L·min); 5. 0.2 mol/(L·min); 6. 0.4 mol/(L·min)

2.3 *Taq* DNA 聚合酶对扩增结果的影响

不同浓度 *Taq* 酶的试验结果(图3)表明,当 *Taq* 酶浓度低于 0.1 mol/(L·min), 扩增产率低或无产物。浓度为 0.1, 0.2, 0.4 mol/(L·min) 时,较大分子质量的 DNA 片段扩增强度减弱。笔者认为,当 Mg^{2+} 浓度恒定时, *Taq* 酶浓度增加会使 Mg^{2+} 对酶的激活能力相对减弱,导致大分子质量 DNA 片段的产率下降。因此,选择浓度为 0.1 mol/(L·min) 的 *Taq* 酶用于扩增反应效果最好。

2.4 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响

图4表明,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时,某些 DNA 片段(箭头所示)不扩增。浓度为 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L 的扩增带型基本一致。浓度增至 3.5 mmol/L 时,扩增片段有弥散趋势,浓度升高,弥散现象更明显,认为是高浓度 Mg^{2+} 对 *Taq* 酶活性产生严重影响所致。所以, Mg^{2+} 浓度以 2.5 mmol/L 为宜。

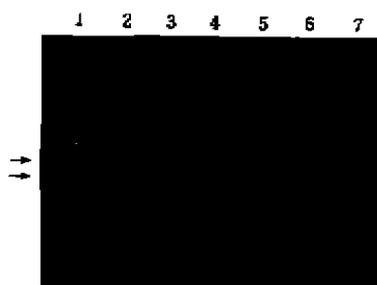


图4 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增结果的影响(引物 OPB03)

1. 1.0 mmol/L; 2. 1.5 mmol/L; 3. 2.0 mmol/L; 4. 2.5 mmol/L; 5. 3.5 mmol/L; 6. 4.0 mmol/L; 7. 4.5 mmol/L.

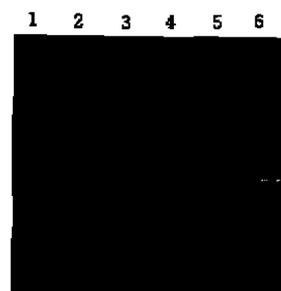


图5 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增结果的影响(引物 OPO13)

1. 0; 2. 0.05 mmol/L; 3. 0.1 mmol/L; 4. 0.2 mmol/L; 5. 0.4 mmol/L; 6. 0.8 mmol/L.

2.5 dNTPs 浓度对扩增结果的影响

图 5 表明,浓度为 0~0.4 mmol/L 时,扩增片段的产率和 dNTPs 浓度呈正相关。浓度为 0.4 和 0.8 mmol/L 的扩增结果基本一致,以 0.4 mmol/L 为 dNTPs 的最适宜浓度。

3 结 论

3.1 模板 DNA 浓度对扩增结果的影响

反应体系中模板浓度会对扩增结果产生直接影响。以往报道中模板质量浓度从 0.1 ng 到几百 ng 不等^[7]。本研究模板质量浓度为 1.2 和 1.5 mg/L 时,某些扩增片段不稳定。当浓度达到 2.0 mg/L 时,无扩增产物。认为可能是由于模板质量浓度增加,体系中杂质含量也相应增多,从而影响 *Taq* DNA 聚合酶活性所致。随模板质量浓度降低,扩增带型的强度也随之减弱,以浓度为 1.0 mg/L 时扩增结果最佳。

3.2 *Taq* DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 对扩增结果的影响

Taq DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 是影响反应的关键因素^[7]。*Taq* 酶浓度太低,扩增产率降低或无扩增产物。 Mg^{2+} 则是酶的激活剂,试验表明 Mg^{2+} 浓度低于 1.5 mmol/L 时,反应产率下降, Mg^{2+} 浓度高于 3.5 mmol/L 时,酶活性受到影响,扩增带型成严重弥散状。所以 *Taq* 酶浓度以 0.1 mol/(L·min) 为宜,相应的 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L。

3.3 随机引物对扩增结果的影响

RAPD 反应的随机引物一般是 10 碱基的寡聚核苷酸片段,G+C 含量在 500~700 g/kg,引物的浓度与扩增产物的特异性有关。Bruno 等^[8]发现引物浓度对 DNA 片段的带型影响很大,引物浓度增加,非特异性扩增产物也增加。本研究支持这一观点,引物浓度为 2.25 mg/L 时有非特异性片段产生。笔者认为引物浓度应在 1.5 mg/L 左右。

3.4 dNTPs 对扩增结果的影响

dNTPs 为 RAPD 扩增反应的底物。浓度过低,产率下降;浓度过高,错误掺入率增加,本试验中 dNTPs 浓度在 0.2~0.8 mmol/L 时扩增结果基本一致,0.4 mmol/L 为 dNTPs 的最适宜浓度。

综上所述,苹果 RAPD 扩增反应的最佳反应体系是:10 μ L 反应体系中含 Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, 明胶 0.01 g/L, 牛血清白蛋白 5.0 μ g, dNTPs 0.4 mmol/L, 引物 1.5 mg/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 mol/(L·min), 模板 DNA 1.0 mg/L。该体系可作为苹果基因组 RAPD 多样性分析的参考体系。

[参考文献]

- [1] Demeke T, Adams R P, R Chibbar R, et al. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-A case study in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84: 990-994.
- [2] Koller B, Lehmann A, Medermott J M, et al. Identification of apple cultivars using RAPD Markers[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 901-904.
- [3] 王跃进, Lamikanra. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(4): 383-391.
- [4] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple[J]. Journal of Heredity, 1994, 85: 4-11.
- [5] Hancock J F, Callow P A. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria* ×

- unusua[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(4): 862-864.
- [6] Lu J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-a new molecular marker[J]. Acta Botanica Sinica, 1993, 35: 120-127.
- [7] 荆玉祥, 匡延云, 李德葆. 植物分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 296-298.
- [8] Bruno W S, Rhonda J. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers[J]. Theor Appl Genet, 1991, 86: 105-112.

Study on RAPD reaction system of apple

ZHANG Jin-jin, WANG Yue-jin

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

Abstract: RAPD reaction factors of apple genetic DNA were compared and the optimum RAPD reaction condition for apple was obtained. The main factors are as follows: 0.1 mol/(L · min) *Taq* DNA polymerase, 0.4 mmol/L dNTPs, 1.0 mg/L template DNA, 1.5 mg/L 10-mers random primer, 2.5 mmol/L Mg^{2+} .

Key words: apple; genetic DNA; RAPD

《园艺学报》2001 年征订启事

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术刊物, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物和西瓜、甜瓜等方面未经发表的科研报告及研究简报、经过省(直辖市)级审定的新品种、学术活动报道及广告等。读者对象主要是园艺科研人员、大专院校师生及专业技术人员。

本刊 2001 年由 80 页增加至 96 页, 双月 25 日出版, 16 开本。每期定价 6.00 元, 全年 36.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局办理订阅, 漏订者可直接寄款至本编辑部订购。国内邮发代号 87-471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 BM448。

欢迎购阅 2000 年增刊, 定价 10 元, 免收邮费, 欲购者请与编辑部联系。

编辑部地址: 北京市海淀区白石桥路 30 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部

邮政编码: 100081 电话: (010)68919523

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告