

# 梨属植物 RAPD 反应体系的建立与优化\*

马艳芝<sup>1,2</sup>, 王向东<sup>3</sup>, 张玉星<sup>1</sup>

(1 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001; 2 唐山师范学院 生物科学技术系, 河北 唐山 063000;

3 唐山市农业科学研究院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 以鸭梨、杜梨为材料,对梨属植物 DNA 的提取及 RAPD 反应体系进行了系统优化,建立了梨属植物最佳反应体系及参数。结果表明,适当提高抗氧化、抗酚类物质的浓度(2%  $\beta$ -巯基乙醇,2% PV P-40,20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ),提取的基因组 DNA 纯度较高;反应体系中含有  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L,dNTPs 浓度 200  $\mu\text{mol/L}$ ,引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ,模板 DNA 1.6 ng/ $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶 0.06 U/ $\mu\text{L}$ ,可成功用于梨属植物 RAPD 扩增,说明改良的 CTAB 法能成功用于梨属植物 DNA 提取,建立的最佳反应体系可用于梨属植物 RAPD 扩增。

**[关键词]** 梨属植物;RAPD;反应体系

**[中图分类号]** S188

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)03-0144-05

## Establishment and optimization of RAPD technique in *Pyrus L.*

MA Yan-zhi<sup>1,2</sup>, WANG Xiang-dong<sup>3</sup>, ZHANG Yu-xing<sup>1</sup>

(1 College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China;

2 Department of Biological Science and Technology, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Hebei 063000, China;

3 Agricultural Science Academy of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract:** Tested with Yali pear and *Betulaefolia*, the paper studied the extract of DNA of *Pyrus* and the optimized RAPD reaction system. The result showed as follows: by raising the concentrations of antioxidative components and antiphenolic compounds (2%  $\beta$ ME, 2% PV P-40, 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), the purity of the extracted genomic DNA was higher. It's concluded that the optimum reaction system that contained  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTPs 200  $\mu\text{mol/L}$ , primer 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , 1.6 ng/ $\mu\text{L}$  template DNA, 0.06 U/ $\mu\text{L}$ , Taq DNA polymerase would be applied in the amplification of RAPD. It explained that reformed CTAB method could extract the genomic DNA of *Pyrus* successfully, and the optimum RAPD reaction system could amplify RAPD in *Pyrus L.*

**Key words:** *Pyrus*; RAPD; reaction system

RAPD 技术是建立在 PCR (Polymerase Chain Reaction) 基础上的一种可对整个未知序列基因组进行多态性分析的 DNA 分子标记技术<sup>[1]</sup>,被广泛应用于果树种质资源研究中。在国外,1998 年 Botta 等<sup>[2]</sup>应用 RAPD 技术研究了意大利埃蒙特(Piemonte)的梨种质资源,鉴别了 17 个梨品种,并建立了系统发育关系图;2000 年 Kim 等<sup>[3]</sup>讨论了 RAPD 技术在梨树品种鉴定方面应用的潜力与局限性,并揭示了供试

梨树品种的亲缘关系;2000 年 Teng 等<sup>[4]</sup>对原产中国的梨属植物 13 个种进行分析,探讨了新疆梨的分类地位,并对供试材料进行了聚类分析。在国内,1998 年王丙旭<sup>[5]</sup>应用 RAPD 技术对梨树种质资源的秋子梨、砂梨、白梨和西洋梨的 40 个品种进行了品种鉴定、亲缘关系和分类研究。但 RAPD 技术在梨属植物应用过程中,优化和稳定体系的研究不系统。本试验以栽培品种鸭梨和野生品种杜梨为材料,在前人已初

\* [收稿日期] 2006-02-17

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(303240)

[作者简介] 马艳芝(1977-),女,河北唐山人,讲师,硕士,主要从事植物学及植物分类学研究。

[通讯作者] 张玉星(1961-),男,河北沧县人,教授,博士,主要从事果树优质无公害栽培技术与品种改良。

步建立起 RAPD 反应体系的基础上, 对梨属植物 RAPD 反应体系进行了更加系统的优化, 使其能更广泛的应用于梨属植物, 为 RAPD 技术在梨属植物资源利用方面的应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与药品

材料: 鸭梨与杜梨成熟叶片, 采自河北农业大学标本园。

供试药品: 试验所用普通化学试剂购自保定海泰克生物技术有限公司、保定博爱欣生化试剂公司; 所需 PCR 试剂 (*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物等) 购自上海生工 (Sangon) 生物工程公司; 电泳检测所需琼脂糖和 DNA 分子量标准 (Marker: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus) 为 MBI 产品, 均购自上海生工 (Sangon) 生物工程公司。

### 1.2 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取参照经典的CTAB法<sup>[6]</sup>, 并加以改进, 即在提取液中加入抗酚类、抗氧化物质 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 2% PV P-40, 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 。

### 1.3 RAPD 扩增

RAPD 扩增反应在 Whatman Biometra 型热循环仪上进行。以 0.2 mL Eppendorf 管编号, 采用 25  $\mu\text{L}$  体系进行 RAPD 扩增, 各组分浓度及其用量分别为: 10  $\times$  PCR 缓冲液, 2.5  $\mu\text{L}$  (即 100 mmol/L KCl, 8 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)); 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu\text{L}$ ; 5  $\mu\text{mol/L}$  引物 2  $\mu\text{L}$ ; 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ; 20 ng/ $\mu\text{L}$  模板

DNA 2  $\mu\text{L}$ ; 5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ ; DDW (双蒸水) 14.2  $\mu\text{L}$ 。加入 20  $\mu\text{L}$  矿物油覆盖, 扩增程序: 94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min, 43 个循环; 72 保温 10 min, 最后 4 保温 (为了使本体系更加具有广泛性, 优化体系过程中使用的引物不是单一的, 也不固定, 随机使用所购买的引物)。

### 1.4 RAPD 扩增产物的检测

RAPD 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB) 电泳分离, 电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE, 电泳于 DYY-III 稳压电泳仪上进行 (电压 3.5 V/cm)。根据扩增片段的大小, 适时停止电泳。电泳结果在紫外透射仪上观察, 照相。同时, 本着节约的原则, 在体系优化过程中未使用 Marker。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组DNA的提取和检测

基因组DNA的提取是 RAPD 扩增能否成功的关键。许多研究表明<sup>[7-8]</sup>, 影响 RAPD 扩增的 DNA 杂质往往不是 RNA 或蛋白质这些大分子物质, 而是多糖类和酚类等小分子物质, 但梨属植物叶片含有多糖类 and 酚类物质。因此, 在对抗氧化、抗酚类物质进行浓度梯度预试验基础上, 适当提高抗氧化、抗酚类物质的浓度 (本试验采用 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 2% PV P-40, 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), 用 CTAB 法提取梨基因组DNA, 结果见图 1。图 1 结果表明, 提取的基因组DNA 多呈透明无色状, 且易溶于 1  $\times$  TE 中, 经过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测呈 1 条亮带。

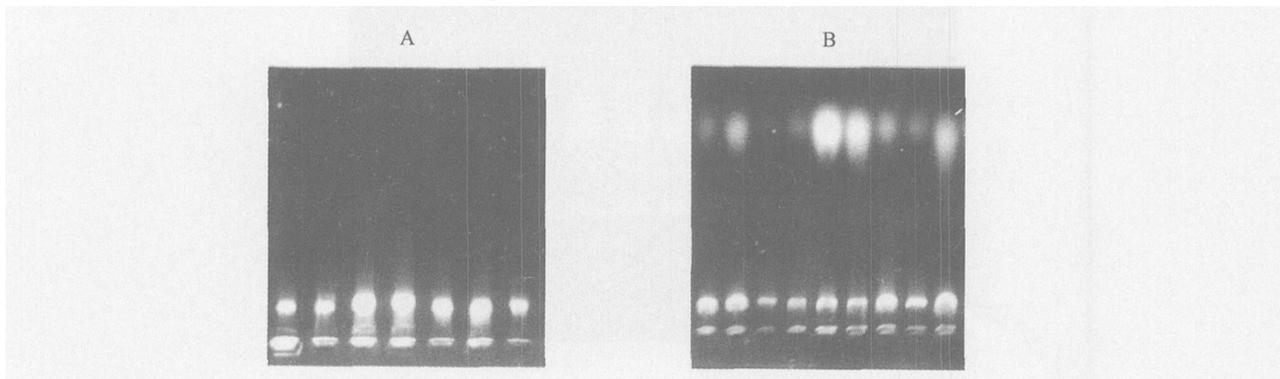


图 1 部分供试类型基因组DNA 的电泳检测结果

A. 去除 RNA; B. 未去除 RNA

Fig. 1 Electrophoretic products of the genomic DNA from materials of *Pyrus* tested in this study

A. Treated with Rnase; B. Not treated with Rnase

一般认为,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  值在 1.5 以上即可进行 RAPD 分析, 本试验中各样品的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  值均在 1.6~2.0, 只有很少一部分在 1.4~1.6, 表明蛋白

质等杂质均较少, DNA 纯度较高, 无需去除 RNA 即可用于 RAPD-PCR, 为 RAPD 稳定扩增奠定了基础。

## 2.2 RAPD 反应体系的优化

### 2.2.1 模板 DNA 用量对 RAPD 扩增结果的影响

在反应体系中, 其他条件不变, 加入模板 DNA 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 ng/ $\mu$ L, 研究模板 DNA 用量对 RAPD 扩增结果的影响, 结果见图 2。图 2 结

果表明, 在模板 DNA 用量为 0.4~12.8 ng/ $\mu$ L 时, 鸭梨和杜梨均能产生清晰的带型。说明模板 DNA 用量对 RAPD 扩增结果不太敏感。本试验确定的模板 DNA 用量为 1.6 ng/ $\mu$ L。

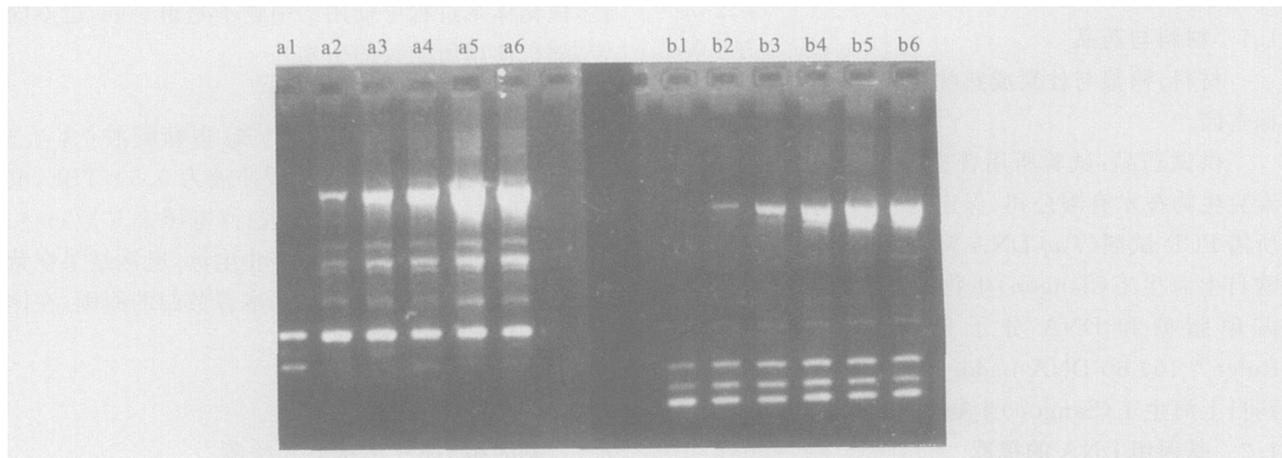


图 2 模板 DNA 用量对 RAPD 扩增结果的影响

a 鸭梨; b 杜梨; 1~6 模板 DNA 用量分别为 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 ng/ $\mu$ L

Fig. 2 Effect of template concentration on RAPD amplification

a YaLi pear; b Betulaefolia; 1-6 DNA concentration in order: 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 ng/ $\mu$ L

### 2.2.2 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增结果的影响

在反应体系中, 其他条件不变, 加入 dNTPs 的浓度分别为 50, 100, 200, 400, 600, 800  $\mu$ mol/L, 研究 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增结果的影响, 结果见图 3。由图 3 可以看出, dNTPs 浓度低于 100  $\mu$ mol/L

时, 扩增条带较少; 浓度在 200  $\mu$ mol/L 以上时, 条带基本一致, 其中以 200  $\mu$ mol/L 时产生的条带最清晰。因此, 本试验确定的 dNTPs 使用浓度为 200  $\mu$ mol/L。

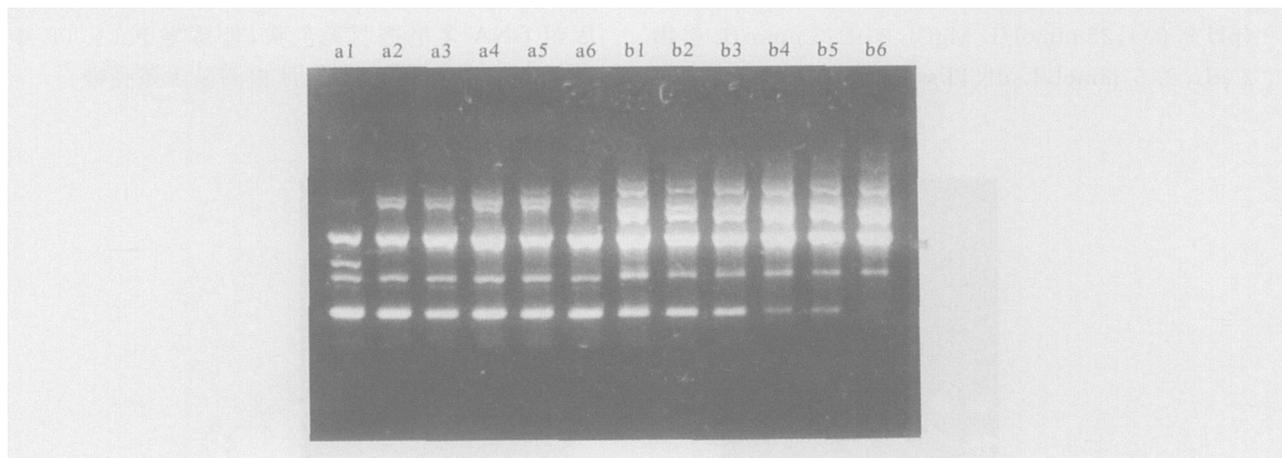


图 3 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增结果的影响

a 鸭梨; b 杜梨; 1~6 dNTPs 浓度依次为 50, 100, 200, 400, 600, 800  $\mu$ mol/L

Fig. 3 Effect of dNTPs concentration on RAPD amplification

a YaLi pear; b Betulaefolia; 1-6 dNTPs concentration in order: 50, 100, 200, 400, 600, 800  $\mu$ mol/L

2.2.3 *Taq* DNA 聚合酶对 RAPD 扩增结果的影响 在反应体系中, 其他条件不变, 加入 *Taq* DNA 聚合酶的浓度分别为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 U/ $\mu$ L, 研究 *Taq* DNA 聚合酶对 RAPD 扩增

结果的影响, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 0.02, 0.04 U/ $\mu$ L 处理的谱带少且不清晰, 而 0.06~0.12 U/ $\mu$ L 处理从条带数量及清晰度上基本无差异。因此, 确定 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.06 U/ $\mu$ L。

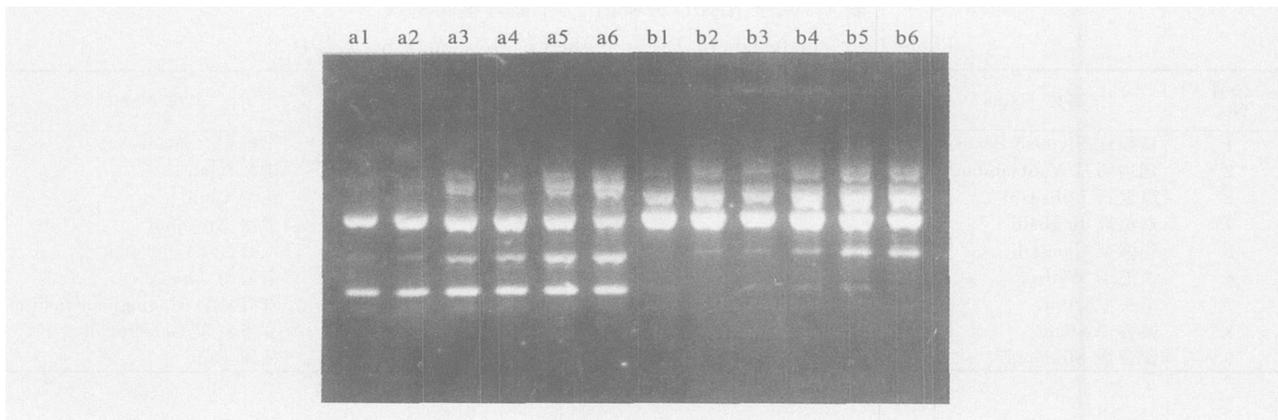


图 4 Taq DNA 聚合酶对 RAPD 扩增结果的影响

a 鸭梨; b 杜梨; 1~ 6 Taq DNA 聚合酶浓度依次为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 U/μL

Fig 4 Effect of Taq DNA polymerase concentration on RAPD amplification

a Yali pear; b Betulaefolia; 1- 6 Taq DNA polymerase concentration in order: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 U/μL

2.2.4 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 RAPD 扩增的影响 在反应体系中, 其他条件不变, 分别加入 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 研究 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 RAPD 扩增结果的影响, 结果见图 5。由图 5 可以看出, 在试验浓度范围内都能扩增, 但 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 0.5, 1.0, 1.5 mmol/L 时, 扩增出的条带数和扩增量均少, 这是由于 Mg<sup>2+</sup> 是 Taq 酶的激活剂, Mg<sup>2+</sup> 浓度低时, Taq 酶活性低, 而当 Mg<sup>2+</sup> 浓度在 2.0~ 3.0 mmol/L 时, 均可产生稳定、清晰、一致的扩增带型。因此, 本试验确定的 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.0 mmol/L。

2.2.5 引物浓度对 RAPD 扩增结果的影响 在反

应体系中, 其他条件不变, 加入引物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μmol/L, 研究引物浓度对 RAPD 扩增结果的影响, 结果见图 6。图 6 结果显示, 引物浓度为 0.1, 0.6 μmol/L 时扩增不稳定, 其他浓度产生的扩增结果基本一致。因此, 本试验确定的引物浓度为 0.4 μmol/L。

应用该反应体系对部分梨属植物(表 1)进行扩增, 结果如图 7 所示。图 7 结果表明, 应用优化后的体系对 27 个梨品种(系)、类型进行 RAPD 分析, 都能得到比较稳定的 RAPD 图谱, 扩增出的条带数在 4~ 8, 且有些为多态性条带。

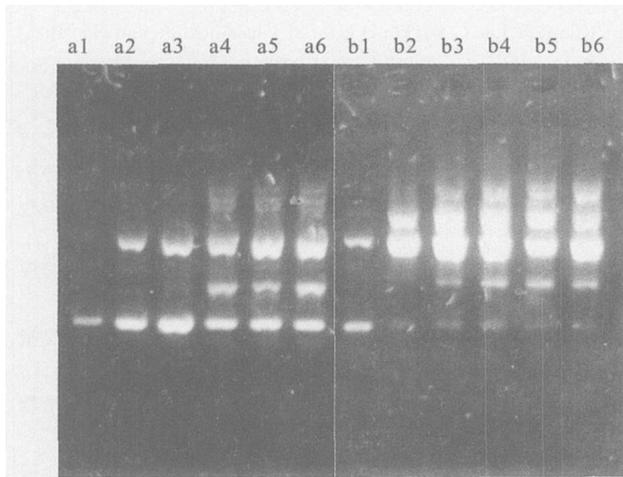


图 5 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 RAPD 扩增结果的影响

a 鸭梨; b 杜梨; 1~ 6 Mg<sup>2+</sup> 浓度依次为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

Fig 5 Effect of the Mg<sup>2+</sup> concentration on RAPD amplification

a Yali pear; b Betulaefolia; 1- 6 Mg<sup>2+</sup> concentration in order: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

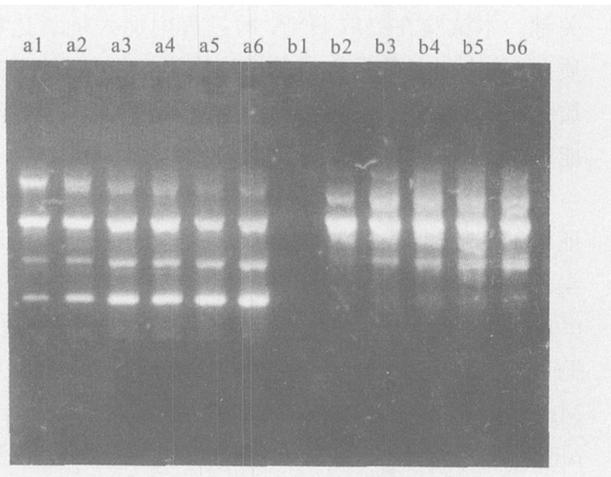


图 6 引物浓度对 RAPD 扩增结果的影响

a 鸭梨; b 杜梨; 1~ 6 引物浓度依次为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μmol/L

Fig 6 Effect of primer concentration on RAPD amplification

a Yali pear; b Betulaefolia; 1- 6 Primer concentration in order: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μmol/L

表 1 用于 RAPD 分析的 27 个梨属植物材料

Table 1 27 materials of *Pyrus* applied in this study by RAPD

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
1	日面红 Flemish Beauty	10	大香水 Daxiangshui	19	早酥梨 Zaosuli
2	延边明月 Yanbianmingyue	11	秋白梨 Qiubaili	20	麻梨 Mali
3	绿宝石 Lubaoshi	12	满园香 Manyuanxiang	21	茌梨 Chili
4	京白梨 Jingbaili	13	伏茄 Fuqiel	22	幸水 Xingshui
5	苍溪梨 Cangxili	14	锦香 Jinxiang	23	八月红 Bayuehong
6	歪把子 Waibazi	15	佛见喜 Fojianxi	24	金坠梨 Jinzhuli
7	车头 Chetou	16	糖梨 Tangli	25	青海马奶头 Qinghai Maimaitou
8	矮香 Aixiang	17	红香酥 Hongxiangsu	26	甘肃麦梨 Gansumaili
9	蜜香梨 Mixiangli	18	苹果梨 Pingguoli	27	杜梨 Duli

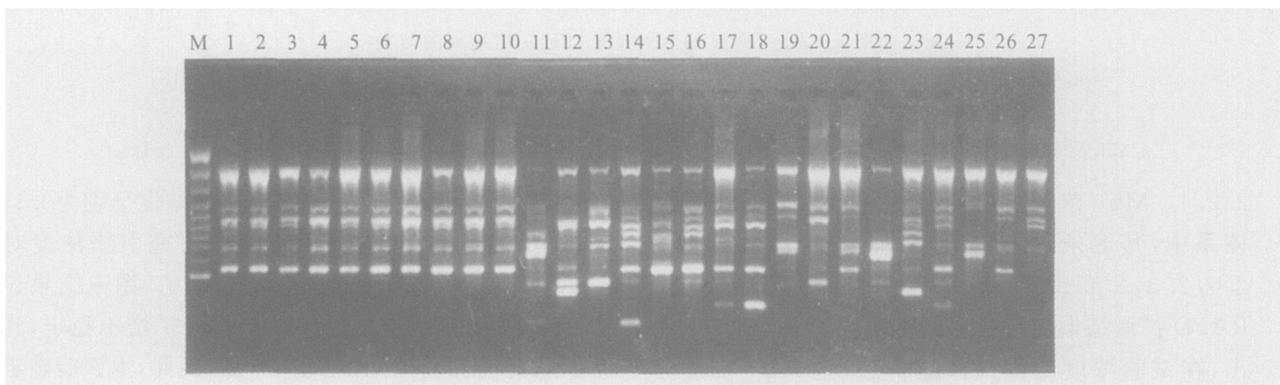


图 7 27 个供试梨属植物材料的 RAPD 图谱

M. Marker; 1~ 27. 供试梨属植物

Fig. 7 27 patterns of 27 materials

M. Marker; 1- 27. Materials of *Pyrus* applied in this study

### 3 讨论

基因组 DNA 的提取是 RAPD 扩增能否成功的关键。本试验在提取 DNA 的过程中加入抗氧化物质,有效抑制了酚类物质和 DNA 的氧化,保证了高质量 DNA 的成功提取。结果表明,改良的 CTAB 法能成功进行梨属植物 DNA 提取。

确定反应体系中每个因子合适的反应参数是保证 RAPD 分析稳定性和重复性的前提<sup>[9]</sup>。本研究建立的梨属植物 RAPD 优化反应体系为: 100 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) (即 10 × PCR 缓冲液, 2.5 μL), Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, dNTPs 200 μmol/L, 引物 0.4 μmol/L, 模板 DNA 1.6 ng/μL, Taq DNA 聚合酶 0.06 U/μL, 其余用 DDW。经与前人结果比较<sup>[5, 10]</sup>认为,梨属植物 RAPD 分析的最佳反应条件在不同实验室之间有较强的一致性,只需对引物 Taq DNA 聚合酶和 Mg<sup>2+</sup> 的用量进行小幅度调整。

#### [参考文献]

[1] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物分子生物学试验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 236-237.

- [2] Botta R, Akkac A, Me G, et al. Identification of pear cultivars by molecular markers [J]. Acta Horticulturae, 1998 (457): 63-70.
- [3] Kim C S, Lee G P, Han D H, et al. Classification and identification of *Pyrus perhelia* using RAPD [J]. Journal of Korean Society for Horticultural Science, 2000, 41(2): 119-214.
- [4] Teng Y W, Tanabe K, Tamura F, et al. Genetic relationships of pear cultivars in Xinjiang, China, as measured by RAPD markers [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2000, 76(6): 771-779.
- [5] 王丙旭. RAPD 在梨种质资源亲缘关系和品种鉴定中的应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 1998: 1-9.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] 范洪源, 蔡青, 宿兵, 等. DNA 提纯方法对甘蔗亚族植物 RAPD 的影响[J]. 西南农业学报, 1998, 12(1): 1-7.
- [8] 李晓青. 福建柏总 DNA 的快速简便提取和鉴定[J]. 林业科学, 1999(5): 51.
- [9] 赵锦, 刘孟军, 吕增仁, 等. RAPD 技术在植物遗传多样性研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(1): 25-28, 36.
- [10] 马兵钢, 牛建新, 马连营, 等. 库尔勒香梨基因组 DNA 提取及 RAPD 体系建立[J]. 新疆农业科学, 2001(1): 2-7.