

萝卜 DDRT-PCR 技术体系的优化

贾 晋,张鲁刚

(西北农林科技大学 园艺学院 陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**探索快速高效的 RNA 提取方法,建立高效率的 mRNA 差异显示体系。**【方法】**以萝卜幼嫩茎叶及花蕾为材料,比较了酸性酚—异硫氰酸胍—氯仿提取法(异硫氰酸胍法)与 BIOZOL 试剂法提取 RNA 的效果,并对 DDRT-PCR 体系中 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物及 cDNA 用量进行了优化。**【结果】**BIOZOL 试剂提取的 RNA 量大质好,经纯化后,其 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8~2.1,表明杂质少,质量浓度大于 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$,符合 mRNA 差异显示的要求;确定的最佳 DDRT-PCR 反应体系($20\ \mu\text{L}$)为: $10\times\text{Buffer}$ 2.5 mmol/L, Mg^{2+} 2.8 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, *Taq* 酶 1.5 U, 锚定引物 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 随机引物 1.25 $\mu\text{mol/L}$, cDNA 用量 0.5 μL 。mRNA 差异显示结果表明,高分辨率的片断为 100~1 000 bp。经验证,该体系也适用于大白菜和油菜 mRNA 差异显示研究。**【结论】**通过两种 RNA 提取方法比较和 DDRT-PCR 体系优化,获得了萝卜最佳 RNA 提取方法及 mRNA 差异显示反应体系。

[关键词] 萝卜;RNA 提取;DDRT-PCR;体系优化

[中图分类号] S631.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)04-0128-07

mRNA differential display technique in radish(*Raphanus sativus*)

JIA Jin,ZHANG Lu-gang

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Key Laboratory of Agriculture Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to obtain high qualitative RNA applied in later experimentation to establish high efficient mRNA differential display system. **【Method】** The effects of acidic phenol-guanidine thiocyanate-chloroform method and BIOZOL reagent on RNA extraction with tender leaf and bud of radish were compared, and the main factors of DDRT-PCR such as concentration of *Taq* enzyme, Mg^{2+} , dNTPs, primer and cDNA were optimized. **【Result】** It showed that the RNA extracted by BIOZOL reagent was better than the RNA extracted by acidic phenol-guanidine thiocyanate-chloroform method, its OD_{260}/OD_{280} reach 1.8—2.1 after RNA was purified, which meant that the impurity in it was very little and it was up to the requirement of mRNA differential display; An optimal DDRT-PCR system was determined ($20\ \mu\text{L}$), which was made up of $1\times\text{Buffer}$, Mg^{2+} 2.8 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, *Taq* enzyme 1.5 U, Anchor Primer 2.5 $\mu\text{mol/L}$, Random Primer 1.25 $\mu\text{mol/L}$, cDNA 0.5 μL . The high differentiating amplification of DDRT-PCR was between 100—1 000 bp. This system is also suitable for the mRNA differential display of Chinese Cabbage and Rape. **【Conclusion】** By comparing the effects of acidic phenol-guanidine thiocyanate-chloroform method and BIOZOL reagent on RNA extraction and optimizing DDRT-PCR system, high qualitative RNA method and optimal mRNA differential display system were obtained.

* [收稿日期] 2007-10-18

[基金项目] 国家“863”计划项目“植物分子与细胞高效育种技术与品种创制”(2006AA100108-4-7);陕西省科技厅陕西省 13115 工程项目“优质多抗专用蔬菜新品种选用技术”(2007ZDKG-05)

[作者简介] 贾 晋(1975—),女,内蒙古呼和浩特人,在读博士,主要从事蔬菜育种与生物技术研究。
E-mail:jiajin0201@yahoo.com.cn

[通讯作者] 张鲁刚(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜育种与生物技术研究。E-mail:lugangzh@163.com

Key words: *Raphanus sativus*; RNA extraction; DDRT-PCR; system optimizing

利用差异表达分离基因的方法很多,包括代表性差异分析技术(Representational Difference Analysis, RDA)^[1]、基因表达连续性分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)^[2]和抑制性消减杂交法(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)^[3]等。Liang 等^[4]于 1992 年以研究与癌症发生有关的基因为目的,创立了一种鉴定和克隆哺乳动物正常生理状态与异常状态细胞之间差异表达的基因分析方法,即 mRNA 差异显示反转录 PCR(Differential Display Reverse Transcription PCR, DDRT-PCR)。该方法自创立以来,不但成功用于动物及人类疾病与发育相关基因的鉴定和克隆^[2],而且成功应用于与植物胚胎发育^[5]、无融合生殖^[6-7]、植物抗逆^[8-9]和抗病性^[10]及植物和真菌互作有关基因表达等方面的研究^[11]。

萝卜是原产我国的重要蔬菜。目前,对萝卜育种及生理生化分析等方面的研究比较深入,但对其分子生物学的研究还处于起步阶段,许多方面尚存在不足。例如,黄浩等^[12]及张惠蓉等^[13]报道了萝卜 mRNA 差异显示体系的优化结果,但 RNA 提取过程繁杂、浪费时间^[12],mRNA 差异显示体系可重复性差。因此,采取简便、高效的萝卜 RNA 提取方法,并探索重复性好的 mRNA 差异显示体系非常必要。本研究以萝卜幼嫩茎叶及花蕾为试材,探索了快速、高效的 RNA 提取方法;并以萝卜花蕾为研究材料,对影响 DDRT-PCR 体系的 5 个关键因素进行了优化,得到了重复性好、适用范围较广的 mRNA 差异显示体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

萝卜幼嫩茎叶及花蕾由西北农林科技大学大白菜研究室提供。BIOZOL 试剂为博日生物技术公司产品。锚定引物及随机引物由上海 Sangon 公司合成,DDRT-PCR 优化体系用的锚定引物 B0213 序列为 5'-TTTTTTTTTTTTTTTA-3' (oligod13TA),随机引物 B0305 序列为 5'-GGAACCAATC-3'。RQ1 DNase I 及反转录酶为 Promega 公司产品, *Taq* 酶为华美公司产品。所用研钵及玻璃器皿在 160 ℃下烘 8 h 以上;所用试剂均为新开封或经 DEPC 处理过夜、高压灭菌后的双蒸水配制;离心管等塑料制品均用 1 mL/L DEPC 水浸泡过夜、高压灭菌除去

DEPC 后使用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取方法的比较 称取 0.205 g 萝卜茎叶鲜样及 0.361 g 萝卜花蕾鲜样,采用酸性酚-异硫氰酸胍-氯仿提取法(异硫氰酸胍法)及 BIOZOL 试剂提取 RNA,异硫氰酸胍法的提取流程参考张凤等^[14]的方法,BIOZOL 试剂操作流程参考说明书进行。取 1 μL RNA 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶检测,另取 1 μL 在 ND-1000 型微量紫外分光光度计上测 OD 值及质量浓度,其余在 -20 ℃保存备用。RNA 提取量 = (RNA 质量浓度 × RNA 总体积) / 试材质量。

1.2.2 RNA 的纯化 取总 RNA 50 μg, RNasin 40 U, RQ1 DNase I (1 U/μL) 30 U, 1 × Buffer, 加 DEPC 水至 100 μL, 在 37 ℃下反应 30 min, 然后加 300 μL V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 混合液, 混合后振荡, 再加 300 μL DEPC 水, 在冰上放置 15 min 后, 4 ℃下 12 000 r/min 离心 15 min, 吸上清转入另一离心管中, 加等体积异丙醇于 -20 ℃沉淀 2 h 以上, 10 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 沉淀用体积分数 75% 乙醇洗涤 2 次, 干燥 10 min 后用 20 μL DEPC 水溶解。

1.2.3 RNA 的反转录 向 20 μL 体系中加入纯化后的总 RNA 1.5 μg 和锚定引物 6 μmol/L, 65~70 ℃水浴 5~10 min 后立即置于冰上 5 min, 依次加入 1 × Buffer, dNTPs 0.5 mmol/L, RNasin 20 U, 补充 DEPC 水至 19 μL, 30 ℃温育 6 min, 使引物退火, 然后加 M-MLV 200 U, 42 ℃温育 1 h, 70 ℃灭活 M-MLV 酶活性 15 min 后, 立即使用或者贮存于 -20 ℃备用。

1.2.4 DDRT-PCR 扩增体系的优化 选用锚定引物 oligodT13A 和随机引物 B0305 优化反应体系, 对 DDRT-PCR 反应中的 *Taq* 酶、Mg²⁺、dNTPs、引物及模板 DNA 用量 5 个因子分别进行优化。*Taq* 酶用量设 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 和 3 U 6 个水平; Mg²⁺ 浓度设 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.5, 2.8, 3.1, 3.4, 3.7, 4.0 和 4.3 mmol/L 11 个水平; dNTPs 浓度设 0.1, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275 和 0.3 mmol/L 8 个水平。参照刘列钊等^[15]锚定引物与随机引物用量 2:1 的配比, 设置 5 个处理(表 1)。模板 DNA 用量设 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 和 3.5 μL 7 个水平。

表 1 锚定引物与随机引物的用量
Table 1 Concentration combination of Anchor Primer and Random Primer μmol/L

引物 Primer	组合 Combinations				
锚定引物 Anchor Primer	1	1.5	2	2.5	3
随机引物 Random Primer	0.5	0.75	1	1.25	1.5

反应总体积 20 μL,于 PTC-200 型 PCR 仪上扩增。扩增程序为:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,45 ℃退火 2 min,72 ℃延伸 1 min,40 个循环;72 ℃延伸 7 min。

1.2.5 电泳 用 6%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)在 BIO-RAD 公司生产的 PowerpacTM Universal 型电泳仪上电泳检测 PCR 产物,120 V 恒电压电泳 6 h,银染法检测。染色时先用固定液(含体积分数 10%乙醇和 0.5%冰醋酸)固定 15 min,蒸馏水漂洗 2 次,再用染色液(1 g/L AgNO₃)染色 15 min,用 0.02 g/L Na₂S₂O₃ 漂洗 30 s 后,用显色液(15 g/L NaOH,4 g/L 甲醛)显影直至出现清晰条带,最后用蒸馏水停显。银染后用 BIO-RAD 公司生产的 GEL-DOC™-XR 型凝胶成像仪拍照分析。

2 结果与分析

2.1 两种 RNA 提取方法的比较

从图 1 可以看出,采用异硫氰酸胍法提取的萝卜 RNA 带型与用 BIOZOL 试剂提取的相似,可以清晰地看出 RNA 28 S、18 S 和 5 S 3 条谱带,而且带型完整,但异硫氰酸胍法的带型亮度较淡。由表 2 可见,BIOZOL 试剂 RNA 提取量多,其中由萝卜薹叶提取的 RNA 量为 588.6 μg/g,花蕾提取的 RNA 量为 900.2 μg/g,均高于异硫氰酸胍法提取的 RNA 量;两种方法提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 都

在 1.8~2.1。异硫氰酸胍法提取的 RNA OD_{260}/OD_{230} 偏低,且质量浓度小于 1 μg/μL,不符合反转录对 RNA 质量的要求;而 BIOZOL 试剂提取的 RNA OD_{260}/OD_{230} 较高,质量浓度大于 1 μg/μL,符合后续试验对 RNA 质量的要求。

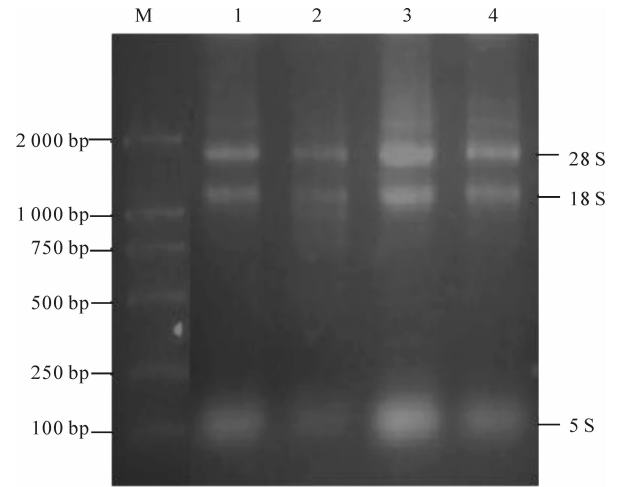


图 1 异硫氰酸胍法与 BIOZOL 试剂提取的萝卜花蕾及薹叶 RNA 的电泳结果比较

M. DL2000 Marker;1,3. BIOZOL 试剂;2,4. 异硫氰酸胍法
Fig. 1 Contrast of RNA extraction by guanidine thiocyanate method and BIOZOL reagent method
M. DL2000 Marker;1,3. BIOZOL reagent method; 2,4. Guanidine thiocyanate method

表 2 异硫氰酸胍法及 BIOZOL 试剂提取的萝卜 RNA 比较
Table 2 Contrast of RNAs extracted by guanidine thiocyanate method and BIOZOL

材料 Material	提取方法 Extraction method	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	RNA 质量浓度/ (μg · μL ⁻¹) Concentration	RNA 提取量/ (μg · g ⁻¹) Extraction concentration
花蕾 Flower bud	BIOZOL 试剂 BIOZOL reagent	2.06	1.88	1.800	900.2
	异硫氰酸胍法 Guanidine thiocyanate method	1.87	1.65	0.401	828.8
薹叶 Scape leaf	BIOZOL 试剂 BIOZOL reagent	2.09	2.02	1.962	588.6
	异硫氰酸胍法 Guanidine thiocyanate method	2.03	1.72	0.828	400.0

2.2 DDRT-PCR 扩增体系的优化结果

2.2.1 Taq 酶用量对 DDRT-PCR 扩增效果的影响 从图 2 可见,Taq 酶用量为 0.5~3 U 时,扩增的条带带型稳定、整齐,其中 Taq 酶用量为 0.5 U(泳道 1)及 1 U(泳道 2)时,虽然带型变化不大,但是扩

出的带浅,不利于结果分析;而 Taq 酶用量为 1.5~3 U(泳道 3~6)时,扩出的带深。因此,选择 1.5 U 为 Taq 酶最佳用量。

2.2.2 Mg²⁺ 浓度对 DDRT-PCR 扩增效果的影响 由图 3 可见,Mg²⁺ 浓度为 1.2 mmol/L(泳道 1)和

4.3 mmol/L(泳道 11)时,扩增不出条带; Mg^{2+} 浓度为 1.5~4.0 mmol/L(泳道 2~10)时,随着 Mg^{2+} 浓度增加,扩增条带先增加后减少; Mg^{2+} 浓度为 2.5~3.1 mmol/L(泳道 5~7)时,扩增效果明显优于 Mg^{2+} 浓度为 1.5,1.8 mmol/L(泳道 2,3)和 Mg^{2+}

浓度为 3.7,4.0 mmol/L(泳道 9,10),主带清晰稳定。因此,选择 Mg^{2+} 浓度为 2.8 mmol/L 为宜。 Mg^{2+} 浓度为 3.4 mmol/L(泳道 8)的带型明显不同于其他泳道,这可能是 DDRT-PCR 体系不稳定、假阳性率高的原因。

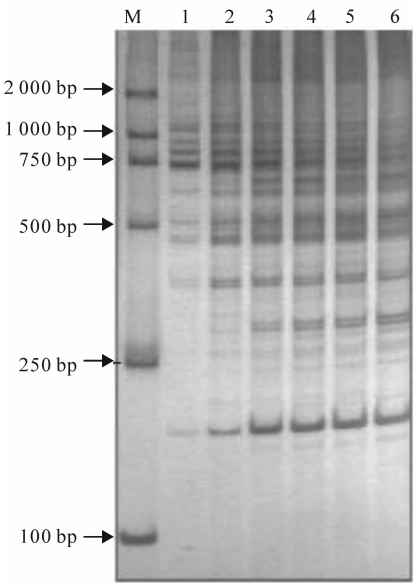


图 2 不同 *Taq* 酶用量的 DDRT-PCR 扩增结果
M. DL2000 Marker;1~6. *Taq* 酶用量
分别为 0.5,1.1,1.5,2.2,2.5 和 3 U

Fig. 2 Amplification results of DDRT-PCR under different *Taq* enzyme dosages

M. DL2000 Marker;1-6. 0.5,1.1,1.5,2.2,2.5 and 3 U dosage of *Taq* enzyme

2.2.3 dNTPs 浓度对 DDRT-PCR 扩增效果的影响 从图 4 可以看出,当 dNTPs 浓度为 0.1,0.15,0.175 和 0.2 mmol/L 时没有扩增出条带;dNTPs 浓度为 0.225,0.25 和 0.275 mmol/L 时扩增出丰富且相似的条带;dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L 时又不能扩增出条带,可能是高浓度 dNTPs 对 Mg^{2+} 产生抑制作用的结果。综合比较认为,dNTPs 浓度以 0.25 mmol/L 比较适宜。

2.2.4 引物用量对 DDRT-PCR 扩增效果的影响 由图 5 可以看出,锚定引物与随机引物用量不同,扩增效果差异明显,锚定引物/随机引物用量分别为 1 μ mol/L/0.5 μ mol/L(泳道 1),1.5 μ mol/L/0.75 μ mol/L(泳道 2)和 2 μ mol/L/1 μ mol/L(泳道 3)时,扩增条带少且不稳定;而锚定引物/随机引物用量分别为 2.5 μ mol/L/1.25 μ mol/L(泳道 4)和 3 μ mol/L/1.5 μ mol/L(泳道 5)时,扩增条带多且稳定。因此,取锚定引物用量为 2.5 μ mol/L 及随机引

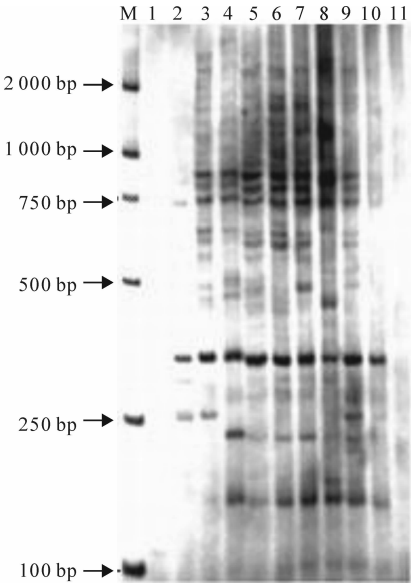


图 3 不同 Mg^{2+} 浓度的 DDRT-PCR 扩增结果
M. DL2000 Marker;1~11. Mg^{2+} 浓度分别为
1.2,1.5,1.8,2.1,2.5,2.8,3.1,3.4,3.7,4.0 和 4.3 mmol/L

Fig. 3 Amplification results of DDRT-PCR under different Mg^{2+} concentrations

M. DL2000 Marker;1-11. Mg^{2+} concentration is 1.2,1.5,1.8,2.1,2.5,2.8,3.1,3.4,3.7,4.0 and 4.3 mmol/L respectively
物用量为 1.25 μ mol/L 的引物组合为佳。

2.2.5 模板 DNA 用量对 DDRT-PCR 扩增效果的影响 由图 6 可见,模板 DNA 用量为 0.5~3.5 μ L 时,扩增出的带型相似,说明在试验范围内,模板 DNA 用量对扩增结果影响不大。本研究模板 DNA 用量采用 0.5 μ L。

综上所述,确定的萝卜 DDRT-PCR 优化体系为:10 $\times$ Buffer 2.5 mmol/L, Mg^{2+} 2.8 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, *Taq* 酶 1.5 U,锚定引物 2.5 μ mol/L,随机引物 1.25 μ mol/L,cDNA 0.5 μ L。

2.3 DDRT-PCR 扩增体系对萝卜、大白菜、油菜 cDNA 的扩增结果

应用优化的 DDRT-PCR 扩增体系进一步对大白菜和油菜的 cDNA 进行扩增(图 7),结果显示得到了较好的扩增结果,主带清晰,相同材料不同器官(叶片与花蕾)扩出的条带虽存在差异,但差异不大,而不同材料扩增的带型差异明显。

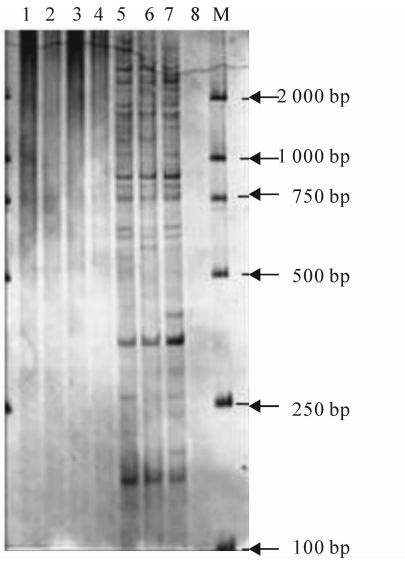


图 4 不同 dNTPs 浓度的 DDRT-PCR 扩增结果
M, DL2000 Marker;1~8, dNTPs 浓度分别为 0.1,0.15, 0.175,0.2,0.225,0.25,0.275 和 0.3 mmol/L
Fig. 4 Amplification results of DDRT-PCR under different dNTPs concentrations
M, DL2000 Marker;1~8, dNTPs concentration is 0.1,0.15, 0.175,0.2,0.225,0.25,0.275 and 0.3 mmol/L

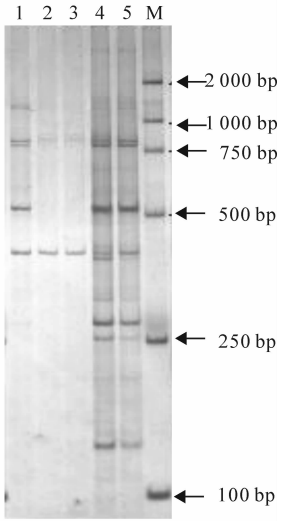


图 5 不同引物用量的 DDRT-PCR 扩增结果
M, DL2000 Marker;1~5, 锚定引物/随机引物分别为 1 μ mol/L/ 0.5 μ mol/L, 1.5 μ mol/L/0.75 μ mol/L, 2 μ mol/L/1 μ mol/L, 2.5 μ mol/L/1.25 μ mol/L 和 3 μ mol/L/1.5 μ mol/L
Fig. 5 Amplification results of DDRT-PCR under different primer concentrations
M, DL2000 Marker;1~5, Anchor Primer/ Random Primer is 1 μ mol/L/ 0.5 μ mol/L, 1.5 μ mol/L/0.75 μ mol/L, 2 μ mol/L/1 μ mol/L, 2.5 μ mol/L/1.25 μ mol/L and 3 μ mol/L/1.5 μ mol/L respectively

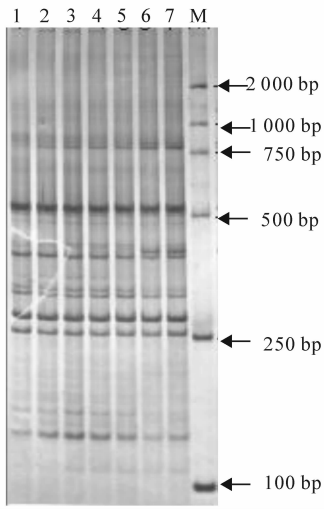


图 6 不同模板 DNA 用量的 DDRT-PCR 扩增结果
M, DL2000 Marker;1~7, cDNA 用量分别为 0.5,1,1.5,2,2.5,3 和 3.5 μ L
Fig. 6 Amplification results of DDRT-PCR under different DNA dosages
M, DL2000 Marker;1~7; cDNA dosage is 0.5,1, 1.5,2,2.5,3 and 3.5 μ L respectively

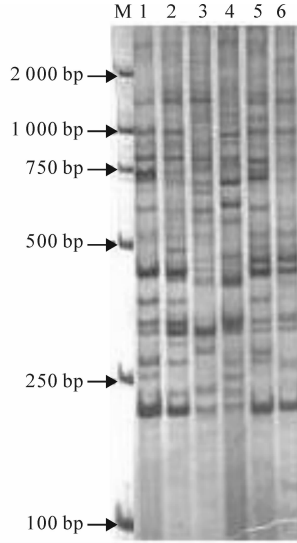


图 7 DDRT-PCR 体系对萝卜、大白菜和油菜薹叶及花蕾 cDNA 的扩增结果
M, DL2000 Marker;1~6, 分别为萝卜、大白菜和油菜薹叶及花蕾的 cDNA 扩增结果(从左到右)
Fig. 7 DDRT-PCR result of leaf and bud from Radish, Chinese Cabbage and Rape
M, DL2000 Marker;1~6, DDRT-PCR result of leaf and bud from Radish, Chinese Cabbage and Rape(from left to right)

3 讨 论

在 mRNA 差异显示技术中, RNA 的提取质量与后续 DDRT-PCR 试验的成败关系密切。为了快速得到量大质好的 RNA, 本研究对张战凤等^[14]改进的异硫氰酸胍法与 BIOZOL 试剂提取的萝卜 RNA 进行了比较。结果表明, 两种方法提取的 RNA 带型相似, 可以清晰地看出 RNA 28 S、18 S 和 5 S 3 条谱带, 而且带型完整。在 28 S 及 18 S 带的上下有一些条带存在, 可能为一些构型不同的 RNA 电泳结果, 点样孔较亮表明可能有蛋白质、酚类、糖类等物质残留, 而参照 OD_{260}/OD_{280} 值推测不是蛋白质的污染, 可能为酚类及多糖的污染。后续试验证明, 这些残留物并不影响试验结果。用 BIOZOL 试剂提取的 RNA 量也较多。此外, 两种方法提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 都在 1.8~2.1。用异硫氰酸胍法提取的 RNA OD_{260}/OD_{230} 偏低, 说明该法所提 RNA 有异硫氰酸胍等无机离子残留, 而且质量浓度小于 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 不符合反转录对 RNA 质量的要求。而 BIOZOL 试剂提取的 RNA OD_{260}/OD_{230} 较高, 没有无机离子污染, 质量浓度大于 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 符合后续试验对 RNA 质量的要求。据此认为选用试剂公司开发的 RNA 提取试剂 (BIOZOL 试剂) 提取的 RNA 质好量大, 可节省时间及试验成本。

目前, 有关萝卜 mRNA 差异显示体系优化方面的报道较少^[12-13], 笔者利用已报道的体系进行试验但不能重复, 因此进行了 DDRT-PCR 的 5 个影响因子优化试验, 得到了不同于前人的研究结果。

在 DDRT-PCR 中, *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTPs、模板 DNA、锚定引物与随机引物的合理配比均明显影响扩增结果^[16-17]。本研究通过对 *Taq* 酶用量进行优化, 确定其最佳用量为 1.5 U, 与黄浩等^[12] 的 1 U 用量不同, 但是 *Taq* 酶用量并非越大越好, 过大则会引起非特异扩增, 加大结果分析的难度。在本研究中, 1 U 的 *Taq* 酶用量致使部分条带扩不出来, 而用量大于 1.5 U 则背景过深, 因此选用 1.5 U 的用量; 对 Mg^{2+} 浓度的优化试验发现, Mg^{2+} 浓度在 2.5~3.1 mmol/L 时均可取得较好的扩增效果, Mg^{2+} 浓度过大, 假阳性率高, 过低则可能受 dNTPs 抑制, 无法得到稳定重复的扩增条带, 采用 2.8 mmol/L Mg^{2+} 浓度能得到比较理想的扩增效果, 该结果与张惠蓉等^[13] 的 1.5 mmol/L 用量不同; 对 dNTPs 浓度进行优化发现, dNTPs 浓度过多或过少都得不到理想的扩增结果, 可能是 dNTPs 过少受

Mg^{2+} 抑制, 过多则抑制 Mg^{2+} , 只有二者合理组配才能得到理想的扩增结果。在 PCR 过程中, Mg^{2+} 和 dNTPs 是两个关键的影响因子, 在本研究 dNTPs 浓度的优化过程中, 浓度不适宜则完全扩不出条带, 优选的 0.25 mmol/L dNTPs 浓度大于黄浩等^[12] 的 0.1 mmol/L dNTPs 浓度。采用刘列钊等^[15] 的锚定引物与随机引物用量按 2:1 配比, 经优化确定锚定引物用量为 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 随机引物用量为 1.25 $\mu\text{mol/L}$, 在 mRNA 差异显示过程中取得了较好的扩增效果, 这也不同于黄浩等^[12] 的锚定引物为 1 $\mu\text{mol/L}$, 随机引物为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的用量。刘列钊等^[15] 为了获得高产量的扩增产物, 加大了 dNTPs 与上、下游引物的用量, 在 mRNA 差异显示中得到了比较好的试验结果, 笔者也得到了相同的结论。此外, 本研究通过优化体系扩增的高分辨率片断长度在 100~1 000 bp, 与黄浩等^[12] 100~380 bp 的结果不同, 说明优化的体系较前人具有更高的扩增效率。

张惠蓉等^[13] 认为, 不同研究材料间反应体系存在差异。本研究以萝卜为试验材料优化得到的体系, 在大白菜及油菜中均获到了较满意的扩增结果, 这与前人的观点不同。

[参考文献]

- [1] Hubank M, Bryntesson F, Schatz D G. Cloning of apoptosis-related genes by representational difference analysis of cDNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 282: 255-273.
- [2] Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B. Serial analysis of gene expression [J]. *Science*, 1995, 270: 484-487.
- [3] Rebrikov D V, Desai S M, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 258: 107-134.
- [4] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257: 967-971.
- [5] 王风华, 赖钟雄, 郑金贵, 等. 龙眼体细胞胚胎发生过程的基因差异表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(6): 703-708.
Wang F H, Lai Z X, Zheng J G, et al. Differential gene expression in process of somatic embryogenesis in Logan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(6): 703-708. (in Chinese)
- [6] Vielle J P, Nuccio M L, Budiman M A, et al. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32(6): 1085-1092.
- [7] 于冰, 张绍军, 李海英, 等. 甜菜无融合生殖系花期表达基因的差异分析 [J]. *中国糖料*, 2003(1): 14-17.
Yu B, Zhang S J, Li H Y, et al. Foundation of the gene difference analysis experiments system expressed by flowering phase in sugar beet apomixes [J]. *Sugar Crops of China*, 2003(1): 14-

17. (in Chinese)

[8] 陈永华,赵 森,严钦泉,等. 利用差异显示法研究水稻耐淹涝相关基因 [J]. 农业生物技术学报,2006,14(6):894-898.
Chen Y H,Zhao S,Yan Q Q,et al. Studies on genes related to submergence tolerant using differential display technique in rice [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2006,14(6):894-898. (in Chinese)

[9] 冯志勇,米朔甫,陈明杰,等. 低温胁迫下香菇基因表达差异研究 [J]. 应用与环境生物学报,2006,12(5):614-617.
Feng Z Y,Mi S F,Chen M J,et al. Differences of gene expression in mycelin of lentinula edodes under cold stress [J]. Chin J Appl Environ Bio,2006,12(5):614-617. (in Chinese)

[10] 易图永,张宝玺,谢丙炎,等. 利用差异显示技术克隆辣椒抗疫病相关 DNA 序列的研究 [J]. 中国蔬菜,2005(12):11-13.
Yi T Y,Zhang B X,Xie B Y,et al. Cloning of the genes resistant to phytophthore capsici in pepper by using the differential display technique [J]. China Vegetables,2005(12):11-13. (in Chinese)

[11] Qin Q M,Zhang Q,Zhao W S,et al. Identification of a lectin gene induced in rice in response to *Magnaporthe grisea* infection [J]. Acta Botanica Sinica,2003,45(1):76-81.

[12] 黄 浩,柳李旺,龚义勤,等. 萝卜总 RNA 提取与 mRNA 差异显示技术 [J]. 植物生理学通讯,2004,40(4):483-486.
Huang H,Liu L W,Gong Y Q,et al. The total RNA extraction and mRNA differential display technique in Radish(*Raphanus sativus*) [J]. Plant Physiology Communications,2004,40(4):483-486. (in Chinese)

[13] 张惠蓉,龚义勤,柳李旺,等. 萝卜 mRNA 差异显示技术反应体系的优化及应用 [J]. 江苏农业科学,2007(1):76-80.
Zhang H R,Gong Y Q,Liu L W,et al. Optimization and application of mRNA differential display technique reaction system in Radish [J]. Jiangsu Agricultural Sciences,2007(1):76-80. (in Chinese)

[14] 张战凤,张鲁刚,王 绮. 大白菜花蕾总 RNA 有效、快速提取的方法 [J]. 农业生物技术学报,2006,14(1):145-146.
Zhang Z F,Zhang L G,Wang Q. An effective quick protocol for total RNA isolation from flower bud of Chinese cabbage [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2006,14(1):145-146. (in Chinese)

[15] 刘列钊,栗茂腾,王 灏,等. 利用 mRNA 差异显示技术寻找甘蓝型油菜黄籽基因 [J]. 中国农业科学,2004,37(11):1772-1776.
Liu L Z, Li M T,Wang H, et al. Studies of yellow-seeded gene in *Brassica napus* with mRNA differential display [J]. Scientia Agricultura Sinica,2004,37(11):1772-1776. (in Chinese)

[16] 黄 浩. 萝卜细胞质雄性不育细胞学与分子标记的初步研究 [D]. 南京:南京师范大学,2004.
Huang H. Cytology and preliminary molecular mapping for cytoplasmic male sterility (CMS) in Radish (*Raphanus sativus*) [D]. Naging: Naging Normal University,2004. (in Chinese)

[17] 王跃进,张今今. 葡萄银染 mRNA 差异显示分析体系的建立及优化 [J]. 农业生物技术学报,2005,13(2):254-255.
Wang Y J,Zhang J J. Establishment and optimization of sliver staining differential display in grape [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2005,13(2):254-255. (in Chinese)

(上接第 127 页)

[7] 李晓林. 低温和植物生长调节剂对桃花粉萌发的影响 [J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2005,27(4):526-529.
Li X L. The influence of low temperature and plant growth regulators on peach pollen germination [J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science Edition,2005,2(4):526-529. (in Chinese)

[8] 李 蕾,Jacob H,Reinke J. 植物生长调节剂 BAS-125-10W 对梨枝条生长控制效应的研究 [J]. 海南师范学院学报:自然科学版,2003,16(4):60-63.
Li L,Jacob H,Reinke J. Effects of a new plant growth regulator “BAS-125-10W” on the shoot growth of pear [J]. Journal of Hainan Normal University: Natural Science Edition,2003,16(4):60-63.

[9] 魏海蓉,高东升,李宪利. 植物生长调节剂对甜樱桃休眠的调控及花芽酚类物质含量的影响 [J]. 园艺学报,2005,32(4):584-588.
Wei H R,Gao D S,Li X L. Effects of plant growth regulators on the content of phenolics in sweet cherry dormant flower buds and dormancy [J]. Acta Horticulturae Sinica,2005,32(4):584-588.

[10] Steer W M,Steer J M. Pollen tube tip growth [J]. New Phytol,1989(111):323-358.

[11] 韩宏伟,王建友,张永威. 植物生长调节剂对巴旦杏保花保果效应的研究 [J]. 新疆农业科学,2001,38(2):66-68.
Han H W,Wang J Y,Zhang Y W. Effects of plant regulators on protecting flower and fruit in almond [J]. Xinjiang Agricultural Sciences,2001,38(2):66-68.

[12] 刘星辉,林 倩,蔡 宇. 提高荔枝花粉萌发率的研究 [J]. 福建农业科技,1983(3):26-28.
Liu X H,Lin Q,Cai Y. Study of enhancing pollen germination rate in lich [J]. Fujian Agriculture and Tecnology,1983(3):26-28.

[13] 张 义,王亚莉,陈俊才. 低温及药剂处理对李花粉生活力的影响 [J]. 湖北农学院学报,2003,23(4):248-250.
Zhang Y,Wang Y L,Chen J C. Effect of low temperature and chemicals on vitality of plum pollen [J]. Journal of Hubei Agricultural College,2003,23(4):248-250.

[14] 岩波洋造. 花粉学 [M]. 东京:讲谈社,昭和 55,1980:58-73.

[15] 成健红,谭敦炎,李 疆,等. 巴旦杏授粉试验及花粉管生长的荧光显微观察 [J]. 西北植物学报,2001,21(5):894-899.
Cheng J H,Tan D Y,Li J,et al. Studies on pollination experiment and the growth of pollen tube under fluorescent microscope on almond [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin,2001,21(5):894-899.