

影响芥蓝×甘蓝 RAPD 标记稳定性的外部条件优化研究^{*}

陈书霞^{1a}, 房玉林^{1b}, 王晓武²

(1 西北农林科技大学 a 园艺学院, b 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农科院 蔬菜花卉研究所, 北京 100086)

[摘 要] 通过对影响 RAPD 标记稳定性的引物浓度梯度、退火温度梯度、dNTP 浓度梯度、Taq 酶浓度梯度等外部条件的优化研究, 确定了 RAPD 反应适宜的引物浓度为 0.1~0.2 pmol/μL, 退火温度为 48~52 °C, dNTP 浓度为 0.3~0.15 mmol/L 及 Taq 酶浓度为 0.3 U/μL, 提高了该反应体系中 RAPD 的稳定性。

[关键词] RAPD; 引物浓度梯度; 退火温度梯度; dNTP 浓度梯度; Taq 酶浓度梯度

[中图分类号] S635.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0103-04

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记技术是 Williams 于 1990 年在 PCR (polymerase chain reaction) 基因扩增技术的基础上发展起来的一种新的标记方法^[1]。由于 RAPD 使用随机引物和低退火温度, 允许引物与模板适当的错配, 从而增大了引物在基因组 DNA 中配对的随机性, 提高了基因组分析的效率。目前, RAPD 标记技术已广泛应用于蔬菜学研究的许多方面, 如品种纯度鉴定^[2,3]、遗传图谱构建^[4~6]、基因定位^[7]等。但 RAPD 使用较短引物, 致使标记的可重复性及稳定性较差, 因此在进行具体实验时必须严格优化其外部条件, 同时尽可能改善其内部因素, 以提高标记的稳定性和特异性^[2], 使 RAPD 的应用范围更加广泛。所以建立某种蔬菜的 RAPD 反应条件之后, 必须进行外部条件的优化, 以使该操作变得简便、快速^[8], 且在不同的实验室通用。为了提高所用标记的特异性和稳定性, 本研究在利用 RAPD 标记构建芥蓝×甘蓝 F₂ 群体分子标记连锁图^[5]时, 进行了 RAPD 标记外部条件的优化研究, 得到了一个稳定的 RAPD 反应体系。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用材料由中国农科院蔬菜花卉研究所

甘蓝组提供。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取方法参照王晓武^[9]的方法。DNA 质量浓度用琼脂糖凝胶电泳法测定。根据 DNA 质量浓度测定值将所有样品质量浓度调整到 40 ng/μL。

1.3 RAPD 扩增

RAPD 扩增引物选用 Operon 公司的 10 bp 寡聚核苷酸随机顺序引物; 仪器用 PE9600 型 PCR 仪; Taq 酶购自鼎国生物技术的发展中心。RAPD 反应混合液包括 10×PCR 反应缓冲液 2 μL, Taq DNA 聚合酶 6 个单位, 模板 DNA 20 ng, 10 bp 随机引物 8 pmol, dNTP 200 mmol/L, 纯水补至 20 μL。反应程序参照王晓武等^[17]所用程序并略有调整。RAPD 基本反应程序为 95 °C 3 min, 然后 36 °C 30 s, 72 °C 80 s, 92 °C 20 s, 40 个循环。PCR 扩增完成后, 样品加入 3 μL 15% Ficoll 400 加样缓冲液, 混匀, 取 8 μL 进行 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳用简易银染法染色之后, 用数码相机拍照, 直接输入计算机。

1.4 浓度梯度设置

以亲本 P1 的 DNA 为模板, 在反应体系中设置引物浓度(终浓度)梯度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 pmol/μL, dNTP 浓度(终浓度)梯度分

^{*} [收稿日期] 2004-11-10

[基金项目] 农业部 948 项目(991055); 蔬菜遗传与生理重点实验室资助项目

[作者简介] 陈书霞(1971-), 女, 河南临颖人, 讲师, 博士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

[通讯作者] 王晓武(1966-), 男, 江西于都人, 副研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种及生物技术研究。

别为 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 mmol/L, Taq 酶浓度梯度分别为 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 U/μL, 退火温度梯度为 36, 40, 44, 48, 52, 55 °C, 其他条件同 1.3。

2 结果与分析

2.1 引物浓度梯度对 RA PD 扩增结果的影响

在反应体系中设置了不同的引物浓度梯度, 以

分析其对扩增反应结果的影响。从图 1 可以看出, 当引物浓度在 0.1 pmol/μL 时, 形成的扩增较弱, 只扩增出几条较强的谱带, 而引物浓度为 0.2 pmol/μL 时, 扩增效果较好; 当引物浓度增加到 0.4 pmol/μL 时, 扩增的谱带明显增多, 导致一些细小的非特异谱带增加, 而且随着引物浓度的增加, 非特异谱带的增加越多(图 1, 1~7 泳道)。试验结果表明, 引物浓度以 0.1~0.2 pmol/μL 为宜。

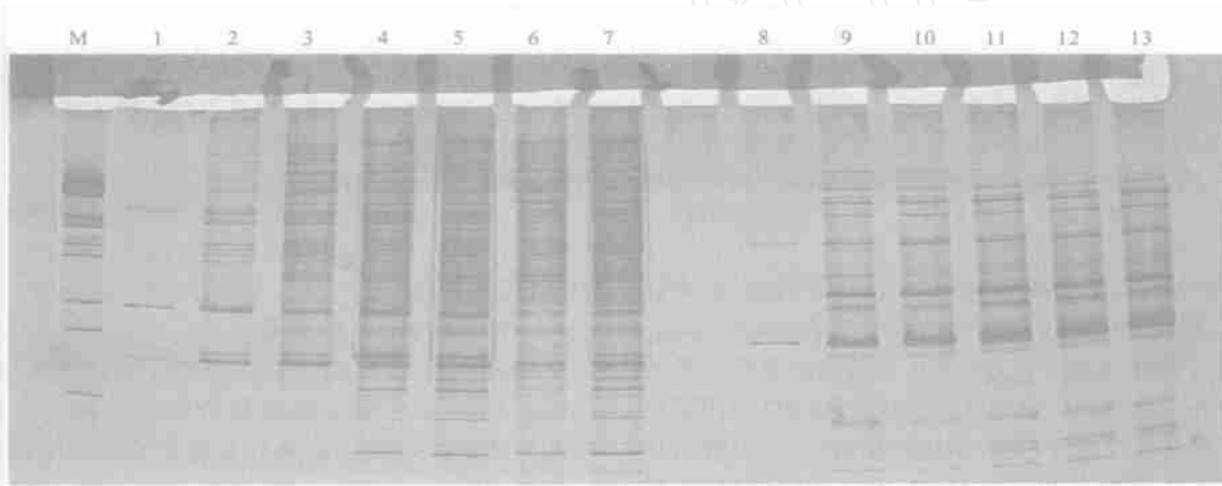


图 1 不同引物浓度梯度和退火温度梯度对 RA PD 扩增结果的影响

M. *H. indIII*+ *EcoR* I; 1~7. 引物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 pmol/μL, 所用引物为 A03;
8~13 退火温度分别为 55, 52, 48, 44, 40, 36 °C, 所用引物为 B01

Fig. 1 Effect of different primer concentration and annealing temperature on RA PD

M. *H. indIII*+ *EcoR* I; The concentration of primer of 1- 7 are 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 pmol/μL, respectively; the primer used is A03;
The temperate of 8- 13 55, 52, 48, 44, 40, 36 °C, the primer used is B01

2.2 退火温度梯度对 RA PD 扩增结果的影响

从图 1 中 8~13 泳道的电泳图片可以看出, 随着退火温度的升高, 谱带的数量明显减少, 当退火温度为 55 °C 时, 只扩增出两条主要的谱带(图 1 泳道 8), 几乎形不成有效的扩增。这说明随着退火温度的升高, 碱基之间配对的严谨性也提高, 从而使扩增的谱带数减少。当退火温度为 36 °C 时, 有较多的谱带扩出, 这说明碱基之间错配较多, 扩增的严谨度下降。从试验结果可以看出, 当退火温度在 36~52 °C 时, 都能够扩增出主要的目标条带, 但为了使试验有较高的严谨性, 可以适当提高退火温度。因此, 在实验中退火温度以 48~52 °C 为宜, 既扩增出了主要的目的条带, 又减少了非特异性谱带的产生。

2.3 dNTP 浓度梯度对 RA PD 扩增结果的影响

从图 2 可以看出, dNTP 浓度为 0.4 mmol/L 时, 扩增出的谱带较多, dNTP 浓度为 0.3~0.15 mmol/L 时, 扩增的主要谱带比较清晰, 而且非特异

谱带明显减少; 而浓度为 0.1 mmol/L 时, 可能是 dNTP 的浓度太低, 几乎形不成扩增。因此, 在实验中 dNTP 浓度以 0.3~0.15 mmol/L 为宜, 既扩增出了主要的谱带, 又减少了非目标谱带的产生。

2.4 Taq 酶浓度梯度对 RA PD 扩增结果的影响

从图 3 可以看出, 当 Taq 酶浓度为 0.8~0.6 U/μL 时, 扩增出的谱带较多, 随着 Taq 酶浓度下降, 扩增出的谱带减少, 当 Taq 酶浓度为 0.2 U/μL 时, 只能隐约扩增出几个扩增比较强的带, 而当 Taq 酶浓度为 0.4~0.3 U/μL 时, 扩增的谱带比较清晰, 非特异性谱带也减少。但出于节约的缘故, 可以将 Taq 酶的终浓度确定为 0.3 U/μL。

采用引物浓度为 0.1~0.2 pmol/μL, 退火温度为 48~52 °C, dNTP 浓度为 0.3~0.15 mmol/L 及 Taq 酶浓度为 0.3 U/μL 的反应体系, 利用 300 个随机引物对芥蓝 C₁₀₀₋₁₂ 和甘蓝秋 50-Y7 两个亲本多态性进行了 RA PD 检测, 并用筛选到的 150 多个多

态性引物对 F₂ 群体进行了多态性检测, 结果见图 4, 多次重复扩增都获得了一致的结果。以这些多态性引物在 F₂ 作图群体上产生的多态性带为基础构建了甘蓝的基本遗传图谱^[5]。

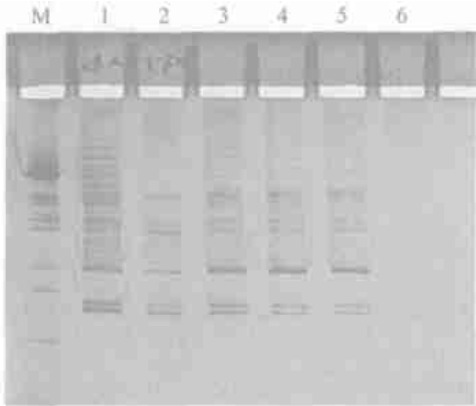


图 2 dNTP 浓度梯度对 RA PD 扩增结果的影响
M. *H. ind+* *EcoR* I; 1~ 6 dNTP 浓度分别为 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 mmol/L, 所用引物为 A03

Fig 2 Effect of different dNTP concentration on RA PD

A. *H. ind+* *EcoR* I; 1- 6 The concentration of dNTP is 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 mmol/L separately, the primer used is A03

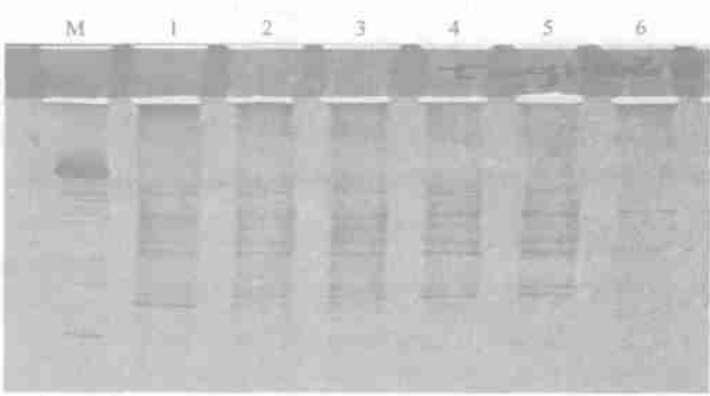


图 3 Taq 酶浓度梯度对 RA PD 扩增结果的影响
M. *H. ind+* *EcoR* I; 1~ 6 Taq 酶浓度分别为 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 U/μL, 所用引物为 A03

Fig 3 Effect of different Taq concentration on RA PD

M. *H. ind+* *EcoR* I; 1- 6 The concentration of Taq is 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 U/μL separately, the primer used is A03

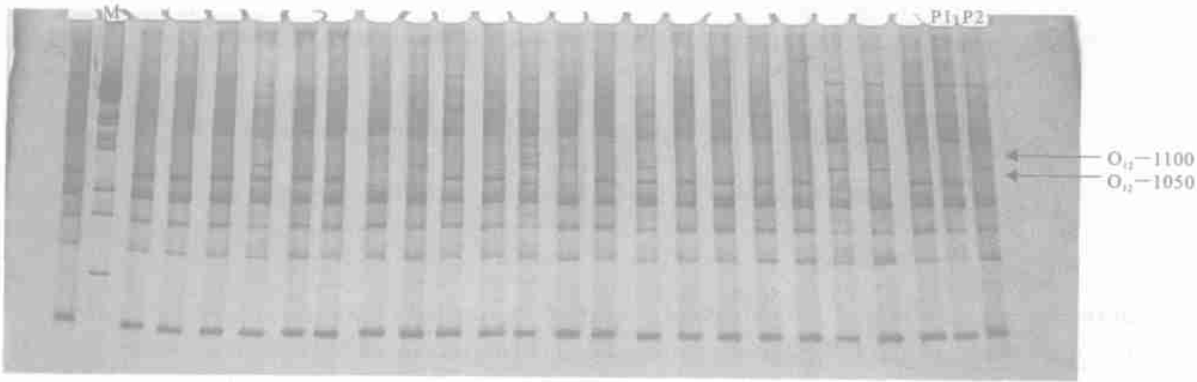


图 4 O₁₂ 在 47~ 72 单株中产生的多态性标记

M. *H. ind+* *EcoR* I; P1 芥蓝 C₁₀₀₋₁₂; P2 甘蓝秋 50-Y7; O₁₂-1100 和 O₁₂-1050 是由 O₁₂ 产生的多态性带

Fig 4 Markers produced between 47- 72 individuals by O₁₂

M. *H. ind+* *EcoR* I; P1. *B. oleracea* var. *capitata*; P2 *B. oleracea* var. *alboglabra*; O₁₂-1100 and O₁₂-1050 are polymorphic markers

3 讨 论

由于 RA PD 存在稳定性和重复性差, 易于产生假阳性等缺点, 在试验时必须严格优化其外部条件, 同时尽可能对其内部因素进行改善, 以提高其稳定性和特异性。

在引物与模板结合阶段, 模板浓度的大小、退火温度的高低都影响 RA PD 反应的结果。在链的延伸阶段, Mg²⁺ 浓度、Tag 酶浓度、dNTP 浓度、缓冲体

系的浓度以及所形成的引物模板复合体的数量等外部条件都会影响 RA PD 反应的特异性和稳定性。本研究表明, 引物浓度为 0.1~ 0.2 pmol/μL, 退火温度为 48~ 52 °C, dNTP 浓度为 0.3~ 0.15 mmol/L, Taq 酶浓度为 0.3 U/μL 时, 扩增的效果较好。吴少华等^[10]、蒲淑萍等^[11]对 RA PD 条件优化的研究中也得到相似结论。如蒲淑萍等^[11]研究认为, dNTP 浓度以 0.15 mmol/L, Taq 酶的终浓度为 0.15 U/μL, 引物浓度为 0.2 pmol/μL, 退火温度 38

°C左右扩增效果较好。但退火温度太低容易造成碱基误配,形成非特异扩增,对这一点应该进行认真商榷。

前人在改进 RA PD 反应的外部条件上已经总结出比较严谨的反应体系,但这些外部条件的改进只能在一定程度上提高 RA PD 的稳定性和特异性,对于特定的反应必须有特定的反应条件。因此,为了

提高利用 RA PD 方法构建芥蓝×甘蓝分子标记连锁图的通用性,本研究必须进行外部反应条件的优化,以获得稳定扩增的目标条带。与此同时,还要选用 ER PAD 或 Scar 等方法进行 RA PD 内部条件的优化。从而特异地提高特征谱带,消除非目的谱带^[12]。

[参考文献]

- [1] Williams J G K, Van Zandvoort P, Van E C K, et al DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531- 6535
- [2] Hu J, Quiros F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RA PD markers[J]. Plant Cell Rep, 1991, 10(10): 505- 511
- [3] 黄三文, 张宝玺, 郭家珍, 等. 辣椒 RA PD 系统的建立及在杂种纯度鉴定中的应用[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 77- 79
- [4] 张鲁刚, 王 鸣, 陈 杭, 等. 中国白菜 RA PD 分子图谱的构建[J]. 植物学报, 2000, 42(5): 485- 489
- [5] 陈书霞, 王晓武, 方智远, 等. RA PD 标记构建芥蓝×甘蓝分子标记连锁图[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 229- 232
- [6] Song K M, Suzuki J K, Slocum M K, et al A linkage map of *B rassic a rap a* (syn. *Campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci[J]. Theor Appl Genet, 1991, 82: 296- 304
- [7] 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 RA PD 标记[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 197- 198
- [8] 范丙友, 刘玉梅, 高水平. RA PD 技术在我国主要蔬菜遗传育种研究中的应用[J]. 中国蔬菜, 2002, (3): 55- 56
- [9] 王晓武. 甘蓝显性雄性不育基因的分子标记及延长随机引物扩增 DNA 标记的建立[D]. 北京: 中国农科院蔬菜花卉研究所资料室, 1998 23- 25
- [10] 吴少华, 张大生, 潘东明, 等. 木奈基因组 DNA 的提取及 RA PD 条件优化[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1): 51- 55
- [11] 蒲淑萍, 王 希, 段昌柱. PCR 的建立及优化研究[J]. 重庆医科大学学报, 2001, 26(4): 436- 440
- [12] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 甘蓝显性雄性不育基因的延长随机引物扩增 DNA (ER PAD) 标记[J]. 园艺学报, 1999, 26(1): 23- 27

Optimizing conditions affecting the stability of RA PD

CHEN Shu-xia^{1a}, FANG Yu-lin^{1b}, WANG Xiao-wu²

(1 a College of Horticulture, b College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Vegetable Crops, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100086, China)

Abstract: Factors that affect the stability of RA PD were optimized such as primer concentration grads, annealing temperature grads, dNTP concentration grads and taq concentration grads. The proper concentration of primer was 0.1- 0.2 pmol/μL, the proper annealing temperature 48- 52 °C, the proper concentration of dNTP 0.3- 0.15 mmol/L, the proper Taq concentration 0.3 U/μL. and the stability of RA PD was enhanced in this system.

Key words: RA PD; primer concentration grads; annealing template concentration grads; dNTP concentration grads; Taq concentration grads