朱鹮 RMAPD 扩增体系的正交试验优化*

张永德[1],范光丽[1],雷初朝[1],常秀云[2],张军凤[2],陈 宏[1]
(1. 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省林业厅,陕西 西安 710000)

[摘 要] 采用正交试验设计,从 Mg^{2+}、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、微卫星引物和随机引物浓度等方面对朱鹮 RMAPD 扩增体系进行了优化。结果表明,朱鹮 RMAPD 扩增的最佳体系为:10 ×Buffer 2.0 μL,$MgCl_2$ 3.13 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1 U,dNTP 0.10 mmol/L,微卫星引物 0.20 μmol/L,随机引物 0.50 μmol/L,模板 DNA 3.75 mg/L,最后补 ddH_2O 至 20 μL。将该体系用于朱鹮 RMAPD 分析,得到了重复性和稳定性良好的朱鹮 RMAPD 试验结果。

[关键词] 朱鹮;RMAPD;扩增体系;正交试验设计
[中图分类号] S818.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)07-0028-05

Orthogonal experiment optimization of RMAPD in crested ibis

ZHANG Yong-de[1], FAN Guang-li[1], LEI Chu-zhao[1], CHANG Xiu-yun[2], ZHANG Jun-feng[2], CHEN hong[1]
(1 *College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*; 2 *The Forestry Department of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi* 710000, *China*)

Abstract: $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment design was performed with 5 factors of the concentration of Mg^{2+}, *Taq* DNA polymerase, dNTP and primers for the RMAPD reaction system in crested ibis. The results indicated that the RMAPD reaction system in crested ibis was 10 ×Buffer 2.0 μL, $MgCl_2$ 3.13 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 1 U, dNTP 0.10 mmol/L, microsatellite primer 0.20 μmol/L, random primer 0.50 μmol/L, template DNA 3.75 mg/L, and adding ddH_2O to 20 μL. Results of RMAPD in crested ibis with good repeatability and stability were obtained by using the optimized reaction system.

Key words: crested ibis (*Nipponia Nippon*); RMAPD; reaction system; orthogonal experiment design

朱鹮是世界极濒危鸟类,曾广泛分布于日本、朝鲜、中国和俄罗斯等地。由于人为捕杀和栖息地的不断丧失,其野生种群到 20 世纪中叶已濒临灭绝[1]。1981 年,在陕西洋县发现了朱鹮,但其种群数量只有 7 只[1],目前洋县人工饲养的朱鹮种群就是由这 7 只发展而来的。较小的群体和频繁的近交,导致朱鹮群体出现一些死胚和畸形个体。利用现代分子生物学方法对这一濒危物种的遗传多态性和遗传背景进行研究,对于科学地指导朱鹮的保护和扩繁工作具有重要意义。

由于 RAPD 和微卫星等分子标记能够从 DNA 水平上检测遗传差异,且标记位点数目多、范围广,又不受环境条件的影响,因而受到普遍青睐,并已在朱鹮上得到应用,如范光丽等[2]、雷初朝等[3]、刘斌等[4]和李军林等[5]分别利用 RAPD 标记技术对朱鹮进行了亲缘关系鉴定。雷初朝[3]、JI Ya-jie 等[6]利用微卫星标记对朱鹮亲缘关系进行了鉴定,但由于 RAPD 对扩增体系要求严格,而微卫星研究需要筛选或设计特异性的引物来扩增[7],因而限制了其在许多珍稀物种中的应用。受随机扩增微卫星多态

* [收稿日期] 2006-05-31
[基金项目] 国家自然科学基金项目(No 3007093);陕西省自然科学基金项目(No 2001SM14);陕西省林业厅野生动物救护基金项目
[作者简介] 张永德(1977 -),男,山东潍坊人,在读博士,主要从事神经生物学研究。E-mail:yondar@126.com
[通讯作者] 范光丽(1943 -),女,山西太原人,教授,博士生导师,主要从事神经生物学研究。E-mail:guanglifan@yahoo.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性[8-9]的启发,张永德等[10]和蓝贤勇等[11]将随机引物与微卫星单引物结合起来扩增基因组 DNA,并将其命名为随机微卫星扩增 DNA 多态性(random microsatellite amplify polymorphic DNA,RMAPD)。研究表明,利用该方法分析朱鹮群体遗传多样性是可行的,且显示出了较为丰富的多态性,稳定性比 RAPD 得到了较大提高[10]。但由于 RMAPD 技术也是建立在 PCR 基础上,其稳定性易受扩增体系的影响,所以获得 PCR 最佳扩增体系显得尤为重要。目前,常用的 PCR 优化试验多采用多次单因素设计方法进行优化,但 PCR 反应受多种因素的影响,取其一而试之,难免顾此失彼,忽视互作效应,而正交试验设计可克服上述缺陷,容易发现各因素之间的内在规律,较快地找到最优的水平组合[12]。本试验利用正交试验设计,进行了 Mg^{2+}、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、微卫星引物和随机引物浓度 5 因素 4 水平试验,对朱鹮 RMAPD 扩增体系进行优化,从系统模型上探讨优化选择的方法,以期获得适合朱鹮 RMAPD 研究的 PCR 扩增体系,为今后朱鹮种群的遗传多样性研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　血样　43 只朱鹮血样采自陕西省洋县朱鹮保护观察站,-80 ℃保存。

1.1.2　试剂与仪器　Tris 饱和酚、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 和 SD004 Marker 等为鼎国生物公司产品,蛋白酶 K 为 Merk 公司产品。M-22R 低温高速冷冻离心机为 Biometro 公司产品,T gradient 96 PCR 仪为德国 Biometro 公司产品,Kodak DC120 凝胶成像系统为美国柯达公司产品。

1.2　朱鹮全血基因组 DNA 的提取

按常规的酚-氯仿法提取,DNA 经 8 g/L 琼脂糖电泳检测,紫外分光光度计确定浓度,稀释成 50 mg/L 备用。

1.3　引物的筛选

1.3.1　微卫星引物　参考文献[13]的扩增体系和扩增程序,利用其他物种的微卫星引物对 43 份朱鹮血样 DNA 进行 PCR 扩增。筛选出 1 对具有多态性产物的微卫星引物 *HEL*1F:5′-CAG TGA GAC GAT TAC CTT GG-3′; *HEL*1R:5′-AGG CTA CAG TCC ATG GGA TT-3′。

1.3.2　随机引物　参考文献[14]的扩增体系和扩增程序,从 30 个随机引物中筛选出 2 个随机引物 RB06:5′-GGT CTA CAC C-3′和 RA10:5′-CAA AGC GCT C-3′。

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4　朱鹮 RMAPD 正交试验因素及水平的选定

由于试验的影响因素多,在一次试验中不可能研究全部因素,可选择几个主要因素进行分析,对于同一因素所选取的不同水平及其水平间隔,依据以往的经验及实际情况来定。本研究选择了 Mg^{2+} 浓度(A)、*Taq* DNA 聚合酶用量(B)、dNTP 浓度(C)、微卫星引物浓度(D)和随机引物浓度(E)5 个因素,每因素设 4 个水平,采用正交表设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,详见表 1。

表 1　朱鹮 RMAPD 扩增 $L_{16}(4^5)$ 正交试验的设计

Table 1　Orthogonal experiment design scheme of $L_{16}(4^5)$ of RMAPD in crested ibis

组别 Groups	因素 Factors				
	A/(mmol·L⁻¹)	B/U	C/(mmol·L⁻¹)	D/(μmol·L⁻¹)	E/(μmol·L⁻¹)
1	1(1.88)	1(0.50)	1(0.10)	1(0.10)	1(0.20)
2	1	2(0.75)	2(0.15)	2(0.20)	2(0.30)
3	1	3(1.00)	3(0.20)	3(0.30)	3(0.40)
4	1	4(1.25)	4(0.25)	4(0.40)	4(0.50)
5	2(2.50)	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3(3.13)	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4(3.75)	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

1.5　朱鹮 RMAPD 正交试验

按表 1 设计的正交试验进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系中含有模板 DNA(50 ng/μL)1.5 μL,其余试剂按表 1 设计添加,最后补 ddH_2O 至 20 μL。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

RMAPD 的 PCR 反应程序参考文献[15]中介绍的“对称 PCR”方法并稍作修改:95 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,94 ℃变性 30 s,36 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,电压为 5～6 V/cm,电泳缓冲液为 0.5 ×TBE,电泳 0.5～1 h 后在凝胶成像系统上检测结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 朱鹮全血基因组 DNA 的提取结果

朱鹮全血基因组 DNA 提取结果见图 1。从图 1 可以看出,DNA 提取效果较好,无降解,可用于朱鹮 RMAPD 正交试验分析。

2.2 朱鹮 RMAPD 扩增体系的正交试验结果

由图 2 可知,1、2 组试验无任何扩增条带;3、9、16 组试验条带数少,且不清晰,重复性差;8 和 11 组试验条带数较多,带型清晰,重复性好。最后确定第 11 组 $A_3B_3C_1D_2E_4$ 为朱鹮 RMAPD 的最佳扩增体系,即 20 μL 体系中包含 10 ×Buffer 2.0 μL,$MgCl_2$ 3.13 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1 U,dNTP 0.10 mmol/L,微卫星引物 0.20 μmol/L,随机引物 0.50 μmol/L,模板 DNA 3.75 mg/L。

2.3 朱鹮基因组 RMAPD 的扩增

利用优化的扩增体系对 43 只朱鹮基因组 DNA 进行扩增,得到较理想的 RMAPD 扩增结果(图 3,图 4),琼脂糖凝胶电泳带纹清晰,重复性和稳定性好。

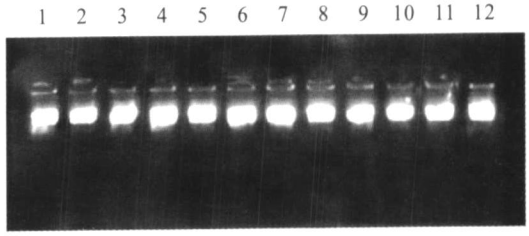

图 1 朱鹮全血基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果
1～12. 分别为 12 份朱鹮基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of crested ibis genome DNA
1 - 12. Agarose gel electrophoresis results of genome DNA in 12 crested ibis

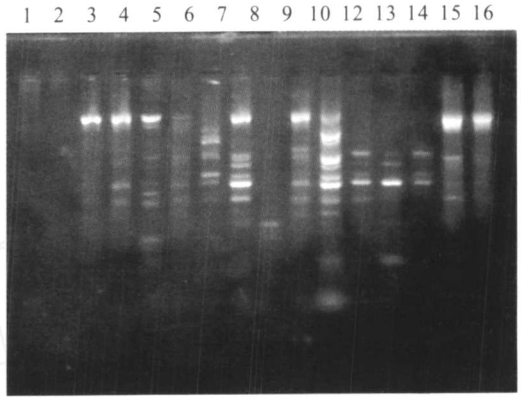

图 2 朱鹮 RMAPD 正交试验优化结果
1～16. 分别为 1～16 组正交试验扩增结果

Fig. 2 RMAPD optimized orthogonal design results of crested ibis
1 - 16. 16 groups RMAPD orthogonal design results of crested ibis

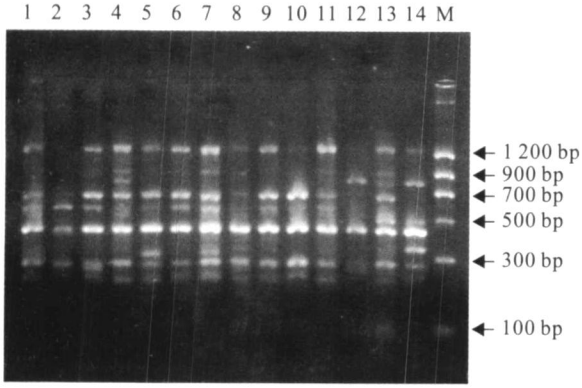

图 3 朱鹮 RMAPD(RA10 与 *HEL*1F)的扩增结果
1～14. 分别为 14 份朱鹮 RMAPD(RA10 与 HEL1F)扩增结果;M. SD004 Marker

Fig. 3 RMAPD amplified results of crested ibis (RA10 and *HEL*1F)
1 - 14. RMAPD amplified results of 14 crested ibis (RA10 and *HEL*1F); M. SD004 Marker

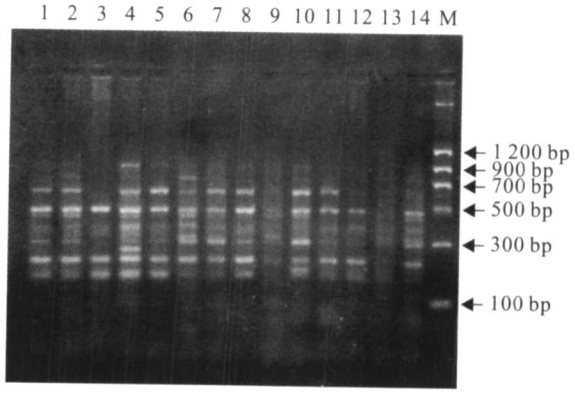

图 4 朱鹮 RMAPD(RB06 与 *HEL*1F)的扩增结果
1～14. 分别为 14 份朱鹮 RMAPD(RB06 与 *HEL*1F)扩增结果;M. SD004 Marker

Fig. 4 RMAPD amplified results of crested ibis (RB06 and *HEL*1F)
1 - 14. RMAPD amplified results of 14 crested ibis (RB06 and *HEL*1F); M. SD004 Marker

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨　论

3.1　正交试验用于 RMAPD 体系优化的合理性

RMAPD 是利用随机引物和微卫星的上游或下游引物一起作为扩增引物的一种分子标记方法。由于该标记方法中含有随机引物,故能影响 RAPD 的因素也可能影响 RMAPD。引物的种类、长度、浓度、DNA 的质量和浓度、扩增条件和操作技术等都可能影响 RAPD 的扩增结果,从而降低试验的重复性或出现错误的带纹[16-18],所以在进行遗传分析时,必须对 RMAPD 扩增体系进行优化和标准化,这样才能够得到可靠、稳定的结果。

正确、合理地选用试验设计方法,是快速获得良好分子生物学结果的前提,但迄今为止,PCR 扩增体系优化多采用单因素设计方法。事实上,多因素间的交互作用是影响 PCR 反应稳定性的重要原因之一。PCR 正交试验设计是研究多因素试验的一种有效设计方法,可以通过部分试验了解试验全面的情况和因素之间的内在规律,从中找出较优的处理组合。柳淑芳等[19]以 mRNA 差异显示 PCR 中模板 DNA 浓度、dNTP 浓度、Mg^{2+} 浓度、随机引物浓度、锚定引物浓度以及 *Taq* DNA 聚合酶用量为因素进行了 6 因素 4 水平的正交试验;王彦华等[20]利用正交试验设计对不结球白菜 ISSR 的扩增体系进行研究,均取得了理想的试验效果。本研究采用正交法优化朱鹮 RMAPD 扩增体系,考虑到 Mg^{2+}、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、引物等因素在 PCR 反应过程中的交互作用,一次 PCR 反应即可确定最佳扩增体系,简化了反应条件的优选程序,节省了时间,减少了试剂用量,降低了试验成本,且扩增带纹数量丰富、清晰,效果较理想,表明正交法是优化 RMAPD 扩增体系的一种理想方法。

3.2　正交试验结果的判定及试验体系对结果的影响

到目前为止,对 PCR 正交试验结果的判定还没有一个统一标准,判定结果带有个人主观成分,往往对结果分析带来不确定因素,容易漏掉试验的最佳组合,给分析各组成成分对结果的影响程度造成了困难,使其不能充分发挥正交试验的作用,因此,寻找 PCR 正交试验可靠的判断指标应成为下一步的研究目标。一旦对 PCR 扩增条件的客观标准格式予以模型上的确定,无疑将对 PCR 技术产生较大的影响。

PCR 扩增体系是由多种成分组成的复杂体系,一种或者多种成分的改变会对结果造成很大影响。从本试验结果也可以看出,由不同试验组合得到的试验结果差距很大,也就是说,PCR 试验中各种组成成分的不同水平,会对试验结果造成较大的影响,会影响到带纹的有无、清晰度以及数量的多少,所以获得最佳的试验体系就显得尤为重要。试验体系一旦确定,试验中的试剂和各种成分的比例都不要再进行改动,以免对结果的可靠性造成影响。

[参考文献]

[1] Yamashina Y,Nakanishi G. Nipponia Nippon[M]. Tokyo:Newton Books,1983.

[2] 范光丽,陈　宏,雷初朝,等. 朱鹮人工饲养群体扩增 DNA 指纹分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(增刊):1-4.

[3] 雷初朝,范光丽,张永德,等. 一个人工朱鹮种群的遗传多态性[J]. 动物学报,2005,51(4):650-656.

[4] 刘　斌,韩之明,刘　彦,等. 朱鹮的随机扩增多态 DNA 分析与种内亲缘关系研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(1):45-49.

[5] 李军林,舒　青,蒙世杰,等. 非损伤性取样在朱鹮种群遗传研究中的应用[J]. 遗传,2001,23(3):217-219.

[6] JI Ya-jie,LIU Yu-di,DING Chang-qing,et al. Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis,Nipponia nippon (Ciconiiformes: Threskiornithidae) [J]. Molecular Ecology Notes,2004,4(4),615-617.

[7] Galbusera P,van Dongen S,Matthysen E. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds[J]. Conservation Genetics,2000,1(2):163-168.

[8] Wolff K,Zietkiewicz E,Hofstra H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprinting patterns[J]. Theor Appl Genet,1995,91(3):439-447.

[9] Wu K S,Jones R,Danncherger L,et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. Nucleic Acids Research,1994,22(15):3257-3258.

[10] 张永德,范光丽,雷初朝,等. 朱鹮随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD) 研究[J]. 遗传,2005,27(6):915-918.

[11] 蓝贤勇,陈　宏,张永德,等. 一种新的分子标记方法——随机微卫星扩增多态 DNA (RMAPD) [J]. 遗传,2006,28(1):78-84.

[12] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:286-287.

[13] 张建勤,孙兆军,孟德连,等. 用微卫星标记对宁夏固原地区两个鸡群体遗传多样性的分析[J]. 中国农学通报,2005,21(4):4-6.

[14] Chen H,Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints,PAPD marker and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish [J]. Biochem Genet,1995,33:297-304.

[15] 樊　斌,刘　榜,李　奎. 随机扩增微卫星 DNA 多态标记 (RAMPs) 及其应用[J]. 黄牛杂志,2002,28(2):27-29.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[16] Fraga J ,Rodriguez J ,Fuentes O ,et al. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of *Cuban Triatominae* [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo ,2005 ,47(5) :295-300.

[17] Quintaes B R ,Leal N C ,Reis E M ,et al. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica serovar Typhi* [J]. Rev Soc Bras Med Trop ,2004 ,37(2) :143-147.

[18] 陈 宏,孙维斌,雷初朝,等. RAPD 标记稳定性的影响因素探析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003 ,31 (5) : 139-142.

[19] 柳淑芳,杜立新,朱 靖,等. 正交法整体优化差异显示反应体系[J]. 遗传,2004 ,26(6) :836-840.

[20] 王彦华,侯喜林,徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报,2004 ,24(5) :899-902.

(上接第 27 页)

[7] Kimura M ,Ohta T. Mutation an evolution at the molecular level[J]. Genetics ,1973 ,73(suppl) :19-35.

[8] 郭满才. 群体遗传变异的信息学模型研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2002.

[9] Wright S. Variability within and among natural populations [M]. Chicago : The Univ of Chicago Press , United States , 1978 :35-49.

[10] Arranze J J ,Bayon R , San Primitivo F. Genetic variation of five microsatellite loci in four breeds of cattle[J]. Journal Agriculture Science ,1996(27) :533-538.

[11] Bachanan F C ,Adamas L J ,Littejohn R P ,et al. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellite[J]. Genomics ,1994(22) :397-403.

[12] Weigend S ,Romanov M N. Current strategies for the assessment and revolution of genetic diversity in chicken resources [J]. World ' Poultry Science Journal ,2001 ,57(3) :275-288.

[13] Vaiman D ,Mecier D ,Moazami-Gou D ,et al. A set of 99 cattle microsatellites characterization synteny mapping and polymorphism[J]. Mammalian Genome ,1994 ,5 :288-297.

[14] 贾名威,杨利国,管 峰,等. 奶牛和肉牛 6 个 STR 基因座遗传多态性研究[J]. 遗传,2004 ,26(3) :309-314.

[15] 野泽谦,常 洪,任战军. 驯化对动物群体变异水平的影响[J]. 畜牧兽医杂志,1996(3) :55-56.

[16] 孙维斌. 八个黄牛品种种质特性的 DNA 分子标记研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学,2003.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net