

几种因素对山茶属植物 RAPD 分析的 DNA 扩增的影响^{*}

唐绍清

(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

施苏华

(中山大学生命科学学院)

林海波

(深圳市园林科学研究所)

摘要 多种因素会影响 RAPD 扩增, 本研究试验了引物、Mg²⁺ 和 dNTP 的浓度以及 Taq 酶来源对山茶属植物进行 RAPD 分析的 DNA 扩增的影响。结果表明这些因素对扩增结果都会产生影响, 通过比较分析, 得到了一个对于山茶属植物进行 RAPD 分析较理想的扩增条件。

关键词 山茶属; RAPD; 扩增条件

The effects of amplification conditions on RAPD amplification for *Camellia*

Tang Shaoqing

(Guangxi Normal University, Department of Biology, Guilin 541004)

Shi Suhua

(Zhongshan University, School of Life Sciences)

Lin Haibo

(Shenzhen Institute of Horticulture)

Abstract The effects of the sources of Taq DNA polymerase and the concentrations of magnesium, primer and dNTP were tested. The results showed that RAPD patterns were affected by those conditions of amplification reaction. The optimal amplification conditions for *Camellia* were the following: 1ng total DNA/ μ l reaction volume; 2.0 mmol/L MgCl₂; 100 μ mol/L each dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 1U qualified Taq DNA polymerase/ μ l reaction volume.

Key words *Camellia*; RAPD; amplification conditions

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析具有花费少、快捷、要求少量的 DNA、不需要有关 DNA 序列资料、不包括放射性的使用和能获得的标记位点数目不受限制等优点, 已被广泛应用于基因定位、寻找特定基因连锁标记、研究植物分类和进化及种群遗传变异性等方面。但模板 DNA 量、引物浓度、镁离子浓度、脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 浓度、Taq 酶的量 and 来源以及扩增程序等都会影响 DNA 扩增^[1, 2], 从而影响扩增产物的重复性, 以致影响 RAPD 分析的可靠性。本研究试验了各种因素对山茶属植物进行 RAPD 分析 DNA 扩增的影响, 目的在于得到一个对于

1997-08-18 收稿

第一作者简介: 唐绍清, 男, 1965 年出生, 博士, 从事植物学教学研究工作。

* 广东省自然科学基金资助项目 950092

山茶属植物进行 RAPD 分析较理想的扩增条件。

1 材料与方 法

1.1 材料 大样金花茶 (*Camellia grandis* (C. F. Liang et S. L. Mo) Chang et S. Y. Liang)、龙州金花茶 (*C. longzhouensis* J. Y. Luo)、东兴金花茶 (*C. tunghinensis* Chang)、淡黄金花茶 (*C. flavidula* Chang)和凹脉金花茶 (*C. impressinervis* Chang et S. Y. Liang)。

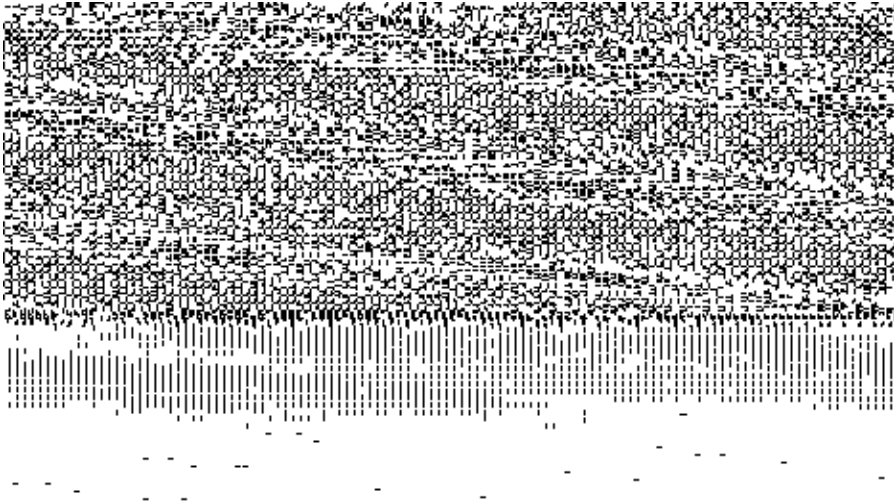


图 1 几种因素对 RAPD 扩增的影响

Fig 1. The effects of amplification conditions on RAPD amplification

a. 引物浓度对 RAPD 扩增的影响 1、2: 20 ng 大金花茶总 DNA; 3、4 20 ng 龙州金花茶总 DNA; 5、6、7: 20 ng 东兴金花茶总 DNA。不同的引物浓度: 1、3、5: Operon 公司指定的引物浓度; 2、4、6: 2/3 倍指定的引物浓度; 7: 1/2 倍指定的引物浓度。M: 1 kb Ladder DNA marker.

b. dNTP 和镁离子浓度对 RAPD 扩增的影响 不同的 dNTP 浓度: 1、2: 100 μ mol/L dNTP; 3、4、5、6、7、8: 200 μ mol/L dNTP。不同的 MgCl₂ 浓度: 1、3: 1.5 mmol/L MgCl₂; 2、4: 2.0 mmol/L MgCl₂; 5: 2.5 mmol/L MgCl₂; 6: 3.0 mmol/L MgCl₂; 7: 3.5 mmol/L MgCl₂; 8: 4.0 mmol/L MgCl₂。

c. Taq 来源对 RAPD 扩增的影响 1、3、5: 20 ng 总 DNA; 2、4、6: 对照, 不加总 DNA。不同来源的 Taq 酶: 1、2: 某公司的酶 1 个单位; 3、4: 华美公司(SABC)的酶 1 个单位; 5、6: Promega 公司的酶 0.5 个单位。

a. Effect of the concentration of primer on the amplification of RAPD. Line 1, 2: 20 ng total DNA of *Camellia grandis*; Line 3, 4: 20 ng total DNA of *C. longzhouensis*; Line 5, 6, 7: 20 ng total DNA of *C. tunghinensis*. Concentration of primer varied as follows: Line 1, 3, 5: the concentration of primer recommended by the manufacture (Operon Technologies); Line 2, 4, 6: 2/3 times the concentration of primer recommended by the manufacture; Line 7: 1/2 times the concentration of primer recommended by the manufacture. M: 1kb Ladder DNA.

b. Effects of the concentration of dNTP and Magnesium on the amplification of RAPD. Line 1, 2: 100 μ mol/L dNTP; Line 3, 4, 5, 6, 7, 8: 200 μ mol/L dNTP. The concentration of MgCl₂ varied as follows: Line 1, 3: 1.5 mmol/L MgCl₂; Line 2, 4: 2.0 mmol/L MgCl₂; Line 5: 2.5 mmol/L MgCl₂; Line 6: 3.0 mmol/L MgCl₂; Line 7: 3.5 mmol/L MgCl₂; Line 8: 4.0 mmol/L MgCl₂。

c. Effect of Taq DNA polymerase source on the amplification of RAPD. Line 1, 3, 5: 20 ng total DNA of *Camellia impressinervis*; Line 2, 4, 6: no template. Line 1, 2: 1 U Taq DNA polymerase from a company; Line 3, 4: 1 U Taq polymerase from SABC; Line 5, 6: 0.5 U Taq polymerase from Promega.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

采用 CTAB 法^[3]提取总 DNA。DNA 纯化按下列步骤进行: DNA TE 溶液加入 1% 体积的 RNA 酶(10 mg/ml), 37 °C, 45 min; 加入 3 倍体积的 6 mol/L NaCl, 约 4 μl 玻璃粉 TE 溶液, 混匀, 放置 5 min(中间摇动几次); 5 000 rpm 离心 3 min, 去上清液; 加洗液(含 0.2 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1 mmol/L EDTA; 50%乙醇)150 μl, 混匀, 4 000 rpm 离心 1 min, 去上清液, 重复清洗 3 次; 凉干, 加 50 μl 1× TE; 50 °C 保温 20 min; 10 000 rpm 离心 10 min, 将上清液移至新管, 弃沉淀, -20 °C 保存, 用于 PCR。

1.2.2 引物浓度对 RAPD 扩增的影响

共同的反应条件: 20 μl 反应体积, 1× Taq 酶 buffer, 100 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 个单位 Taq 酶, 约 20 ng 总 DNA(大金花茶、龙州金花茶和东兴金花茶)。不同的 RAPD 引物 OPA-18(10 个核苷酸长, Operon 公司产品)浓度: 1) Operon 公司指定浓度; 2) 2/3 倍指定浓度; 3) 1/2 倍指定浓度。

1.2.3 dNTP 和 Mg²⁺ 浓度 RAPD 扩增的影响

共同的扩增条件: 20 μl 反应体积, 1× Taq 酶 buffer, 约 20 ng 淡黄金花茶总 DNA, Operon 公司指定的引物浓度(OPA-18), 1 个单位 Taq 酶。不同浓度的 dNTP 和 MgCl₂:

- 1) 100 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂;
- 2) 100 μmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂;
- 3) 200 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂;
- 4) 200 μmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂;
- 5) 200 μmol/L dNTP, 2.5 mmol/L MgCl₂;
- 6) 200 μmol/L dNTP, 3.0 mmol/L MgCl₂;
- 7) 200 μmol/L dNTP, 3.5 mmol/L MgCl₂;
- 8) 200 μmol/L dNTP, 4.0 mmol/L MgCl₂。

1.2.4 Taq 酶质量对 RAPD 扩增的影响

共同的反应条件: 20 μl 反应体积, 1× Taq 酶 buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 100 μmol/L dNTP, Operon 公司指定的引物浓度(OPA-12)。不同公司生产的 Taq 酶: 1) 某公司生产的 Taq 酶 1 单位, 20 ng 凹脉金花茶总 DNA; 2) 某公司生产的 Taq 酶 1 个单位, 空白对照(不加总 DNA); 3) 华美公司的 Taq 酶 1 个单位, 20 ng 凹脉金花茶总 DNA; 4) 华美公司的 Taq 酶 1 个单位, 空白对照; 5) Promega 公司的 Taq 酶 0.5 个单位, 20 ng 凹脉金花茶总 DNA; 6) Promega 公司的 Taq 酶 0.5 个单位, 空白对照。

以上扩增均在 PCR 仪(Perkins-Elmer Cetus model 480), 按下列程序进行扩增: 94 °C 5 min, 一个循环; 接着 45 个下列循环, 94 °C 1 min → 35 °C 1 min → 72 °C 1 min; 最后 72 °C 7 min, 一个循环, 结束。扩增完成后, 取 10 μl 样装在 1.4% 琼脂糖凝胶上, 在 1× TAE 缓冲溶液中电泳, 稳压(4 v/cm) 电泳约 4 h 30 min, 1 kb Ladder DNA(美, 生命技术公司产品)用作分子量标准。凝胶在 0.5 μg/ml EB(溴化乙锭)溶液中染色约 40 min, 在紫外光下检测。

2 实验结果与分析

2.1 试验引物浓度对扩增效果的影响 结果表明(图版 1 a), Operon 公司指定的引物浓度(Operon 公司产品说明的使用浓度, 即加 1/10 于反应体积的标准浓度的引物)扩增的效果较好, 得到的 DNA 片段多, 量大。2/3 倍 Operon 公司指定浓度和 1/2 倍 Operon 公司指定浓度引物扩增效果也可以, 但缺少其中少数带, 有的带相对较弱。因此用 Operon 公司指定的引物浓度进行 DNA 扩增是较理想的。

2.2 试验不同 dNTP 浓度和 $MgCl_2$ 浓度对扩增的影响 结果表明(图版 1:b), 在 $100 \mu\text{mol/L}$ 或 $200 \mu\text{mol/L}$ dNTP 浓度下, 均能扩增到清晰的带型。对于 Mg^{2+} 浓度, 从 1.5 mmol/L 至 2.5 mmol/L 带型无变化, 但在 2.0 mmol/L 扩增产物量大。从 3.0 mmol/L 至 4 mmol/L 产生两条新带, 并且随着 Mg^{2+} 浓度增高而变得清晰。因此 $100 \mu\text{mol/L}$ dNTP 和 2.0 mmol/L Mg^{2+} 为较理想的 PCR 反应条件。这与 Ellsworth 等^[4]报道的镁离子浓度对扩增产物的影响结果有所不同, 他们发现从 0 到 2 mmol/L 扩增带型有变化, 但超过 2.0 mmol/L , 一直至 7.0 mmol/L , 带型无变化。

2.3 酶的来源是影响扩增的另一个重要方面 用购自某公司(1 个单位)、华美生物技术公司(1 个单位)和 Promega(0.5 个单位)的 Taq 酶作了比较(图版 1:c)。华美生物公司和 Promega 公司生产的 Taq 酶的空白对照无假带的产生, 而某公司生产的酶有大量假带的产生。加总 DNA 后, 华美公司的酶的扩增产物比 Promega 公司的酶的扩增产物多一条约 3000 bp 的片段, 其他带一致, 某公司的酶与上述两家公司的酶的扩增产物大多数一致, 但多了一条与假带相同的带。结果表明, Taq 酶的质量也是至关重要的, 质量不好的酶, 可能会有大量假带的产生, 不同来源的酶可能会有某些带型的变化。因此有必要选取质量较好的 Taq 酶, 用同一引物对不同材料进行 DNA 扩增, 必须使用来源相同的 Taq 酶。

2.4 扩增程序也会对扩增结果产生影响 使用常规的 RAPD 扩增程序: $94 \text{ }^\circ\text{C} 1 \text{ min} \rightarrow 35 \text{ }^\circ\text{C} 1 \text{ min} \rightarrow 72 \text{ }^\circ\text{C} 2 \text{ min}$ 45 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C} 7 \text{ min}$ 1 个循环。与被 Yu 等^[5]认为是耗时短, 效果好的程序: $94 \text{ }^\circ\text{C} 5 \text{ min}$ 1 个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C} 5 \text{ s} \rightarrow 35 \text{ }^\circ\text{C} 30 \text{ min} \rightarrow 72 \text{ }^\circ\text{C} 60 \text{ s}$ 35 个循环, 接着 $72 \text{ }^\circ\text{C} 7 \text{ min}$ 进行扩增比较。扩增结果表明前一程序扩增效果良好, 而后一种程序无任何扩增产物, 可见后一种快速的扩增程序不一定适合于所有的材料。

以上各因素都会影响到 DNA 扩增, 对于不同材料可能要求不同的最适的扩增条件。因此, 为了能得到重复性好可用于 RAPD 分析的扩增 DNA 片段, 研究前确定最适的各扩增条件, 并对这一条件加以固定, 是非常重要的。经过上述试验后确定了对于山茶属植物进行 RAPD 分析较理想的扩增条件: 2.0 mmol/L $MgCl_2$; $100 \mu\text{mol/L}$ dNTP; 约 1 ng 总 DNA/ μl 反应体积; Operon 公司说明的引物浓度; 1 个单位质量较好的 Taq 酶/ $20 \mu\text{l}$ 反应体积。

参考文献

- 1 Adams R P, Demeke T. Systematic relationships in Juniperus based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon*, 1993, 42 (3): 553~571
- 2 Yu K, Pauls K P. Optimization of DNA extraction and PCR procedures for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in plant. PCR Technology: Current Innovations. New York: CRC Press, 1994, 193~200
- 3 Doyle J J, et al. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11~15
- 4 Ellsworth D L, Rittenhous K D, Honeycutt R L. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, 14: 214~216
- 5 Yu K, Pauls K P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20 (10): 2606