

高粱胞质雄性不育及保持系的 RAPD 技术优化

范昌发^{1,2}, 孙春昫^{3,4}, 孙毅², 王景雪², 贾敬芬¹, 何军贤³, 郭晓才⁴

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 山西省农业生物技术研究中心, 山西 太原 030031; 3. 四川大学 生命学院, 四川 成都 610064; 4. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:以高粱胞质雄性不育系和保持系 A₁T_x623A/B, A₂V₄A/B 为材料, 考察了 Mg²⁺, Taq 酶, dNTP, 引物, 模板等的用量、循环参数及不同的 PCR 仪对随机扩增多态性 DNA (RAPD) 反应的影响。结果发现: 在 25 μL 体系中, MgCl₂ 2.0 mmol/L, Taq 酶 0.75 U (1U=1 μmol/min), dNTP 0.15 mmol/L, 引物 16.5 ng, 模板 30 ng, 明胶 0.001%, KCl 50 mmol/L, Tris 10 mmol/L (pH8.3) 为最佳反应混合物组合。对 Peltier Thermal Cycler 200 而言, 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 35℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后 72℃ 保温 5 min, 共计 40 个循环为最佳扩增条件; 对 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler-480 而言, 采用 94℃ 预变性 3 min 后, 前 3 个循环, 94℃ 变性 1 min, 35℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 后 37 个循环, 94℃ 变性 30 s, 36℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 保温 5 min 的循环程序可获得理想扩增。并阐述了优化 RAPD 实验体系的设计原则。

关键词: 胞质雄性不育; 高粱; RAPD; 技术优化**中图分类号:** Q945.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2002)03-0298-05

随机扩增多态性 DNA (random amplification of polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术^[1]在生物学领域中有十分广泛的用途^[2]。该技术具有诸多优点, 但也存在反应混合物成分复杂、干扰因素多、导致实验的重复性差、非特异扩增等严重问题。对于初学者, 如何根据实际情况及实验目的, 在众多变化因子中摸索出一套最优方案是不易的, 而最佳反应体系的建立对于后续实验又至关重要, 良好 RAPD 实验体系的建立就等于成功了 80%^[3]。

有很多关于 RAPD 体系优化方案的报道^[4,5], 积累了大量经验, 但也有其明显不足: 第一, 优化方案的设计思路不明确, 不分主次而把众多因素同等对待; 第二, 有的不够系统, 有的设计过于庞杂, 浪费时间和财力, 加之每一种植物的 RAPD 扩增有其自身的特点, 因而很有必要对其进一步探讨。我们在对高粱的 RAPD 分析中, 对 PCR 反应体系中各成分的优化作了一些探索, 并针对不同的 PCR 仪优化循

环参数, 建立了一套适合高粱雄性不育及其保持系 RAPD 分析的实验体系, 并采用多个随机引物进行了检测。本实验所得优化参数及设计原则, 可供其他植物的 RAPD 分析和类似实验参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及样品制备

材料为高粱胞质雄性不育系 A₁T_x623A, A₂V₄A 及其保持系, 取黄化苗于 -40℃ 保存备用。

CTAB 沉淀法提取总 DNA^[6]。0.8% 的琼脂糖胶检测 DNA 的大小和定量。电极缓冲液为 TAE, 胶中含 EB 0.5 μg/mL。

1.2 引物、试剂及仪器

Taq 酶, dNTP, CTAB 等购自 MBI, 其余为进口超纯试剂。PCR 仪为 Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200) 和 Perkin Elmer Cetus 公司的 DNA

收稿日期: 2000-10-08**基金项目:** 中国科学院生物科学与技术研究特别支持资助项目 (STZ-1-16); 山西省留学回国人员资助项目 (No. 981015); 山西省财政厅科技支农资助项目 (No. 98003)**作者简介:** 范昌发 (1970-), 男, 重庆忠县人, 西北大学博士生, 从事植物雄性不育和无融合生殖研究。

(PTC-200) 和 Perkin Elmer Cetus 公司的 DNA Thermal Cycler (PE-480)。所用引物(见表 2)购自上海 Sangon 公司。

1.3 方法

RAPDR 采用 25 μL 的反应体系。根据目的制备反应混合物(见表 1), 无菌超纯水补充体积至 25 μL , 20 μL 矿物油覆盖。针对不同的 PCR 仪和需要设置循环参数。扩增产物于 1.4% 琼脂糖胶上进行电泳检测, 胶中含 EB 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 电极缓冲液为 TAE。电泳结果在紫外灯下照相记录、GDS8000 下分析。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 实验体系的设计原则

参考前人结果, 确定某一组分的浓度范围, 按主次逐个优化各组分。PCR 反应混合物中, Mg^{2+} , Taq 酶, dNTP 等对反应的影响是主要的(见表 1), 其余因素的影响相对较小。循环参数中, 变性温度及时间和退火温度是决定反应的成败和特异性的重要因素, 所以得首先考虑这些因素。在优化某一因素时, 其他则为固定值, 该值是根据文献确定的。判定扩增效果的标准是电泳结果, 它背景低、谱带清晰、数目适中、稳定可重复。

在优化反应条件时, 其浓度范围过大是不必要的。第一, 前人关于 PCR 反应已经做了大量的工作, 积累了丰富的经验, 就每一成分而言, 都有参考值可寻, 如 MgCl_2 用量一般在 1.5~2.0 mmol/L, 2.0 mmol/L 的最多^[3], 过大范围的测试等于浪费时间和财力。第二, 如果采用相近或相同的实验体系, 有利于将不同实验室得出的同类实验结果进行比较。所以, 我们仅需结合自己的实验, 在一定范围内进行优化即可, 这样既兼顾了实验效果, 又省时省力。

2.2 PCR 反应混合物各成分对扩增效果的影响

2.2.1 Mg^{2+} 对 RAPD 反应的影响 Mg^{2+} 对 RAPD 反应的特异性及扩增效率都有影响。浓度过高会使非特异扩增产物增加, 目标谱带不清晰; 低浓度的 MgCl_2 可减少非特异扩增, 但可能使扩增失败。本实验中, 在 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L MgCl_2 时, 谱带最清晰, 数目适中(见图 1)。鉴于 MgCl_2 浓度为 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L 时的扩增效果几乎一样, 为降低非特异扩增的可能性, 把 2.0 mmol/L 作为最佳浓度, 这与前人的许多报道是一致的^[4,5]。值得一提的是, dNTP 能与 Mg^{2+} 等摩尔结

合而消耗部分 Mg^{2+} ^[7], 由于 RAPD 中所用的随机引物一般为 10 ng, 与模板 DNA 间的结合能力很低, 较高的 Mg^{2+} 浓度有利于引物与模板的结合, RAPD 中所用 Mg^{2+} 浓度比常规 PCR 中要高的原因也在于此。



图 1 MgCl_2 和 Taq 酶浓度对 RAPD 效果的影响

Fig. 1 The effect of the concentration of MgCl_2 and Taq polymerase on the amplification results.

MgCl_2 为 1~8 泳道; Taq 酶为 9~16 泳道。(1) 1.5 mmol/L (2) 2.0 mmol/L (3) 2.5 mmol/L (4) 3.0 mmol/L, 模板 DNA 为 $A_1T_\alpha 623A$; (5) 1.5 mmol/L (6) 2.0 mmol/L (7) 2.5 mmol/L (8) 3.0 mmol/L, 模板 DNA 为 $A_1T_\alpha 623B$; (9) 0.25 U (10) 0.50 U (11) 0.75 U (12) 1.0 U, 模板 DNA 为 $A_1T_\alpha 623A$; (13) 0.25 U (14) 0.50 U (15) 0.75 U (16) 1.0 U, 模板 DNA 为 $A_1T_\alpha 623B$; (M) 为分子量标记 DL-2000 (大连宝生)

2.2.2 Taq 酶浓度对 RAPD 反应的影响 Taq 酶是 PCR 反应中最为重要的因素之一, 酶的用量太大, 会增加非特异扩增; 反之, 可能得不到扩增产物。Taq 酶用量一般在 0.5~1.0 U/25 μL ^[3], 但在本实验中, Taq 酶浓度为 0.5 U 时, 扩增的带数少而模糊(见图 1), 为 0.75 U 和 1.0 U 时, 谱带清楚, 数目较多, 从经济和减少非特异扩增的角度出发, 选取 0.75 U 为 Taq 酶的最适浓度。

高温^[7]和杂质如多糖、酚类及琼脂糖等对于 Taq 酶的活性均有较大损害, 为保证其活性, 提倡在完成预变性后再加入 Taq 酶, 用较纯的模板 DNA, 减少杂质干扰。

2.2.3 dNTP 含量对扩增效果的影响 在 RAPD 反应中, 4 种 dNTP 的应用范围在 0.05~0.2 mmol/L^[3], 通常采用 0.1 mmol/L。在本实验中, dNTP 浓度为 0.15 mmol/L 时, 扩增结果清楚, 谱带数目适中(见图 2), 在 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 时谱带数目偏少而清晰度较差。过高浓度的 dNTP 不可取, 因为这样会大大增加错误掺入率, 对于基因克隆和测序均不利。当每种 dNTP 的浓度达到 0.1 mmol/L 时, 足以合成 12.5 μg DNA, 即可满足大部分后续实验的要求。



图 2 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响

Fig. 2 The effect of the concentration of the dNTP on the RAPD results

(M) 分子量标准 DL-2000 (1) 0.10 mmol/L (2) 0.15 mmol/L (3) 0.20 mmol/L

2.2.4 引物含量对扩增效果的影响 在 25 μL 体系中,引物的含量一般为 15~30 ng。根据我们的测试结果,引物浓度 16.5 ng 时效果最佳(见图 3),但

在 11 ng 和 22 ng 的情况下,亦能得到很好的扩增结果,这说明在一定范围内引物的量有较大的弹性。



图 3 引物浓度对 RAPD 扩增的影响

Fig. 3 The effect of the concentration of primer on the RAPD results

(M) 分子量标准 ΔDNA/EcoRI+HindIII (1) 11.0 ng (2) 16.5 ng (3) 22.0 ng

表 1 PCR 反应混合物各成分对扩增效果的影响*

Tab. 1 The effect of PCR reaction mixture on the amplification

反应顺序	MgCl ₂ /mmol · L ⁻¹	Taq 酶 /u	dNTP mmol · L ⁻¹	引物 /ng	DNA /ng	明胶 /%	白蛋白 BSA [®] /μg	二甲基亚砷 DMSO/%	KCl /mmol · L ⁻¹	Tris ^①	结果 ^②
I-1	1.5	1.00	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	+
I-2	2.0	1.00	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	++
I-3	2.5	1.00	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	++
I-4	3.0	1.00	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	+
II-1	2.0	0.25	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	+
II-2	2.0	0.50	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	+
II-3	2.0	0.75	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	++
II-4	2.0	1.00	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	++
III-1	2.0	0.75	0.10	15	25	0.001	--	--	50	10	+
III-2	2.0	0.75	0.15	15	25	0.001	--	--	50	10	++
III-3	2.0	0.75	0.20	15	25	0.001	--	--	50	10	+
IV-1	2.0	0.75	0.15	11.0	25	0.001	--	--	50	10	++
IV-2	2.0	0.75	0.15	16.5	25	0.001	--	--	50	10	++
IV-3	2.0	0.75	0.15	22.0	25	0.001	--	--	50	10	++
V-1	2.0	0.75	0.15	16.5	10	0.001	--	--	50	10	-
V-2	2.0	0.75	0.15	16.5	20	0.001	--	--	50	10	-
V-3	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	--	--	50	10	+++
V-4	2.0	0.75	0.15	16.5	45	0.001	--	--	50	10	+
VI-1	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	12.5	5.00	50	10	-
VI-2	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	12.5	--	50	10	-
VI-3	2.0	0.75	0.15	16.5	30	--	12.5	5.00	50	10	-
VI-4	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	--	5.00	50	10	-
VII-1	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	--	--	10xbuffer^③	+	
结论	2.0	0.75	0.15	16.5	30	0.001	--	--	50	10	+++

注: * ① pH 为 8.3 ② “-”无扩增,“+”较好,“++”好,“+++”理想,扩增效果的评估是根据多次实验而定 ③ 随 Taq 酶配售 ④ “--”无 表中黑体字以下为已优化的因素,黑体字部分为正被优化的因素,反应按表中所列次序进行,上一轮的优化结果为以后的实验采用。

2.2.5 模板 DNA 量对扩增效果的影响 在 RAPD 中,模板 DNA 的量不宜太多。从理论上推算,一个细胞所含的 DNA 量即可满足扩增的需要,模板分子数越多,则错误扩增的机会就越大。本实验表明,模板 DNA 为 30 和 45 ng 的情况下,均能得到很好的扩增产物(见图 4),而在 10 和 20 ng 时,均不能得到好的扩增产物。从增强特异性出发,选取 30 ng 为最佳浓度。

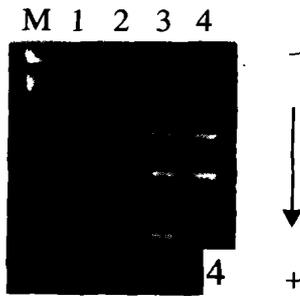


图 4 模板浓度对 RAPD 扩增的影响

Fig. 4 The effect of the concentration of template DNA on the RAPD results

(M) 分子量标准 ADNA/EcoRI+HindIII(1) 10 ng (2) 20 ng (3) 30 ng (4) 45 ng

2.2.6 BSA 和 DMSO 的影响 有人认为,加入 5% 的 DMSO 或 2.5% 的甲醛或 50 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化四甲氨(TMAC)可以大大提高扩增的特异性^[3]。但是,在本实验中,单独加入乙酰化 BSA 或与 0.001% 的明胶同时加入,或与 DMSO 组合(见表 1),均不能得到好的扩增,有时甚至会失败。大量实验表明,单独加入 0.001% 的明胶就能获得满意效果。由此看来,在高粱中乙酰化 BSA 和 DMSO 并非理想扩增的必要条件。

2.3 退火温度及仪器对扩增产物的影响

循环参数中变化较大的是退火温度,一般为 35~37 $^{\circ}\text{C}$ 。在本实验中测试了 35 $^{\circ}\text{C}$ 和 36 $^{\circ}\text{C}$ 两个退火温度,均能得到良好的扩增效果。考虑到获得产物和特异性两个方面的要求,有人建议在某些特定的实验中,可在最初的 3~5 个循环中,采用 35~37 $^{\circ}\text{C}$ 为退火温度,以后的循环中选用较高的退火温度(如 55 $^{\circ}\text{C}$)。

不同厂家、同一厂家不同批次生产的 PCR 仪性能差别很大,因此要根据具体的实际情况优化循环参数。PE-480 有两种计时模式,一种是把温度升降的时间计入设定时间,另一种是实际温度达到设定温度之后方开始计时。在本实验中,在 PTC-200 上采用 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 的循环

程序能获得理想的扩增效果,而这一循环程序在 PE-480 上则很难得到扩增产物。若采用 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min 后,前 3 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,后 37 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 的循环程序能获得清晰的谱带。

2.4 本实验体系可靠性检测

根据上述优化结果,用 14 随机引物对该反应体系进行了检测,结果表明,经该系统的扩增谱带丰富,清晰,背景低,是十分理想的扩增(见图 5,6,表 2)。

表 2 所用引物和扩增结果

Tab. 2 The primers and their amplification results

引物次序	引物	序列	扩增谱带 ^①
P1	S472	AAGGGCGAGT	5,5
P2	S473	GGAGTGCCTC	4,5
P3	S474	CCAGCCGAAC	6,6
P4	S475	GGAAGCCAAC	5,5
P5	S476	CCAAGCTGCC	6,6
P6	S477	TGACCCGCCT	10,10
P7	S478	GGCTTGGCCT	5,5
P8	S1117	GCTAACGTCC	8,8
P9	S1118	ACGGGACTCT	8,9
P10	S1119	CCAGGTCTTC	8,7
P11	S1120	ACCAACCAGG	9,9
P12	S1181	GGCAGGTGGA	7,7
P13	S1182	ACCCTCGGAC	6,7
P14	S1183	GAGGTGTCTG	6,6

注:① 前 7 条分别为在 T_{623A/B} 中的扩增谱带数;后 7 条分别为在 V_{1A/B} 中的扩增谱带数

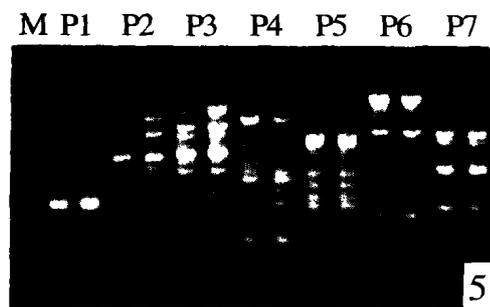


图 5 7 个引物对 T_{623A/B} 的扩增结果

Fig. 5 RAPD Pattern obtained from T_{623A/B} with 7 different primers

(M) 分子量标准 DL-2000, P1-P7 为 7 个引物对 T_{623A/B} 的扩增结果

一般认为,影响 PCR 技术稳定性和敏感性的因素主要有, Mg²⁺ 浓度、Taq 酶、dNTP、模板浓度、纯度及完整性和前几个循环的参数,我们的结果支持

这一看法。针对不同的材料均要进行技术优化,才能

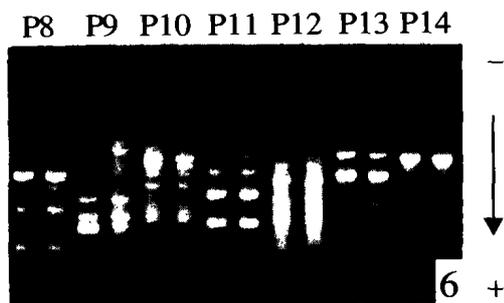


图 6 7 个引物对 V₄A/B 的扩增结果(P8-P14 泳道)

Fig. 6 RAPD Pattern obtained from V₄A/B with 7 different primers(Lane P8-P14)

得到理想的结果。而且,在某些 PCR 中影响很大的因素在另类 PCR 中可能无显著影响。如 Mg²⁺ 在 RAPD 中影响程度远不如在 ISSR 中大。再如 DM-SO 一般会增加扩增的特异性,尤其是对大片段 DNA 的扩增,而我们却未能得到扩增。这再一次说明,在进行 PCR 扩增时,针对材料进行技术优化是非常必要的。

参考文献:

- [1] WILLIAMS J G K, KUBELIC A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6 531-6 535.
- [2] 李常保, 宋建成. RAPD 标记与作物改良[J]. *生物技术通报*, 1998, (6): 20-34.
- [3] 王 斌. RAPD 及其在分子生物学研究中的应用[A]. 董云洲, 高沙沙. RAPD-PCR 在生物学研究中的应用[C]. 北京: 中国农业科学院生物技术中心, 1995. 5-11.
- [4] 高志红, 章 镇, 盛炳成, 等. 果梅随机扩增多态 DNA 技术研究[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(3): 214-218.
- [5] 傅骏骅, 李连城, 刘新芝, 等. 玉米 RAPD 程序优化研究及其初步探讨[J]. *作物学报*, 1997, 23(1): 56-61.
- [6] BERNATZKY R, TANKSLEY S D. Genetics of action related sequences in tomato[J]. *Thero Appl Genet*, 1986, 72: 314-321.
- [7] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993. 24.

(编 辑 徐象平)

A study on the optimum for RAPD experimental protocol of CMS sorghum and their maintainers

FAN Chang-fa^{1,2}, SUN Chun-yun^{3,4}, SUN Yi², WANG Jing-xue²,
JIA Jing-fen¹, HE Jun-xian³, GUO Xiao-cai⁴

(1. Department of Biology, Northwestern University, Xi'an 710069, China; 2. Biotechnology Center, Shaanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; 3. College of Life Science, Sichan University, Chengdu 610064, China; 4. Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: CMS sorghum A₁T₆23A/B and A₁V₄A/B as plant material were used in present experiment for optimizing the factors influencing RAPD reaction effect. The results showed that in a 25 μL reaction volume, the optimum mixture contained 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.75 U Taq polymerase(MBI), 0.15 mmol/L dNTP, 16.5 ng primer, about 30 ng DNA, 0.001% Gelatin, KCl 50 mmol/L, and 10 mmol/L Tris (pH8.3). The optimum PCR reaction program, if amplification performed in Peltier Thermal Cycler 200, was after initial denaturation at 94°C for 5 min, each of 40 cycles consisted of 94°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 2 min, then final extention at 72°C for 5 min. If amplification performed in Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480, the best program was after initial denaturation at 94°C for 3min, the first 3 cycles contained 94°C 30 s, 35°C 45 s, 72°C 1 min, the followed 37 cycles contained 94°C 30s, 36°C 45s, 72°C 1 min, at last extention at 72°C for 5 min. The principle of optimizing the RAPD reaction factors was described.

Key words: CMS sorghum; RAPD; optimizing experimental protocol