

# 蓝莓RAPD反应体系的建立

徐娜 夏秀英 栾雨时 徐品三 (大连理工大学环境与生命学院, 辽宁大连 116024)

**摘要** 以蓝莓幼嫩叶片为试材, 采用CTAB法提取基因组DNA, 并对影响RAPD反应的因素进行了研究, 建立了适用于蓝莓的RAPD最佳反应体系。结果表明: 从幼嫩的叶片中提取的DNA质量高; 20  $\mu$ l RAPD-PCR体系中, 退火温度37  $^{\circ}$ C、dNTPs浓度0.25 mmol/L、模板DNA浓度0.5~1.5 ng/ $\mu$ l、引物浓度1 pmol/ $\mu$ l、Taq酶用量1.0 U时, 获得的特异性谱带清晰可靠, 可重复性高。

**关键词** 蓝莓; RAPD; 反应体系

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)22-5790-02

## Establishment of Reaction System of RAPD for Highberry

XU Na et al (School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024)

**Abstract** By CTAB method the genomic DNA of blueberry was extracted, using tender leaves as materials. Several factors which affected RAPD amplification in blueberry genomic DNA were analyzed and a better system was promoted. The results showed that the highest quality of DNA was from tender leaves. In 20  $\mu$ l reaction system, the best annealing temperature was 37  $^{\circ}$ C containing DNA template 0.5~1.5 ng/ $\mu$ l, TaqE1u, dNTPs 0.25 mmol/L and ten base random primer 1 pmol/ $\mu$ l. The electrophoresis bands were clear and stable.

**Key words** Highberry; RAPD; Reaction system

蓝莓属于杜鹃花科越橘属植物, 其果实具有极高的营养价值 and 保健功能。我国虽然是野生蓝莓的主要产地, 但目前绝大多数栽培品种均引自国外。由于引种途径各异, 许多品种缺乏背景资料, 难以进行分类鉴定, 造成品种名称混乱、种系不清等问题, 严重影响我国蓝莓育种研究及商品苗木的生产。从DNA水平上对我国蓝莓种质资源建立蓝莓的分子鉴别、分类体系, 了解各品种的遗传背景。这对蓝莓种质资源的引进、合理利用等具有重要意义。

RAPD技术是广泛应用于种质资源的鉴定和分类的手段。由于不同物种对RAPD反应条件存在差异, 而且RAPD技术对反应条件很敏感, 因此若要保证RAPD结果的可靠性和重复性, 应首先对其反应条件进行优化筛选。笔者就Taq DNA聚合酶、dNTPs、模板DNA浓度、引物浓度、退火温度5种因素进行优化, 旨在建立适合蓝莓RAPD的反应体系, 为进一步对蓝莓的种质资源及其分类研究创造条件。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 供试蓝莓由大连越橘科技开发有限公司苗圃提供, 选取嫩叶用于DNA提取。

**1.2 酶及引物** Ex Taq酶(试剂盒)、10碱基随机引物都购自大连宝生物工程有限公司。

**1.3 DNA提取** 采用CTAB法<sup>[1]</sup>。

**1.4 PCR扩增** PCR反应在Takara公司TP600型PCR仪上进行。反应体系20  $\mu$ l。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 36  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 40个循环; 72  $^{\circ}$ C, 8 min。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶(EB染色)电泳, 电泳结束后放在自动凝胶成像仪中观察, 拍照记录。

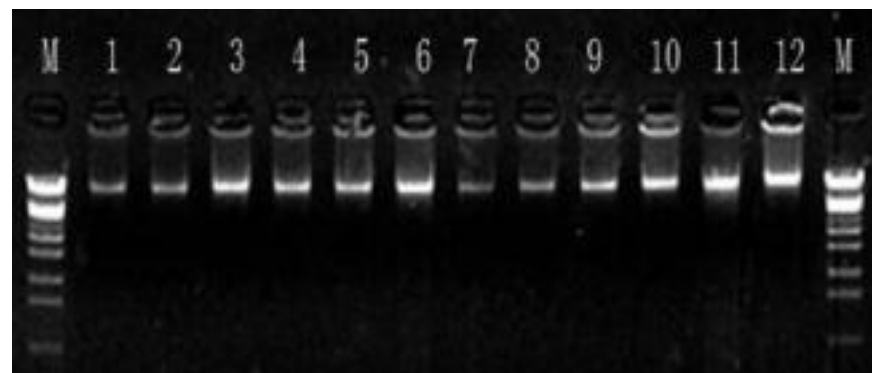
**1.5 RAPD反应体系优化** 分别研究了模板浓度、底物浓度、引物浓度、Taq酶用量及退火温度对RAPD反应的影响。变化某个因素时其他因素选择中间梯度, 固定不变。每组设置3次重复, 并用不同的引物及模板对试验结果进行验证。各因素梯度设置、试验用引物及品种如表1。

表1 蓝莓RAPD反应体系优化各因素梯度设置

因素	梯度设置					随机引物	品种
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5		
模板浓度 ng/ $\mu$ l	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	qpy13	Bonidon
dNIP浓度 mmol/L	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	qpg10	Northblue
引物浓度 pmol/ $\mu$ l	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	qpg10	Northblue
Taq酶用量 U/20 $\mu$ l	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	qpa18	Bonidon
退火温度	35	36	37	38	39	qpy13	Bonidon

## 2 结果与分析

**2.1 DNA的制备** 采用CTAB法提取蓝莓基因组DNA。由图1可知, DNA各样品主带明显, 带型整齐, 没有降解现象, 总DNA分子量都在19 kb左右。DNA经紫外分光光度计检测, 其OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值在1.8~2.1之间, 说明提取的DNA无蛋白质及RNA污染, 纯度较高。用此DNA作为模板进行RAPD反应扩增到较多特异条带, 表明该DNA提取方法可以满足蓝莓RAPD反应对模板的要求。



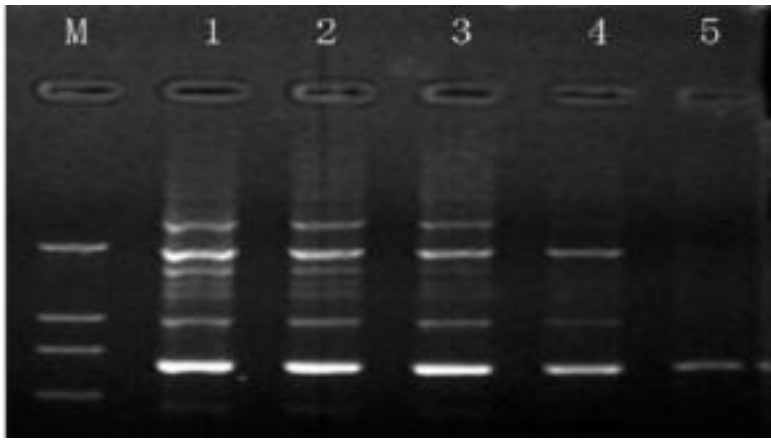
注: M为DNA Marker - EcoT14 digest; 1~12为蓝莓基因组DNA。

图1 蓝莓基因组DNA电泳图谱

## 2.2 RAPD PCR反应条件的优化

**2.2.1 模板DNA浓度对RAPD反应的影响。** 模板DNA的含量是制约扩增产物得率及特异性的重要因子。模板含量过低, 分子碰撞的机率低, 偶然性大, 无法得到扩增产物或使结果不稳定; 模板含量过高, 又会增加非特异产物的扩增, 造成弥散型电泳结果。适于RAPD反应的模板浓度范围因物种不同而异。如小麦RAPD反应中, 模板DNA用量在0.2~0.4 ng/ $\mu$ l<sup>[2]</sup>, 而霸王基因组RAPD反应最适DNA用量为2 ng/ $\mu$ l<sup>[3]</sup>。该研究选用的不同DNA浓度都可扩增出条带(图2), 但随着浓度增加, 条带数量逐渐减少, 2.5 ng/ $\mu$ l时只出现1

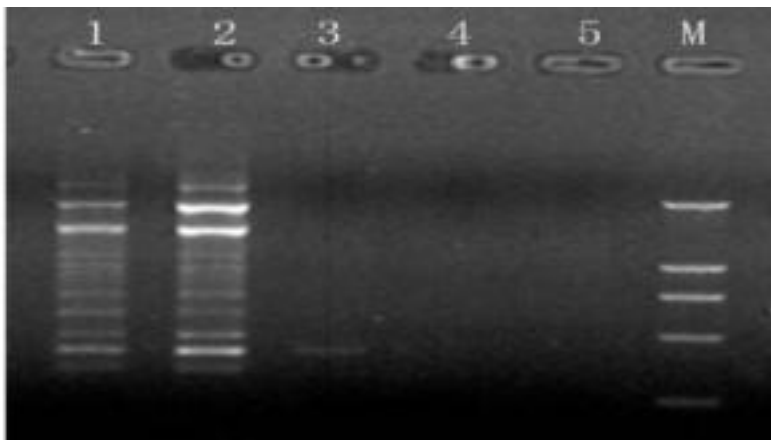
条带。用 $0.5 \sim 1.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  的 DNA 作为模板, 扩增出的条带清晰、数量最多。据此, 以下试验采用的模板浓度为 $1.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。



注:1~5 模板 DNA 浓度分别为 $0.5, 1, 1.5, 2, 2.5$ ; M 为 DL2000 Marker。

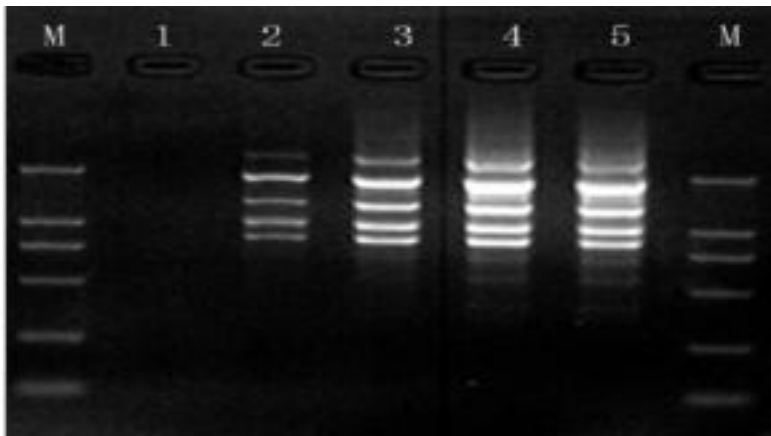
图2 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响

**2.2.2 底物 dNTPs 浓度对 RAPD 反应的影响。** dNTPs 是作为 PCR 反应的原料参与新链 DNA 的合成过程, 其浓度变化对 RAPD 扩增条带的数量和强弱影响较大。一般认为 dNTP 在反应体系中的最终浓度以 $0.1 \sim 0.2 \text{ mmol}/\text{L}$  最佳<sup>[4]</sup>。由图3可知, dNTP 浓度为 $0.125 \sim 0.25 \text{ mmol}/\text{L}$  时均可扩增出数量较多且清晰的条带,  $0.25 \text{ mmol}/\text{L}$  效果最佳; 高于该浓度, 扩增条带变弱或消失。



注:1~5 dNTPs 浓度分别为 $0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.625 \text{ mmol}/\text{L}$ ; M 为 DL2000 Marker。

图3 底物 dNTPs 浓度对 RAPD 反应的影响

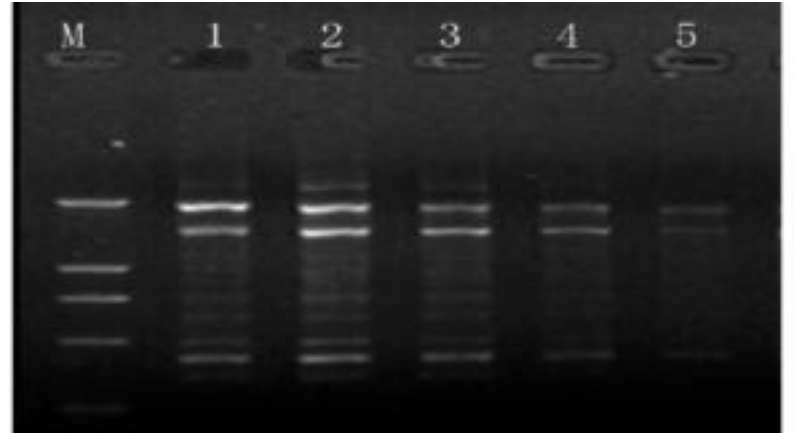


注: M 为 DL2000 Marker; 1~5 Taq 酶含量分别为 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ U}$ 。

图4 Taq 酶用量对 RAPD 反应的影响

**2.2.3 Taq 酶用量对 RAPD 反应的影响。** 在 RAPD 反应中, 使用高浓度的 Taq 酶不仅浪费, 而且容易产生非特异扩增; Taq 酶含量过低会使新链的合成效率下降, 导致扩增产物减少或消失。Taq 酶用量还与模板的质量及酶的活性有关<sup>[5]</sup>。由图4可知, 该研究中 Taq 酶用量低于 $1 \text{ U}$  时, 无扩增条带; 当用量为 $1 \sim 1.5 \text{ U}$  时, 扩增出的条带较多且主带较强; 高于 $1.5 \text{ U}$ , 扩增出的条带出现脱尾现象。考虑到经济因素, 选择 $1 \text{ U}$  作为蓝莓 RAPD 反应的 Taq 酶用量。

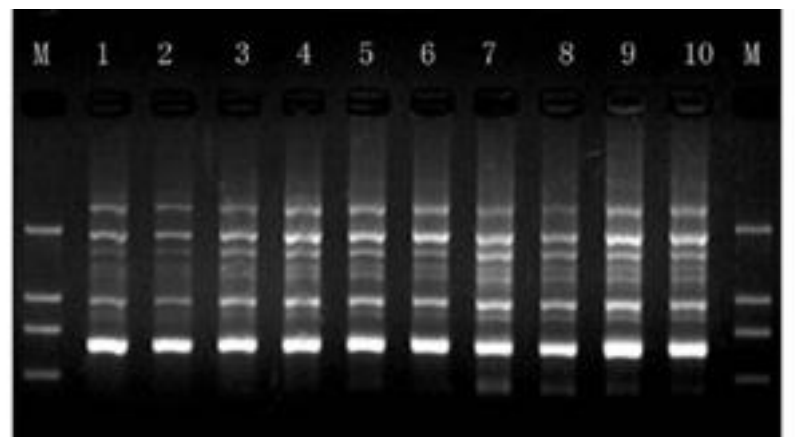
**2.2.4 随机引物浓度对 RAPD 反应的影响。** RAPD PCR 中, 引物浓度过低, 引物与模板结合机率下降, 扩增反应会过早结束, 造成引物条带过浅甚至没有条带; 引物浓度太高会导致非特异性产物的出现。由图5可知, 引物浓度为 $1 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  时扩增出的主带亮而清晰, 引物浓度增加, 扩增出的条带数量减少, 主带变弱, 可见蓝莓 RAPD 体系中最佳引物浓度为 $1 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 。



注: M 为 DL2000 Marker; 1~5 随机引物浓度分别为 $0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 。

图5 随机引物浓度对 RAPD 反应的影响

**2.2.5 不同退火温度对 RAPD 反应的影响。** 退火温度是影响扩增特异性的主要因子之一。在一定温度范围内, 退火温度越高扩增特异性越高; 随着温度的降低扩增产物的特异性也降低。由图6可知, 该试验在 $36 \sim 39$  范围内均可扩增出明显主带,  $37$  以上扩增出的条带清晰, 可重复性好, 因此可选择 $37$  作为蓝莓 RAPD 反应的退火温度。



注: M 为 DL2000 Marker; 1, 3, 5, 7, 9 退火温度分别为 $35, 36, 37, 38, 39$ ; 2, 4, 6, 8, 10 依次为 1, 3, 5, 7, 9 的重复。

图6 不同退火温度对 RAPD 反应的影响

### 3 讨论

准确性和稳定性是利用 RAPD 进行遗传分析的前提条件。不同的材料、不同的 DNA 提取方法、不同的仪器和不同的反应体系对 RAPD 反应结果有较大的影响。任何一个反应因子设置不好, 都会影响整个反应过程。因此, 系统地探索其反应最佳条件, 优化反应体系是提高 RAPD 反应可靠性和重复性的关键。该研究通过多次重复试验建立了适合蓝莓 RAPD 分析的反应体系:  $20 \mu\text{l}$  体系中, 模板 DNA 浓度 $0.5 \sim 1.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、dNTPs  $0.25 \text{ mmol}/\text{L}$ 、引物 $1 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 、Taq 酶活性值 $1.0 \text{ U}$ , 退火温度 $37$ 。

研究发现, DNA 模板质量是影响蓝莓 RAPD 稳定性的主要因素, 若模板质量差, 即使按照优化的体系也难以达到准确一致的效果。该研究用 CTAB 法从幼嫩的叶片或组培苗叶片提取 DNA 质量较好, 用其作为模板, PCR 扩增出的条带清

(下转第5793页)

(上接第5791 页)

晰,而且结果重复性好。从成熟叶片中提取 DNA 为模板,由于难以消除多糖、酚类物质及蛋白等的影响,结果往往不稳定。因此,探索快速、高效提取田间成熟叶片 DNA 的方法是当务之急。

## 参考文献

- [1] 栾雨时,包永明. 生物工程实验技术手册 M. 北京:化学工业出版社. 2005:164- 168.
- [2] DEVOS K M,GALE M D.The use of random amplified Polymorphic DNA marker in wheat[J].Theor、Appl、Genet,1992,84:567- 572.
- [3] 郝瑞文,景建洲,李振勇,等.霸王基因组 RAPD 优化条件的建立[J].中国沙漠,2006,26(2):286- 290.