

冷暖型小麦基因差异的最佳 RAPD 反应体系研究

裴国亮 李京敬 王长发 陶士珩 (西北农林科技大学生物信息中心, 陕西杨凌 712100)

摘要 为了建立小麦 RAPD 反应的最佳体系, 保证反应结果的稳定性和可靠性, 寻找小麦冷暖型基因差异, 降低试验成本, 在相同 PCR 扩增程序(94 预变性 5 min, 94 变性 45 s, 38 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min, 40 个循环, 72 延伸 10 min, 4 保存)下, 对冷暖型小麦基因组 DNA 的 RAPD 扩增体系各参数进行比较筛选, 创建其最佳反应体系为: 25 μ l 反应体系中, 模板 DNA 20 ng, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTPs 0.2 mmol/L, Taq 酶 1 U, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L, ddH₂O 12 μ l, 随机引物 10 ng。

关键词 冷型小麦; RAPD 反应体系

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)13-2993-03

Study on RAPD Reaction System for Gene Difference of the Cold and Warm Type of Wheat

PH Guoliang et al (College of Bio-information, Northwest Science and Technology University of Agricultural and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract In this research, with the same PCR program: 94 / 5 min, 94 / 45 s, 38 / 1 min, 72 / 1.5 min, 40 cycle, 72 / 10 min, 4 forever, the effects of the compositions of RAPD PCR reaction system on the gene difference of the cold and warm type of wheat were studied. An optimized RAPD system was set up: total volume was 25 μ l, including DNA 20 ng template DNA, 10 \times PCR buffer at 2.5 μ l, dNTPs at 0.2 mmol/L, Taq DNA polymerase at 1 U, Mg^{2+} at 2.0 mmol/L, ddH₂O 12 μ l and 10 ng random primers.

Key words Cold wheat; RAPD reaction system

冷型小麦是指灌浆成熟期间(开花至成熟,下同),冠层温度与当地生产上长期起骨干作用的对照品种相比较,相当或持续偏低的小麦;所谓暖型小麦则指上述期间与对照品种相比较持续偏高的小麦^[1]。冷型和暖型小麦的冠层温度以及其他一些重要性状都具有较明显的单态性,即不论各年天气如何,冷型小麦的冠层温度与对照品种相比总表现为持续偏低,暖型小麦则总表现为持续偏高;与之相伴随的一些重要内、外性状,冷型小麦较为优良,而暖型小麦则明显逊色。生物的代谢活动是由生物体内的遗传基因所决定的,如果可以从基因的角度对冷暖型小麦的差异加以揭示,从基因的水平进一步对冷型小麦的特征进行说明,对未来小麦的分子育种,实现小麦的稳产高产都有重要的意义^[2]。

RAPD(DNA 随机扩增多态性)^[3,4]技术自问世以来,以其简便、经济、快捷,且无须事先了解物种的相关分子生物学信息等特点,迅速渗透到基因组研究的各个领域^[5,6]。采用 RAPD 技术定位冷型小麦的特征基因,是比较经济和理想的方法,但 RAPD 反应影响因素较多,各反应因子的优化组合,是获得清晰、可重复扩增产物的前提,也是扩增反应成功的关键^[7,8]。为了保证反应结果的稳定性和可靠性,降低反应成本,笔者研究了各种因素变化对扩增结果的影响,建立了冷型小麦 RAPD 反应的最佳体系。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 试验材料是经多年种植遗传稳定的冷型小麦小偃6号、RB6,以及与之对照的暖型小麦 NR9405、9430。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取。采用 CTAB 法提取冷暖型小麦基因组 DNA。

1.2.2 DNA 浓度及纯度测定。电泳:在 0.8% 琼脂糖凝胶(含 EB 为 0.5 μ g/ml), 1 \times TAE 缓冲液(0.04 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA), 3~5 V/cm 下电泳,以 DNA/Hind 作对照,检测所提的 DNA 分子量大小、浓度及纯度。紫外分光

光 OD 值:取 DNA 溶液 4 μ l,加无菌蒸馏水 396 μ l,即稀释 100 倍,在紫外分光光度计上测 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,由 OD₂₆₀ \times 5 即得 DNA 浓度(μ g/ μ l)。由 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值可判断 DNA 纯度,比值在 1.60~1.90 可用于 PCR 扩增。

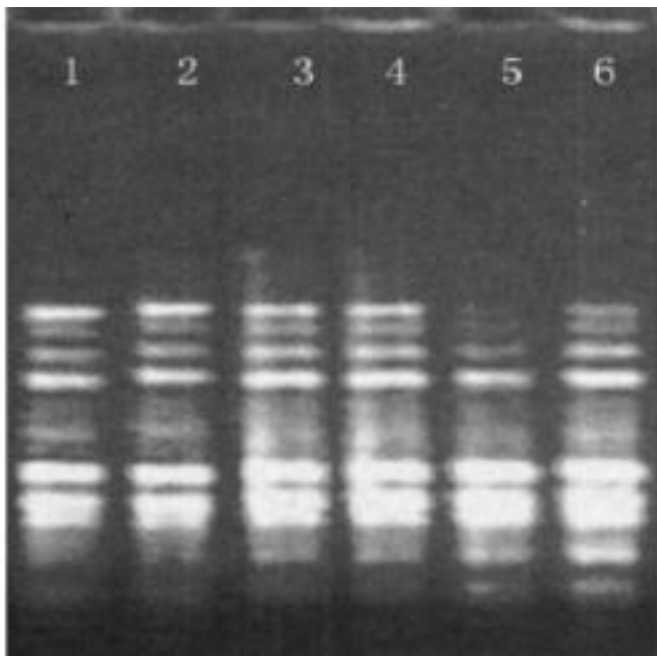
1.2.3 RAPD 扩增反应体系。利用 PTC2200 型 PCR 仪进行反应。反应体系为:模板 DNA 20~80 ng, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTPs 0.1~0.3 mmol/L, Taq 酶 0.5~2.5 U, Mg^{2+} 浓度为 1.5~3.0 mmol/L, 随机引物 5~20 ng, 总体积 25 μ l, 加盖 10 μ l 矿物油。在对反应体系中每个成分进行筛选时,初始反应体系中其他参数按 ABI 公司所建议的数值。PCR 扩增程序:94 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 36 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 45 个循环, 72 延伸 10 min, 4 保存。

1.2.4 PCR 产物的电泳分离。利用 1.4% 琼脂糖胶(琼脂糖加热溶于 1 \times TAE 缓冲液中,稍微冷却后加 EB 5 ng/ml), 在 1 \times TAE 缓冲液中进行水平电泳,电压 5 V/cm。利用 UVP2 凝胶成像系统(GDS2800)检测电泳结果,并利用该系统进行凝胶扫描照像。

2 结果与分析

2.1 模板质量浓度对扩增结果的影响 扩增反应中的模板 DNA,一般是含有待研究或待分离目的基因的总核 DNA。从理论上讲,一个细胞中的 DNA 量就足够用做扩增反应的模板,但是模板分子数越多,则错误扩增越少,因此模板 DNA 需要一定的量。然而当模板 DNA 量过多,又将降低扩增效率,增加非特异性产物。根据相关文献,在建议的扩增条件下,每 25 μ l 反应混合物中,模板 DNA 加入量宜为 15~100 ng^[9]。图 1 表明,模板质量为 10~40 ng 时,扩增产物无显著差异,但以 20 ng 为最优;模板质量为 40 ng 时, RAPD 产物的带型开始有弥散;当模板质量小于 10 ng 时, RAPD 产物的强度也相应减弱,而且扩增出的条带数也相应地减少;当模板质量大于 40 ng 时, RAPD 产物出现严重拖尾现象,带型分不清楚。因此,选择 20 ng 为 RAPD PCR 反应体系中最适宜模板质量。

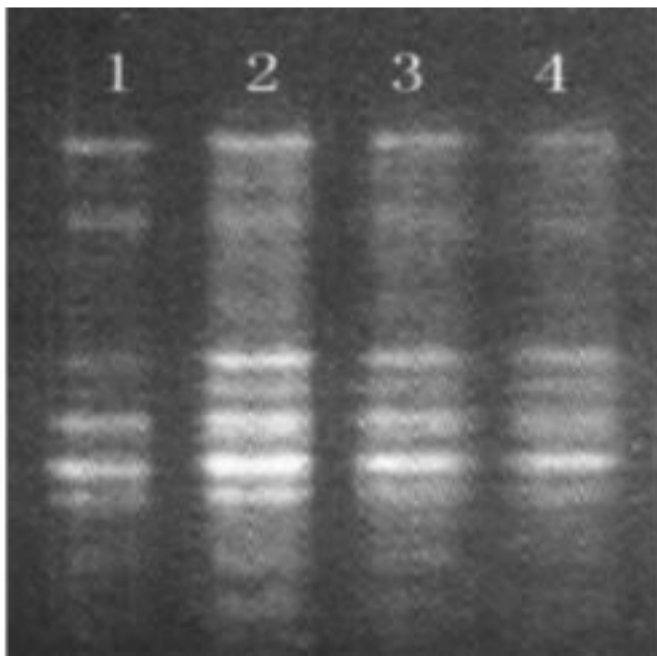
2.2 随机引物的浓度对扩增结果的影响 引物量的多少对扩增条带的影响比较大。在研究 RAPD 反应体系中发现,引



注:1~5号分别为模板质量10、20、30、40、50 ng。

图1 在25 µl体系中添加不同模板质量的扩增结果

物的浓度对RAPD指纹图谱影响很大,随着引物浓度的增加,产生的条带也增加,引物浓度太小,容易发生错配。若引物浓度小于10 ng,一般RAPD反应不会成功,或者使一些引物的再现性差。通常引物量为10~100 ng。图2表明,在25 µl的反应体系中,引物量为5 ng,无扩增产物;引物量为10、15、20 ng时,扩增片段的产率随之增加,但扩增出的条带数减少,尤其是弱带减少。为了保证反应结果的稳定性和特异性,引物浓度以10 ng为最佳。



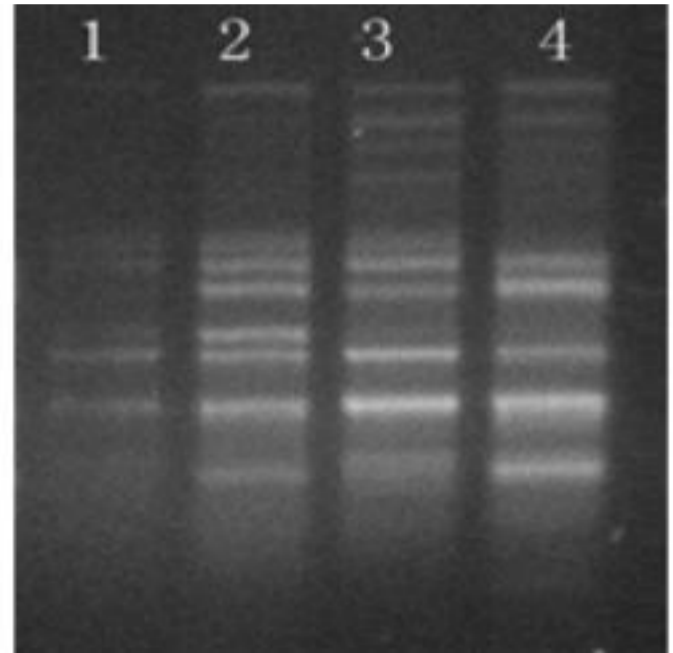
注:1~4分别添加的引物量是4、10、15、20 ng。

图2 在25 µl体系中添加不同引物量的扩增结果

2.3 Taq DNA聚合酶对扩增结果的影响 Taq酶对RAPD反应的稳定性非常重要,直接关系到试验的成功与否^[10]。在PCR反应体系中Taq酶用量一般为0.5~2.5 U,然而由于DNA、引物以及其他条件的差异,Taq酶的用量也有差异。反应混合物中酶量过大,会使非特异性扩增产物含量增高,特异性减少,扩增产物的电泳呈弥散状;若酶浓度过低,则合成产物的量减少。图3是选用MBI公司聚合酶不同加入量的扩增效果。对不同公司出品的Taq酶在试验的初期阶段要做比较试验,不一定是越好的Taq酶做RAPD的效果就越好,这要和试验的目的相结合。在该试验中,由于定位的是复杂性状,就要求品种间差异较多,反映在结果上就要求有较多稳定出现的高质量条带。

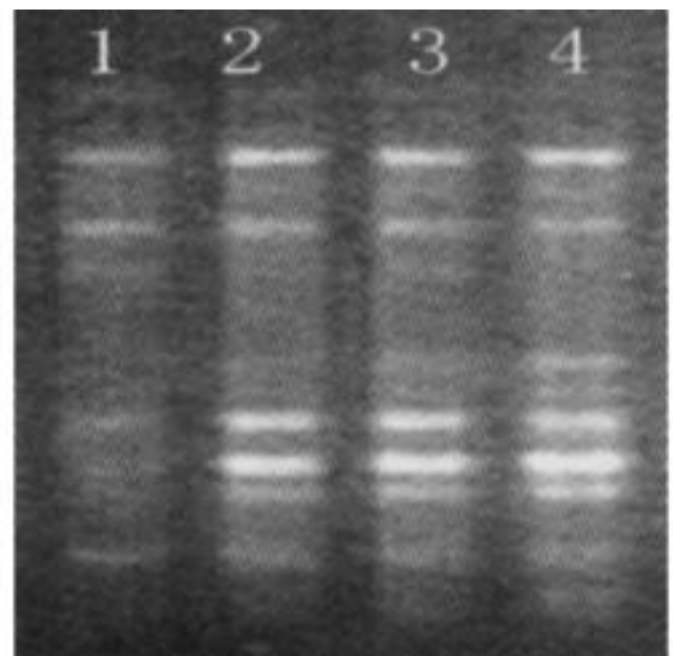
2.4 Mg²⁺浓度对扩增结果的影响 Mg²⁺浓度对RAPD反应的特异性和扩增效率都有影响。在反应系统其他方面都可

以稳定下来的时候对Mg²⁺的优化十分重要^[10]。当Mg²⁺浓度过高时,会使非特异性扩增产物增加,而且扩增电泳图谱中容易产生弥散状背景;当Mg²⁺浓度低时,会使扩增产物条带变暗,数目变得不稳定。当Mg²⁺浓度为1.0 mmol/L时,RAPD的PCR扩增产物不存在;当Mg²⁺浓度为1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L时,RAPD的PCR扩增产物的带型基本一致,但以Mg²⁺浓度为2.0 mmol/L时扩增电泳条带最为清晰。而当浓度增至2.5 mmol/L时,扩增片段开始有弥散趋势;浓度升至3.0 mmol/L时,弥散现象更为明显,认为是高浓度Mg²⁺对Taq酶活性产生严重影响。所以,从试验结果来看(图4),Mg²⁺浓度以2.0 mmol/L为宜。



注:1~4 Taq酶浓度依次是0.5、1.0、1.5、2.0 U。

图3 在25 µl体系中不同的聚合酶浓度扩增的结果



注:1~4 Mg²⁺浓度依次递增:1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L。

图4 在25 µl体系中Mg²⁺不同浓度扩增的结果

2.5 dNTPs浓度对扩增结果的影响 dNTPs为RAPD扩增反应的底物。浓度过低,产率下降,使条带数目不稳定,明暗有变化;浓度过高,错误掺入率增加,使扩增条带有弥散。试验中选用Taq酶指定dNTPs浓度,以0.2 mmol/L为dNTPs的最适宜浓度。

2.6 RAPD反应体系中各个阶段温度、时间的优化 对绝大多数的反应体系,起初的变性温度都在94℃,由于小麦的基因组较大,所以变性的时间较长,有研究表明必须在30 s以上才可以使基因组变性完全^[11]。大多数引物的最适复性温度为35~38℃^[12],但有一些引物在此温度下,无论如何调整其他反应条件,如酶量、引物、dNTP、MgCl₂浓度等,均不能显

著减少非特异性产物,只有提高复性温度,才能提高扩增产物的特异性,产生清晰的带型。该试验曾采用40~46 的复性温度,虽然可以得到清晰的条带,但是条带数太少,不能满足试验要求。延伸温度选用 RAPD 的最适温度72 。

3 结论与讨论

3.1 模板 DNA 浓度对扩增结果的影响 反应体系中模板浓度会对扩增结果产生直接影响。以往的报道中模板质量浓度从15~100 ng 不等^[13]。该试验模板质量浓度为30 和40 ng 时,某些扩增条带存在拖尾现象,影响试验结果的分析;当浓度达到60 ng 时,扩增产物拖尾严重到难以分辨。认为可能是由于模板质量浓度增加,体系中杂质含量也相应增多,从而影响 Taq DNA 聚合酶活性所致。随模板质量浓度降低,扩增带型的强度也随之减弱,以浓度为20 ng 时扩增结果最佳。

3.2 Taq DNA 聚合酶和 Mg²⁺ 对扩增结果的影响 Taq DNA 聚合酶和 Mg²⁺ 是影响 RAPD 反应的关键因素。Taq 酶浓度太低,扩增产率降低或无扩增产物。Mg²⁺ 则是酶的激活剂,试验表明 Mg²⁺ 浓度低于1.5 mmol/L 时,反应产率下降;Mg²⁺ 浓度高于3.0 mmol/L 时,酶活性受到影响,扩增带型拖尾现象严重,呈弥散状。所以 Taq 酶浓度以1.0 U 为宜,相应的 Mg²⁺ 浓度以2.0 mmol/L 为宜。

3.3 随机引物对扩增结果的影响 RAPD 反应的随机引物一般是10 碱基的寡聚核苷酸片段,G+C 含量在50%~70%,引物的浓度与扩增产物的特异性有关,引物浓度增加,非特异性扩增产物也增加,引物浓度低,PCR 产物减少。从该试验结果来看,引物浓度应在10 ng 左右。

3.4 dNTPs 对扩增结果的影响 RAPD 反应中,4 种 dNTPs

的浓度通常在0.05~0.3 mmol/L,在该试验中,dNTPs 的最适宜浓度为0.2 mmol/L。

综上所述,小麦 RAPD 扩增反应的最佳反应体系是:25 μ l 反应体系中,模板 DNA 20 ng,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l,dNTPs 0.2 mmol/L,Taq 酶 1 U,Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L,ddH₂O 12 μ l,随机引物 10 ng。该体系可作为冷型小麦 RAPD 反应的参考体系。

参考文献

- [1] 张篙午.小麦温型现象研究[J].应用生态学报,1997(8):471-474.
- [2] 张篙午,宋哲民,曹翠兰.小麦冷温群体研究[J].中国农业气象,1995,16(4):1-5.
- [3] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIAK K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] WELSH J, MCCLELLAND N. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 7213-7218.
- [5] 赵中秋,郑海雷,张春光.分子标记的发展及其在植物研究中的应用[J].福建热作科技,2000,25(4):13-16.
- [6] 卢江.随机放大多态性DNA(RAPD)——一种新的分子遗传标记技术[J].植物学报,1993,35(增刊):119-127.
- [7] 王冰冰,孙宝启.RAPD 技术进展及其在小麦育种中的应用[J].农业生物技术学报,1997,5(3):227-232.
- [8] 刘春林,官春云.植物RAPD 标记的可靠性研究[J].生物技术通报,1999(2):31-34.
- [9] DEVOS K M, GALE M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 567-672.
- [10] 汪小全,邹喻苹,张大明,等.RAPD 应用于遗传多样性和系统学问题中的问题[J].植物学报,1996,38(12):754-762.
- [11] ECTH C S, ERDAH L A, MCCOY T J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated Alfalfa [J]. *Genome*, 1992, 35: 84-87.
- [12] HE S, OHM H, MACKENZIE S. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 573-578.
- [13] 李晋涛.水稻幼苗单株DNA 的提取及其PCR-RAP 反应体系的建立[J].生物技术,1998,8(4):13-16.