

铁皮石斛野生居群研究(IV): RAPD 反应体系的构建与优化

丁鸽, 丁小余, 沈洁, 刘冬扬, 贺佳, 唐凤

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 为获得铁皮石斛 RAPD 的最佳反应体系, 本文对影响 RAPD 反应的模板含量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、Taq 酶浓度、扩增程序及退火温度等多种因子进行了构建与优化. 通过各因子的组合研究, 我们得到铁皮石斛 RAPD 反应最适扩增体系是: 25 μ L PCR 反应体积, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 为 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 12 pmol, ddH₂O 14.2 μ L. 最佳扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 38 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 4 $^{\circ}$ C 保存.

[关键词] 铁皮石斛, 随机扩增多态 DNA, 反应体系, 优化

[中图分类号] Q946 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0084-05

Studies of Wild Populations of *Dendrobium officinale* (IV): Establishment and Optimization of RAPD Reaction System

Ding Ge, Ding Xiaoyu, Shen Jie, Liu Dongyang, He Jia, Tang Feng

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: To obtain the optimal amplification conditions for *Dendrobium officinale*, the effects of the concentrations of DNA templates, magnesium, dNTP and Taq DNA polymerase and annealing temperature are tested and optimized. The optimal amplification conditions for *Dendrobium officinale* is acquired through the experiments: 25 μ L PCR reaction volume, 10 \times Buffer is 2.5 μ L, the concentration of magnesium is 2.5 mmol/L, dNTP is 2.5 mmol/L, the concentration of DNA templates is 30 ng, Taq DNA polymerase is 1.5 U, primer is 12 pmol, ddH₂O is 14.2 μ L. The optimal amplification program is also obtained: 94 $^{\circ}$ C 180 s, 1 cycle; 94 $^{\circ}$ C 50 s; 38 $^{\circ}$ C 60 s; 72 $^{\circ}$ C 120 s, 40 cycles; 72 $^{\circ}$ C 300 s, 1 cycle. stored in 4 $^{\circ}$ C.

Key words: *Dendrobium officinale*, random amplified polymorphic DNA, reaction system, optimization

0 引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属多年附生草本植物,是我国特有的珍稀濒危植物,是我国传统名贵中药之一,早在《本草纲目》中就被列为上品,具有养阴生津、润喉护嗓、温胃明目等功效. 为此,国内外学者对铁皮石斛的化学成分及药理作用进行了广泛研究,进一步证实铁皮石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等功效^[1-4].

随机扩增多态 DNA,简称 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA),是建立在 PCR 反应基础上的分子生物学技术,具有简单、快速和试验费用较低,不需预知研究对象的基因组序列等优点,被广泛应用于生物遗传多样性^[5]及分子鉴别^[6]的研究中. 为了研究铁皮石斛的遗传多样性,首先要建立稳定的反应体系,保证 RAPD 结果的可靠性与重复性. 本实验就模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、Taq 酶浓度等影响

收稿日期: 2005-03-04.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370144).

作者简介: 丁鸽,女,1982—,硕士研究生,从事植物分子生物学的学习与研究, E-mail: dingge2001@163.com

通讯联系人: 丁小余,1965—,教授,博士生导师,从事植物学的教学与研究, E-mail: dingxyj@263.net

RAPD 反应的诸因素进行了构建和优化,建立重复性强、稳定性好的铁皮石斛 RAPD 反应体系,为进一步研究铁皮石斛的遗传多样性、开发利用这一珍稀药用资源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料:采自石斛的主产区云南、贵州、广西等地的原始森林,由南京师范大学丁小余教授鉴定,种质通过组织培养保存于南京师范大学生命科学院植物组培室。

试剂:引物购于南京生兴生物公司,PCR 反应缓冲液、高品质的 Taq 酶及 dNTP 均为上海 Promega 公司产品。

1.2 基因组 DNA 的提取与定量

取新鲜的叶片或茎 0.1 g,或采用硅胶干燥材料,用无菌水冲洗干净,在液氮中研成粉末。根据 QIA-GEN 试剂盒的使用指南进行高质量的总 DNA 提取。

提取后的 DNA 用紫外吸收法和琼脂糖电泳双重检测 DNA 浓度和纯度。用于 PCR 扩增反应。

1.3 RAPD 反应程序

在 PTC200 扩增仪上,经过摸索,得到铁皮石斛 RAPD 分析的 PCR 反应程序:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 50 s,38℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 40 次;最后 72℃ 延伸 5 min。4℃ 保存。

1.4 RAPD 扩增中各影响因素

1.4.1 Mg^{2+} 含量

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 1.5 μ L, ddH₂O 14.2 μ L。不同浓度的 Mg^{2+} :

① 1 mmol/L; ② 2.5 mmol/L; ③ 3.5 mmol/L; ④ 4.5 mmol/L; ⑤ 5.5 mmol/L; ⑥ 6.5 mmol/L。(图 2.)

1.4.2 dNTP 浓度

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, 模板 DNA 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 1.5 μ L, ddH₂O 14.2 μ L。不同浓度的 dNTP:

① 1 mmol/L; ② 2.5 mmol/L; ③ 3.5 mmol/L; ④ 4.5 mmol/L; ⑤ 5.5 mmol/L; ⑥ 6.5 mmol/L。(图 3.)

1.4.3 引物浓度

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, ddH₂O 14.2 μ L。不同浓度的引物:

① 4 pmol; ② 8 pmol; ③ 12 pmol; ④ 16 pmol; ⑤ 24 pmol; ⑥ 32 pmol。(图 4.)

1.4.4 模板 DNA 浓度

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 1.5 μ L, ddH₂O 14.2 μ L。不同浓度的模板 DNA:

① 10 ng; ② 30 ng; ③ 50 ng; ④ 70 ng; ⑤ 100 ng。(图 5.)

1.4.5 Taq 酶单位

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 30 ng, 随机引物 1.5 μ L, ddH₂O 14.2 μ L。不同浓度的 Taq 酶:

① 1 U; ② 1.5 U; ③ 2 U; ④ 2.5 U; ⑤ 3 U; ⑥ 4 U。(图 6.)

1.4.6 退火温度

共同的 PCR 反应条件:25 μ L PCR 反应体积,10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 2.5 μ L (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 1.5 μ L, ddH₂O 14.2 μ L。不同的退火温度:

① 36℃; ② 38℃; ③ 40℃。(图 7.)

1.5 PCR 产物的鉴定

扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (0.5 \times TBE, 0.5 mg/LEB) 电泳,在紫外凝胶成像系统 (UVP GDS—8000) 上观察并记录电泳结果。

2 实验结果

2.1 模板 DNA 的检测

DNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳 ($0.5 \times \text{TBE}$, 0.5 mg/LEB), 电压 100 V , 电泳 2.5 h , 通过 UVP GDS—8000 凝胶成像系统观察, 显示结果(图 1)表明, 相对分子质量都在 $1.32 \times 10^7 \text{ g/mol}$ 以上, 可以证明利用 QIAGEN 试剂盒提取的基因组 DNA 是高质量的。

2.2 Mg^{2+} 浓度

当 Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时, 无条带出现; 在 2.5 mmol/L 能得到清晰的带, 带型稳定性好。从 4.5 mmol/L 开始发生带型的变化, 并且随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 带的数量增加, 开始出现非特异性条带。(图 2.)

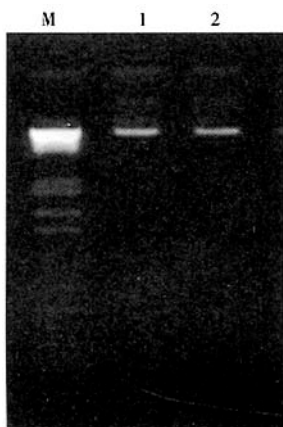


图 1 铁皮石斛总 DNA 凝胶电泳结果

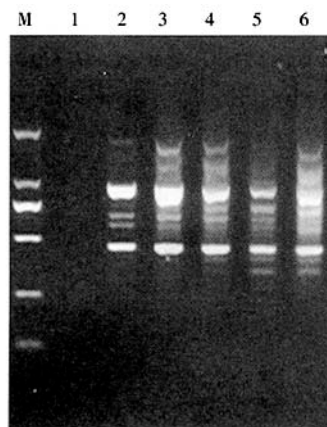


图 2 Mg^{2+} 浓度梯度对扩增带型的影响

2.3 dNTP 浓度

当 dNTP 为 $1 \mu\text{L}$ 时, 反应所产生的条带较少且亮度较低; 当 dNTP 为 $2.5 \mu\text{L} \sim 4.5 \mu\text{L}$ 时, 产生的条带基本一致; 但当 dNTP 为 $2.5 \mu\text{L}$ 时, 所产生的条带重复性好。当 dNTP 为 $5.5 \mu\text{L}$ 和 $6.5 \mu\text{L}$ 时, 产生的条带明显减少, 且有的条带亮度降低。(图 3.)

2.4 引物浓度

当引物浓度为 6 pmol 、 8 pmol 时, 反应出现较少的条带, 且亮度较弱。当引物浓度为 12 pmol 、 16 pmol 时, 扩增产物带型相似, 背景干扰较小。当引物浓度为 24 pmol 、 32 pmol , 反应出现非特异性条带并且背景干扰增大。(图 4.)

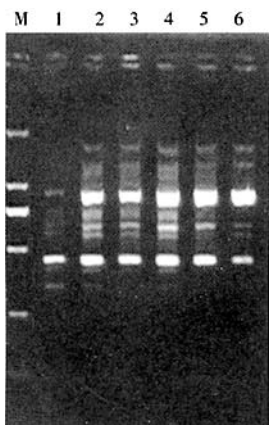


图 3 dNTP 浓度梯度对扩增带型的影响

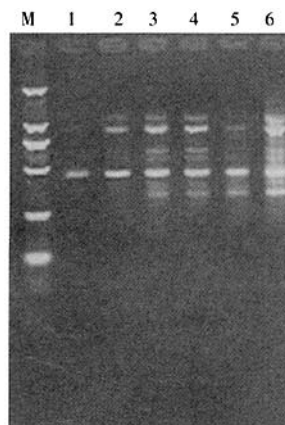


图 4 不同引物浓度的扩增效果

2.5 模板 DNA 浓度

当模板含量为 10 ng、100 ng 时,反应都有扩增,且其扩增的带型变化不大.但当模板为 10~30 ng 时,扩增的条带多且清晰、重复性好.当模板含量大于 50 ng 时,扩增产物反而减少,条带亮度稍有减弱.(图 5.)

2.6 Taq 酶浓度

当酶浓度为 1~1.5 U 时,扩增的条带相似,条带清晰特异性强.当酶浓度达到 2 U 及以上时,扩增条带发生较大改变.有时条带多且拖尾现象明显;有时条带数又明显减少,扩增条带不稳定.(图 6.)

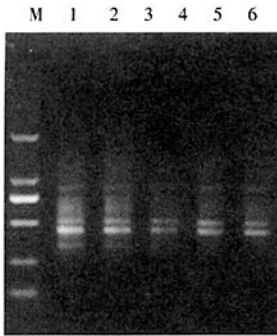


图 5 模板浓度梯度对扩增带型的影响

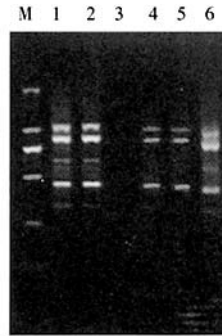


图 6 不同 Taq 酶浓度的扩增效果

2.7 退火温度

见图 7,退火温度对扩增结果产生较大的影响.当退火温度为 36℃ 时,产生非特异性条带较多,且条带亮度稍弱.退火温度为 38℃ 时,产生的条带较多而且稳定存在,是本实验采用的扩增程序.当退火温度为 40℃ 时,产生的条带少,亮度低,扩增特异性不高.

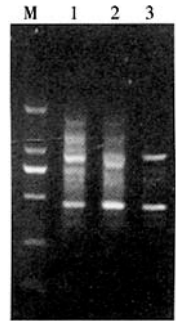


图 7 不同退火温度的扩增效果

3 讨论

RAPD 标记技术以其操作方便、多态性好、灵敏度高为优良品质,成为植物资源保护和种质资源保存的依据^[7],被广泛用于药用植物的鉴别^[8-11]以及物种亲缘关系、进化趋势^[12,13]的研究,特别是对濒危物种的研究更有实际的意义^[14].在对濒危药用植物铁皮石斛研究之前,构建稳定的 RAPD 反应体系是必要的.

高质量的 DNA 模板是保证 RAPD 反应稳定性和重现性的重要因素之一.本文中的 DNA 是利用德国 QIAGEN 试剂盒提取的新鲜组培物,所获 DNA 均为 20 kb 以上,所以能确保 DNA 的质量.当反应体系中 DNA 模板含量在 10~100 ng 范围之间,均扩增出清晰条带,且带型基本无变化,说明模板含量的高低在相当大的范围内不会对 RAPD 反应结果产生太大的影响.这一结论与汪小全等的实验结果类似^[15].当 DNA 模板在 10~30 ng 时,扩增条带最为清晰稳定,所以本实验的模板浓度均采用 30 ng.

RAPD 扩增条带的质和量与 Taq 聚合酶的质量和活力密切相关.我们在实验中选择了高质量的 Taq 酶,以减少低品质 Taq 酶的错配,增加了反应的重现性.在 RAPD 中 Taq 酶的用量一般为 0.5~2.0 U,过高会有小片断出现,过低则会导致扩增条带太弱.模板的纯度、 Mg^{2+} 浓度、反应温度都是通过影响聚合酶的活力而进一步引起扩增结果的差异^[14].

Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂,其浓度的变化对 RAPD 扩增结果有重要影响. Mg^{2+} 浓度过低时,酶活力显著降低,产物减少;过高时会导致非特异性扩增产物的积累,背景模糊^[16].本实验结果表明 Mg^{2+} 在 2.5 mmol/L 时扩增最好,扩增带型没有变化.

dNTP 是反应中磷酸的主要来源,是合成 DNA 的原料,其浓度略高一些,可以保证 PCR 扩增反应的完全,因为在浓度低于 2.5 mmol/L 时可以看到扩增条带明显减少.但如果 dNTP 浓度过高,就会与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} ,使 Taq 酶无法正常完全发挥聚合作用.

引物的浓度与扩增产物的特异性有关. 引物浓度过低, 无法与所有的模板 DNA 结合位点结合, 导致扩增结果不理想; 引物浓度过高时, 会促使引物错误地引导非特异性产物——引物二聚体的合成, 非特异性产物和引物二聚体亦均是 PCR 反应的底物, 与靶序列竞争 DNA 聚合酶和底物 dNTPs, 均使靶序列的扩增量降低, 而出现非特异条带, 与前人结果类似^[17]. 本实验所采用的引物浓度为 12 pmol.

退火温度对 RAPD 条带的数量和强弱影响较大. 当改变退火温度时, RAPD 带谱发生明显的变化. 退火温度为 36℃ 时, 产生非特异性条带较多. 退火温度为 40℃ 时, 产生的非特异性条带较少. 本实验采用了 38℃ 的退火温度.

通过多次实验, 我们得出铁皮石斛 RAPD 扩增的最佳体系是 (25 μL 反应体积): 2.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 2.5 μL (各 2.5 mmol/L), 模板 DNA 30 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 1.5 μL. 最佳扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 50 s, 38℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 循环 40 次; 最后 72℃ 延伸 5 min. 4℃ 保存.

[参考文献]

- [1] Hua Yunfen, Zhang Ming, Fu Cheng Xin, et al. Structural characterization of a 2-O-ace-tylglucomanan from *Dendrobium officinale* stem[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(13): 2219—2224.
- [2] 杨虹, 王顺春, 王峥涛, 等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(4): 254—257.
- [3] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(1): 109—113.
- [4] 陈晓梅, 等. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70—75.
- [5] 赵锦, 刘孟军, 吕增仁. RAPD 技术在植物遗传多样性研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(1): 25—28.
- [6] Jia Jianhang, Wang Ping, Jin Demin, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of porphura [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(4): 403—407.
- [7] 宋卫华, 李晓东, 李新伟, 等. 三峡库区稀有植物裸芸香的遗传多样性和保育策略[J]. 生物多样性, 2004, 12(2): 227—236.
- [8] Park S Y, Yook C S, Nohara T, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic relationships among Acanthopanax species[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(12): 1270—1274.
- [9] 张铭, 黄华荣, 廖苏梅, 等. 石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(7): 442—447.
- [10] Zhang Y B, Ngan F N, Wang Z T, et al. Radom primed polymerase chian reaction differentiates Codonopsis pilosula from different localities[J]. Planta Medica, 1999, 65: 157—160.
- [11] 方芳, 郭水良, 黄华, 等. 浙江产香茶菜属植物 8 个居群的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2003, 34(6): 553—557.
- [12] 黄春洪, 杭悦宇, 周义锋, 等. 我国盾叶薯蓣居群遗传结构分析[J]. 云南植物研究, 2003, 25(6): 641—647.
- [13] Li Ang, Luo Yibo, Xiong Zhiting, et al. A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(2): 250—252.
- [14] 李雪雁, 王艇, 苏应娟. 子遗植物桫欏 RAPD 分析中主要反应参数的影响[J]. 生态科学, 2003, 22(2): 120—123.
- [15] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954—962.
- [16] 邹继军, 董伟, 张志永, 等. 大豆 RAPD 影响因素的探讨[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 197—201.
- [17] 金忠民, 沙伟, 孙天国, 等. 蓝萼香茶菜随机扩增多态 DNA (RAPD) 反应体系优化[J]. 广西科学, 2004, 11(3): 258—260.

[责任编辑: 孙德泉]