

学术园地

马铃薯 RAPD 标记的 PCR 技术影响因素的探讨

陈绪清¹ 柳俊 郑用琰 谢从华

(华中农业大学生命科学技术学院 湖北武汉 430070)

摘要 试验采用不同的马铃薯材料进行 PCR 技术体系的研究, 建立和完善了马铃薯少量材料的 DNA 提取方法, 研究了 PCR 扩增中 Mg^{2+} 浓度、引物和底物浓度对 PCR 产物的影响。试验结果表明, 在以引物为 10_{mer} 的 PCR 反应体系中, 适当提高 Mg^{2+} 浓度 (1.5~2.7 mM) 有利于 PCR 反应的进行, 而引物与底物只有一个相对适当浓度范围内才能获得理想的结果, 过低会使扩增产物达不到可检测的水平, 过高则会影响扩增产物的特异性。本试验中引物的适宜浓度为 0.8 μ M, 底物为 80~180 μ M。所建立的优化马铃薯 PCR 体系同样适用于水稻、玉米、番茄和油菜等作物。

关键词 马铃薯; PCR (polymerase chain reaction); RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

1 前言

PCR (Polymerase chain reaction) 技术是 80 年代末期发展起来的 DNA 扩增技术。它是模拟生物 DNA 复制的基本过程, 根据双链 DNA 能在高温下变性成为单链 DNA, 而单链 DNA 在温度较低时能按照碱基互补配对原则再复性成为双链 DNA 的特性, 通过设计寡核苷酸引物, 以生物 DNA 为模板, 在底物 dNTPs 存在的条件下, 用 DNA 聚合酶催化复制基因组中两个引物结合位点间的 DNA 片断。在经过一定次数的变性—复性—延伸的循环后, 复制的 DNA 片断数

量呈指数增加, 使其达到可检测的水平。近年来, PCR 技术已广泛应用于生命科学的众多研究领域, 特别是根据 DNA 分子中核苷酸排列及分布特点而精心设计各种不同类型的引物分子所发展起来的分子标记体系, 如 RAPD、SSR、STS、ISSR、AFLP 等, 已在构建高密度遗传连锁图、目标基因的精细定位、生物种质遗传多型性评估等方面取得了许多重要进展^[1~6]。

RAPD 技术是 1990 年由 Welsh^[7] 和 Williams^[8] 所领导的两个研究小组几乎同时发展起来的以 10_{mer} 随机序列的寡核苷酸片段为引物, 对总 DNA 分子进行 PCR 反应的分子标记体系, 在马铃薯的研究中已经得到广泛应用^[9~12]。但由于各研究者所使用的 DNA 扩增仪及反应条件不尽相同, 所获得

的技术参数相距甚大。同时, 国内在马铃薯 RAPD 影响因素方面的研究尚不系统, 导致各研究者往往需要进行重复性探索试验, 直接影响了该技术在马铃薯研究中的应用。本研究旨在系统了解马铃薯 RAPD 反应中主要的影响因子及其相互作用, 以建立较为稳定的 RAPD 反应体系, 为 RAPD 标记在马铃薯研究中的实际应用提供可靠参考。

2 材料与方法

2.1 试验材料

本试验选用了不同类型的马铃薯栽培种和野生种, 以求试验结果具有较广泛的代表性。其中所有材料均用于小量材料 DNA 的提取方法研究, 4 份用于 PCR 反应影响因素的研究。

栽培品种 ($2n=48$): 鄂马铃薯 1 号 (E-1)、N552、51-5、22-2、I-10

栽培种双单倍体 ($2n=24$): 京丰 1 号 (JF-1)、DH4、93-34079

近缘栽培种 ($2n=24$): *Solanum phureja*

野生种 ($2n=24$): *Solanum chacoense*

2.2 DNA 提取

DNA 小量提取法 (该方法参照 1991 年 Edwards 方法^[13]稍作修改): 取 0.1 g 新鲜叶片, 放入 1.5 ml Eppendoff 管中用自制玻棒充分研磨使其呈匀浆状, 随即加入抽提缓冲液 (100 mM Tris-HCl pH=8.0、500 mM NaCl、50 mM EDTA、0.7 μ l/ml β -巯基乙醇) 600 μ l 涡旋 5 s。静置一定时间 (1 h 以内) 后在室温下 13 000 r/m 离心 1 min, 提取上清液在其中加入 4 μ l RNase (10 mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 再加入等体积苯酚并充分混匀, 使呈浅绿色乳状, 室温下 13000 r/m 离心 3 min, 小心提取上清液并在其中再加入等体积氯仿, 充分混匀后用同样条件离心 3 min, 小心提取上清液并加入等体积 -20 $^{\circ}$ C

预冷的异丙醇轻轻地混匀, -20 $^{\circ}$ C 静置 3 h 以上, 使 DNA 充分沉淀。然后, 13 000 r/m 室温离心 5 min, 弃上清液, 晾干 DNA。使用时加入 100 μ l 重蒸水溶解 DNA。取 10 μ l DNA 溶液, 以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。溶解后的 DNA 可直接用于 PCR 扩增。

此外, 为了检验本试验建立的 PCR 体系的实用性, 试验还将其它几个作物的 DNA 用于 PCR 扩增, 其 DNA 来源有由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室袁美提供的 4 份 SDS 法提取的油菜总 DNA (两份芥菜型油菜、两份甘蓝型油菜)、安贤惠提供的两份小量提取法提取的甘蓝型油菜总 DNA (未经苯酚-氯仿抽提纯化)、冯纯大提供的两份棉花总 DNA (抗病品种、感病品种)、许莉提供的两份玉米总 DNA (可育品种、雄性不育品种) 和黄烈健提供的两份番茄总 DNA。

2.3 PCR 试剂

Taq DNA 聚合酶、反应缓冲液及 $MgCl_2$ 购自上海生工生物工程公司、华美生物工程公司、武汉卫检科技开发服务公司; dNTPs 购自 Promega 公司; 引物购自 Operon 公司的 10-mer 随机引物。

2.4 PCR 扩增运行程序

试验采用的 PCR 扩增仪为 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480。PCR 扩增运行程序设置为: 94 $^{\circ}$ C 3 min—38 $^{\circ}$ C 2 min—72 $^{\circ}$ C 2 min 2 次循环—94 $^{\circ}$ C 1 min—40 $^{\circ}$ C 1 min—72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s 40 次循环—72 $^{\circ}$ C 10 min, 保存温度 4 $^{\circ}$ C。

3 结果与分析

PCR 反应体系的主要因子包括供试模板 DNA、dNTPs、引物、 $MgCl_2$ 、Taq 酶及反应缓冲液。在建立马铃薯 PCR 反应体系时,

固定使用同一公司的 Taq 酶及其提供的反应缓冲液。除此之外, 本试验主要就模板 DNA 的质量、dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度和引物浓度进行最佳组合方案的探讨, 研究其对 PCR 扩增结果的影响。

3.1 马铃薯总 DNA 的提取

本试验采用 DNA 小量提取法提取 DNA, 目的在于使所建立的整套试验方法实用于在育种实践中早期的小量材料的选择鉴定。试验结果显示, 该方法提取 DNA 方便、快速, 并且质量和纯度也很高 (图 1), 这为 PCR 结果的稳定性提供了重要保证。

3.2 dNTPs 浓度对 PCR 结果的影响

dNTPs 浓度的影响主要体现在 PCR 扩增

产物量的多少。在一定的浓度范围内 ($80 \sim 180 \mu M$) 一般不影响扩增产物的带型, 只是产物中部分带的亮度增加 (图 2)。但当底物浓度超过 $200 \mu M$ 时, 扩增产物中就可能出现一些非特异扩增。

3.3 引物浓度对 PCR 结果的影响

引物浓度太高或太低对 PCR 扩增都有很大的影响。本试验中引物浓度低于 $0.4 \mu M$, 扩增产物量很低, 电泳时很难检测到可分辨的带型, 但当引物浓度高于 $1.2 \mu M$ 时, 扩增反应也无法进行, 这可能是由于引物浓度过高引起分子间的相互干扰, 形成引物二聚体, 使 PCR 扩增无法进行。本试验引物浓度以 $0.8 \mu M$ 为最佳 (图 3)。

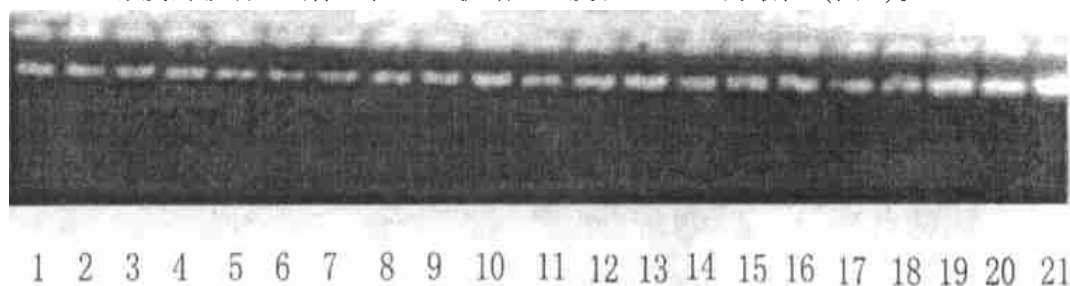


图 1 马铃薯总 DNA 琼脂糖凝胶电泳

1, 2 为 E-1; 3, 4 为 51-5; 5, 6 为 22-2; 7, 8 为 I-10; 9, 10 为 N552; 11, 12 为 DH4; 13, 14 为 93-34079; 15, 16 为 JF-1; 17, 18 为 *S. chacoense*; 19, 20, 21 为 *S. phureja*。

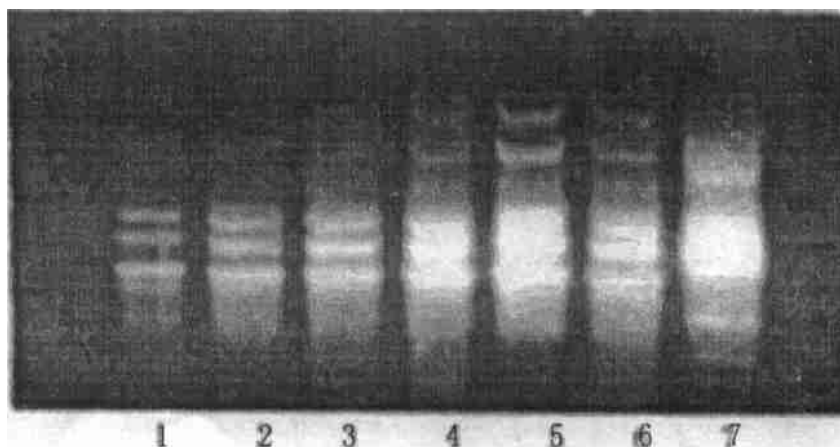


图 2 同一引物 (OPA-09) 不同 dNTPs 浓度的 PCR 扩增产物的凝胶电泳

1~7 依次为 $80 \mu M$ 、 $100 \mu M$ 、 $120 \mu M$ 、 $140 \mu M$ 、 $160 \mu M$ 、 $180 \mu M$ 、 $200 \mu M$ 。

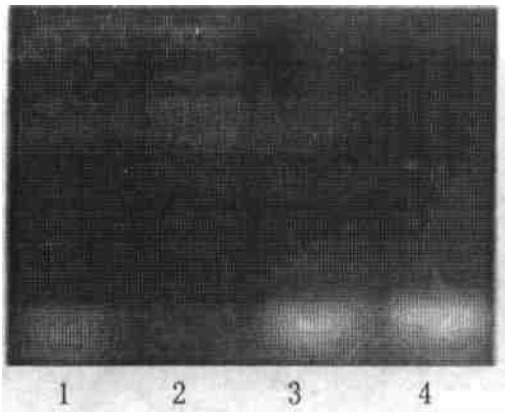


图 3 同一引物 (OPA-09) 不同浓度 的 PCR 扩增产物的凝胶电泳
1~4 依次为 0.4 μM、0.8 μM、1.2 μM、1.6 μM。

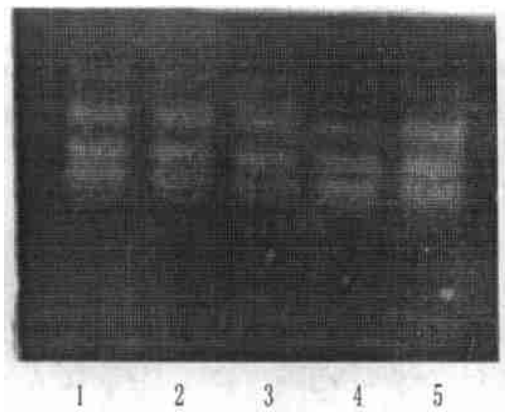


图 4 同一引物 (OPA-09) 不同 Mg^{2+} 浓度的 PCR 扩增产物的凝胶电泳
1~5 依次为 1.5 mM、1.8 mM、2.1 mM、2.4 mM、2.7 mM。

3.4 Mg^{2+} 浓度对 PCR 结果的影响

Mg^{2+} 在 PCR 中是 Taq 酶的辅因子, Taq 酶活性的发挥需要 Mg^{2+} 的存在。同时, PCR 体系中, DNA、dNTPs 等对 Mg^{2+} 都有结合作用, 这样使反应体系中游离态的 Mg^{2+} 浓度远低于表观 Mg^{2+} 浓度。因此, 在进行 PCR 条件探索时, 适当提高 Mg^{2+} 浓度更有利于 PCR 扩增。在本试验中, Mg^{2+} 浓度在较宽的范围内 (1.5~2.7 mM) 对 PCR 扩增无影响 (图 4)。

综合上述三个因素, 优化的 PCR 体系为:

重蒸水	8.5 μl
dNTPs (500 μM)	6.0 μl
15 mM $MgCl_2$	2.5 μl
10×反应缓冲液	2.5 μl
引物 (10 μM)	2.0 μl
Taq 酶 (2U/μl)	0.5 μl
DNA (30 μg/μl)	3.0 μl
总体积	25 μl

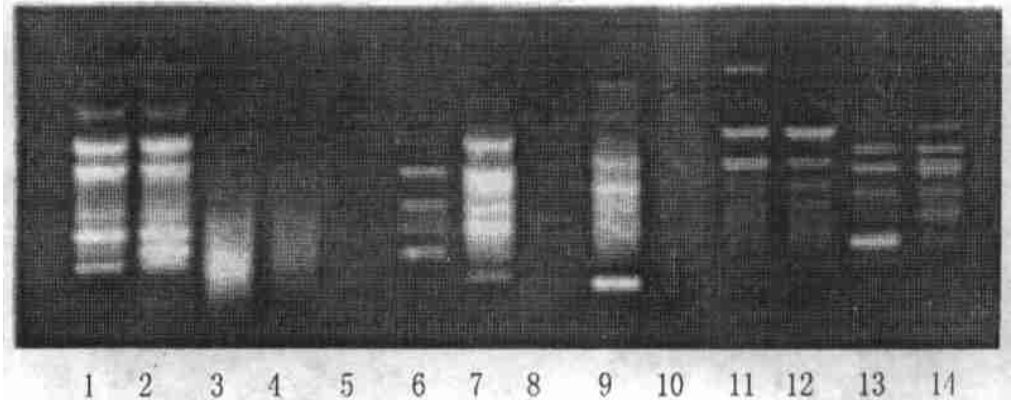


图 5 不同作物 DNA 在同一引物 (OPA-08) 和相同反应体系下的 PCR 扩增产物的凝胶电泳
1,2 为芥菜型油菜 DNA; 3,4 为甘蓝型油菜 DNA (少量提取法); 5,6 为甘蓝型油菜 DNA (大量提取法);
7 为棉花 DNA; 8 为玉米 DNA; 9,10 为番茄 DNA; 11,12 为番茄 DNA; 13,14 为马铃薯 DNA。

3.5 不同作物 DNA 在优化后反应体系中的扩增情况

为了检验优化试验获得的 PCR 体系的稳定性和实用范围,在上述建立的体系中用同一引物(OPA-08)对油菜、棉花、玉米和马铃薯同时进行 PCR 扩增,结果显示其扩增反应均得到满意效果(图 5)。由此说明,该体系也适用于上述作物的任意引物 PCR 扩增。

4 讨 论

4.1 DNA 提取

以 PCR 技术为基础的 RAPD 标记之所以被认为是最有可能直接应用于育种实践,其主要原因之一就是 PCR 反应所用 DNA 量少,从而使其在育种早期材料量较少的情况下,能够用于早期辅助选择。然而,如果采用常规的方法提取 DNA,通常需要较多的植物材料,这在育种早期材料的鉴定中往往很难实现,所以分子鉴定应用首先就要有材料用量很少的 DNA 提取方法。本试验在 Edward (1991)^[13]微量提取 DNA 的方法基础上进行了适当改进,试验结果表明,改进后的 DNA 小量提取法仅用 0.1 g 新鲜植物材料,就可以获得用于 PCR 扩增所需的模板 DNA 量。同时这一方法还具有提取速度快,整个过程只需 4 h 左右;所需药品的种类和用量少,提取步骤简单,单位材料 DNA 产量高,一般可达 200~250 ng/g, DNA 质量好(OD_{260}/OD_{280} 为 1.50~1.79)等优点。

在试验中观察到,采用小量 DNA 提取法必须注意以下几点:首先是所用植物材料一定要新鲜,最好采用幼嫩叶片或试管苗;其次是研磨要迅速充分,呈匀浆状时要迅速加入缓冲液并涡旋,以免细胞内物质氧化而导致提取的 DNA 变褐;最后是 DNA 沉淀要充分,以便提高 DNA 产量,最好采用 -20℃

预冷的异丙醇。未经预冷的异丙醇在加入混匀后要在 -20℃ 冰箱内放置 3~4 h 以上,使 DNA 充分沉淀。

4.2 PCR 体系中各试剂对 PCR 产物的影响

试验采用 4 份马铃薯材料研究了 $MgCl_2$ 底物及引物浓度对 PCR 扩增产物的影响。结果显示在一定浓度范围内,高浓度 $MgCl_2$ 和适宜的底物及引物浓度是获得理想扩增产物的前提。在 PCR 扩增过程中,需要较高浓度的 Mg^{2+} 原因可能是 dNTPs 中的磷酸根离子与子 DNA 中的磷酸根残基共同竞争 Taq DNA 聚合酶活性必须的 Mg^{2+} ,当 dNTPs 浓度超出一定范围或者 DNA 浓度过高时,使反应体系中 Mg^{2+} 实际浓度远远低于表观浓度,从而使 Taq DNA 聚合酶所需结合的 Mg^{2+} 不足,影响 Taq DNA 聚合酶的活性。因此,在 PCR 反应体系中,适当提高 Mg^{2+} 的浓度,有助于 PCR 反应的进行。在我们的试验中显示, Mg^{2+} 的浓度有一较宽的使用范围,选用上限浓度更有利于 PCR 扩增。dNTPs 浓度对扩增带型的影响,主要是 dNTPs 浓度太低时,扩增的产物量很少,一般很难用凝胶电泳检测出来。但当 dNTPs 浓度过高时则产生一些非特异带而影响试验结果。我们的试验结果显示,当 dNTPs 浓度高于 200 μM 时即会出现非特异性扩增,这可能是过高的 dNTPs 浓度是扩增过程中的错误掺入率大大增加的缘故^[7,8]。

4.3 PCR 循环对 PCR 结果的影响

从理论上讲,PCR 循环次数达到 25 次足以扩增出用于凝胶电泳检测所需的 DNA 量。循环次数太多可能出现非特异性扩增。但是,在本试验中,25 和 30 次循环很难扩增出足够用于凝胶电泳检测 DNA 量,往往需要 35 次以上才能扩增出足够用于检测的用量,同时,在试验过程中还发现 40~50 次的循环次数在扩增产物中也很少出现非特异性扩增的带型,并且,扩增产物的量也有一定的增加,特别是采用 10 mer 的随机引

物进行扩增时, 更是如此。原因可能是引物不一定在每一个循环中都能与其靶位点结合。每次循环的扩增产物的实际产量少于理论产量。考虑到试验结果与试验时间, 因此本试验的 PCR 循环采用 40 次。

4.4 PCR 结果的稳定性和可重复性

在适合的 PCR 体系建立后, PCR 结果的稳定性和可重复性主要受引物长度和复性温度的影响。一般说来, 引物越长, 复性温度越高, 结果的稳定性和重复性越高。以 RAPDs 标记为目的的 PCR 技术, 其所用的引物长度为 10 个碱基 (10_{mer}), 因此当引物与模板 DNA 退火形成复合物时, 所需温度不宜太高。一般为 35~42 °C, 当温度高于 42 °C 时, 10_{mer} 的随机引物一般很难与模板 DNA 的靶位点复性而扩增出稳定的可重复的带型。有人认为 PCR 结果的稳定性或重复性还受到模板 DNA 靶位点对引物竞争的影响^[14]。并且, Hallden 等^[15] 在 1996 年通过研究, 证实了 RAPD 扩增结果的不稳定性与引物结合位点竞争有关。

参 考 文 献

- [1] Grandillo S and Tanksley S D. Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 957~965
- [2] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J and Owen L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 998~1006
- [3] Inoue T, Zhong H S, Miyao A, Ashikawa I, Monna L, Fukuoka S, Miyadera N, Nagamura Y, Kurata N, Sasaki T and Minobe Y. Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 728~734
- [4] Ohmori T, Murata M and Motoyoshi E. Molecular characterization of RAPDs and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 151~156

- [5] Skroch P, Tivang J, and Nienhuis J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Symp Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, Minneapolis, 1992, 26
- [6] Van Eck H J, van der Voort J R, Draaistra S, Van Zandvoort P, Van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobson E, Helder J and Bakker J. The inheritance and chromosomal localization of RFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*, 1995, 1: 397~410
- [7] Welsh J and McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213~7218
- [8] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski A and Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6513~6535
- [9] Baird E, Cooper-Bland S, Waugh R, De Maine M J and Powell W. Molecular characterisation of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using RAPD markers. *Mol Gen Genet*, 1992, 233: 469~475
- [10] Masuelli R W, Tanimoto E Y, Brown C R, and Comai L. Irregular meiosis in a somatic hybrid between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 401~408
- [11] Naoki T, Kyoichi S and Naoto K. RAPD markers for confirmation of somatic hybrids in the dihaploid breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*, 1994, 13: 367~371
- [12] Spooner D M, Tivang J, Nienhuis J, Miller J F and Douches D S. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 532~540
- [13] Edwards K, Johnston C and Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349
- [14] Skroch P and Nienhuis J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPDs data on RAPDs based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1086~1091
- [15] Hallden C, Hansen M, Nilsson N O and Hjerdin A. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 1185~1192

FACTORS IN PCR REACTION SYSTEM INFLUENCING POTATO RAPD MARKERS

Chen Xuqing, Liu Jun, Zheng Yonglian and Xie Conghua

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan Hubei 430070)

ABSTRACT: Different potato cultivars were involved in the experiment aiming at to establish a stable and efficient PCR system for potato RAPD markers. An improved protocol of DNA extraction with small amount of potato plant materials was developed. The effects of concentrations of Mg^{2+} , primer and substrate (dNTP) were investigated. The results showed that, in a PCR system with 10 mer primers, a relatively high concentration of Mg^{2+} (1.5~2.7 mM in the experiment) insured a good result of the PCR reaction while a proper concentration of the primer and substrate should be obtained, which were 0.8 and 80~180 μM respectively, lower produced undetectable bands and higher affected the specificity of amplified products. The obtained optimized PCR system was approved with DNA samples of the other crops such as rice, maize, tomato and oil seed rape.

KEY WORDS: potato; PCR (Polymerase chain reaction); RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)