

大豆 RAPD 影响因素的探讨^{*}

邹继军¹ 董 伟² 张志永² 陈受宜²

王继才³ 徐金星¹ 杨庆凯¹ 曹越平¹

(1 东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030

2 中国科学院遗传研究所, 北京 100101 3 齐齐哈尔市种子局))

摘 要

为确保 RAPD 结果的重复性和真实性, 本文对影响大豆 RAPD 结果的主要因素进行了研究。这些因素包括: Taq 酶、MgCl₂ 模板、dNTPs 引物浓度、双引物扩增及热循环数。最终优化的大豆 RAPD 反应体系为: 25 μ l 反应液中, 10 倍反应缓冲液 (100mM Tris-HCl pH8.0, 500mM KCl, 0.1% gelatin), 2.0mM MgCl₂, dCTP dGTP dTTP dATP 各为 0.2mM, 15ng 引物, 25ng DNA, 1U Taq 酶。研究结果还表明, 双引物比单引物扩增的小片段数增多, 但也存在着原有单引物扩增条带缺失现象。

关键词 RAPD; 大豆; 影响因素

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术是以多聚酶链式反应 (PCR) 为基础, 用随机排列的寡聚脱氧核苷酸单链扩增基因组中不同位点的 DNA, 进而揭示等位点间的多态性 (Williams 等, 1990; Welsh 等, 1990)。此技术已在遗传作图、基因定位、种质遗传多样性和系谱关系分析等方面得到广泛应用。RAPD 具有检测快速、操作简单、费用较低等优点。但此技术也有些不足, 如重复性和稳定性差, 反应体系的某些细小变化都可能改变扩增结果等。我们在大豆抗病基因定位研究中, 对 RAPD 影响因素, 如 Taq 酶、MgCl₂ 模板、dNTPs 引物浓度、循环数等进行了大量实验探索, 并在此基础上建立了大豆 RAPD 研究的稳定体系。

材料与方法

1 大豆材料及 DNA 提取

本研究所用大豆材料东农 9674 和东农 91212 为常规育种中的稳定品系, 由东北农业

^{*} 收稿日期 1997-08-13 This paper was received on Aug. 13, 1997.

大学大豆研究所提供。大豆叶片在液氮中研磨粉末状,然后按 Thomas等 (1990)方法提取 DNA

2 RAPD反应条件设置

本实验所用 5个引物均购自美国 Operon公司,编号及序列列于表 1 Taq酶由中国科学院遗传所生产。9600型 PCR仪是美国 Perkin Elmer公司产品。扩增产物在 1. 4% 琼脂糖凝胶, K⁺ TAE缓冲液中电泳,经 EB染色,在紫外灯下观察结果并记载。基本反应体系 (25 μ l): 10倍反应缓冲液 (100mM Tris- HCl pH8. 0, 500mM KCl, 0. 1% gelatin), 2. 0mM MgCl₂, dCTP dGTP dTTP dATP各为 0. 2mM, 15ng引物, 25ngDNA, 1u Taq酶。基本反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1min, 36 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 5个循环;接着 94 $^{\circ}$ C 30s, 36 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 30s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。各种研究的影响因素列于表 2。在研究各项影响因素时,只改变基本反应体系中的某项因素,其它因素不变。

表 1 研究中所用的引物

Table 1 Primers used for this study

RAPD引物	引物序列 (5'→ 3')	RAPD引物	引物序列 (5'→ 3')
RAPD primers	Primer sequence	RAPD primers	Primer sequence
OPA- 01	CAGGCCCTTC	OPH- 15	AATGGCGCAG
OPA- 02	TGCCGAGCTG	OPR- 02	CACAGCTGCC
OPA- 03	CAGTAGCCAG		

表 2 RAPD反应中研究的影响因素

Table 2 Affecting factors studied in RAPD reactions

Taq 聚合酶 (μ l)	MgCl ₂	模板 (ng)	dNTPs	引物 (ng)	循环数*
Taq enzyme	(mM)	Tem plate	(mM)	Primer	Cycles
0. 50	1. 0	15	0. 05	2	25
0. 75	1. 5	25	0. 1	5	30
1. 00	2. 0	40	0. 2	10	35
1. 25	2. 5	55	0. 4	15	40
1. 50	3. 0	70	0. 6	20	45
2. 00	3. 5			25	
	4. 0			30	

* 在此循环数之前,均有 5个与基本反应条件相同的循环。
* Before these cycles, there are all five cycles which are same as the basic conditions

结果与分析

1 Taq聚合酶浓度

如图 1所示,当 Taq聚合酶的浓度在每 25ul0. 50u至 2. 0u之间时,扩增结果基本一致。但 0. 50u与 0. 75u时,扩增条带较 1. 0 1. 25和 1. 5u的亮度稍弱;当浓度升高到 2. 0u时,有少量的小片段产生,但量较少,带型模糊。所以,Taq聚合酶的含量在 1. 0~ 1. 5u/

25ul较为合适。

2 $MgCl_2$ 浓度

Mg^{++} 是 Taq酶的激活剂, Mg^{++} 不足时, Taq酶的作用效率降低。由图 2可见, 浓度低于 2.0mM 时, 无扩增产物形成 (1.0mM) 或扩增带型很弱而不便于观察 (1.5mM)。浓度分别为 2.0 2.5 3.0mM 时, 扩增带型一致, 也较为清晰。当浓度提高到 3.5和 4.0mM 时, 背景开始变模糊, 且扩增产物也有所增加, 这是高浓度的 Mg^{++} 导致非特异扩增产物积累的结果。由此可见, Mg^{++} 浓度的变化对扩增结果有着重要的影响。

3 模板浓度

模板与引物的比例是 RAPD反应成功的关键。如果模板浓度过高或过低, 都不会有扩增结果。本研究中模板 DNA 的量从 15ng 到 70ng 时, 扩增结果一致 (图 3), 这说明模板 DNA 的量在一定范围内对 RAPD扩增结果无明显影响。

4 dNTPs 浓度

dNTPs 是反应中磷酸根的主要来源, 其浓度的任何变化都会影响到 Mg^{++} 的有效浓度。为检验 dNTPs 浓度的影响, 在基本反应体系下, 将 dNTPs 浓度由 0.05mM 增加到 0.6mM。结果表明: dNTPs 量过高时 (0.6mM), 无扩增条带 (图 4)。可能的解释是, dNTPs 与 Taq聚合酶竞争 Mg^{++} , 过量的 dNTPs 使 Taq酶无法正常发挥聚合作用。0.05mM dNTPs 的量又过低, 扩增带型较弱, 不利于观察。当 dNTPs 浓度为 0.1 0.2和 0.4mM 时, 扩增带型一致且较为清晰, 可见 dNTPs 用量在此范围内较为适合。

5 引物浓度及双引物扩增

由图 5可见, 引物量为 2ng 和 5ng 时, 无扩增结果, 当引物量进一步增加时 (30ng), 扩增产物中产生较模糊的小片段, 引物在 10ng 至 25ng 范围内, 扩增结果较好且带型一致。双引物扩增可揭示单引物无法检测到的多态性, 比单引物扩增的小片段增多, 但也存在原有单引物扩增的条带缺失现象 (图 6)。

6 循环数

使用标准反应体系, 在前 5个循环 94℃ 1min, 36℃ 2min, 72℃ 2min 不变的情况下, 我们将后续的循环数分别设为 25 30 35 40 45 (图 7)。结果表明, 25个循环时, 扩增量较少, 不易观察记载; 30个循环时, 扩增结果要好于 25个循环, 但扩增条带的亮度稍差于 35 40和 45个循环; 循环数在 35圈以上时, 扩增效果较好, 且带型也一致。所以, 在此条件下, 为提高机器的利用率和节省时间, 后续扩增的循环数定为 35圈较好。

讨 论

本实验的影响因素研究 (除双引物扩增外), 均采用两种模板 DNA 和 5种引物进行扩增, 所得结果基本一致。结果还表明, 不同引物扩增的条带数有明显差别, 如 OPH-15 只扩增出一条带 (图 1), 而 OPA-02 却可扩增出 8条带 (图 6)。双引物的扩增, 可揭示出单引物无法检测到的条带, Williamson 等 (1994) 就曾利用双引物扩增筛选出与番茄根结线虫抗性紧密连锁的遗传标记, 利用双引物的扩增大大提高了引物的利用率。

RAPD反应涉及很多影响因素, 任何一种因素发生改变, 都有可能影响到整个扩增

结果。因此,利用 RAPD进行遗传分析首先就要考虑所得结果的重复性和真实性,对不同研究目的、不同扩增仪器和不同批次的试剂都应系统地摸索反应条件,优化反应体系。虽然对 RAPD反应存在众多的影响因素,但这些因素还是有有一定规律可循的,如 Taq聚合酶、引物、MgCl₂浓度等增加到一定程度,都可能使扩增产物中小片段增加,电泳背景模糊及非特异性增强;并且,某些影响因素(如模板浓度、Taq聚合酶)在一定变化范围内扩增结果是一致的。基于此,本研究本着重复性好、经济性高和结果利于观察的原则,将大豆 RAPD反应体系确定为: 25ul反应液中, 10倍反应缓冲液(100mM Tris-HCl pH8.0, 500mM KCl, 0.1% gelatin), 2.0mM MgCl₂, dCTP dGTP dTTP dATP各为 0.2mM, 15ng引物, 25ng DNA, 1u Taq酶。利用这一体系,我们已在大豆抗病基因定位、种间遗传多样性分析及特异指纹图谱建立等方面开展了一些工作。在研究中,我们还发现, RAPD反应的重复性与引物模板的组合有重要关系。某种引物与模板 DNA的组合重复性较差,反应条件(如不同试剂来源和用量等)稍有变化,就可能产生非常不同的结果;而某些引物与模板的组合却重复性很好,在大多数 RAPD反应中都可得到重复可靠的结果,这种重复可靠的引物与模板组合正是我们利用 RAPD筛选遗传标记的基础之一。

参 考 文 献

- [1] Thomas H. J., Stever D., Plant Molecular Biology Report, 1990, 8(4): 297~ 303
- [2] Welsh J. and McClelland M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 7213~ 7218
- [3] Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., et al., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990, 18 6531~ 6535
- [4] Williamson V. M., Ho J.-Y., Wu F. F., et al., A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. Theor Appl Genet 1994, 87 757~ 763

STUDY OF AFFECTING FACTORS IN SOYBEAN RAPD

Zou Jijun¹ Dong Wei² Zhang Zhiyong² Chen Shouyi²
Wang Jichai³ Xu Jinxing¹ Yang Qingkai¹ Cao Yueping¹

(¹ Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030

² Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, 100101,

³ Qiqihaer City Seed Bureau))

Abstract

To ensure that the results of RAPD will be reproducible and true, the major affecting factors in soybean RAPD were studied. These factors included the concentrations of Taq polymerase enzyme, MgCl₂, template, dNTPs, primer, amplification of paired

primers and thermal cycles. The final optimized soybean RAPD conditions were in 25ul reaction solution, 10× Buffer (100mM Tris- HCl pH8. 0, 500mM KCl, 0. 1% gelatin) , 2. 0mM MgCl₂, 0. 2mM dNTPs, 15ng primer, 1. 0u Taq polymerase enzyme. The results also showed that compared with the amplification of single primer, paired primers not only resulted in more small fragments but also lost some bands.

Key words RAPD, Soybean (*Glycine max*) , Affecting factors

图版说明:

图 1 不同 Taq聚合酶浓度的影响 (引物 OPH- 15)

Fig. 1 Effects of different Taq polymerase enzyme concentration (primer OPH- 15)

M.分子量标准 M. Molecular marker

1 2 0. 5u; 3 4 0. 75u; 5 6 1. 0u; 7 8 1. 25u; 9 10 1. 5u; 11 12 2. 0u

图 2 不同 MgCl₂浓度的影响 (引物: OPA- 03)

Fig. 2 Effects of different MgCl₂ concentration (primer OPA- 03)

M.分子量标准 M. Molecular marker

1 1. 0mM; 2 1. 5mM; 3 2. 0mM; 4 2. 5mM; 5 3. 0mM; 6 3. 5mM; 7 4. 0mM

图 3 不同 dNTPs浓度的影响 (引物: OPR- 02)

Fig. 3 Effects of different dNTPs concentration (primer OPR- 02)

1 2 0. 05mM; 3 4 0. 1mM; 5 6 0. 2mM; 7 8 0. 4mM; 9 10 0. 6mM

图 4 引物不同浓度的影响 (引物: OPH- 15)

Fig. 4 Effects of different primer concentration (primer OPH- 15)

M.分子量标准 M. Molecular marker

1. 2ng 2. 5ng 3. 10ng 4. 15ng 5. 20ng 6. 25ng 7. 30ng

图 5 不同模板浓度的影响 (引物: OPR- 02)

Fig. 5 Effects of different template concentration (primer OPR- 02)

1 15ng; 2 25ng; 3 40ng; 4 55ng; 5 70ng

图 6 双引物扩增

Fig. 6 Amplified with paired primers

M.分子量标准 M. Molecular marker

1 2 OPA- 01(15ng); 3 4 OPA- 02(15ng); 5 6 OPA- 01(7. 5ng)+ OPA- 02(7. 5ng); 7 8 OPA- 01(15ng)+ OPA- 02(15ng)

图 7 不同循环数的影响 (引物: OPA- 02)

Fig. 7 Effects of different cycles (primer OPA- 02)

M.分子量标准 M. Molecular marker

1 25; 2 30; 3 35; 4 40; 5 45