

影响 RAPD 实验结果的稳定性和可靠性因素研究

周章乐, 王振英, 彭永康

(天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300074)

摘要:以小麦栽培种京 411 为材料, 对小麦的基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 获得稳定而清晰的 PCR 扩增效果。对影响 RAPD 实验结果稳定性和可靠性的因素进行了初步探讨。

关键词:小麦; 基因组 DNA; RAPD; 可靠性

中图分类号:Q503 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0081-03

The Discussion of Factors Effect on Stability and Reliability of RAPD Reaction in Wheat

ZHOU Zhang-le, WANG Zhen-ying, PENG Yong-kang

(Department of Biology and Chemistry, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract: RAPD was used to analyze the genome DNA of cultivate variety wheat Jing 411. The results are steady and clear. In this paper we preliminarily discuss the factor of stability and reliability which effect the results of RAPD reaction.

Key words: Wheat; Genomic DNA; RAPD; Reliability

RAPD 技术因其重复性差、多态性低等特点而制约了它的发展^[1]。近年来, 影响 RAPD 技术的稳定性、可靠性等外部因素有很多报道。本文报道的是我们所建立的小麦基因组 DNA 的 RAPD 反应体系, 利用该体系可获稳定可靠的实验结果, 谱带清晰, 可用于植物基因组差异分析等。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用材料为小麦栽培种京 411。

1.2 PCR 反应体系

前 4 个循环为 96 ℃ 变性 1 min, 35 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min。后 45 个循环为 94 ℃ 变性 45 s, 36 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

引物复性的温度取决于引物的碱基组成、长度

和浓度。在 RAPD 分析中, 扩增反应的引物大多为 10 bp, GC 含量为 60% ~ 70%, 与此相应的退火温度一般为 35 ~ 37 ℃, 比常规的退火温度低。退火温度高, 引物和模板结合特异性增加; 退火温度低, 可增加 RAPD 反应的敏感性, 其特异性降低, 非特异性引物出现的机率增大, 条带可能增多^[3~5]。在本试验的研究中, 主要运用 RAPD 方法来寻找分析抗白粉病和感白粉病小麦基因组中可能存在的差异。因此, 我们对常规的扩增程序进行了改进, 采用双温扩增法^[2]。前 4 个循环于较低温度 35 ℃ 退火, 可降低背景, 得到的带纹清晰且多态性较强, 利于差异片段的筛选; 后 45 个循环将退火温度提高到 36 ℃, 提高了特异性及可重复性。

2 结果与分析

2.1 模板的纯度和浓度

收稿日期: 2003-01-17

基金项目: 天津市科委青年基金(003701111); 天津市攻关项目(993122511-1)资助

作者简介: 周章乐(1978-), 女, 广西桂林人, 在读硕士, 主要从事植物抗性分子生物学研究, 彭永康为通讯联系人。

RAPD对模板纯度的要求不是很高,即使含少量RNA和蛋白质都不影响扩增效果。但如含某些抽提液的残留成分(SDS,CTAB,氯仿,乙醇等)会影响扩增效果。本实验采用酚/仿抽提法获得的DNA纯度较高,OD₂₆₀/280为1.8。在乙醇沉淀离心时,我们采取较低速度离心(10 000 r/min),保证使大片DNA分子沉降下来,而小分子杂质仍保留在上清中,然后用枪头将白色絮状沉淀挑出。因此,在提取少量材料时(如抽提总DNA)若能采用酚/仿抽提法,杂质较少,能获得较为理想的模板纯度。

根据研究报道,DNA模板浓度的适宜范围较大。在本实验中(图1),10~60 ng范围内,扩增主条带基本一致,次带在条带数和扩增产量上稍有变化。在10~15 ng范围内,扩增条带一致,条带清晰,带纹丰富,背景低;在20~35 ng范围内时,部分次带变得模糊甚至消失;在40~60 ng范围内,部分条带变清晰,部分条带变模糊或消失,但背景稍高。可见,模板浓度的细微变化,会引起条带数的增减。这是由于RAPD引物碱基数很少,所以灵敏度很高,很容易受条件变化的影响而产生条带数的变化,导致扩增结果的不稳定性。因此,每次均应保证在选定的模板范围内扩增,以保证条带数的稳定性。对多个模板进行研究时,应同时制备,在扩增开始前就达到不同样品之间浓度的统一,再进行模板浓度梯度实验,以确保结果的可重复性。

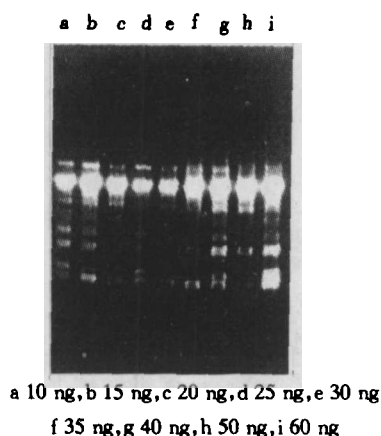


图1 模板浓度对扩增带型的影响

2.2 Taq 酶浓度

Taq 酶的质量和浓度对扩增结果至关重要。在25 μ L 体系中,一般用量为0.5~2 U。本实验中(图2),Taq 酶用量为1 U时扩增条带丰富而清晰,用量低于1 U时带纹减少而且较模糊,用量高于1 U时带纹也较少。

可见,Taq 酶用量太低,DNA 扩增强度较弱,有

的带扩不出来;用量为1 U时,扩出DNA的带型和强度都较好;而用量太高时,会引起非特异性扩增,导致假阳性,在胶上出现较深背景^[7]。

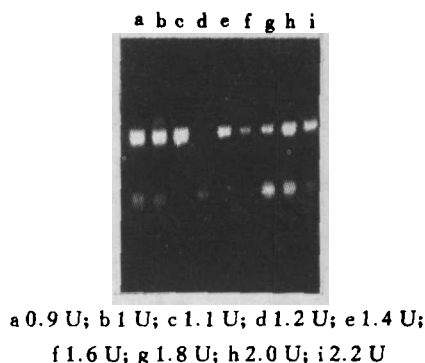


图2 Taq 酶浓度对扩增带型的影响

2.3 Mg^{2+} 浓度

目前,公认 Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L,该浓度下非特异性扩增较少,但这也与模板溶液中TE浓度紧密相关。因为TE溶液中的EDTA可以螯和反应体系中的 Mg^{2+} ,使其浓度下降,从而影响酶的活力。因此,如果用TE稀释的模板,则体系中的 Mg^{2+} 浓度可能要稍微偏大一点,但不能过大^[8]。在本实验中, Mg^{2+} 在2~3 mmol/L时扩增带纹较为丰富,过低条带减少、模糊,过高背景变深见图3。

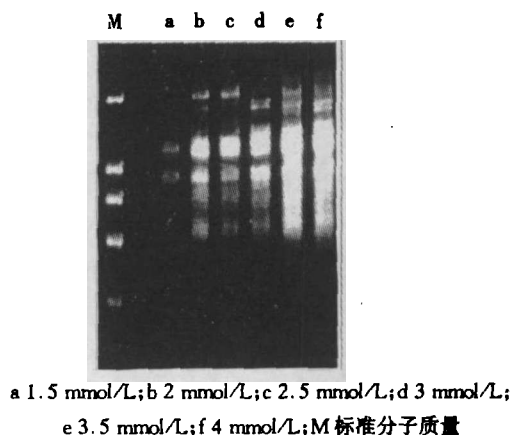
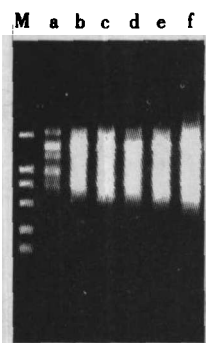


图3 Mg^{2+} 浓度对扩增带型的影响

2.4 引物浓度

实验所用引物为OP及S系列引物,实验结果表明(图4),当浓度为0.8 μ mol/L时条带丰富,清晰。浓度大于1 μ mol/L时背景变深,条带不清晰,出现了非特异扩增。在实验中我们发现,同一体系中可能有若干个引物扩增效果差,甚至一条带也没有。这时不必为这个引物而重新摸索条件,应接着筛选其他引物。如果以后的扩增没有受到影响,说明这些引物的结合位点太少或根本没有牢固的结合位点^[8]。

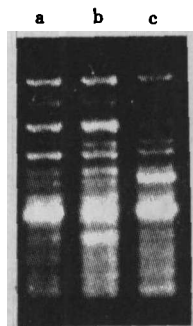


a 0.8 $\mu\text{mol/L}$; b 1 $\mu\text{mol/L}$; c 1.2 $\mu\text{mol/L}$; d 1.4 $\mu\text{mol/L}$;
e 1.6 $\mu\text{mol/L}$; f 1.8 $\mu\text{mol/L}$; M 标准分子质量

图 4 引物浓度对扩增带型的影响

2.5 最佳体系的扩增结果

用最佳反应体系对 3 个小麦品种的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 获得稳定清晰且多态性强的实验结果, 见图 5。



a, 京 411; b, Am4; c, Brock

图 5 最佳反应体系的扩增结果(引物为 S2098)

3 讨论

本实验用酚/仿的方法提取了小麦的基因组 DNA, 并建立起了小麦 RAPD 反应体系。即在 25 μL 体系中, 模板浓度为 10~15 ng, Mg^{2+} 浓度在 2~3 mmol/L, OP 及 S 系列的引物浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$, Tag 酶 1 U, dNTP 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 。这一体系重复性和稳定性好。但在实验过程中, 仍有一些值得注意的问题: (1) 组成反应体系的所有物质(水, Buffer, Mg^{2+} , dNTP, 模板, 引物, Taq, 石蜡油)包括移液器的枪口都有可能污染, 建议每次扩增均应设空白对照以排除污染^[5]。吸取样品时应动作轻缓, 避免气溶胶的产生使量程不准或气溶胶的破裂而污染枪头, 建议定期用 70% 的酒精擦拭枪头并常在紫外灯下杀菌或者使用枪头过滤器; (2) 当用同一公司生产的一批新买到的 Taq 酶时, 有时会出现扩增效果比以前差的情况, 如条带较弱或带纹减少。这很可能是由于酶的活力降低了。此时, 应对该批产品进行最佳使用浓度的筛选, 以恢复整个最佳反

应系统。

RAPD 技术由于使用引物短(10 bp), 对反应条件极为敏感, 它的重复性一直存在着较大争议。RAPD 扩增片段的多少及重复性除了与基因组特性有关之外, 也受到扩增体系(如模板的质量和浓度, Mg^{2+} 浓度, dNTP 浓度, 引物 G+C 含量, 引物浓度, Taq 酶的用量和纯度)及外部因素(PCR 仪的性能, 反应程序, 凝胶电泳的类别和胶的质量等)的影响。因此, 要获得重复性结果, 应尽力使 RAPD 反映标准化, 即在实验中首先摸索出 RAPD 反应体系中各组分的适宜浓度, 并确保整个实验各次反应的各组分的来源和浓度保持一致, 这其中模板来源和浓度显得尤为重要。建议一次性提取足够量的 DNA, 然后统一按 20 ng/ μL 的浓度稀释模板并分装成 100 μL /小管, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存储备, 由此可以减少因重新提取或重新稀释而造成模板浓度、纯度或来源的误差。因此, 控制好模板的质量是获得 RAPD 实验结果重复性和可靠性的关键。实验中应尽可能使用同一台 PCR 仪, 反应程序前后一致; 凝胶电泳的类型及统计数据的标准也应前后一致^[8]。

参考文献:

- [1] 王冰冰, 孙宝启. RAPD 技术进展及其在小麦遗传育种中的应用[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(3): 227-232.
- [2] Ayala M, Balint R F, Garilondo J V, *et al.* New primer strategy improves precision of differential display[J]. Bio Techniques, 1995, 18(5): 842-850.
- [3] 夏 铭, 奕非时, 李景鹏. RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化性[J]. 植物研究, 1999, 19(2): 195-200.
- [4] 袁勇芳, 李思光, 许 杨, 等. RAPD 技术重复性的影响因素[J]. 江西科学, 2000, 18(2): 120-124.
- [5] 焦 锋, 楼程富. RAPD 技术应用中的一些问题及对策[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4): 98-102.
- [6] 汪永庆, 徐来祥, 张知彬, 等. RAPD 技术的标准化问题[J]. 动物学杂志, 2000, 35(4): 57-60.
- [7] 李晋涛. 水稻幼苗单株 DNA 的提取及其 PCR-RAPD 反应体系的建立[J]. 生物技术, 1998, 8(4): 13-16.
- [8] 安德荣, 程继红, 成卓敏, 等. 影响小麦 RAPD 稳定性的试验技术研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(1): 14-17.