

水稻基因组 DNA 的 RAPD 扩增研究^{*}

朱必凤¹, 吴成钢², 廖朝晖¹, 刘安玲¹, 刘 主¹

(1. 韶关学院英东生物工程学院, 广东 韶关 512005;

2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 343000)

摘 要: 通过对水稻 RAPD 反应条件比较研究, 建立了对除草剂敏感致死水稻 RAPD 的最适反应体系和反应扩增程序, 即在 25 μ L 反应体系中, 含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% NP-40, 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L (each) dNTPs, 20 ng 引物, 20 ng 基因组 DNA, 1.5 U 的 Taq 酶。反应扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min; 扩增 40 个循环, 每循环包括: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min; 最终延伸 5 min。

关键词: 水稻; 基因组 DNA; RAPD; 反应系统

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0087-04

水稻 8077s 是经过长期定向诱变选育的苯达松敏感致死水稻两用不育系, 将其应用于两系杂交稻制种, 可以通过直接喷雾一定浓度的苯达松溶液简便有效地杀死两系杂交稻中可能混入的自交苗, 从而有效地避免两系杂交稻推广应用中因水稻光温敏雄性不育系的育种波动所造成的风险^[1]。8077s 是水稻隐性单基因遗传的突变体, 与抗除草剂转基因水稻^[2]相比, 8077s 不存在转基因水稻的安全性问题, 和显性抗除草剂基因向杂草转移可能带来的生态环境问题。对控制重要形状的基因进行分子标记精确定位和高密度分子标记图谱构建, 进而进行目标基因的分离、克隆和目标基因回交转育的分子辅助选择 (molecular marker assistant selection, MAS) 是当前植物分子生物学和植物遗传学领域的热点和主攻方向之一。本文以 8077s 和丰 35 为样品, 对其基因组 DNA 的提取及其 RAPD 扩增反应条件进行了研究, 为对除草剂敏感致死水稻的分子标记及 MAS 打下实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻 8077s, 由湖北省农科院张集文先生提供。丰 35 由广东省农科院提供。两种材料在韶关市农科所种植。取水稻叶片为材料。

Taq DNA 聚合酶, MgCl_2 及 10 $\times$ buffer 缓冲液购自上海博彩生物有限公司, 引物购自上海生工。

1.2 水稻基因组 DNA 的提取

采用改进的 SDS 法。

1.2.1 RAPD 反应体系 总体积为 25 μ L 的 RAPD 反应体系, 内含 2.0 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% NP-40, 0.1 mmol/L dNTPs, 1.5 U TaqDNA 聚合酶, 20 ng 随机引物, 20 ng 基因组 DNA。对模板浓度、 MgCl_2 浓度及热循环参数等反应因素进行研究, 每次反应改变一个参数, 其它条件不变。上述 RAPD 反应体系的混合物, 瞬时离心后在 Perkin-Elmer 9600 型 PCR 仪上进行 DNA 扩增。

1.2.2 RAPD 扩增程序 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 1 循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 40 循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。

1.3 RAPD 扩增产物电泳

先在 RAPD 扩增产物中加入凝胶加样缓冲液 (w, 0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯青 FF、40% 蔗糖), 混匀, 取 8 μ L 在 w = 1.4% 琼脂糖凝胶中 (内含 0.5 μ g/mL 的 EB) 电泳 3.20 h, 电压为 5 V/cm。最后在 ImageMaster VDS 凝胶成像系统上成像检测, 结果照相并存盘。

2 结果和讨论

2.1 RAPD 反应成分的优化

(1) DNA 浓度对 RAPD 图谱的影响。许多研究者研究了模板 DNA 浓度对 RAPD 的影响, 模板

* 收稿日期: 2002-12-09

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001446)

作者简介: 朱必凤 (1955 年生), 男, 教授; E-mail: bfbzhu@sgu.edu.cn

DNA 太少得到不稳定的带型, 太多的 DNA 可产生非专一性的带。为了获得可重复和较强的 RAPD 带, 有必要优化模板 DNA 的量。我们将模板稀释成 5 种浓度进行扩增。

从图 1 中扩增的片断来看: 模板浓度在一定范围内扩增的带型基本不变。10~150 ng 的模板 DNA 量都可产生清晰的 RAPD 带型。说明 RAPD 反应对模板量的要求有一定的跨度, 这与有关研究^[3,4] 相似。我们选择 DNA 浓度为 20 ng。

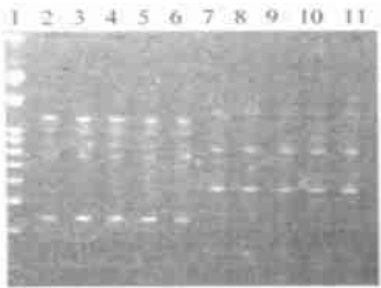


图 1 引物 S161 和引物 S17 在不同 DNA 浓度下的 PCR 扩增结果

Fig 1 The results of PAPD at different DNA concentration using primer S161 and primer S17

1: 100 bp 相对分子质量标准;

2—6: 引物为 S161,

DNA 质量分别为 15 000, 60, 20, 10 ng;

7—11: 引物为 S17,

DNA 质量分别为 15000, 60, 20, 10 ng;

(2) $MgCl_2$ 浓度对 RAPD 图谱的影响。 $MgCl_2$ 浓度对 RAPD PCR 反应的特异性和扩增效果有着显著的影响, Taq 酶需要 Mg^{2+} , 同时引物和模板的双链杂交体的解链和退火受两阶阳离子的影响。若 Mg^{2+} 浓度过低, 加上 dNTP 和溶液中的 EDTA 对 Mg^{2+} 螯合作用, 使得没有足够的 Mg^{2+} 来激活 Taq 酶的活性, 将导致扩增产物减少甚至整个反应失败^[5,6]。而 Mg^{2+} 浓度过高, 反应的严谨度降低, 非特异性扩增产物将大大增加。图 2 显示 Mg^{2+} 浓度在 1.6~2.2 mmol/L 时带型基本不变, Mg^{2+} 浓度有 2.4~3.0 mmol/L 时扩增产物有所增加, 但不清晰。

2.2 RAPD 的热循环条件优化

(1) 变性时间。模板的变性一步很重要, 变性温度范围一般在 92~95 °C, 但 Taq 酶在 95 °C 可保持 50% 的活力只有 35 min 左右, 高温变性时间过长, 会造成 Taq 酶活力降低。从图 4 可以看出, 变性时间为 10 s 的效果与变性 15 s 和 30 s 相一致, 而变性时间在 45 s 时, RAPD 带有所减少, 并且模糊, 可能是变性时间长, 使 Taq 酶活性受到损害。本实验选择 10 s 作为变性时间。

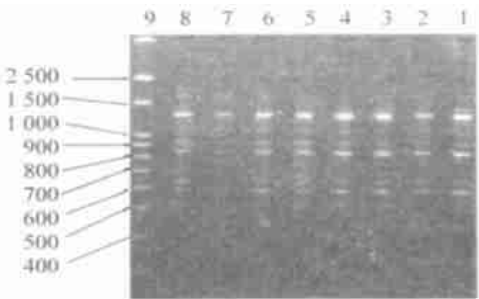


图 2 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 图谱的影响

Fig 2 The effect on RAPD reaction with different Mg^{2+} concentration

1—8: $c(Mg^{2+})$: 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0 mol/L;

9: 100 bp 相对分子质量标准

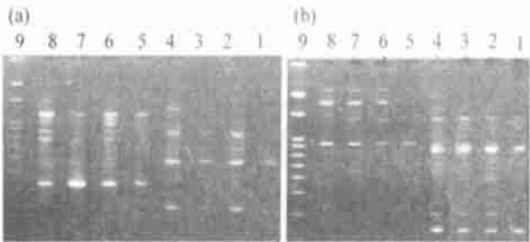


图 3 变性时间对 RAPD 图谱的影响

Fig 3 The effect on RAPD reaction with the denaturation time

(a) 材料为 8077s; (b) 材料为 丰 35;

1—4: 引物 S17; 5—8: 引物 S161;

变性时间分别为: 45, 30, 15, 10 s

(2) 退火温度。退火温度取决于引物的 T_m 值。退火温度低, 引物和模板结合特异性较差, 出现条带的可能性增多, 退火温度高, 引物和模板结合特异性增加。在 RAPD 反应中常用的退火温度为 36 °C, 比常规 PCR 扩增中的温度要低, 提高退火温度可以提高扩增的特异性。图 4 中当温度为 40 °C 或 45 °C 时, 避免了拖尾, 从而使一些原来相对较弱的带得以显示出来, 并且从图 8 中的泳道 2 和 6, 图 6 中的泳道 2 和 6 中可以看出, 提高退火温度能够避免个别带的过分扩增, 使各带得以均衡地增加。另外, 从图 5 的泳道 1 和 5, 和图 7 的泳道 1 和 5 可以看出: 温度太高 (45 °C), 扩增效果不好, 这可能是由于复性温度过高, 引物与模板 DNA 亲和力太小所致。比较图 4 (a) 和图 (b), 相同引物, 对不同模板进行 DNA 扩增的优化条件不近相同。因此 40 °C 为最适退火温度。

(3) 延伸时间对 RAPD 图谱的影响。延伸时间取决靶序列的长度与浓度, 也会影响扩增片断的长度。一般 RAPD 扩增产物在 0.2~3 kb, 适宜范围在 2.5 kb 以下。另外一点是延伸时间和 Taq 酶的

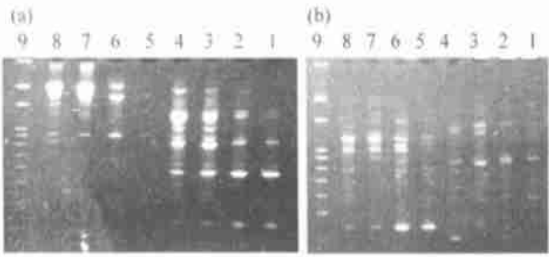


图 4 退火温度对 RAPD 图谱的影响

Fig 4 The effect on RAPD reaction with different annealing temperature

以 8077s 为材料，1—4：引物 S17；5—8：引物 S126；
退火温度分别为 45, 40, 36, 30 °C；
9：相对分子质量标准

活性有关，在 72 ~ 78 °C，Taq 酶延伸速率在理论上，可达 2 ~ 4 kb/min。但在本研究中，当把延伸时间缩短到 1 min（图 5 中的泳道 3 和 8）时，发现没有扩增产物出现或较大相对分子质量的条带（> 1 000 bp）消失。而 1.5 min 和 2.0 min 的扩增结果谱带清晰，所以较合适的延伸时间为 1.5 min。本结果与延伸时间可缩短至 45 s 或 30 s 的报道不同^[7,8]。



图 5 不同延伸时间的 RAPD 图谱

Fig 5 The effect on RAPD reaction with different extension time

丰 35，1—4：引物 S161；5—8：引物 S126；
延伸时间分别为：2, 1.5, 1, 0.45 min；
9：相对分子质量标准

(4) 循环次数。循环数决定着扩增程度，在其它参数已优化的条件下，最适循环数取决于靶序列初始浓度，过多的循环会增加非特性扩增产物的数量和复杂性（平台效应），循环数太少，PCR 产物就会极低，扩增带太弱而不利于观察。从图 6 中可以看到，25 个循环得不到扩增产物，30 个循环，以 8077s 为模板时，可见扩增片断，而对于模板丰 35，则带型仍模糊。至 35 循环时，至 35 循环时，以 8077s 为模板时，可见较清晰的特异带产生，而以丰 35 为模板时的带型仍模糊。自 40 循环至 45

循环可得到较好的、一致的扩增带型。由此也可见：某个循环次数对某些引物和模板 DNA 是优化的，而对其它引物和模板而言可能不是最适合的。以水稻为材料，循环以 40 为好。

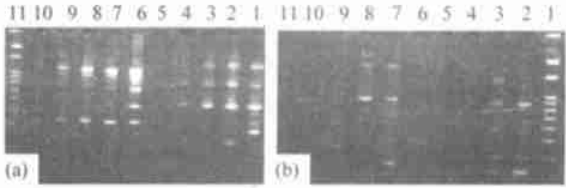


图 6 循环次数对 RAPD 图谱的影响

Fig 6 The effect on RAPD reaction with different PCR amplification cycles

(a) 8077s (b) 丰 35
1—4：引物 S17；5—8：引物 S161，
循环次数分别为：45, 40, 35, 30, 25

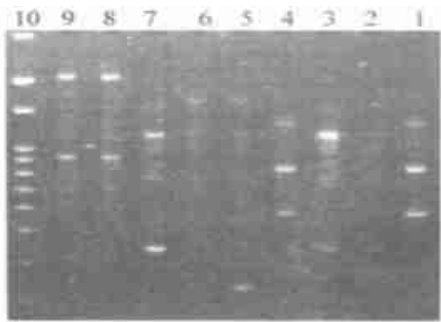


图 7 双引物扩增的 RAPD 图谱

Fig 7 The result of RAPD reaction with double primers

1：引物 S17；2：线物 S17 和 S161；
3：引物 S161；4：引物 S17；5：引物 S17 和 S119；
6：引物 S119；7：线物 S161；8：引物 S161 和 S126；
9：引物 S126；10：相对分子质量标准

2.3 双引物扩增的 RAPD 图谱

单引物扩增的个别条带在双引物中有可能消失（图 7，泳道 8 和泳道 7），但双引物组合可能会检测到两单引物所不能检测到的位点^[11, 12]，特别表现为能扩增较小片断的产物（泳道 5）。从图 8 可以看出，双引物并不能增加信息量，而且单引物中的个别条带在双引物扩增中消失，这可能是由反应体系中引物间的竞争引起的。

3 结 论

通过对水稻 RAPD 反应条件比较研究，建立了对除草剂敏感致死水稻 RAPD 的最适反应体系和反应扩增程序，即在 25 μ L 反应体系中，含 10 mmol/L Tris HCl (pH 8.0)，10 mmol/L KCl，8 mmol/L (NH₄)₂SO₄，w=0.05% NP-40，2.0 mmol/L MgCl₂，

0.1 mmol/L (each) dNTPs, 20 ng 引物, 20 ng 基因组 DNA, 1.5 U 的 Taq 酶。反应扩增程序为: 94 °C 变性 2 min; 扩增 40 个循环, 每循环包括: 94 °C 变性 10 s, 40 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min; 最终延伸 5 min。另外实验还显示: 双引物组合不能提高所拥有引物的利用率。本研究为对除草剂敏感致死水稻分子标记及 MAS 打下了实验基础。

参考文献:

[1] 张集文, 武晓智. 水稻光—温敏雄性不育系化学致死突变的诱变筛选与初步研究[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 65—68.

[2] 黄大年, 李敬阳, 章善庆, 等. 用除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度的新技术[J]. 科学通报, 1998, 43(1): 67—70.

[3] 何川生, 张汉尧, 许介眉. 烟草 RAPD 分析影响因子初探和优化程序[J]. 中国烟草科学, 2001(1): 37—40.

[4] MARTIN P, DARY A, ANDRE A, et al. Identification and typing of *Streptomyces* strains: evaluation of interspecific, intraspecific and intradonal differences by RAPD fingerprinting[J]. Res Microbiol, 2000, 151(10): 853—864.

[5] 安德荣, 程继红, 成卓敏, 等. 影响小麦 RAPD 稳定性试验技术研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(1): 14—17.

[6] 袁勇芳, 许杨, 李思光, 等. 红曲霉 DNA 提取及其 RAPD-PCR 反应体系的建立[J]. 生物技术, 2002(1): 2—4.

[7] SUBHASHINI R, KUMAR K, KANAAYAN S. Biodiversity of *Anabaena azollae* isolates from different *Azolla* cultures[J]. Indian J Exp Biol, 2000, 38(11): 1168—1171.

[8] SKODA S R, PORNKULWAT S, FOSTER J E. Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia haminivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae)[J]. Bull Entomol Res, 2002, 92(1): 89—96.

[9] 孙世孟, 李素美, 郑芝荣, 等. 山东省玉米骨干自交系亲缘关系的 RAPD 分析研究[J]. 作物学报, 1999, 25(6): 727—732.

[10] OLIVIER M, MEEHL M A, LUST G. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) sequences as markers for canine genetic studies[J]. J Hered, 1999, 90(1): 78—82.

[11] SALL T, LING-HALDEN C, HALDEN C. Primer mixtures in RAPD analysis[J]. Hereditas, 2000, 132(3): 203—208.

[12] RIVAS R, VELAZQUEZ E, UALVERDE A, et al. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species[J]. Electrophoresis, 2001, 22(6): 1086—1089.

Study on RAPD Reaction System for the Rice

ZHU Bi feng¹, WU Cheng gang², LIAO Zhao hui¹, LIU An ling¹, LIU Zhu¹

(1. Yingdong college of Biotechnology, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

2. College of Life and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The optimal reaction system was constructed by studying the factors affecting the rice RAPD reaction. The system contained 10 mmol/L Tris HCl (pH 8.0), 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.05% NP-40, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTPs for each nucleotide, 20 ng primers, 20 ng rice DNA, and 1.5 U Taq polymerase in total 25 μL. The process of reaction was 95 °C for 120 s in the beginning, then 94 °C for 10 s, 40 °C for 30 s, 72 °C for 90 s, for 40 cycles, 72 °C for 300 s in the end.

Key words: rice; genome DNA; RAPD; reaction system