

扩增条件对茶类植物 RAPD 带的影响

袁长春 施苏华 叶创兴

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 采用梯度分析的方法试验了模板DNA、引物、镁离子、dNTP和Taq酶的浓度对茶类植物进行RAPD分析中DNA扩增结果的影响。实验表明这些条件的变化对扩增出来的RAPD带的数目和强弱会产生影响。经过比较分析,筛选出对于茶类植物进行RAPD分析较理想的扩增条件: 2.0 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 15 ng 引物/20 μl 反应体积, 4 ng 模板DNA/μl 反应体积, 1 U Taq 酶/20 μl 反应体积。

关键词 茶类植物; 扩增条件; RAPD 带

中图分类号 Q94-33

IMPACTS OF RAPD AMPLIFICATION CONDITIONS ON RAPD BANDS FOR *CAMELLIA*

Yuan Changchun Shi Suhua Ye Chuangxing

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract The impacts of the concentrations of template DNA, primer, magnesium, dNTP and Taq DNA polymerase on RAPD amplification for *Camellia* were tested by means of ladder analysis. The results showed that RAPD band patterns were changed observably with the variation of concentrations of template DNA or primer or Taq DNA polymerase, and there was a positive interrelation between the both within a limited range, but little impact was generated by the concentrations of 1.0-4.0 mmol/L MgCl₂ or 100-400 μmol/L dNTP on RAPD band patterns. The optimal amplification conditions for *Camellia* were chosen as follows: 4 ng template DNA/μl reaction volume, 15 ng primer/20 μl reaction volume, 2.0 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 1 U Taq DNA polymerase/20 μl reaction volume.

Key words *Camellia*; Amplification conditions; RAPD bands

随机扩增多态性DNA (RAPD)分析是以PCR为基础,具有简便、灵敏度较高、要求DNA量少、不需要有DNA序列资料、不需要使用同位素和能获得的标记位点数目不受限制等优点已被广泛用于植物种属鉴定、系统发育分析、基因组研究、连锁图的建立、基因定位以及远缘杂交中外源基因的追踪等^[1]。RAPD分析是以扩增所得的RAPD带为依据,进行统计和聚类分析,得出分析材料间彼此的相互联系。RAPD分析结果的准确性受扩增效果的影响,而扩增条

件适宜与否,直接影响扩增效果和扩增产物的重复性,因为模板DNA量、引物浓度、镁离子浓度、脱氧核苷三磷酸(dNTP)浓度和Taq酶的量都会影响DNA扩增^[1-3]。本研究采用浓度梯度变化的方法分别试验这些条件对茶类植物RAPD带数量和强弱的影响,旨在得到一个较理想的DNA扩增条件,使其RAPD分析的结果更客观。同时,希望对今后进行山茶属或其近缘属种的RAPD分析时,尤其是其引物筛选过程中,预先确定较为合适的DNA扩增条件提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

大叶茶(英红九号)*Camellia assamica* (Mast.) Chang, 小叶茶(铁观音)*C. sinensis* (L.) O. Ktze, 可可茶(毛叶茶)*C. ptilophylla* Chang 三个不同品种(含可可碱、含可可碱+咖啡碱、含咖啡碱)。其中大叶茶和小叶茶采自广东省茶科所,可可茶采自原产地,每种材料采样10株。

1.2 方法

DNA提取和定量测定 采用2×CTAB法^[4]从1.2–1.5 g鲜叶中提取总DNA。DNA纯化按下列步骤进行:100 μl DNA 1×TE溶液加入3倍体积的6 mol/L NaI, 7 μl玻璃粉TE溶液,混匀,室温放置5 min; 8000 r min⁻¹离心2 min,弃上清液;加洗脱液(含0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 50%乙醇)200 μl,混匀,8000 r min⁻¹离心2 min,弃上清液,重复洗脱3次;晾干,加100 μl 1×TE 50℃保温15–20 min至沉淀完全溶解;10000 r min⁻¹离心10 min,将上清液移至新管,弃沉淀,–20℃保存备用。

取纯化后的总DNA 10 μl稀释250倍后用紫外分光光度法^[5]测定其含量分别为:大叶茶100 ng μl⁻¹、小叶茶110 ng μl⁻¹、可可茶(含可可碱)120 ng μl⁻¹、可可茶(含咖啡碱)240 ng μl⁻¹、可可茶(含可可碱+咖啡碱)90 ng μl⁻¹。

试验模板DNA量对RAPD带的影响 共同的DNA扩增条件:20 μl反应体积,1×Taq酶缓冲液,150 μmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 15 ng S35 (Sangon公司)引物,1U/20 μl Taq酶(华美)。不同量的可可茶(含咖啡碱)模板DNA(稀释3倍加入):1) 0 μl(对照); 2) 0.1 μl(终浓度为0.4 ng μl⁻¹); 3) 0.3 μl(终浓度为1 ng μl⁻¹); 4) 0.7 μl(终浓度为2.7 ng μl⁻¹); 5) 1 μl(终浓度为4 ng μl⁻¹); 6) 1.5 μl(终浓度为6 ng μl⁻¹)。

试验引物浓度和Taq酶的量对RAPD带的影响 共同的DNA扩增条件:20 μl反应体积,1×Taq酶缓冲液,2.0 mmol/L MgCl₂, 150 μmol/L dNTP, 4 ng μl⁻¹可可茶(含咖啡碱)总DNA。不同浓度的S35 (Sangon)引物和Taq酶(华美):1) 6 ng/20 μl S35引物,1 U/20 μl Taq酶; 2) 15 ng/20 μl S35引物,1 U/20 μl Taq酶; 3) 30 ng/20 μl S35引物,1 U/20 μl Taq酶; 4) 45 ng/20 μl S35引物,1 U/20 μl Taq酶; 5) 0.2 U/20 μl Taq酶,15 ng/20 μl S35引物; 6) 0.5 U/20 μl Taq酶,15 ng/20 μl S35引物; 7) 1.0 U/20 μl Taq酶,15 ng/20 μl S35引物; 8) 1.5 U/20 μl Taq酶,15 ng/20 μl S35引物。

试验dNTP和MgCl₂浓度对RAPD带的影响 共同的DNA扩增条件:20 μl反应体

积, $1 \times$ Taq 酶缓冲液, 15 ng S35 (Sangon) 引物, 4 ng μl^{-1} 可可茶 (含咖啡碱) 总 DNA, 1 U Taq 酶 (华美)。不同浓度的 dNTP 和 MgCl_2 : 1) 1.0 mmol/L MgCl_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP; 2) 2.0 mmol/L MgCl_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP; 3) 3.0 mmol/L MgCl_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP; 4) 4.0 mmol/L MgCl_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP; 5) 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 mmol/L MgCl_2 ; 6) 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 mmol/L MgCl_2 ; 7) 300 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 mmol/L MgCl_2 ; 8) 400 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 mmol/L MgCl_2 。

以上扩增均在 PTC-100 型 PCR 仪 (MJ Research Inc.) 上按下列程序进行: 94°C 4 min 1 个循环; 94°C 1 min \rightarrow 35°C 2 min \rightarrow 72°C 2 min 45 个循环; 最后 72°C 7 min 一个循环, 结束。扩增完成后取 17 μl 扩增产物点样于 $\rho = 1.4\%$ 琼脂糖凝胶上, 在 $1 \times$ TAE 缓冲液中电泳, 稳压 (4 v cm^{-1}), 电泳约 3.5 h, 2 kb ladder DNA (中山大学生物工程中心产品) 用作分子量标记。凝胶在 $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ EB (溴化乙锭) 溶液中染色约 40 min, 紫外光下检测和照像。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 量对 RAPD 带的影响

模板 DNA 量的变化对 RAPD 带的数量和强弱影响较大 (图 1a)。在一定范围内, 带的数量和强度随加入模板 DNA 量的增加而增加。模板量太少 ($0.4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) 时, 无带出现; 为 $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 时, 仅有两条较弱的带; 当模板量达到 $2.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 时, 带的数量明显增多, 但仍较弱; 模板量在 $4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 和 $6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 情况下, RAPD 带效果更佳, 且前者更好的清晰度, 这与 operon 公司建议的 $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 的模板浓度^[1]以及唐绍清等^[6]报道的金花茶约 $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 的最适模板浓度以及苏应娟等^[7]在罗汉松 RAPD 分析中 $50-80 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 的模板浓度相差较大。可见扩增材料不同, 对模板的最适浓度要求不同。同时, 不同材料或同种材料不同分装管中所提取到的总 DNA 含量差异较大, 因而扩增前对用作模板的 DNA 进行定量测定, 有利于掌握模板的准确加入量, 获得稳定的扩增效果。

2.2 引物浓度和 Taq 酶的量对 RAPD 带的影响

引物浓度和 Taq 酶量的变化对 RAPD 带的影响也较大 (图 1b)。引物浓度偏低 ($6 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$) 时, 带的数目明显减少; 浓度过高 ($45 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$) 时, 出现明显引物带, 且带的清晰度降低; 因而 $15-30 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$ 的引物浓度较为合适。Taq 酶量过少 ($0.2 \text{ U}/20 \mu\text{l}$) 时, 没有扩增产物出现; 当增加到 $0.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$ 时, 也只有微弱扩增产物; $1 \text{ U}/20 \mu\text{l}$ 的 Taq 酶量扩增效果较为理想; 酶量过高 ($1.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$) 时, RAPD 带反而模糊不清。这与 operon 公司推荐的 $0.5 \text{ U}/25 \mu\text{l}$ 的 Taq 酶浓度有所不同。当然, 不同厂家生产的 Taq 酶的活力有所差异, 只有经过试验, 才能获知其最适酶量。

2.3 镁离子浓度和 dNTP 浓度变化对 RAPD 带的影响

MgCl_2 和 dNTP 浓度的变化对 RAPD 带型的影响相对较小 (图 1c)。1.0-4.0 mmol/L Mg^{2+} 时, 均有扩增产物, 带型变化较小。浓度偏高 ($3.0-4.0 \text{ mmol/L}$) 时, 弱带不能分辨。因而 1.0-2.0 mmol/L 的镁离子浓度较为合适, 且镁离子浓度为 2.0 mmol/L 时, 对 Taq 酶激活能

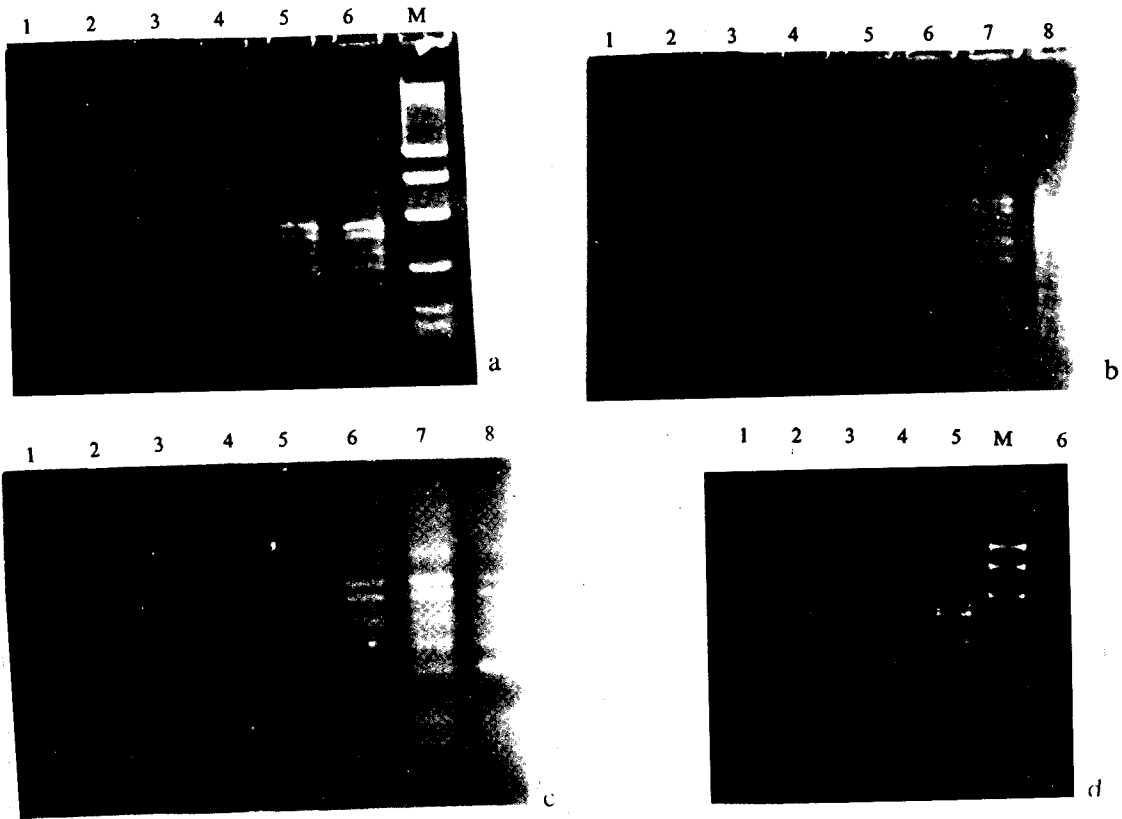


图1 扩增条件对 RAPD 带的影响

Fig. 1 The impacts of amplification conditions on RAPD bands

a, b, c 均为可可茶 (含咖啡碱) DNA 扩增后的 RAPD 带。M: 2kb ladder DNA Marker, 其分子量从上到下各为: 3681bp、2799bp、1972bp、1167bp、771bp、672bp、594bp、365bp、278bp。

a. 模板 DNA 浓度 1. 对照, 不加总 DNA; 2. $0.4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; 3. $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; 4. $2.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; 5. $4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; 6. $6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ 。

b. 引物和 Taq 酶浓度 引物浓度: 1. $6 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; 2. $15 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; 3. $30 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; 4. $45 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$ 。Taq 酶浓度: 5. $0.2 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; 6. $0.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; 7. $1.0 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; 8. $1.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$ 。

c. dNTP 和镁离子浓度 MgCl_2 : 1. 1.0 mmol/L ; 2. 2.0 mmol/L ; 3. 3.0 mmol/L ; 4. 4.0 mmol/L 。不同浓度的 dNTP: 5. $100 \mu\text{mol/L}$; 6. $200 \mu\text{mol/L}$; 7. $300 \mu\text{mol/L}$; 8. $400 \mu\text{mol/L}$ 。

d. 不同的材料理想扩增条件下的 RAPD 带 1. 小叶茶; 2. 大叶茶; 3. 可可茶 (含可可碱); 4. 可可茶 (含可可碱和咖啡碱); 5. 可可茶 (含咖啡碱); 6. 对照。

a. Impacts of the concentration of template DNA on the RAPD bands. The concentration of the total DNA of *Camellia ptilophylla* Chang (containing caffeine) varied as follows: Line 1, no template; Line 2, $0.4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; Line 3, $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; Line 4, $2.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; Line 5, $4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$; Line 6, $6 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. M: 2kb ladder DNA Marker.

b. Impacts of the concentration of primer and Taq DNA polymerase on the RAPD bands for *Camellia ptilophylla* Chang (containing caffeine). The concentration of primer varied as follows: Line 1, $6 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; Line 2, $15 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; Line 3, $30 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$; Line 4, $45 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$. Concentration of Taq DNA polymerase varied as follows: Line 5, $0.2 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; Line 6, $0.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; Line 7, $1.0 \text{ U}/20 \mu\text{l}$; Line 8, $1.5 \text{ U}/20 \mu\text{l}$.

c. Impacts of the concentration of magnesium and dNTP on the RAPD bands for *Camellia ptilophylla* Chang (containing caffeine). Line 1, $1.0 \text{ mmol/L MgCl}_2$; Line 2, $2.0 \text{ mmol/L MgCl}_2$; Line 3, $3.0 \text{ mmol/L MgCl}_2$; Line 4, $4.0 \text{ mmol/L MgCl}_2$; Line 5, $100 \mu\text{mol/L dNTP}$; Line 6, $200 \mu\text{mol/L dNTP}$; Line 7, $300 \mu\text{mol/L dNTP}$; Line 8, $400 \mu\text{mol/L dNTP}$.

d. The RAPD bands amplified with optimal amplification condition for *Thea*. Line 1, *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze; Line 2, *C. assamica* (Mast.) Chang; Line 3, *C. ptilophylla* Chang (containing theobromine); Line 4, *C. ptilophylla* Chang (containing caffeine and theobromine); Line 5, *C. ptilophylla* Chang (containing caffeine); Line 6, no template DNA. M: 2kb ladder DNA Marker.

力最高^[1]。这与 Ellsworth 等^[2]发现从 0 到 2.0 mmol/L 扩增带型有变化, 但从 2.0 mmol/L 到 7.0 mmol/L 时带型无变化的结果相似。而与唐绍清等^[6]报道的结果有所不同, 他们发现镁离子浓度从 1.5–2.5 mmol/L 时, 带型无变化, 从 3.0 mmol/L 至 4.0 mmol/L 产生两条新带, 并随镁离子浓度增加而变得清晰。100 至 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 dNTP, RAPD 带型基本相似。dNTP 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 多数带较弱。为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 弱带分辨不清。因而 dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 较为适合, 且前者有更清晰的 RAPD 带。

由上可知, 扩增条件的变化会对扩增出的 RAPD 带的数量和强弱产生影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性。尤其模板 DNA、引物和 Taq 酶的浓度不适宜时, 会对分析结果造成较大人为偏差。因此, 为了获得重复性和可靠性强的可用于 RAPD 分析的扩增 DNA 片段, 研究前采用分相梯度分析的方法, 筛选出较为合适的扩增条件, 并加以固定, 是十分有用和重要的。经过上述试验后, 获得对于茶类植物进行 RAPD 分析较理想的扩增条如下: 2.0 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 15 ng 引物/20 μl 反应体积, 4 ng 模板 DNA/ μl 反应体积, 1 U Taq 酶/20 μl 反应体积。依此扩增条件, 选用 S35 (Sangon) 引物, 使用上述扩增程序, 对五种实验材料进行 DNA 扩增, 得到较为理想的 RAPD 带(图 1d), 并具有较好的重复性。

参考文献

- 1 荆玉祥, 匡廷云, 李德葆主编. 植物分子生物学—成就与前景. 北京: 科学出版社, 1995, 295–302
- 2 Ellsworth D L, Rittenhous K D, Honoycutt R L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, 14:214–216
- 3 Adams R P, Demeke T. Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon*, 1993, 42(3):553–571
- 4 Doyle J J et al. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15
- 5 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993, 58–60
- 6 唐绍清, 施苏华, 林海波. 几种因素对山茶属植物 RAPD 分析的 DNA 扩增的影响. *广西植物*, 1998, 18(2): 185–188
- 7 苏应娟, 王艇, 杨维东等. 罗汉松属植物 DNA 的提取和 RAPD 分析. *中山大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(4): 13–18