

文章编号: 1004-7271(2001)03-0193-06

海带孢子体 DNA 随机扩增反应条件优化

胡远皆, 周志刚

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:从海带孢子体的酶解单细胞中提取的基因组 DNA, 可用于随机扩增多态 DNA (RAPD) 的重复性研究。通过对扩增反应体系中各因子和扩增程序的梯度实验, 确定优化反应体系为: 0.2 μmol/L 引物, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 100 μmol/L dNTP, 1.0 U Taq DNA 聚合酶, 30 ng 模板 DNA; 优化反应程序为: 94℃ 变性 2min, 接着 45 个循环包括 94℃ 变性 1min, 37℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min; 最后 72℃ 延伸 10min。在此优化条件下得到的 RAPD 图谱有较好的特异性和重复性, 为海带遗传多样性、种质鉴定、分子标记及辅助育种等研究提供了有用的手段。

关键词:海带; 孢子体; 随机扩增多态 DNA; 基因组 DNA

中图分类号: S943 文献标识码: A

Optimization of random amplified reaction conditions for *Laminaria japonica* (Phaeophyta) sporophyte DNA

HU Yuan-jie, ZHOU Zhi-gang

(Fisheries College, SFI, Shanghai 200090, China)

Abstract: Unicells isolated from *Laminaria japonica* sporophyte with enzymatic dissociation, were used to extract genomic DNA and to study the reproducibility of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns. The ingredients and programs of amplified reactions were individually optimized. The reactions were composed of 0.2 μmol/L primer, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 100 μmol/L dNTP, 1.0 U Taq DNA polymerase, 30 ng template DNA. The optimized programs were pre-denaturation at 94℃ for 2 min; and then 45 cycles containing denaturation 1 min at 94℃, annealing 1 min at 37℃, and elongation 2 min at 72℃; and at last holding 10 min at 72℃. The optimized conditions could result in satisfactory specificity and reproducibility of RAPD amplification patterns, and consequently provide a useful means for the research of genetic diversity, molecular marker, germplasm identification and auxiliary breeding in *L. japonica*.

Key words: *Laminaria japonica*; sporophyte; RAPD; genomic DNA

随机扩增多态 DNA (RAPD) 是二十世纪九十年代发展起来的一种 DNA 分子标记技术^[1,2]。由于该方法具有安全、快捷、简便、有效等特点^[3], 因此被广泛应用于生物的遗传多样性、群体遗传、分类、亲缘关系分析、特定基因分离与定位及遗传育种等许多研究领域。对大型红藻如紫菜 (*Porphyra*) 的研究, 已有成功应用的报道^[4-6], 但对于褐藻如海带 (*Laminaria japonica*) 的研究, 由于孢子体中含有大量的粘性多糖, 影响了高质量基因组 DNA 的提取^[7], 造成该方面的研究进展缓慢。若通过酶解海带孢子体得到

收稿日期: 2001-04-24

基金项目: 上海市教育委员会“曙光计划”项目 (98-SG-32) 和国家自然科学基金项目 (39800105)。

第一作者: 胡远皆 (1975-), 男, 安徽安庆人, 上海水产大学 2001 届硕士研究生, 专业方向为藻类生物技术研究。

游离的单细胞,并用于总 DNA 的提取,则可有效除去多糖的污染和用于 PCR 扩增。本文通过多重实验,对扩增条件和程序进行优化,可以得到海带孢子体 DNA 高度重复和稳定性的 RAPD 图谱。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

海带孢子体于 1998 年 4 月采自大连,冷藏于 -20°C 。用于程序优化的 10bp 随机引物购自上海生物工程公司,经筛选后下列引物可成功地用于扩增: S22 (TCCCGAGCTG)、S23 (AGTCAGCCAC)、S24 (AATCGGGCTG)、S27 (GAAACGGGTG)、S28 (GTGACGTAGG)、S29 (GGGTAACGCC)、S65 (GATGACCGCC)、S66 (GAACCGACTC)、S68 (TGGACCGGTG); *Taq* DNA 聚合酶购自加拿大 Biostar 公司; dNTP 购自美国 Promega 公司。

1.2 实验方法

经酶解孢子体得到的单细胞用于基因组 DNA 的提取,实验程序参照 Hu 和 Zhou⁽¹⁾的方法。25 μL PCR 基本反应体系组成为:0.2 $\mu\text{mol/L}$ 寡核苷酸引物,缓冲溶液中含 [50mmol/L KCl, 2.0mmol/L Mg^{2+} , 10mmol/L Tris(pH 8.3)], 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 40 ng 模板 DNA。循环反应体系的优化按单因子梯度设置进行(表 1)。

表 1 PCR 扩增反应体系的优化

Tab.1 Optimization of reaction ingredients for PCR amplification

成 份	梯 度						
引物 ($\mu\text{mol/L}$)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	
Mg^{2+} (mmol/L)	0.025	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	
dNTP ($\mu\text{mol/L}$)	10	20	50	100	200	300	
<i>Taq</i> 酶(U)	0.25	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
模板 DNA (ng)	2.5	5.0	10	20	40	80	

基本扩增程序为:93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min,接着 45 个循环包括 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s,36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。优化程序参表 2,每步骤都在前面优化的基础上进行,而未优化的条件则同基本程序。

表 2 PCR 扩增程序的优化

Tab.2 Optimization of reaction program for PCR amplification

优化因子	梯 度
退火温度($^{\circ}\text{C}$)	33,35,36,37,38,39,41,44
退火时间(s)	45,50,55,60,65,70,75
延伸温度($^{\circ}\text{C}$)	64,68,72,76,80
延伸时间(s)	80,100,110,120,130,140,160
(预)变性温度($^{\circ}\text{C}$)	88,91,92,93,94,95,96,97
变性时间(s)	30,45,60,75
循环次数(次)	30,35,40,45,50

RAPD 反应在日本 ASTEC 公司生产的 PCR 循环仪上进行,扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳(含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭),电泳缓冲液为 1 \times TAE(1mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris-acetate, pH 8.0),电压最大不

(1) Hu Y J, Zhou Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues. 2001.

超过 5V/cm, 3h 后紫外灯下观察结果并拍照记录。

2 结果与讨论

2.1 反应体系各因子的优化

2.1.1 随机引物

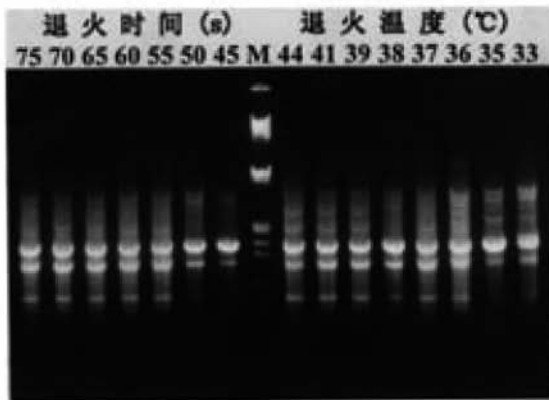
随机引物在 PCR 反应体系中的浓度过高将会引起异位引导(ectopic sites), 其结果是出现意外的非靶序列的扩增; 反之, 如果引物浓度不足, 则 PCR 效率低下^[8]。如图 1a 所示, 在 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 时, 没有 PCR 产物产生, 而在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 下虽有产物形成但出现了靶序列的丢失, 在 0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 下得到的扩增产物完全一致, 没有非靶序列出现, 说明 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物即可满足扩增反应。

2.1.2 *Taq* DNA 聚合酶

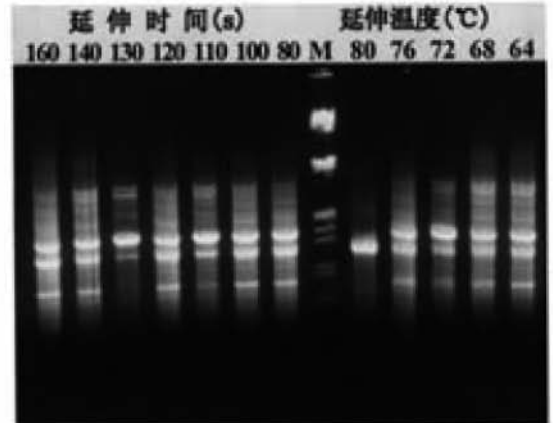
不同来源的 DNA 聚合酶会导致不同的 RAPD 产物^[9], 一般来说在 25 μL 反应体系中催化一典型的 PCR 所需酶量约为 0.5~1U^[10]。由图 1b 可以看出, 0.25U 和 0.5U *Taq* 酶不足以扩增到最大量的 PCR 产物, 当酶量增至 2~4U 时, 产物不仅没有明显的增加, 反而使扩增条带亮度减弱, 由此确定反应的最适酶量为 1U。

2.1.3 Mg^{2+}

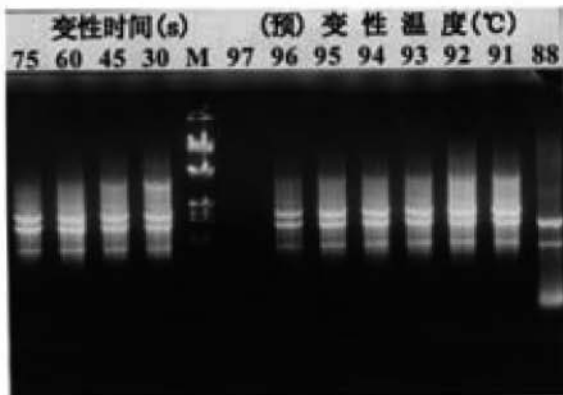
Mg^{2+} 浓度是 PCR 反应至关重要的因素, 它能激活 *Taq* DNA 聚合酶。 Mg^{2+} 浓度太低会无 PCR 产物, 太高时发生错配的概率增加, 导致非特异性的产物产生^[11], 由图 1c 可知, 本实验的最佳 Mg^{2+} 浓度应为 1.5 mmol/L 。



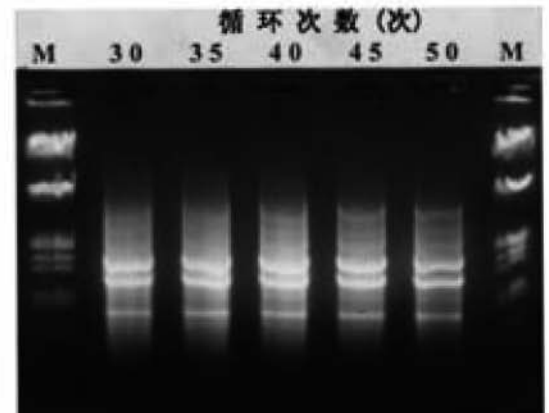
a



b



c



d

(a. 引物; b. *Taq* DNA 聚合酶; c. Mg^{2+} ; d. dNTP; e. 模板 DNA)

2.1.4 dNTP

dNTP是反应中磷酸根的主要来源,且其浓度的任何变化都将影响到 Mg^{2+} 的有效浓度。反应体系中太高的dNTP浓度会抑制 Taq DNA聚合酶的活性^[12],而浓度过低则产率也低。图1d显示,当dNTP浓度低于 $100\mu mol/L$ 时,得不到预期的PCR产物,而高于 $200\mu mol/L$ 时则会发生错误掺入而产生非靶序列,所以最佳的dNTP浓度为 $100\mu mol/L$ 。

2.1.5 模板DNA

反应中应充分考虑模板与引物浓度的比例,因为它会影响扩增产物的质与量^[10]。模板DNA浓度过高将导致靶序列条带模糊,而浓度过低又会造成扩增图谱不完全^[13],实验结果说明20~40 ng模板DNA即能满足扩增反应(图1e)。

从本试验结果得出优化反应体系的组成为: $0.2\mu mol/L$ 引物, $1.5mmol/L$ Mg^{2+} , $100\mu mol/L$ dNTP, 1.0 U Taq DNA聚合酶, 30 ng模板DNA。

2.2 反应程序的优化

2.2.1 退火温度和时间

最适退火温度与靶序列的碱基组成、核苷酸序列、引物的长度及 T_m 值有关^[14],而RAPD标记选取的是10bp随机引物,不需要了解这些因素,所以不能通过理论公式推导,只有经过实验对比确定。经设置梯度试验表明(图2a), $36\sim 38^\circ C$ 下条带清晰,更高温度下没有出现更好的效果;而在较低温度 $33^\circ C$ 和 $35^\circ C$ 时形成非特异性产物,所以认为最适退火温度为 $37^\circ C$ 。在此温度下进行退火时间试验, 45 s时扩增产物不完全, 50 s比 60 s的扩增带弱,进一步延长退火时间,扩增产物没有明显增加,所以确定合适的退火时间为 60 s。

2.2.2 延伸温度和时间

延伸温度和时间的确定主要与 Taq 酶有关。对核苷酸的掺入而言, $75\sim 80^\circ C$ 为 Taq 酶的最佳反应温度^[9]。在优化条件下,进行延伸温度和时间梯度试验(图2b)。延伸温度为 $80^\circ C$ 时,特征性谱带减少,低于 $68^\circ C$ 时特征谱带不清楚,从而确定合适延伸温度为 $72^\circ C$ 。延伸时间太短不利于目的片段的形成,但延伸时间过长,扩增效果反而不好。如 $140\sim 160$ s时,扩增图谱不稳定。为得到更多产量的靶序列和稳定的图谱,选择延伸时间为 120 s。

2.2.3 预变性和变性温度和变性时间

一般而言, $94\sim 95^\circ C$ 是模板DNA变性所必需的^[15]。预变性和变性温度为 $88^\circ C$ 时,特征性长片段缺失而出现非靶短序列(图2c),可能是在较低温度下模板DNA变性不完全而使长片段复制困难。在 $97^\circ C$ 的高温下,没有扩增产物形成,这可能是因为 Taq 酶高温失活^[16]或反应成份如dNTP分解所致^[17]。在变性温度为 $94^\circ C$ 下, 30 s和 45 s背景较强, 60 s和 75 s变性时间充足,都能产生较好的结果,最终取 60 s为变性时间。

2.2.4 循环次数

在其它因素处于最适条件下,扩增程序中热循环次数将对PCR产物的形成有一定的影响。热循环次数过少,得不到足够的产物量。图2d中可以看出, 30 次循环产生的谱带稍弱, 40 个循环后基本稳定,所以确定 45 个循环即可满足扩增的需要。

综合上述结果得出优化反应程序为: $94^\circ C$ 变性 2 min,接着 45 个循环包括 $94^\circ C$ 变性 1 min, $37^\circ C$ 退火 1 min, $72^\circ C$ 延伸 2 min,最后 $72^\circ C$ 延伸 10 min。

2.3 优化体系和程序的检验

用同一海带孢子体分别5次独立提出基因组DNA,应用优化体系组成和优化程序,以引物S65、S66做重复对照实验,得到稳定而重复性高的扩增图谱(图3)。在此优化反应条件下,成功地构建了海带孢子体DNA随机扩增图谱(图4)。

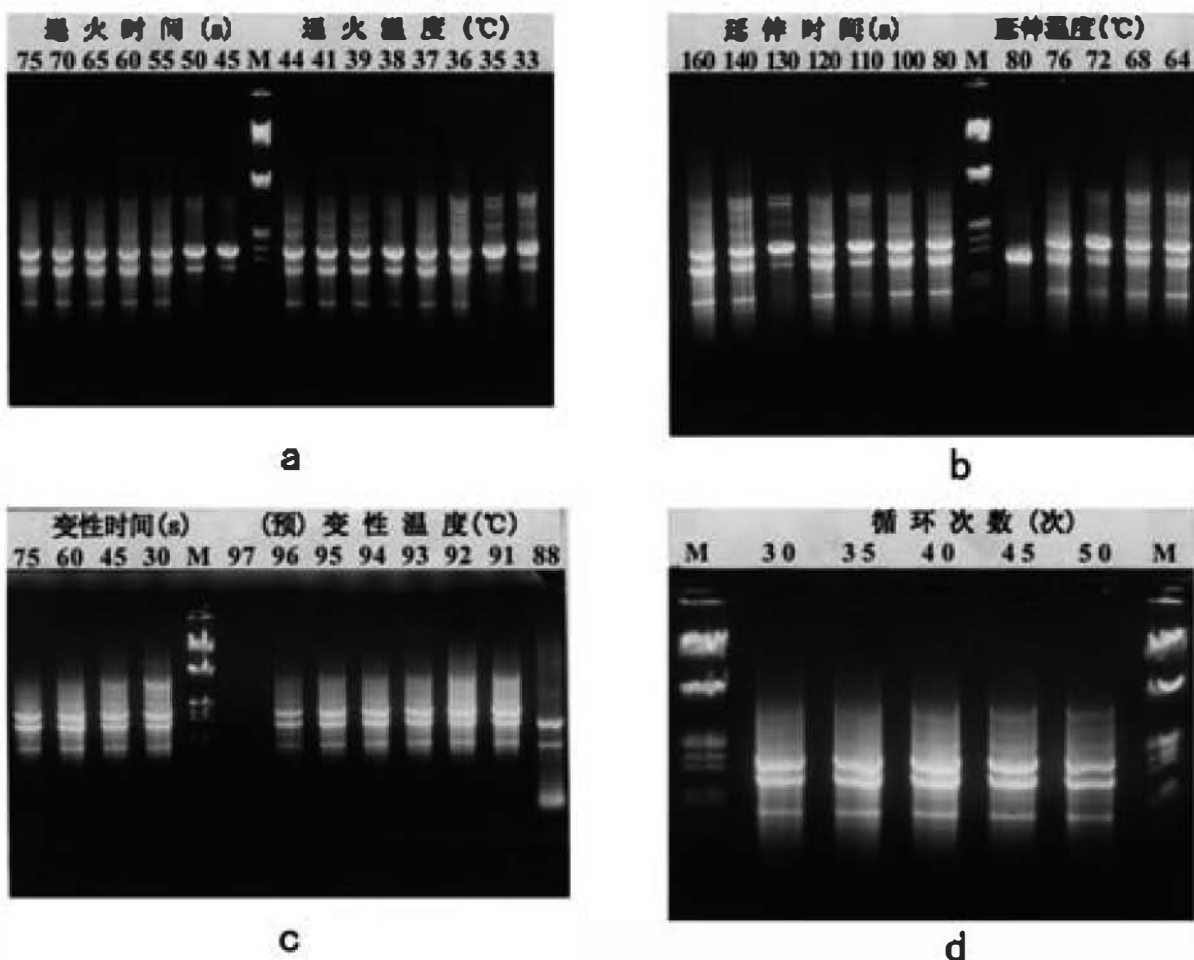


图 2 不同扩增程序条件下的扩增结果

Fig.2 Amplification results under different amplification programs
Lane M refers to the DNA size standards as in the legend to Fig 1.

(a.退火温度和退火时间; b.延伸温度和延伸时间; c.预变性和变性温度和变性时间;d.循环次数)

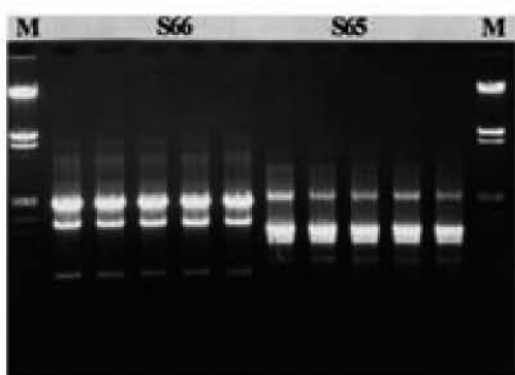


图 3 引物 S65 和 S66 应用于优化反应条件下扩增重复性的检验
Fig.3 Reproducibility of RAPD profiles for five independent DNA extractions of a single isolate under the optimized conditions with primers S65 and S66, respectively
Lane M refers to the DNA size standards as in the legend to Fig 1.

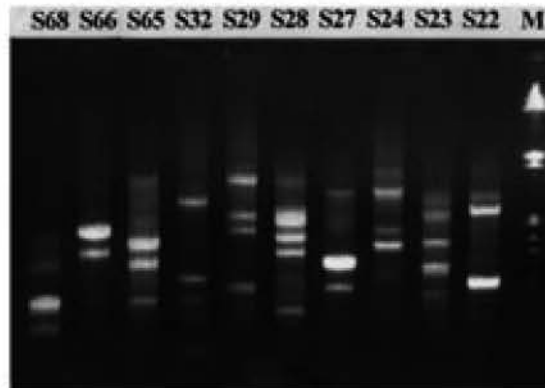


图 4 10 个引物对海带孢子体 DNA 样品在优化条件下的扩增结果
Fig.4 Amplification results of *L. japonica* DNA samples with 10 primers under the optimized conditions
Lane M refers to the DNA size standards as in the legend to Fig 1. The numbers above the lanes indicate the primers present in the amplification reactions.

参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18 (22):6531-6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24):7213-7218.
- [3] Penner C A, Bush A, Wise R, et al. PCR method and applications [M]. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 341-345.
- [4] Julie A D, Donald F K. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6:267-273.
- [5] Mizukami Y, Okauchi M, Kito H, et al. Discrimination of laver cultivars with RAPD markers [J]. *Fish Sci*, 1996, 6:547-551.
- [6] Mizukami Y, Kito H, Kuramoto M, et al. Effect of DNA preparation from laver (*Porphyra yezoensis*) thalli on reproducibility of RAPD (random amplified polymorphic DNA) patterns [J]. *J Appl Phycol*, 1998, 10: 23-29.
- [7] Mayes C, Saunders G W, Tan J H, et al. DNA extraction methods for kelp (Laminariales) tissues [J]. *J Phycol*, 1992, 28(5): 712-716.
- [8] Ellesworth D L, Ritterhouse K D, Honeycutt R L. Artificial variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns [J]. *Biotechnol*, 1993, 14(2): 214-217.
- [9] Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(20): 4647-4648.
- [10] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 40.
- [11] Kohel R J, Park Y H. Effect of concentration of $MgCl_2$ on random amplified DNA [J]. *Biotechniques*, 1994, 16(4): 652-656.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 680.
- [13] Williams J C K, Hanagey M K, Rafalski J A, et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA marker [J]. *Methods Enzymol*, 1993, 218: 704-740.
- [14] Innis M A, Myambo K B, Gelfand D H, et al. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(23): 9436-9440.
- [15] Atienzar F, Evenden A, Jha A, et al. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature [J]. *Biotechnol*, 2000, 28(1): 52-54.
- [16] Witter C T, Fillmore G C, Hillyard D R. Automated polymerase reaction in capillary tubes with hot air [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(1): 4353-4357.
- [17] Witter C T, Garding D J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization [J]. *Biotechnol*, 1991, 10(1): 76-83.

欢迎订阅 2002 年《渔业致富指南》

《渔业致富指南》杂志系目前我国水产行业出版周期最短、传递信息最快的水产科技期刊,读者遍及全国 30 个省、市、自治区,深受广大读者欢迎。本刊主要辟有渔业信息、致富典例、专家论坛、水产养殖实用技术、名特优水产品养殖、鱼类病害防治技术、养殖技术专题讲座、科研园地、读者信箱、水产商情等栏目。

本刊为半月刊,彩封,大 32K 版 56 页,每月 10 日、25 日出版。每期定价 1.50 元,全年 24 期 36 元。全国各地邮局均可办理订阅手续。如当地邮局不能办理订阅手续,请读者直接汇款本刊编辑部订购,本刊常年办理订阅和补订手续(免收邮寄费)。

欢迎各企事业单位刊登各类广告。

本刊地址:武汉市武昌东湖路 96 号

邮编:430071

电 话:027-87812348

传真:027-87311934

邮发代号:38-320 国内统一刊号:CN42-1279/F