

苹果 RAPD 标记的引物筛选与 RAPD 校正

朱元娣¹ 李光晨¹ 张文¹ 王涛²

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院; 2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 为筛选适宜苹果的 RAPD 引物,以苹果富士与舞姿的杂交后代为试材,依据 RAPD 校正方法、利用引物 OPA13 构建了苹果的 RAPD 校正图谱;在 520 个 RAPD 引物中找出了扩增稳定、条带清晰的 246 个引物,其中扩增条带数在 8 个以上的有 91 个引物,可用于苹果的遗传分析。探讨了 RAPD - PCR 反应条件与 RAPD 校正的关系, RAPD 校正能够提高 RAPD - PCR 的扩增能力。

关键词 RAPD 引物; RAPD 校正; 苹果

中图分类号 S 661.1

文章编号 1007-4333(2003)03-0007-04

文献标识码 A

Selection of RAPD primers in apple and RAPD correction

Zhu Yuandi¹, Li Guangchen¹, Zhang Wen¹, Wang Tao²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratories for AgroBiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract 520 RAPD primers were screened in the progeny of "Fuji × Wuzi" for getting suitable primers for RAPD analysis in apple. By using the method of RAPD correction, an apple RAPD correction fingerprint was produced by the primer OPA13. The results showed that 246 primers gave clear polymorphic and steady amplification bands among the total 520 RAPD primers, and 91 primers were got at least 8 bands, which could be used for genetic analysis of apple. RAPD correction can increase the ability of RAPD - PCR amplification. The relationship between RAPD - PCR reaction conditions and RAPD correction is also discussed.

Key words RAPD primer; RAPD correction; apple

RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 标记是 1990 年由美国的 William 和 Welsh 各自领导的研究小组几乎同时发展起来的^[1,2]。该技术以 PCR 为基础,以一寡聚核苷酸序列 (4~15 bp) 为引物 (一般为 10 bp 的随机引物),对基因组 DNA 进行随机扩增,产生多态性长度片段,电泳分离检测。由于 RAPD 标记的引物设计是随机的,不需要预先知道植物基因组 DNA 特异位点序列的信息,与 RFLP、AFLP、SSR 等共显性标记相比具有操作简单、快速、高效的特点,而且用于 PCR 扩增的模板 DNA 用量少、多态性强、灵敏高、自动化程度高、成本低、无放射性危害,现 RAPD 技术已广泛应用于植物遗传学研究的各个领域,在苹果的遗传图谱构建、重要农艺性状的基因定位、种质资源鉴定、系谱分析及分子标记辅助选择等方面显示了广阔的应用前景^[3]。目前 RAPD 标记通常使用的引物是美国 Operon 公司生产的十聚体核苷酸引物共计 520 个,但其数量大而

且碱基序列是随机的,无法根据碱基序列推测出某基因组可能适合的引物,只能随机选取或进行全部引物的筛选。随机选取引物往往不能满足实验所需,而全引物筛选则成本较高。本试验以苹果基因组为试材,对 Operon 公司的 520 个引物进行筛选,将所获得的扩增稳定、多态性好、条带清晰的 RAPD 引物用于苹果柱型基因 *Co* 的遗传分析验证,也可以作为其他的苹果 RAPD 标记分析时引物选择的参照。

RAPD 校正是以 RAPD 的扩增能力为尺度对模板 DNA 或其他因素进行调整,获得最佳的扩增能力^[4]。针对 RAPD 技术的引物短、PCR 反应的退火温度较低 (30~40 °C) 等不足,在优化 PCR 反应中各组分如引物、Taq 酶、Mg²⁺、dNTPs 用量的基础上,重点调整模板 DNA 的浓度,以提高 RAPD 的扩增能力。目前在玉米上已建立了以 OPD20 为引物的 RAPD 校正图谱,并已用于玉米抗囊肿腐霉病的遗传分析,其他植物上未有报道。本试验以苹果品种

收稿日期: 2002-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970526)

作者简介: 朱元娣,在职硕士研究生,副教授;王涛,教授,博士生导师,联系作者,主要从事植物分子遗传研究,

E-mail: Wangt @cau. edu. cn

富士与舞姿的杂交后代为试材,依据 RAPD 校正原理,构建苹果的 RAPD 校正图谱,分析 RAPD 的校正能力及其在苹果 RAPD 标记分析的可操作性。

1 材料和方法

1.1 材料

苹果富士 × 舞姿的杂交后代实生苗的柱型及非柱型单株各 20 株,提取每个单株的叶片总 DNA。依据集团分离分析 (bulk segregant analysis, BSA) 方法^[5],等量混合柱型、非柱型中各单株的 DNA,构成柱型基因池 Pc 和非柱型基因池 Ps 2 个处理。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与纯化 叶片总 DNA 提取参照祝军的改进方法^[6],紫外分光光度计测定 A260/A280 的吸光值,确定 DNA 浓度和质量,并将样品冷藏于 -20℃ 备用。

1.2.2 RAPD 扩增 引物为美国 Operon 公司出品的随机引物,编号为 OPA ~ OPZ 共 26 组 520 个引物;Taq DNA Polymerase (2 U · μL⁻¹),Buffer (10 ×),MgCl₂ (25 mmol L⁻¹),dNTPs (10 mmol L⁻¹) 购于鼎国生物技术发展中心及华美生物技术。扩增在美国应用生物技术公司生产的 Gene Amp. PCR system 9700 上进行。

根据已经优化的 PCR 反应体系^[7],略做调整。在 20 μL 反应体积中各组份的使用浓度为 Taq DNA 聚合酶 0.8 U、1 × Buffer、MgCl₂ 2.5 mmol L⁻¹、dNTP mixed 0.2 mmol L⁻¹、引物 0.2 μmol L⁻¹,模板 DNA 的用量为 40 ng。扩增条件为 94℃ 变性 5 min;42 个循环,包括 94℃ 变性 0.45 min、36℃ 退火 0.45 min、72℃ 延伸 1.20 min;72℃ 延伸 8 min;4℃ 保存。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色检测,凝胶成像扫描仪器扫胶保存。

2 结果与分析

2.1 苹果 RAPD 标记的全引物筛选

分别以柱型及非柱型基因池 DNA 为模板,筛选了 520 个 RAPD 引物,其中 246 个引物具有清晰的扩增,平均条带数是 7 个,扩增区域主要在 400 ~ 2 000 bp,在两池之间具有良好的重复性。另一些引物虽然有清晰的扩增,但扩增条带数量少(少于 4 条)、扩增范围窄,不适宜做遗传分析,不计入内。

图 1 ~ 3 为部分 RAPD 引物的 PCR 扩增结果。在 26 组共 520 个引物中,OPA、OPG、OPH、OPI、OPJ、OPK、OIL、OPO、OPP、OPU、OPW 组的扩增结果最好,

而 OPB、OPC、OPF、OPQ、OPR、OPS、OPX、OPY 组的扩增结果较差。在 246 个可用的引物中,出现 10 条以上扩增带的引物有 21 个、出现 9 条扩增带的有 18 个、出现 8 条扩增带的引物 52 个,其余的扩增带数为 5 ~ 7 条。表 1 为部分引物的 RAPD 扩增能力。在进行苹果的遗传学研究如遗传连锁图谱构建或进行种质资源鉴定时,则宜选用 PCR 扩增清晰、扩增范围广泛而且条带数目多的引物。

2.2 模板 DNA 的浓度与 RAPD 校正

在 RAPD - PCR 扩增中,引物、Taq 酶、Mg²⁺、dNTPs 的用量都容易控制,但模板 DNA 不容易控制。即使 DNA 浓度完全相同,由于降解程度或纯度不同,都会影响到 RAPD 的扩增能力。RAPD 校正以 RAPD 的扩增能力为尺度对模板 DNA 或其他因素进行调整,获得最佳的扩增能力,重点在于对模板 DNA 浓度的调整。其理论基础是碱基误配率的大小 r 与模板浓度 c 成正比,与退火温度 t 成反比,表达式 $r = k \cdot c / t$,其中 k 为误配系数。在 RAPD - PCR 扩增中退火温度一般设定在 36℃,而模板 DNA 的浓度则是变量。图 4 为引物 OPA13 对 10 个苹果 DNA 样品在进行 RAPD 校正前后的 PCR 扩增结果。虽然所有的样本样品均已定量,在 PCR 扩增中的使用量相同,但样品 2、3、6、9 和 10 的浓度还是不能满足 PCR 扩增要求,校正时应略微提高使用时模板 DNA 的浓度以提高 PCR 的扩增能力。经过 RAPD 校正后,各样本的扩增条带清晰、一致。

3 讨论

RAPD 标记技术自问世以来因其特有的优点而被广泛应用。但由于该技术自身的明显缺陷如引物的碱基数目少(一般为 10 bp)、PCR 反应过程中的退火温度低、碱基错配的机率大、可重复性低等,降低了 RAPD 标记的可用性。影响 RAPD 分析技术稳定性的原因是多方面的,模板 DNA 的质量和浓度是最重要的因素。RAPD 校正虽能通过调整模板 DNA 的用量明显地提高 RAPD 扩增的可重复性,但依据少数几个引物所建立的标准 RAPD 校正图谱来校正模板 DNA 用量,对小样本的实验而言,还是可行的,但对大样本的 RAPD 分析,而且在多个引物的条件下,实施起来有很多困难。另外,在实验过程中往往被忽略的另一因素就是引物自身的质量,由于引物的降解导致扩增失败。不同批次的引物即使其他的反应条件都保持一致,也会有不同的结果。

本试验通过对 Operon 公司 520 个引物的筛选,

对照本实验室已有的结果^[6,8],认为在优化的 PCR 扩增条件下,一些 RAPD 引物如 OPH01、OPK17 等在苹果基因组的扩增中具有良好的重复性,关键在于

引物的选取和模板 DNA 的质量与用量。RAPD 校正图谱更适合于进行小样本的 RAPD 标记分析。



图 1 OPG 和 OPJ 组部分引物的 RAPD-PCR 扩增

Fig. 1 RAPD-PCR amplification of some primers from OPG and OPJ groups

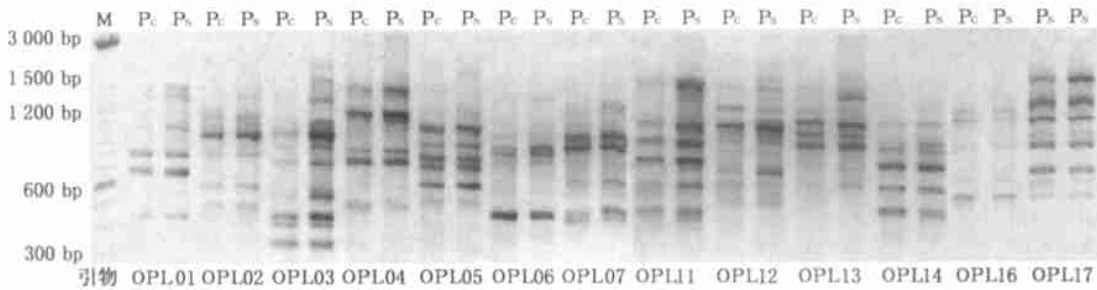


图 2 OPL 组部分引物的 RAPD-PCR 扩增

Fig. 2 RAPD-PCR amplification of some primers from OPL group

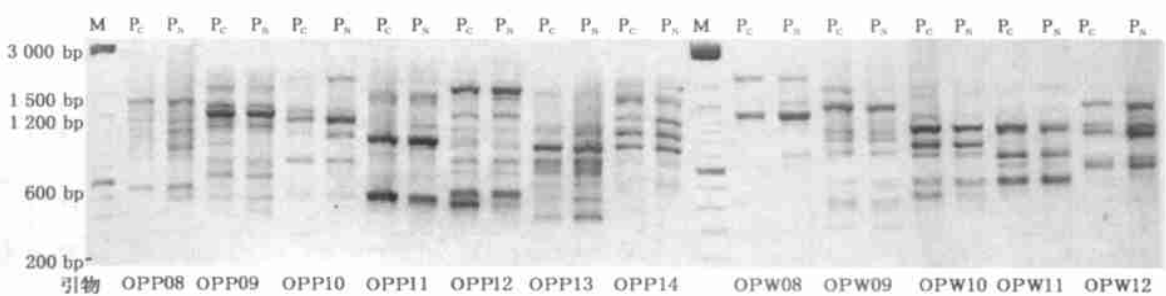


图 3 OPP 和 OPW 组部分引物是 RAPD-PCR 的扩增

Fig. 3 RAPD-PCR amplification of some primers from OPP and OPW groups

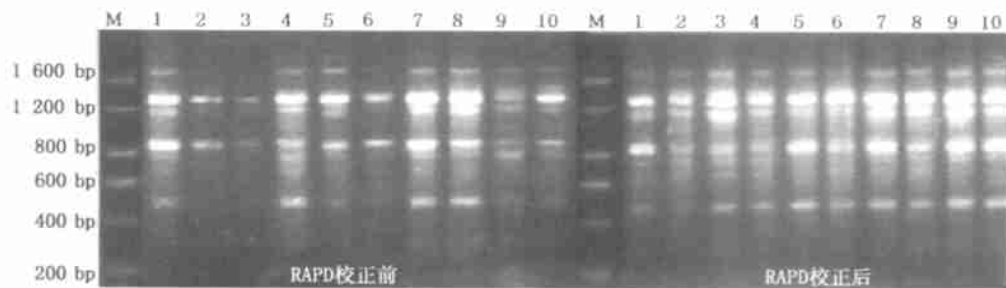


图 4 引物 OPA13 对苹果 DNA 样本在 RAPD 校正前后的扩增结果比较

Fig. 4 Comparison of the amplification results by primer OPA13 before and after RAPD correction in apple DNA samples

表1 经筛选的部分 RAPD 引物的 PCR 扩增能力
Table 1 PCR amplification ability of selected RAPD primers

引物 / 序列 5 - 3	扩增带数	扩增长度 bp	引物 / 序列 5 - 3	扩增带数	扩增长度 bp
OPA09/ GGGTAACGCC	8	350 ~ 1 100	OPH19/ CTGACCAGCC	8	500 ~ 1 400
OPD11/ ACGCCATTG	8	300 ~ 2 000	OPH06/ AAGCGGCAG	8	400 ~ 1 500
OPE04/ GTGACATGCC	8	500 ~ 2 500	OPH01/ CCCGCGATAA	8	350 ~ 1 400
OPE18/ GGACTGCAGA	10	500 ~ 2 500	OPH04/ CCGAACACGG	8	400 ~ 1 500
OPG01/ CTACGGAGGA	8	350 ~ 1 500	OPH09/ TGA CCTCAC	8	350 ~ 1 500
OPG02/ GGCAC TAGG	9	200 ~ 1 400	OPH10/ AAGCCCGAGG	8	350 ~ 1 400
OPG03/ GAGCCCTCCA	9	400 ~ 1 200	OPH13/ CCACACTACC	8	400 ~ 1 200
OPG04/ ACGGTGICTG	9	350 ~ 1 500	OPH14/ CACCCGGATG	8	500 ~ 1 500
OPG05/ CTGAGACGGA	9	300 ~ 1 500	OPH16/ CTGCTTAGGG	8	400 ~ 2 500
OPG06/ GTGCCTAACCC	9	450 ~ 2 000	OPH18/ TGGTCGCACA	8	350 ~ 1 500
OPG08/ TCACGCCAC	8	400 ~ 1 500	OPH19/ GGACCCACT	10	300 ~ 1 400
OPG09/ CTGACGTCAC	8	400 ~ 1 500	OPH20/ AACGGCCCTC	10	200 ~ 1 500
OPG10/ AGGGCCGICT	11	300 ~ 1 200	OPK01/ CATTGAGCC	8	500 ~ 1 600
OPG11/ TGCCCGTCTG	8	400 ~ 1 500	OPK02/ GTCCTCCGAA	8	300 ~ 2 000
OPG13/ CTCTCCGCCA	8	300 ~ 1 400	OPK03/ CCA GCTTAGG	8	300 ~ 2 000
OPG14/ GGATGAGACC	9	300 ~ 1 500	OPK04/ CCGCCCAAAC	9	500 ~ 1 500
OPG16/ ACGGCTCTCC	8	350 ~ 1 500	OPK06/ CACCTTTCCC	10	400 ~ 1 500
OPG17/ ACGACCGACA	8	300 ~ 1 500	OPK07/ AGCGAGCAAAG	13	250 ~ 1 600
OPH04/ GGAAGTCCGC	10	200 ~ 1 200	OPK10/ GTGCAACGTG	10	350 ~ 2 000
OPH12/ ACGCGCATGT	8	300 ~ 1 200	OPK11/ AATGCCCCAG	9	300 ~ 1 500
OPH13/ GACGCCACAC	9	300 ~ 1 200	OPK13/ GGTGTGACC	10	400 ~ 1 500
OPH14/ ACCAGGTTGG	8	400 ~ 1 500	OPK17/ CCCAGCTGTG	8	400 ~ 2 000
OPH15/ AATGGCCCAAG	8	300 ~ 2 000	OPK20/ GTGTCGCGAG	9	400 ~ 1 500
OHL12/ GGGCGGTA	12	500 ~ 2 000	OHL01/ GGCATGACCT	9	450 ~ 1 500
OHL16/ AGGTTGCAAG	8	350 ~ 1 200	OHL02/ TGGGCGTCAA	8	500 ~ 1 400
OHL17/ ACGCTGAGCC	9	450 ~ 2 000	OHL03/ CCA GCACTT	11	350 ~ 2 000
OHL18/ ACCACCCACC	9	350 ~ 1 500	OHL04/ GACTGCACAC	8	450 ~ 1 400
OPO03/ CTGTTGCTAC	8	500 ~ 2 000	OHL05/ ACGCAGGCAC	8	500 ~ 2 000
OPO05/ CCCAGTCACT	10	400 ~ 2 000	OHL06/ GAGGGAAGAG	8	400 ~ 1 400
OPO06/ CCACGGGAAG	8	400 ~ 2 000	OHL08/ AGCAGGTGGA	8	400 ~ 1 400
OPO10/ TCAGAGCCGC	8	400 ~ 1 500	OHL09/ TCGAGAGTIC	8	400 ~ 2 000
OPU01/ ACGGACGTCA	8	400 ~ 1 400	OHL11/ ACGATGAGCC	8	400 ~ 2 000
OPU11/ AGACCCAGAG	9	500 ~ 3 000	OPP02/ TCGGCACGCA	8	500 ~ 2 000
OPU12/ TCACCA GCCA	11	300 ~ 1 500	OPP06/ GTGGGCTGAC	8	400 ~ 1 500
OPU16/ CTGCCTGGA	10	350 ~ 1 300	OPP08/ ACATCGCCCA	8	300 ~ 1 400
OPU18/ GAGGTCCACA	8	400 ~ 1 300	OPP09/ GTGGTCCGCA	10	400 ~ 2 000
OPU19/ GTCA GTCCGG	9	350 ~ 1 500	OPP10/ TCCCGCTTAC	8	500 ~ 2 000
OPU20/ ACA GCCCCCA	9	350 ~ 1 500	OPP11/ AACGCGTCCG	9	500 ~ 1 500
OPW01/ TGACGCATGC	8	250 ~ 1 200	OPP12/ AAGGGCGAGT	9	400 ~ 1 500
OPW06/ AGGCCCGATG	11	300 ~ 1 500	OPP13/ GGA GTCCCTC	10	300 ~ 1 400
OPW08/ GACTGCCTCT	8	400 ~ 1 500	OPP16/ CCAA GCTGCC	8	400 ~ 1 300
OPW12/ TGGGCAGAA	10	300 ~ 1 500	OPP17/ TGACCCGCTT	8	400 ~ 1 500
OPW15/ ACACCGGAAC	12	450 ~ 2 500	OPW02/ ACCCCGCCAA	10	300 ~ 1 400
OPW16/ CAGCTACCA	10	450 ~ 1 500	OPW03/ GTCGCGAGTG	8	400 ~ 1 400
OPX11/ GGA GCCTCAG	8	450 ~ 1 500	OPW05/ GCGGATAAG	8	400 ~ 1 200
OPX13/ ACGGGAGCAA	8	350 ~ 1 500			

参 考 文 献

- [1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213 ~ 7218
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 8: 6531 ~ 6535
- [3] 姜玲. RAPD 技术及其在园艺植物上的研究和应用 [J]. *生物技术*, 1996, 6(5): 35 ~ 39
- [4] 董五辈, 王国英. RAPD 校正及玉米肿瘤腐霉抗性基

因的分子标记 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (2): 129 ~ 131

- [5] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease - resistance genes by bulk segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome region by using segregating population [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 88: 2444 ~ 2448
- [6] 祝军. 苹果、桃基因型 DNA 水平鉴定和苹果 Co 基因分子标记的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 1998
- [7] 祝军, 王涛. 苹果 RAPD 分析体系的建立 [J]. *果树科学*, 2000, 17(4): 239 ~ 243
- [8] 赵玉军. 苹果柱型基因分子标记及柱型基因连锁遗传图谱的构建 [D]. 北京: 中国农业大学, 1999