

TE 缓冲液对 RAPD 带型的影响

刘春林, 阮颖, 王学军, 官春云

(湖南农业大学 生物技术系 作物基因工程 湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410128)

摘要: TE 作为一种溶解 DNA 的常缓冲液, 它对 RAPD 带型的影响往往没有受到重视. 通过对 TE 缓冲液与 RAPD 带型之间关系进行了较系统的研究, 结果说明 TE 对 RAPD 带型有明显影响; 并且显示在 Mg^{++} 为 2 mmol/L 时, TE 是影响 RAPD 带型的敏感因素. 还针对 TE 的不利影响, 提出了有效的解决办法.

关键词: TE 缓冲液; RAPD 带型; 相互关系

中图分类号: Q78; Q81

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001)03-0275-02

Affect of TE Buffer on RAPD Profile

LIU Chun-lin, RUAN Ying, WANG Xue-jun, GUAN Chun-yun

(Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province and Biotechnological Department,
Hunan Agriculture University, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: The relationship between TE buffer and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) profile has been studied and the result showed that TE buffer could change the profile of RAPD, especially at the 2 mmol/L of Mg^{++} concentration. According to the results, TE was regarded as a sensitive factor changing RAPD profile. An alternative solution was suggested to solve the problem.

Key words: TE buffer; RAPD profile; relationship

(Life Science Research, 2001, 5(3): 275~276)

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 作为一种常用的分子标记方法^[1], 被广泛应用于动物、植物、人和微生物的遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究^[2-5].

RAPD 技术在应用于不同研究领域过程中, 由于影响 RAPD 带型的因素比较多, 加上操作人员的技术熟练程度不一, RAPD 技术的可靠性曾一度受到怀疑. 为了彻底改变这一混乱局面, 人们对 RAPD 反应体系中的各种因素如 Mg^{++} 浓度、DNA 质量、模板 DNA 浓度、随机引物和 dNTP 浓度、 Taq 酶的商品型号、反应时间的长短和温度高低等都做过详细的研究, 并且确立了 RAPD 技术为一可靠分子标记技术^[6]. 但在已有影响因素

的研究中都未报道有关 TE (DNA 常用溶解缓冲液) 对 RAPD 带型影响的系统研究. 本文就我们对这一问题的研究作如下报道.

1 材料与方法

1.1 材料

以油菜 DNA ($D(260)/D(280) = 1.9$) 为模板, 引物 S5 购自上海生工, 碱基序列为 T G C G C C C T T C.

1.2 方法

在已筛选出的最佳反应体系的基础上^[7], 设 5 个水平 TE 浓度: 1、1/10、1/100、1/1 000 TE 和水 (DNA 模板溶解在水中) (TE: 10 mmol/L Tris · Cl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0). 同时, 设

* 收稿日期: 2001-05-18; 修回日期: 2001-07-02

基金项目: 湖南省生命科学联合中心重点资助项目 (1999-03)

作者简介: 刘春林 (1963-) 男, 湖南茶陵人, 湖南农业大学副教授, 博士, 从事植物分子遗传学和基因工程研究. Tel: +86-0731-

4617941, Email: liuch63@hotmail.com.

计了 8 个 Mg^{++} 浓度: 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 mmol/L (检验 TE 与 Mg^{++} 的相互关系). 一个 TE 水平与 8 种 Mg^{++} 浓度构成一组, 共 40 管, 设一次重复. PCR 扩增在 PTC-100 热循环仪上完成. 扩增产物用 1.9% 的琼脂糖凝胶电泳分离; 电泳结果在凝胶分析系统 Gel Doc 1 000 上分

析并打印出结果.

2 结 果

图 1-1 ~ 1-5 分别代表 5 种不同浓度的 TE, 即 1、1/10、1/100、1/1 000 TE 和水, 以及它们与 8 种不同 Mg^{++} 浓度组合扩增的结果.

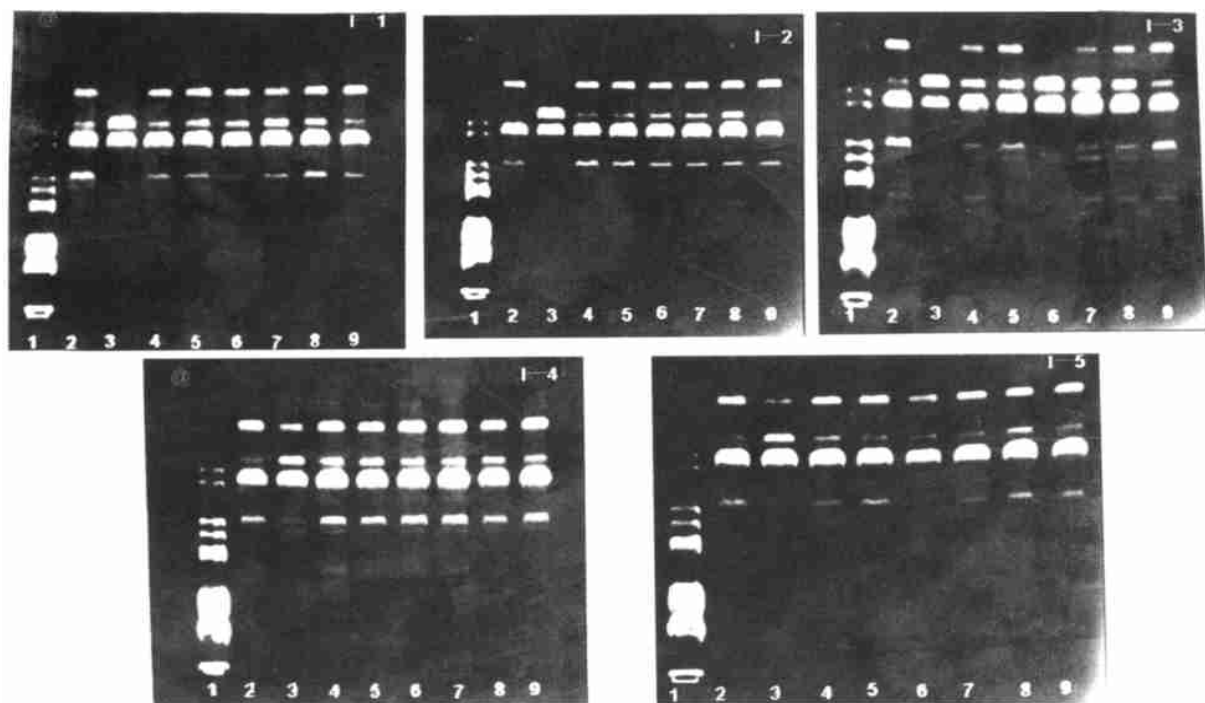


图 1 TE 缓冲液对 RAPD 带型的影响

Fig. 1 Affect of TE Buffer on RAPD Profile

根据图 1, 大体上可分为两组, 一组为水、1/1 000 和 1/100 的相对低浓度 TE 组, 这 3 种浓度的 TE 分别与 8 种不同浓度的 Mg^{++} 组合, 扩增后各电泳道的 RAPD 带型基本一致 (图 1-1 ~ 1-3). 另一组为 1/10 和 1 倍的相对高浓度的 TE 组, 这 2 种浓度的 TE 分别与 8 种不同浓度的 Mg^{++} 的组合, 扩增后各电泳道的 RAPD 带型除第 3 电泳道之外, 其它基本一致 (图 1-4 ~ 1-5). 这两组之间的主要区别在第 3 电泳道 (Mg^{++} 的浓度为 2 mmol/L); 相对低浓度的 TE 组, 只有 2 条明亮的主带, 且大小均匀一致; 相对高浓度的 TE 组, 有 3 条明显的带, 其一条为明亮的主带, 其它 2 条相对较暗.

3 分 析

TE 作为一种溶解 DNA 的常缓冲液, 它对 RAPD 带型的影响往往没有受到重视. 从以上实

验结果可以看出, TE 浓度的变化对 RAPD 的带型有影响, 特别是 Mg^{++} 的浓度为 2 mmol/L 时, 带型变化非常明显. 从组成成分的角度分析, TE 是由三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和乙二铵四乙酸 (EDTA) 组成, 其中 EDTA 是一种螯合剂, 可与 Mg^{++} 的结合, 降低游离的 Mg^{++} 的浓度. 作为 Taq 聚合酶, 其最佳 Mg^{++} 浓度为 2 mmol/L. Mg^{++} 浓度的下降, 可影响 Taq 聚合酶与 DNA 分子上不同部位的亲和力, 最终导致扩增后带的亮度和扩增带数发生变化. 从版图中还可看出, 在 Mg^{++} 为 1.5 mmol/L (第 I 电泳道) 时, TE 的变化对其 RAPD 带型影响不大. 同样 Mg^{++} 大于 2 mmol/L 时, TE 的变化对其 RAPD 带型影响也不大. 所以, 当 Mg^{++} 为 2 mmol/L 时, TE 可以被认为是 Taq 聚合酶活性特征的重要影响因素, 是影响 RAPD 带型的敏感因素. 在实际操作中, 由于提取的 DNA 浓度不一致, (下转第 279 页)

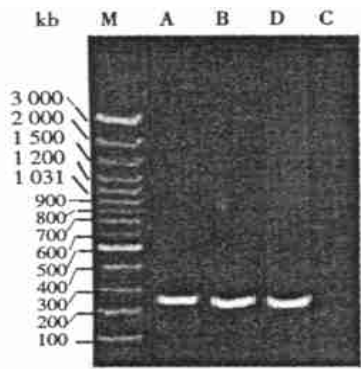


图 2 回收 Bt 4. 071 8 质粒 DNA 片段 P₁、P₂、P₃ 的 PCR 产物电泳图

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus Marker;
A、B、D: 回收质粒 DNA 片段 P₁、P₂、P₃ 的 PCR 产物;
C: 对照.

Fig.2 The electrophoresis of PCR products on recovering plasmid DNA (P₁, P₂, P₃)

M: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus Marker;
A, B, D: PCR products On recovering DNA of plasmids (P₁, P₂, P₃) D N A; C: control.

高, 可以用于各种分子生物学的操作, 加快了实验的进程. 目前此三种方法在本实验室已成常规技术而被应用.

(上接第 276 页)

在用水配制模板 DNA 时, 取用的 DNA 体积不一致, 最终模板溶液中 TE 的浓度不一致. TE 浓度不一致, 就会干扰 RAPD 的带型. 所以, 为清除 TE 的不利影响. 根据这一实验结果, 建议 DNA 纯化后和配制模板 DNA 时, 以超纯水(0.2 μm 孔径过滤器过滤超纯水, 然后在高压锅中高压灭菌)为溶剂 4 保存. 用这种方法保存的 DNA 三年后仍然完整如初(结果待发表).

参考文献(References):

[1] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K L, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6535.

[2] ECHT C S, ERDAHL L A, MCCOY T J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa[J]. *Genome*, 1992, 35: 84-87.

[3] TINKER N A, FORTIN M G, MATHER D E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in

另外, 本文介绍的 Bt 质粒 DNA 回收方法需注意两个操作要点: 一是方法(i)的挡板下边(插入凝胶的一边)务必整齐, 膜应与胶贴紧, 否则 DNA 将从缝隙中遗漏而达不到应有的回收率. 二是操作过程中切胶块尽可能快, 且一定要用长波长(波长> 300 nm)紫外灯, 尽可能减少紫外线的照射量.

参考文献(References):

[1] DRETZEN G M, BELLARD P, SASSONE CORSI, *et al.* A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 1981, 112: 295-298.

[2] 顾其华, 李玲芝, 舒畅, 等. 用普通琼脂糖代替低熔点胶回收 DNA 片段[J]. *遗传*(GU Qi-hua, LI Ling-zhi, SHU Chang, *et al.* Replacing low melting temperature agarose by general agarose to recollect DNA fragment[J]. *Gene*), 2000, 22(2): 103-105.

[3] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社 (SAMBROOK J. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* [M]. Beijing: Science Press), 1998. 318-320.

[4] PARKER R C, SEED B. Two dimensional agarose gel electrophoresis "Sea Plaque" agarose dimension[J]. *Meth Enzy*, 1980, 65: 358-362.

spring barley[J]. *TAG*, 1993, 85: 976-984.

[4] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 分析在遗传多样性研究和系统学研究中的问题. *植物学报*(WAN Xiao-quan, ZHOU Yu-pin, ZHANG Da-ming, *et al.* Problem in the use of RAPD to study of genetic diversity and systematics [J]. *Acta Botanica Sinica*), 1996, 38(12): 954-962.

[5] 惠东威, 陈受宜. RAPD 技术及其应用[J]. *生物工程进展*(HUI Dong-wei, CHEN Shou-yi. RAPD technology and its application [J]. *Progress in Biotechnology*), 1992, 12(6): 1-5

[6] 刘春林, 官春云, 李. 关于植物随机引物扩增多态性 DNA 分子标记技术的可靠性问题[J]. *植物生理学通讯*(LIU Chun-lin, GUAN Chun-yun, LI Shun. The authenticity of plant RAPD molecular marker technology [J]. *Plant Physiology Communication*), 2000, 36(1): 56-59.

[7] 刘春林, 官春云, 李, 等. 油菜分子标记图谱构建及抗菌核病性状的 QTL 定位[J]. *遗传学报*(LIU Chun-lin, GUAN Chun-yun, LI Shun, *et al.* Construction of linkage map and mapping resistance gene of *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* [J]. *Acta Genetica Sinica*), 2000, 27(10): 918-924.