西伯利亚蝗基因组 DNA 提取及 RAPD 分析条件的优化*

葛风伟[1]　季　荣[1**]　曾献春[1]　王　婷[1]　王小平[2]

(1. 新疆师范大学生命与化学学院　乌鲁木齐　830054; 2. 新疆农业职业技术学院　昌吉州　831100)

Extraction of genomic DNA and optimization of RAPD system for *Gomphocerus sibiricus*. GE Feng-Wei[1], JI Rong[1**], ZENG Xian-Chun[1], WANG Ting[1], WANG Xiao-Ping[2] (1. *College of Life and Chemisty, Xinjiang Normal University*, Urumqi 830054, China; 2. *Institute of Agricultural Professional Technology*, Changji 831100, China)

Abstract By using an improved SDS method, we obtained high qualified genomic DNA of *Gomphocerus sibiricus* (L.). The effects of several parameters (contents of dNTP, Mg^{2+}, Taq DNA polymerase and template DNA) on amplification were examined. The optimal reaction system of RAPD of *G. sibiricus* was determined as followed: 0.24 mmol/L dNTP, 2.0 mmol/L Mg^{2+}, 1.0 U Taq DNA polymerase, 45 ng template DNA and 30 ng primer in total 25 μL reaction volume. Modified thermal profile consisted of an initial denaturation step at 94℃ for 1 min and 45 s, followed by 45 cycles of 94℃ for 30 s, 35℃ 1 min and 30 s and 72℃ for 2 min, and a final exposure to 72℃ for 10 min.

Key words RAPD (random amplified polymorphic DNA), genomic DNA, *Gomphocerus sibiricus*, Balikun area

摘　要　以西伯利亚蝗 *Gomphocerus sibiricus* (L.) 为研究材料, 利用改良的 SDS 法提取高质量的 DNA, 分别测试了 dNTP 浓度、镁离子浓度、Taq DNA 聚合酶用量、模板 DNA 的量等因素对反应结果的影响。通过各因子的组合比较, 建立了西伯利亚蝗 RAPD 优化体系: 25 μL PCR 反应体系, 10× buffer 2.5 μL; dNTP 0.24 mmol/L; $MgCl_2$ 2.0 mmol/L; Taq DNA 聚合酶 1 U; DNA 模板 45 ng; 引物 30 ng。扩增程序为: 94℃预变性 1 min 45 s、94℃变性 30 s、35℃退火 1 min 30 s、72℃延伸 2 min, 45 个循环、72℃延伸 10 min。结果表明, 利用优化的反应条件进行西伯利亚蝗基因组 DNA 分析, 实验有着良好的重复性和稳定性。

关键词　随机扩增多态性 DNA, 基因组 DNA, 西伯利亚蝗, 巴里坤地区

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术即随机扩增多态性 DNA, 是 1990 年由 Williams 和 Welsh 同时发展起来的一种 DNA 分子水平上的多态性检测技术, 能揭示个体间的差异和物种间的相关性。目前, RAPD 技术已在昆虫学研究领域中得到广泛应用, 其主要用于亲缘关系[1~4]、遗传多样性以及系统进化[5,17~19]方面的研究。

西伯利亚蝗 *Gomphocerus sibiricus* (L.) 是新疆草原的主要危害种[6], 其广泛分布于北疆沿天山一带。已有报道对西伯利亚蝗的生物学特性方面的研究[7,8], 但其遗传多样性方面还未见报道。运用 RAPD 技术对西伯利亚蝗进行遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系。为此, 本实验就西伯利亚蝗 RAPD 反应中的 dNTP 浓度, 镁离子浓度, Taq DNA 聚合酶用量, 模板 DNA 的量等因素对实验结果的影响进行了摸索, 建立了重复性好, 稳定的西伯利亚蝗 RAPD 反应体系, 为进一步探讨西伯利亚蝗的遗传多样性以及种间亲缘关系奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料来源

供试的西伯利亚蝗样品采自新疆哈密地区的巴里坤草原 (91°19′30″～94°48′30″E, 43°21′～

*国家自然科学基金项目 (30460028); 新疆维吾尔自治区高校科研资助项目 (XJEDU2005I23, XJEDU2004S20)。

**通讯作者, E-mail: jirongxj@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-03, 修回日期: 2006-12-22, 接受日期: 2007-02-09

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

45°5′19″N)。将野外采集的蝗虫个体饥饿 24 h 以上,使其消化道内物质排空,双蒸水冲洗干净后浸入无水乙醇中浸泡 14 h,置换无水乙醇,4 ℃冰箱保存。

1.2 试剂与仪器

所用的蛋白酶 K,RNase A,100 bp DNA Ladder,RAPD-PCR 扩增试剂盒和 RAPD 随机引物购自上海生物工程有限公司,其它药品与试剂为国产 AR 级。

所用 PCR 扩增仪为 Master Cycler Gradient 型梯度 PCR 仪,离心机为 Biofuge fresco 型台式高速冷冻离心机,凝胶成像仪型号为 GelDoc2000 型。

1.3 基因组 DNA 提取和检测

采用 SDS 法,参照文献[9~11]并做部分改进。

三蒸水浸泡标本 48 h 以上,取蝗虫后足股节剪碎装于 2 mL 的 EP 管中,加入 0.8 mL,−20 ℃预冷的 TE(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mol/L EDTA, pH 8.0),研磨成匀浆状,加入 0.1 mL 的 5%的 SDS 和 0.1 mL 的 2 mg/mL 的蛋白酶 K,37 ℃水浴消化过夜;加入 RNA 酶继续消化 1 h,再分别用等体积的酚,氯仿:异戊醇(24:1)抽提,8 000 r/min,10 min 离心分层,加入 2 倍体积的无水乙醇,−20 ℃沉淀 30 min,12 000 r/min,离心 10 min,70%的冷乙醇洗涤,自然风干,用 TE 缓冲液溶解(−20 ℃保存备用)。

用紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度。选取质量好的 DNA,将其稀释至 15 ng/μL。

1.4 RAPD 反应条件的优化

参照张迎春[12~14]等的反应条件,采用 25 μL 的反应体系,对影响反应体系的各因素设置不同的梯度水平:模板 DNA 的量分别设置为 15,30,37.5,45,60 ng;Mg^{2+} 浓度为 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 mmol/L;Taq DNA 酶的浓度为 0.5,1,1.5,2.0 U;dNTP 的浓度为 0.08,0.12,0.16,0.2,0.24,0.32 mmol/L;当进行某一因素水平实验时,仅相应调整灭菌双蒸水的量以保证总反应体系为 25 μL,其它条件与所参照反应体系保持一致。分析各因素对 RAPD-PCR 结果的影响,从而筛选出最适的反应体系。在此基础上,对反应程序中的退火温度进行优化,确定最适的循环条件。本实验以西伯利亚蝗基因组 DNA 为模板,以 S3 为引物(序列 5′-CTACTGCGCT-3′),进行反应条件的优化。

1.5 RAPD 扩增产物鉴定

PCR 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶(0.5×TBE,含 0.5 mg/L 溴化乙锭)上进行电泳分析,电压 80 V。电泳结束后,在凝胶成像系统中观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

用改良 SDS 法提取的 DNA 带型整齐,在 DNA Ladder 在处有一亮带(如图 1),说明提取的 DNA 分子量在 30 kb 以上。紫外分光光度计检测结果表明,DNA 样品 OD260/280 值普遍在 1.6~1.9 之间,说明该法提取的 DNA 可以满足实验需要。

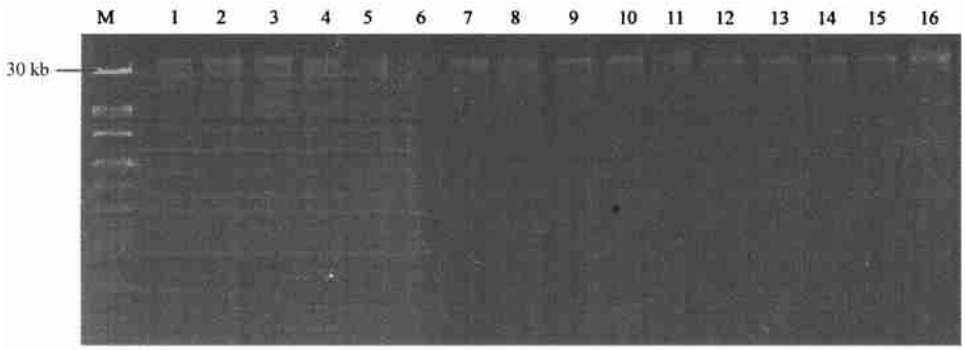

图 1 SDS 法提取西伯利亚蝗的总 DNA

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

2.2　反应条件的优化

2.2.1　dNTP 浓度对扩增效果的影响：本实验对 0.08～0.32 mmol/L 的 dNTP 浓度进行了筛选。结果表明，该浓度范围内均有谱带产生。dNTP 浓度较低时扩增出谱带不全且弱，随着 dNTP 浓度的增加，扩增出谱带的亮度也有所增加，但 dNTP 浓度较高时会出现非特性扩增的谱带。dNTP 浓度为 0.24 mmol/L 时扩增结果较清晰完整，为西伯利亚蝗适宜的 dNTP 浓度(图2)。

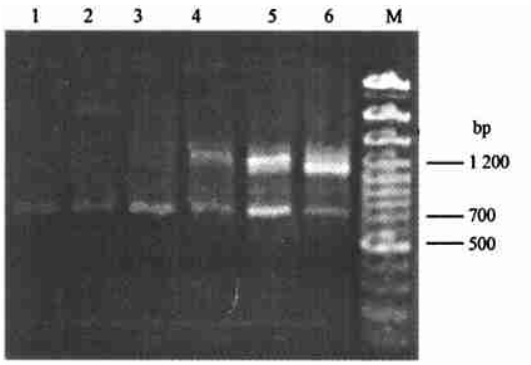

图 2　dNTP 对扩增效果的影响

2.2.2　Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增效果的影响：Mg^{2+} 是 RAPD 反应中的一个重要因素，其浓度影响酶的活性及合成的可靠性。本实验对 1.0～3.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度进行了筛选。图 3 表明，在该浓度范围内均能产生谱带，但低浓度的 Mg^{2+} (＜2.0 mmol/L)所产生的带型不稳定，高浓度的 Mg^{2+} (＞2.5 mmol/L)缺失主带。Mg^{2+} 浓度达 2.0 mmol/L 时可以获得较好的扩增效果。

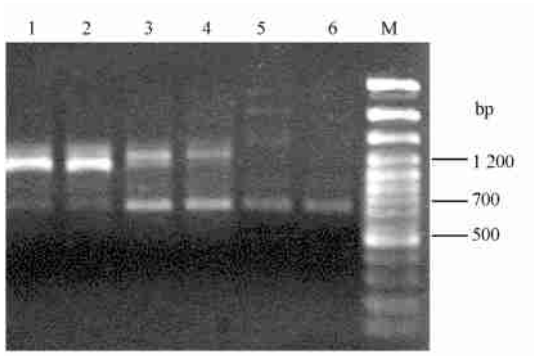

图 3　Mg^{2+} 对 RAPD 扩增效果的影响

2.2.3　Taq DNA 聚合酶用量对 RAPD 扩增效果的影响：实验共设置 4 个 Taq DNA 聚合酶浓度梯度。图 4 显示，Taq DNA 聚合酶单位的变化对 RAPD 谱带的数量和强弱影响较大。当 Taq DNA 聚合酶为 0.5 U 时，扩增谱带少且不稳定；当 Taq DNA 聚合酶用量增加、至 1.5 U 和 2 U 时，谱带数目有所增加且清晰。多次重复实验均发现，25 μL 体系中 1.0 U Taq DNA 聚合酶用量扩增效果较好。

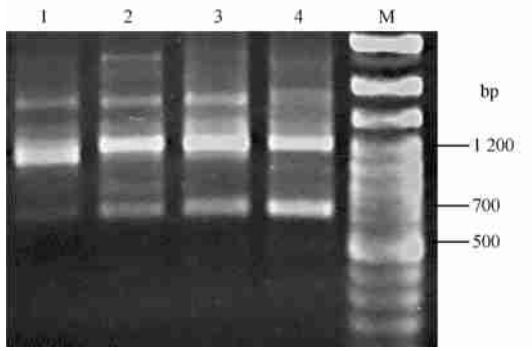

图 4　Taq DNA 聚合酶对 RAPD 扩增效果的影响

2.2.4　模板 DNA 的量对 RAPD 扩增效果的影响：模板的量对 RAPD 扩增结果影响较小(图 5)。这与汪小全等曾提出模板的量对 RAPD 谱带影响不大的结论相似。本实验在模板的量为 15，30，37.5，45，60 ng 的条件下分别进行 RAPD-PCR 扩增分析。结果表明模板的量在该范围内除了谱带的强弱有些变化外并无明显差异，故采用 45 ng 的 DNA 模板的量。

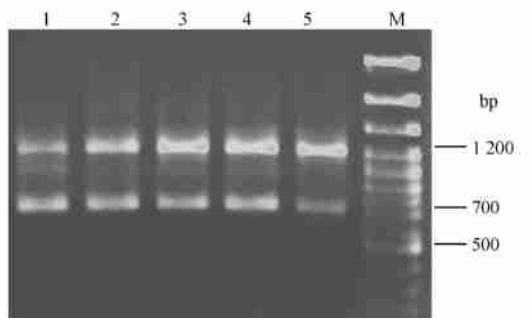

图 5　模板 DNA 对 RAPD 扩增效果的影响

2.2.5　引物退火温度对扩增效果的影响：应用 PCR 仪的温度梯度功能对 31～37.2 ℃之间的退

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

火温度进行多次筛选，相应的退火温度值分别为 31，31.1，31.4，31.9，32.5，33.3，34.1，35，35.7，36.4，36.9，37.2 ℃。结果表明，退火温度在 31 ~37.2 ℃范围内均能扩增出清晰的谱带。由图 6 可看出，在 31 ~37.2 ℃范围内随温度升高，RAPD 谱带越清晰，且主带的强度有所增加；但随温度的升高也会有一些非特异性扩增产物的出现。当退火温度为 35 ℃时能获得较好的扩增效果。

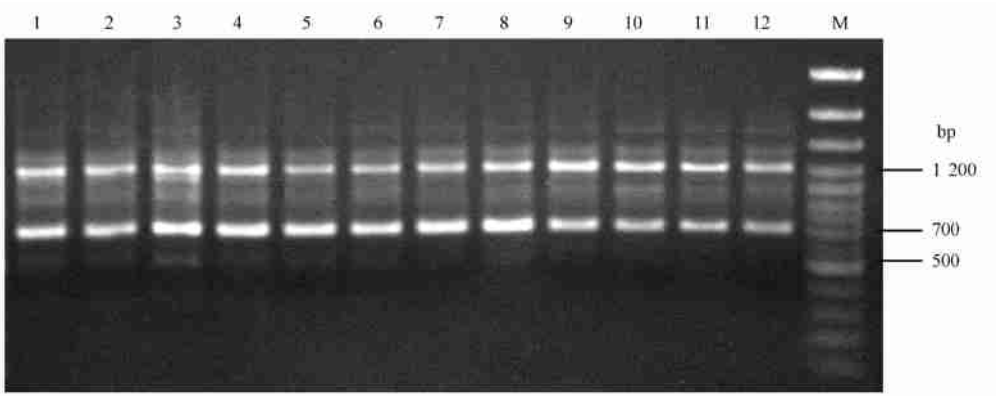

图 6 引物退火温度对扩增效果的影响

3 结论与讨论

本研究得出西伯利亚蝗的 RADP 分析适宜的扩增条件为：25 μL PCR 反应体系中含有 10 × buffer 2.5 μL，dNTP 0.24 mmol/L，$MgCl_2$ 2.0 mmol/L，Taq DNA 聚合酶 1 U，DNA 模板 45 ng，primer 30 ng。适宜的扩增程序为：94 ℃预变性 1 min 45 s；94 ℃变性 30 s；35 ℃退火 1 min 30 s；72 ℃延伸 2 min，45 个循环；72 ℃延伸 10 min。这一反应体系和扩增程序有着较好的扩增效果和重复性。

除本实验优化的实验条件外，还有很多因素均会对 RAPD 结果产生影响，如不同厂家、甚至同一厂家不同批次的 Taq 酶、不同型号的 PCR 仪和操作人员的素质都会影响 RAPD 结果的可重复性[15]。尽管要求不同实验室间的 RAPD 实验结果具有较高的可比性尚存在一定的困难。但当保证实验条件相对稳定，同一操作人员重复同一实验时，RAPD 实验结果稳定并且可靠[16]，我们经过多次反复实验也得出相同结论。

参 考 文 献

1 谭竹钧，韩雅丽，苏和风，郑哲民. 内蒙古大学学报，1998，**29**(6)：801 ~ 805.
2 韩雅丽. 汕头大学学报，2001，**16**(1)：39 ~ 43.
3 蒋国芳，陆敢. 昆虫分类学报，2003，**25**(2)：85 ~ 90.
4 张建珍，马恩波，郭亚平，陈东华，王燕. 动物分类学报，2004，**29**(2)：212 ~ 217.
5 郑哲民，汪桂玲，黄原. 动物学报，2001，**47**(4)：367 ~ 370.
6 黄春梅. 昆虫分类学报，1995，**17**，(增刊)：128 ~ 133.
7 乔璋，乌麻尔别克·纳斯尔吾拉，杜刚，伊生春，阿德力·哈甫孜. 新疆农业科学，1995，(4)：176 ~ 177.
8 新疆为维吾尔自治区巴里坤哈萨克自治县治蝗站，中国科学院北京动物研究所. 昆虫学报，1977，**20**(3)：259 ~ 268.
9 Marchant A D. *Heredity*，1988，**60**：39 ~ 46.
10 田英芳，黄刚，郑哲民，魏朝明. 陕西师范大学学报(自然科学版)，1999，**27**(4)：82 ~ 84.
11 顾红雅，瞿礼嘉. Clark M. S. 植物分子生物学实验手册. 北京：高等教育出版社，施普林格出版社，1998. 7 ~ 9.
12 张迎春，刘波，郑哲民，李力. 昆虫学报，2002，**45**(5)：693 ~ 695.
13 张建珍，郭亚平，马恩波. 动物学杂志，2004，**39**(2)：53 ~ 57.
14 王银东，熊邦喜. 昆虫知识，2006，**43**(3)：353 ~ 358.
15 张民照，康乐. 动物学研究，2001，**22**(1)：20 ~ 26.
16 王洪，岳秉飞，刘双环. 中国实验动物学报，2003，**11**(3)：1 841 ~ 1 886.
17 张迎春，付景. 昆虫知识，2006，**43**(2)：169 ~ 176.
18 王泽东，刘映红，李小珍，刘明圣，裴明玉. 昆虫知识，2006，**43**(5)：603 ~ 607.
19 张大治，郑哲民. 昆虫知识，2005，**42**(2)：123 ~ 127.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n