

四甲基氯化铵在杨树 RAPD 扩增反应中的作用

尹佟明, 李淑娴, 郑阿宝, 王明麻

(南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要: 根据 20 个不同 RAPD 随机引物对杨树 DNA 的扩增结果, 对四甲基氯化铵(TMACI)在杨树 RAPD 扩增反应中的作用进行了研究, 发现 TMACI 可明显改善杨树的 RAPD 扩增效果, 因此 TMACI 可作为一种有效成分加入杨树 RAPD 反应体系中。同时比较了不同浓度的 TMACI 对杨树 RAPD 扩增反应的影响, 确定最适合杨树 RAPD 扩增反应的 TMACI 浓度为 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 。利用 3 个具亲缘关系的杨树家系对含 TMACI 的 RAPD 反应体系的实验结果进行验证, 证实该体系获得的遗传信息是可靠的。

关键词: 四甲基氯化铵; RAPD; 扩增反应特异性; 杨树

中图分类号: S792.11; Q946.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)02-0011-03

The effect of tetramethyl ammonium chloride on RAPD amplification in poplar YIN Tong-ming, LI Shu-xian, ZHENG A-bao, WANG Ming-xiu (Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(2): 11-13

Abstract: According to the amplification result in poplar by 20 10-mer arbitrary primers, the effect of tetramethyl ammonium chloride (TMACI) on RAPD amplification in poplar was studied. It revealed that the effect of TMACI on RAPD amplification is significant and which can improve the result of RAPD amplification. TMACI can be used as an effective composition for assembling the RAPD reaction. The effect of different concentration of TMACI on RAPD amplification was also studied and the suitable concentration (10-50 $\mu\text{mol/L}$) of TMACI used in the RAPD reaction for poplar was determined. In order to test the new reaction system, three pedigrees with clear relationship were adopted, and the result showed that the new system is reliable for genetic study.

Key words: TMACI; RAPD; speciality of amplified action; poplar

由于林木分子生物学研究起步较晚, 缺乏基因组序列的相关信息^[1], 而 RAPD^[2] 技术不需要预知 DNA 序列的信息, 而是利用随机引物进行扩增, 而且与其他的分子标记技术相比, RAPD 实验过程更为简单、快速、成本低, 因此该技术是目前林木遗传研究中使用最为广泛的一种标记技术^[1]。但 RAPD 反应过程中, 由于引物的 T_m 值较低, 反应产物的特异性较差, 影响了实验的稳定性和可重复性。如何提高 RAPD 反应的特异性, 从而提高 RAPD 标记的可重复性是成功利用这一技术的关键。对影响 RAPD 扩增反应特异性环境因子的研究已有许多报道^[3,4]。在合适的扩增条件下, 如何获得更理想的实验结果? 有没有有效的成分可提高扩增反应的特异性? 这些方面还需进一步研究。最近的报道指出四甲基氯化铵(TMACI)对 PCR 扩增反应的特异性有影响, 在一些基因的 PCR 扩增过程中, TMACI 是影响扩增反应的关键因子^[5]。由于 RAPD 分析也涉及

PCR 扩增过程, TMACI 是否对 RAPD 扩增反应的结果也有一定的作用, 本文以杨树 DNA 为实验材料对这一问题进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

DNA 样品来源于杨树, 在南京林业大学杨树育种圃选取三个不同杂交组合的家系, 包括美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marsh.) \times 欧美杨 [*P. euroamericana* (Dode) Guinier] 的两个杂交组合 (69 \times 45, 63 \times 214) 及银白杨 (*P. alba* L.) \times 响叶杨 (*P.*

收稿日期: 2000-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770628); Supported by the International Foundation for Science of Sweden to Dr Yin (No. D/2997-1)

作者简介: 尹佟明 (1970-), 男, 山东临朐人, 博士, 讲师, 主要从事分子生物学方面研究。

adenopoda Maxim.)。每个家系取4个子代。每株个体取休眠芽3~4个,剥去鳞片,将幼嫩组织在酒精中漂洗,去除芽体内的粘液,然后将芽体用卷纸吸干,用于DNA提取。

实验所用随机引物为 Operon 公司产品,dNTPs 购自 Promega 公司,Taq 酶为 PE 公司产品,实验使用的 PCR 仪为 PE-9600。

1.2 DNA 提取

DNA 的提取方法按 Couch 等的微量提取法并加改进^[6],将处理过的芽体3~4个放入小研钵中,加入500 μL 提取液[1% CTAB, 5% PVP, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 350 mmol/L β -mercaptoethanol],并加入少量石英砂,充分研磨,将研磨液转入1.5 mL 的 Empdorf 管中,加入等体积的酚和氯仿,混匀,10 000 g 离心 5 min,将水相转移至新的1.5 mL Empdorf 管中,加等体积氯仿,混匀,10 000 g 离心 5 min,将水相转移至新的1.5 mL Empdorf 管中,加入1/3 体积异丙醇,轻轻混匀,沉淀DNA,然后于12 000 g 离心 10 min,移去水相,用70%的乙醇洗涤沉淀,自然干燥,最后将沉淀重溶于50 μL TE 缓冲液中,利用凝胶比色法确定样品DNA的浓度。

1.3 RAPD 扩增

RAPD 扩增反应参照尹佟明等^[4]的优化反应条件,反应体系(20 μL)组成如下:5 ng 左右模板DNA,10 pmol 引物,dATP、dTTP、dCTP、dGTP 的量各为100 $\mu\text{mol/L}$,2 μL 10 \times Buffer [100 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl (pH 8.3), 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl_2 , 0.01% 明胶,5.0 g/L BSA], 1 U Taq 酶。扩增条件为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,接着进行94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 s,40 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1.5 min,反应38个循环,最后72 $^\circ\text{C}$ 链延伸 7 min,扩增产物用1.0% 琼脂糖凝胶检测分析。

1.4 四甲基氯化铵对杨树 RAPD 扩增反应的影响

根据资料,配制了不同浓度(10 \times)的四甲基氯化铵(0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$),利用美洲黑杨无性系 I-69 杨 DNA 及 20 个 10 碱基的随机引物(OPAA01~OPAA20)设计浓度梯度对比实验,研究四甲基氯化铵在 RAPD 扩增反应中的作用及合适的反应浓度。

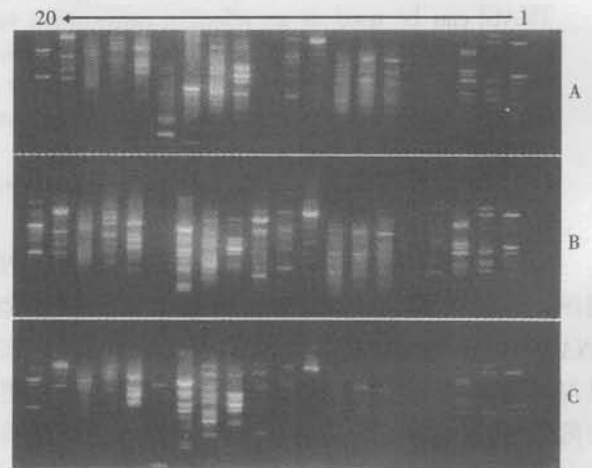
为检验含 TMACI 的反应体系,实验中采用了 3 个亲缘关系清楚的家系苗提取 DNA 并进行 RAPD 扩增,根据扩增结果进行聚类分析,对含 TMACI 反

应体系所获得的实验结果的可靠性进行验证。

2 结果与讨论

2.1 TMACI 在 RAPD 扩增反应中的作用

不加 TMACI 的对照及反应终浓度(10 \times)分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMACI 的对比实验的扩增结果见图 1。由图 1 可以看出,在 RAPD 扩增反应体系中加入 TMACI 可明显改善 RAPD 反应的扩增效果,两个不同浓度的 TMACI 均比对照的扩增效果好。终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ TMACI 的实验结果比终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMACI 的实验结果好。为确定最佳 TMACI 反应浓度,实验设计了每增加 20 $\mu\text{mol/L}$ TMACI 的梯度对照,结果发现,当 TMACI 浓度在 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增结果基本一致。当 TMACI 浓度在 70 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,扩增效果开始下降,当 TMACI 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增的整体效果已有较明显下降。因此适合杨树 RAPD 扩增反应的 TMACI 终浓度应在 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 之间。



TMACI 的终浓度: A 为 100 $\mu\text{mol/L}$, B 为 10 $\mu\text{mol/L}$, C 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 。图中泳道 1~20 分别对应引物 OPAA01~OPAA20。DNA 样品来自美洲黑杨无性系 I-69。

Terminal concentrations of TMACI are: A: 100 $\mu\text{mol/L}$, B: 10 $\mu\text{mol/L}$, C: 0 $\mu\text{mol/L}$. lanes 1~20 are corresponded to Operon RAPD primers OPAA01~OPAA20. DNA samples are extracted from *Populus deltoides* clone I-69.

图 1 不同浓度的 TMACI 对杨树 RAPD 扩增反应的影响
Fig. 1 The effect of different concentrations of TMACI on RAPD amplification in poplar

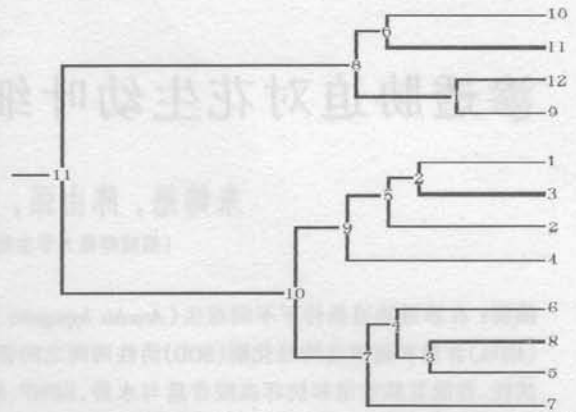
上述结果是根据 20 个引物的整体扩增效果得出的,因此有一定的代表性。总体上看,TMACI 可以改善杨树的 RAPD 扩增效果,但并不是每一个引物的最佳反应条件。在 RAPD 实验过程中,不可能针

对每一个引物确定一个最佳反应条件,对同一批实验材料,需要确定一个对大多数引物适用的通用反应条件,这一条件的确定,需要尽量减小不同引物间碱基组成差异对实验条件要求的不同。TMACI 在相同扩增条件下,可使大多数引物获得良好的扩增效果,可能是因为 TMACI 对减小不同引物的复性动力学的差异有一定的作用。Wood^[7] 等人在利用具有简并性的寡核苷酸作杂交探针筛选基因库时,曾用到 TMACI,以消除 A=T 与 G=C 之间配对强度的差异,使杂交探针与同源序列之间的复性反应动力学仅取决于探针的长度而不受碱基组成的影响^[8]。由于 RAPD 实验过程中所用引物的碱基长度一致,如果能减小碱基组成差异对实验条件要求的不同,就可以在相同的扩增条件下获得不同引物的最佳反应效果,从而使反应条件有更好的通用性。Chevet 等报道在 PCR 反应液中添加 TMACI 可有效提高 PCR 的产量^[8]。本研究也发现 TMACI 增强了某些引物的 RAPD 扩增谱带的强度,特别是那些扩增谱带较弱的引物。因此 TMACI 可作为一种有效的成分加进 RAPD 扩增反应体系中。

本实验的结论是以杨树 DNA 为实验材料获得的,不同的实验材料要求的 TMACI 的适宜浓度可能有差别。另外,合适的反应条件对 RAPD 扩增是最重要的,如果反应条件不合适,在反应体系中加入 TMACI 也不会起作用。这需要针对不同的实验材料进行相应调整。

2.2 含 TMACI 反应体系用于遗传研究的可靠性验证

用三个亲缘关系已知的杨树家系苗进行 RAPD 分析,验证 RAPD 反应体系中加入 TMACI 是否会影响获得的遗传信息的可靠性。实验共使用了筛选出的 12 个引物,获得了 86 个多态性位点,利用 POPGENE32 软件根据 UPGMA 法聚类,结果见图 2。聚类分析的结果与这些杨树家系的亲缘关系有一致性。三个不同家系的子代分别聚在了一起,同时两个美洲黑杨×欧美杨家系聚类距离较近,而银白杨×响叶杨家系则与两个美洲黑杨×欧美杨家系聚类距离较远。因此可证实实验所获得的遗传信息是可靠的。



1,2,3,4 为美洲黑杨×欧美杨(I-69×I-45)家系;5,6,7,8 为美洲黑杨×欧美杨(I-63×I-214)家系;9,10,11,12 为银白杨×响叶杨家系
1,2,3,4 are from the pedigree of *Populus deltoides* × *P. euroamericana* (I-69 × I-45); 5,6,7,8 are from the pedigree of *P. deltoides* × *P. euroamericana* (I-63 × I-214); 9,10,11,12 are from the pedigree of *P. alba* × *P. adenopoda*

图 2 不同亲缘关系杨树材料的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of poplar samples with different relationships

参考文献:

- [1] Grattapaglia D, O'mally D, Sedroff R. Mapping in woody plants with RAPD markers; Application to breeding in forestry and horticulture [A]. In: Sedroff R, Neal D (eds). Proceedings of the Symposium on Applications of RAPD Technology to Plant Breeding [C]. North Carolina State University: CSSA/ASHS/AGA, 1992. 37-40.
- [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]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [3] Lowe A J, Damiani G, Bandi C, et al. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections; the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. Plant Genetic Resources Newsletter, 1996, 107: 50-54.
- [4] 尹佟明,韩正敏,黄敏仁,等. 林木 RAPD 分析及实验条件的优化[J]. 南京林业大学学报,1999,23(4):7-12.
- [5] 廖玉才,李和平. 四甲基氯化铵在 PCR 扩增小麦基因中的关键作用[J]. 遗传,1997,19(2):1-4.
- [6] Couch J A, Hallgren S W, Martin B, et al. Isolation of DNA from plant high in polyphenolic [J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8: 8-12.
- [7] Wood W I, Gitschier J, Weeden N F, et al. Base-composition-independent hybridization in tetramethyl-ammonium chloride: method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 1585-1588.
- [8] Chevet E, Lemaitre G, Katinka D. Low concentrations of tetra-methyl ammonium chloride increase yield and specificity of PCR [J]. Nucl Acids Res, 1995, 16: 3343-3344.

(责任编辑:惠红)