

文章编号: 1674-7054(2014)04-0374-07

女贞 RAPD-PCR 实验条件的优化

赵 峰¹, 刘国民², 李娟玲², 张其文², 符 伟², 张恩华²

(1. 海南广播电视大学 海南 海口 570208; 2. 海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228)

摘 要: 采用单因素梯度试验对影响女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) RAPD 扩增的若干重要影响因素(包括 $MgCl_2$ 、dNTPs、随机引物、*Taq* DNA 聚合酶浓度、模板 DNA 用量, 以及退火温度与循环次数等)进行了优化。优化后的女贞 RAPD-PCR 反应体系为: 每 25 μL 体积中含 $10 \times$ 反应 buffer 2.5 μL , 2.5 mmol $\cdot L^{-1}$ $MgCl_2$ 3.0 μL , 0.2 mmol $\cdot L^{-1}$ dNTPs 0.5 μL , 2.0 U *Taq* 酶 0.4 μL , 0.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 引物 1.0 μL , DNA 模板 60 ng。PCR 扩增程序: 在 94 $^{\circ}C$ 条件下预变性 4 min, 然后依次在 94 $^{\circ}C$ 条件下变性 30 s, 38 $^{\circ}C$ 条件下退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 条件下延伸 2 min, 进行 40 个循环, 最后在 72 $^{\circ}C$ 条件下延伸 10 min, 并于 16 $^{\circ}C$ 条件下保存。以该优化的 RAPD 反应体系对木犀科女贞属植物不同居群间的女贞种质材料的扩增, 均能获得丰富而清晰的条带, 且重现性好。

关键词: 女贞; RAPD; 影响因子; 体系优化

中图分类号: S 571.1

文献标志码: A

女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 系木犀科女贞属植物, 是木犀科苦丁茶的主要种类之一, 其嫩芽可代茶, 果实、种子、树皮、叶和根等部位均可入药^[1-2], 尤其是其果实(即女贞子)中含有多种五环三萜类、皂苷、多糖、油酸及微量元素等多种化学成分^[3], 在临床上主要治疗眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、慢性支气管炎、冠心病、高脂血症、高血糖、肝炎等多种疾病^[4-5]。目前, 有关女贞的研究主要集中在化学成份和药用功效等方面^[3-5], 未见有利用 RAPD 分子标记手段, 研究女贞种质资源遗传多样性的相关报道。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA) 分析技术因其具有快速简便和实验成本低廉等优点, 现已被广泛应用于种质资源的遗传多样性检测、种间关系的确定、物种鉴定、遗传图谱的构建以及种苗质量鉴定等领域。但 RAPD 分析结果的可重复性, 一直是人们关注的焦点^[6-8]。因此, 笔者采用单因子试验系统地研究了女贞 RAPD 反应中的各种重要影响因子, 建立了一套适用于对木犀科女贞属苦丁茶大批量种质材料进行 RAPD 分析的优化的反应体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料 实验材料取自海南大学苦丁茶研究所苦丁茶种质资源圃中定植的第 30 号种质材料, 取 0.6 g 嫩芽提取其基因组 DNA 作为实验的模板 DNA。

1.2 女贞基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[9]提取女贞基因组 DNA, 用紫外分光光度计测定其 OD 值, 并采用 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性; 将 DNA 样品稀释成 20 ng $\cdot \mu L^{-1}$, 用于 RAPD 反应体系的优化实验。

1.3 RAPD-PCR 扩增反应及优化实验设计 RAPD-PCR 基本反应体系的组成为: $10 \times$ 反应 buffer 2.5 μL , 0.2 mmol $\cdot L^{-1}$ dNTPs 0.4 μL , 2.5 mmol $\cdot L^{-1}$ $MgCl_2$ 3.0 μL , *Taq* 酶 2.0 U, DNA 模板 60 ng, 0.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 引物 1.0 μL , 用无菌超纯水补足至 25 μL 。在优化实验前进行预备实验, 以初步筛选出具有较好扩增

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860048); 海南省教育厅基金资助项目(Hjkj2012-51)

作者简介: 赵 峰(1981-), 女, 硕士, 讲师。Email: 928662418@qq.com

通信作者: 李娟玲(1972-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 植物种质资源学。Email: lj10728@126.com

结果的引物,使之在优化实验时能获得理想的实验结果。RAPD-PCR 反应体系的优化实验按单因子梯度设置进行(见表 1)。在保持其他因子完全不变的条件下,改变单一因子,以确定每种单因子比较适宜的浓度。

预备实验:本研究试验了 3 个引物,每个引物均设计了 3 个退火温度梯度,即 37、38、39℃;基本扩增程序:在 94℃条件下预变性 4 min 后再分别变性 30 s;37、38、39℃条件下退火 45 s;然后在 72℃条件下延伸 120 s;进行 40 次循环;再于 72℃条件下延伸 10 min。扩增产物于 16℃条件下保存。在通过单因子试验获得优化的反应体系后,采用该体系,以基本扩增程序进行了循环次数分别为 25、30、35、40、45、50 和 55 次的一系列 RAPD-PCR 扩增实验,确定最佳的循环次数。根据引物理论退火温度原理^[10],共设计了 8 个退火温度梯度,即 35、36、37、38、39、40、41、42℃,所购引物进行退火温度筛选,筛选出其扩增条带丰富、带型清晰而稳定的引物,并确定其适宜的退火温度。

取扩增产物 8.0 μL 和 2.0 μL 上样缓冲液(含 $w=40\%$ 蔗糖及 $w=0.25\%$ 溴酚蓝)均匀混合,点样于 $w=1.5\%$ 的琼脂糖凝胶(含 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 EB)的上样孔中,以 100 bp plus DNA ladder 作为对照相对分子质量标准,在 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液中电泳 1.5~2.0 h(电压 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$)。然后在 Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统下照相并记录,检验、分析优化结果。

表 1 RAPD-PCR 体系优化的因素与水平
Tab. 1 The factors and levels used in the optimization of ISSR-PCR reaction system

水平 Levels	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol·L ⁻¹) Concentration of Mg ²⁺	dNTPs 浓度/ (mmol·L ⁻¹) Concentration of dNTPs	Taq 酶用量/U Dosage of Taq polymerase	模板用量/ng Dosage of Template DNA	引物用量/ (μmol·L ⁻¹) Dosage of primer
1	0	0	0	0	0
2	1.5	0.10	0.5	10	0.4
3	2.0	0.15	1.0	20	0.6
4	2.5	0.20	1.5	40	0.8
5	3.0	0.30	2.0	80	1.0
6	3.5	0.40	2.5	160	1.2
7	4.0	0.50	3.0	240	1.4
8	4.5	0.60	3.5	320	1.6

2 结果与分析

2.1 预备实验结果 从图 1 可以看出,引物 S22 在 3 个温度梯度中扩增出的条带均有拖尾现象,背景模糊(1~3 泳道);引物 S28 在 3 个温度梯度中均能扩增出清晰的条带(4~6 泳道);引物 S30 在 3 个温度梯度范围内,扩增出的条带模糊,背景不清晰(7~9 泳道)。根据预实验的结果,本实验选用 S28 作为优化其他因子的引物。

2.2 模板 DNA 用量对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 从图 2 可以看出,在不加 DNA 模板的条件下,没有扩增出条带(1 泳道);当模板 DNA 用量在 10~320 ng 范围时,所扩增出的条带丰富而清晰,带型一致且稳定(2~8 泳道)。这表明,女贞的模板 DNA 用量对 RAPD-PCR 扩增结果之影响不明显,其适宜的范围较宽。本实验结果支持汪小全等人的观点,即模板 DNA 的量对 RAPD 的条带影响不大,但对扩增产物的量有不同程度的影响^[11]。根据上述实验结果,本研究中对其他因子进行优化时,采用的模板 DNA 用量确定为 60 ng。

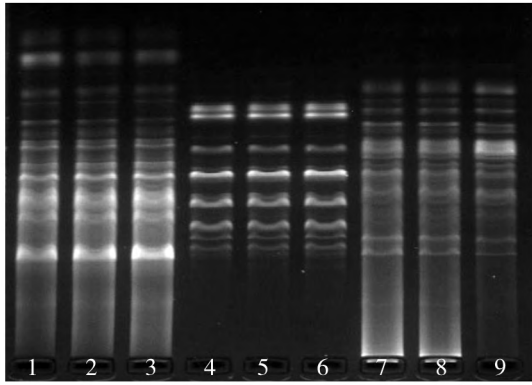


图1 预备实验

泳道 1~3 的引物为 S22; 泳道 4~6 的引物为 S28; 泳道 7~9 的引物为 S30。3 个引物的退火温度依次为 37, 38, 39 °C

Fig. 1 Preparative experiment of annealing temperature
Lanes 1 to 3: Primer S22; Lanes 4 to 6: S28; Lanes 7 to 9: S30. The annealing temperatures of 3 primers were 37, 38, 39 °C, successively

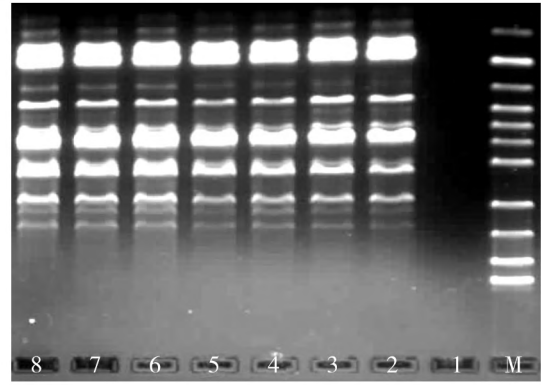


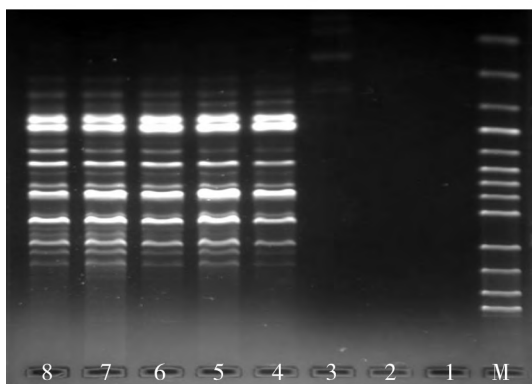
图2 模板 DNA 用量试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1~8 号泳道的浓度分别为 0, 10, 20, 40, 80, 160, 240 和 320 ng

Fig. 2 Testing of dosage of Template DNA

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 8: the treatments at template concentrations of 0, 10, 20, 40, 80, 160, 240, 320 ng, respectively

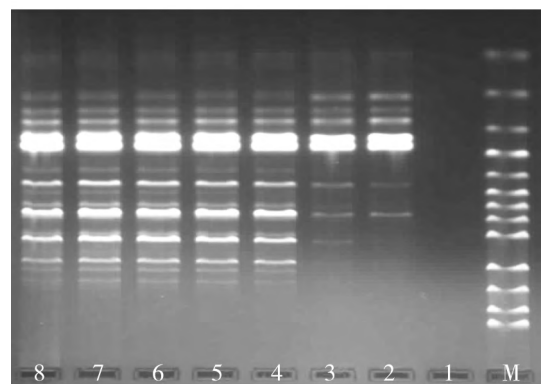
2.3 Mg^{2+} 浓度对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 Mg^{2+} 浓度是影响 RAPD-PCR 结果的重要变量之一, 它可以通过影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性而影响到 RAPD-PCR 扩增结果^[12]。因此, 选择适宜的 Mg^{2+} 浓度是决定 RAPD-PCR 反应成败的关键因素之一。 Mg^{2+} 浓度的变化对 RAPD-PCR 扩增条带的数量和强弱均有较大影响。从图 3 可知, 在不加 Mg^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下, 均不能扩增出条带(1~2 泳道), 表明, 没有 Mg^{2+} 或 Mg^{2+} 浓度太低时, 均不能有效地激活 *Taq* 酶活性。这可能是由于在该条件下, 模板、引物及 dNTPs 竞争与 Mg^{2+} 结合, 导致用于激活 *Taq* 酶的自由 Mg^{2+} 不足, 造成酶活力显著下降, 进而导致扩增反应失败的缘故。当 Mg^{2+} 浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 只能扩增出 3 条弱带(3 泳道)。随着 Mg^{2+} 浓度的进一步提高, 扩增出的条带数量及其亮度均有所增加, 其带型基本一致, 条带丰富, 而且清晰(4~8 泳道)。当 Mg^{2+} 浓度大于 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 泳道的背景加深, 并呈现有拖尾现象(5~8 泳道)。由此可见, Mg^{2+} 浓度过高会使反应出现非特异性扩增, 故在本研究的 RAPD-PCR 扩增反应中, Mg^{2+} 浓度确定采用 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图3 Mg^{2+} 浓度试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1~8 号泳道的浓度分别为 0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 和 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 Testing of Mg^{2+} concentration

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 8: the Mg^{2+} concentrations of 0.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

图4 *Taq* 酶浓度试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1~8 号泳道的浓度分别为 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 和 3.5 U

Fig. 4 Testing of *Taq* concentration

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 8: *Taq* concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 U, respectively

2.4 *Taq* DNA 聚合酶的用量对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 *Taq* DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 的依赖性酶。因此,选择合适的 *Taq* DNA 聚合酶对 PCR 扩增反应至关重要。本实验设置了 1 个对照和 7 个 *Taq* DNA 聚合酶浓度梯度。从图 4 可知,当 *Taq* DNA 聚合酶用量在 0.5 ~ 1.0 U 内时,虽均有扩增产物生成,但扩增出的条带数明显较少(2 ~ 3 泳道);当 *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.5 ~ 3.0 U 时,所扩增出的条带丰富且清晰,带型基本一致(4 ~ 7 泳道);当聚合酶用量为 3.5 U 时,相对分子质量在 2 000 bp 以下的 2 条带均明显变暗(8 泳道)。为了节约成本,本研究的 RAPD 扩增实验中,DNA 聚合酶的用量确定采用 1.5 U。

2.5 dNTPs 浓度对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 从图 5 可以看出,当 dNTPs 浓度在 100 ~ 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,扩增出的带型一致,条带数较多,而且清晰(2 ~ 6 泳道);当浓度为 500 ~ 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,虽能扩增出条带,但其条带数随着 dNTPs 浓度的增加而减少(7 ~ 8 泳道)。为节约实验成本,本实验在进行 RAPD-PCR 扩增时,采用的 dNTPs 浓度确定为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 引物浓度对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 从图 6 可以看出,没有引物(对照)不能扩增出条带(1 泳道);当引物浓度在 0.4 ~ 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,其扩增结果的差异不显著,带型基本一致,但在该浓度范围内,随着引物浓度的递增,扩增强度随之略有递增,且趋于稳定(2 ~ 5 泳道);当引物浓度为 1.2 ~ 1.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带的亮度虽明显加深,但开始出现轻微的弥散现象,且扩增出的弱小片断之条带有所增加(6 ~ 8 泳道)。考虑到在 RAPD-PCR 反应中,引物用量过少会导致扩增量不足,而用量过多则会导致非特异性扩增,故笔者将引物的适宜浓度确定为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

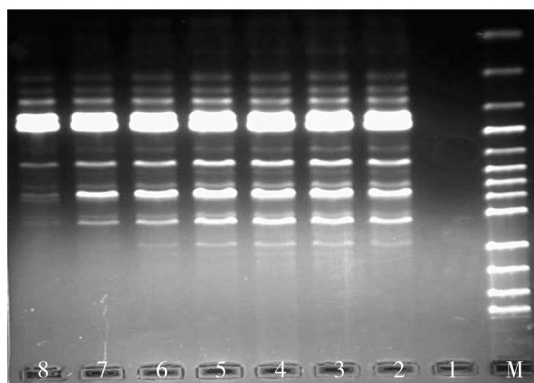


图5 dNTPs 浓度试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1 ~ 7 号泳道的浓度分别为 0, 100, 150, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 5 Testing of dNTPs concentration

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 8: dNTPs concentrations of 0.0, 100, 150, 200, 300, 400, 500 and 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

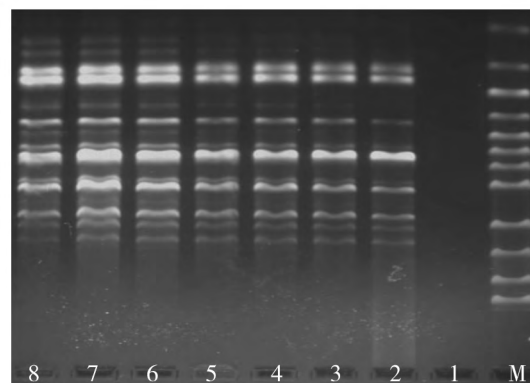


图6 引物浓度试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1 ~ 8 号泳道的浓度分别为 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 6 Testing of primer concentration

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 8: primer concentrations of 0.0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

2.7 反应循环次数对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 从图 7 可以看出,当循环次数为 25 次时,只能检测到少量扩增产物(1 泳道);当循环次数 25 ~ 35 次时,随着循环次数的增加,条带数亦随之增加,亮度亦较明显,但其背景颜色较深(2 ~ 3 泳道);当循环次数为 40 次和 45 次时,其扩增结果一致,均能扩增出丰富的条带,且其条带清晰而稳定(4 ~ 5 泳道);当循环次数达到 50 次和 55 次时,条带之亮度虽更加明显,但其背景颜色过深(6 ~ 7 泳道)。

一般说来,在扩增结果符合要求的前提下,循环次数越少越好。因为过多的循环次数有可能导致一些非特异性产物的干扰,而且发生错误的比例亦会上升^[13]。本实验结果,女贞的 RAPD-PCR 反应体系的循环次数为 40 次较合适。

2.8 退火温度和延伸时间对女贞 RAPD-PCR 扩增的影响 从图 8 可以看出,在 35 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,扩增出的条带有明显拖尾现象,其背景模糊(1 ~ 3 泳道);38 $^{\circ}\text{C}$ 时所扩增出的条带清晰,可重复性好(4 泳道);当温度在 39 ~ 41 $^{\circ}\text{C}$ 范围时,随着温度的升高,有一主条带逐渐缺失(5 ~ 7 泳道);当温度升至 42 $^{\circ}\text{C}$ 时,条带的亮度虽明显,但背景模糊,有弥散拖尾现象,说明存在非特异性扩增。

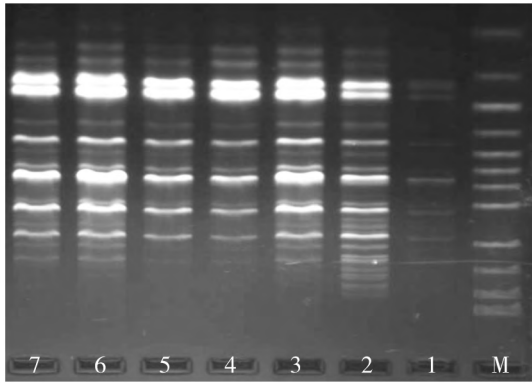


图7 循环次数试验

M 为 100 bp plus DNA ladder; 1~7 号的循环次数分别为 25, 30, 35, 40, 45, 50 和 55

Fig. 7 Testin g of cycles

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lanes 1 to 7: the cycles of amplification: 25, 30, 35, 40, 45, 50 and 55, respectively

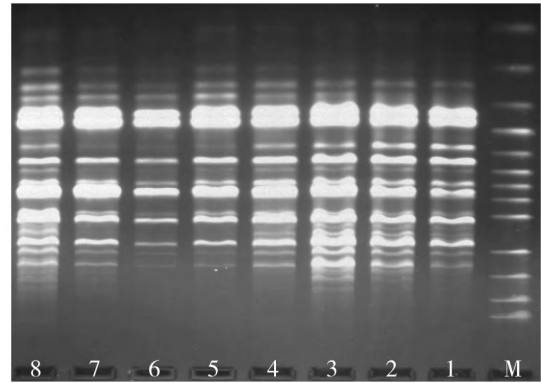


图8 退火温度的影响

泳道 M 为 100 bp plus DNA ladder; 泳道 1~8 分别为程序 P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41 和 P42

Fig. 8 Effect of annealing temperature

Lane M: 100 bp plus DNA ladder; Lane 1 to 8: P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41 and P42, respectively

退火温度是影响扩增特异性的主要因子之一。退火温度过高会引起引物不能与模板牢固结合,导致 DNA 扩增效率下降;温度过低则可能造成引物与模板错配,从而导致非特异性产物增加。Williams 曾指出,在 RAPD-PCR 扩增中,40℃ 以上的复性温度会使 10 个碱基的随机引物之 PCR 反应受到抑制^[14]。因此,笔者选择 38℃ 作为适宜的退火温度。

通常采用的 *Taq* 酶其最适延伸温度一般为 70~75℃,通常采用 72℃ 作为 RAPD 反应的延伸温度。延伸时间主要根据欲扩增片段的长度来确定。本实验中设置了 30, 60, 90, 120 s 等 4 种延伸时间。结果显示,延伸时间为 120 s 时,扩增的条带数最多,且较清晰。这与陈宏等^[15]和 Bielawski 等^[16]所述的扩增产物最大片段的大小和强度随延伸时间的加长而增加的研究结果相一致。Bielawski 等的实验证明,不同的延伸时间(30, 60, 120 s)会导致带谱的差异。在本实验条件下,女贞的 RAPD-PCR 实验最佳延伸时间为 120 s,故以 120 s 作为女贞 RAPD-PCR 扩增优化的延伸时间。

经反复试验,在以上优化的实验条件下多次对女贞种质材料 RAPD-PCR 进行扩增,均能获得理想的扩增结果(图 9)。

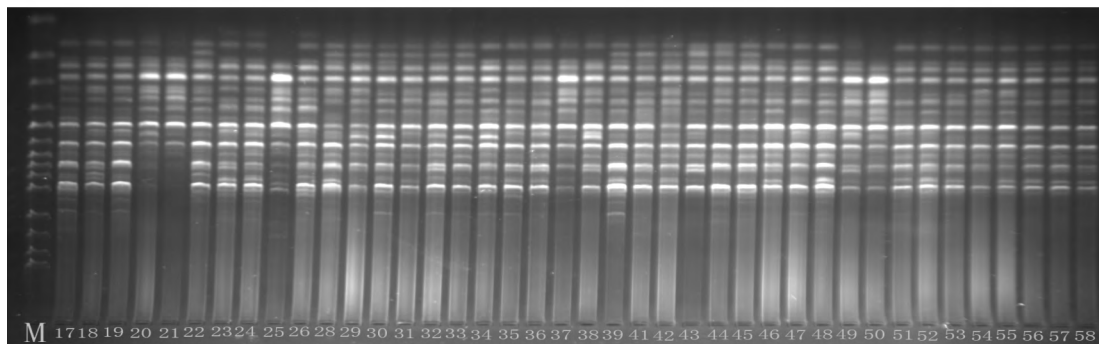


图9 引物 S60 对部分女贞种质材料的扩增结果

Fig. 9 Amplifications of part of *Ligustrum* germplasm materials with primer S60

3 讨论

RAPD 标记已广泛应用于植物种质资源的遗传多样性分析、亲缘关系检测、品种鉴定以及育种材料的早期选择等方面。与其他分子标记方法相比较,RAPD 分子标记方法具有实验检测手段简单、快速、实验

成本低廉等明显优点,但其可重复性不如 AFLP 等分子标记方法,扩增带谱容易受到外界因素的影响,从而直接影响到 RAPD 分析的准确性和可靠性。而 RAPD 带谱的准确性与稳定性是 RAPD 进行遗传多样性分析的前提条件。因此,为了获得准确而稳定的 RAPD 带谱,在对批量样品进行 RAPD 分析前,对 RAPD-PCR 扩增条件进行优化是很有必要的。

目前,有许多学者考虑到各影响因素之间可能存在互作效应而采用正交设计实验,然后采用 SAS 软件对试验结果进行分析,从而找出优化的实验条件。笔者认为,正交设计实验需要对试验结果实行“打分”,这种评价方法本身就带有一定的主观成分,故势必会影响软件分析的实验结果。本实验在设计对照的条件下,运用单因素试验方法,选定其各影响因子比较适宜的浓度,用于下一个因子的优化。这样,既考虑了各因素之间可能存在的互作效应,又可以减少由于“打分”评价带有的主观成分导致的误差,从而使实验结果更加客观。

根据实验结果,可以将女贞 RAPD-PCR 分析优化的实验条件归纳如下:

反应体系组成:每 25 μL 体积中含 $10\times$ 反应 buffer 2.5 μL , 25mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 3.0 μL , 0.2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 0.5 μL , 2.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , 0.4 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ 的引物 1.0 μL , DNA 模板 60 ng。PCR 扩增程序:在 94 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预变性 4 min,然后在 94 $^{\circ}\text{C}$ 条件下变性 30 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 条件下退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下延伸 120 s;进行 40 个循环,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下延伸 10 min;扩增产物于 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

参考文献:

- [1] 刘国民. 中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况[J]. 贵州科学, 2003, 21 (1/2): 69-77.
- [2] 徐小静, 郭志永, 刘越. 苦丁茶植物资源及分子鉴定研究进展[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2012, 21(3): 22-28.
- [3] 黄新苹, 王武朝. 中药女贞子的化学成分研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(1): 47-49.
- [4] 金芝贵, 金剑, 肖忠革, 等. 女贞子的药理作用及其临床应用进展[J]. 药学服务与研究, 2011, 11(3): 189.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 女贞子抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 536.
- [6] 伊华林, 邓秀新. RAPD 为基础的柑橘体细胞杂种有性后代遗传研究[J]. 中国科学, 2007, 37(1): 42-51.
- [7] GRAHAM J, MCNICOL R J, MCNICOL J W. A comparison of methods for estimation of genetic diversity in strawberry cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 402-406.
- [8] 张凤琴, 刘国民, 周鹏, 等. 用 RAPD 技术探讨冬青属苦丁茶的遗传差异、亲缘关系与分类地位[J]. 云南植物研究, 2004, 26(6): 637-644.
- [9] 李娟玲, 刘国民, 贾媛, 等. 一种高效提取鹧鸪茶基因组 DNA 的方法[J]. 农学通报, 2010, 26(8): 69-73.
- [10] 邢建宏, 庞铄权, 刘希华, 等. 药用植物雷公藤 RAPD-PCR 反应体系优化研究[J]. 三明学院学报, 2009, 26(4): 442-445.
- [11] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962.
- [12] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学实验技术[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2013: 458-463.
- [13] 胡凤荣, 王斐, 王志强, 等. 风信子 ISSR-PCR 体系的优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2013, 11(1): 139-144.
- [14] WILLIAMS J G. K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [15] 陈宏, 孙维斌, 雷初朝, 等. RAPD 标记稳定性的影响因素探析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(5): 139-142.
- [16] BIELAWSKI J P, NOACK K, PUMO D E. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA[J]. BioTechniques, 1995, 18: 860-865.

Optimization of the Experimental Conditions for RAPD-PCR of *Ligustrum lucidum* Ait.

ZHAO Feng¹, LIU Guomin², LI Juanling², ZHANG Qiwen², FU Wei², ZHANG Enhua²

(1. Hainan Radio and TV University, Haikou 5700208; 2. The Kudingcha Research Institute of Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Ligustrum lucidum* Ait. was used as the experimental material for RAPD-PCR. Some important factors, such as the concentrations of MgCl_2 , dNTPs, random primers, *Taq* polymerase and template DNA as well as the annealing temperature and the cycles of amplification, were optimized by single factor experiment in order to establish the optimal RAPD-PCR system and procedure. Stable RAPD-PCR reaction parameters for *L. lucidum* Ait. were determined and optimized. 2.5 μL 10 $\times$ PCR buffer; 3.0 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 ; 0.5 μL dNTPs, 0.4 μL *Taq* polymerase, 1.0 μL primers, and 60 ng DNA template were contained in 25 μL reaction solution. The PCR amplification program was to pre-denature at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min, then denature at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30s, anneal at 38 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, extend at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, and conduct 40 cycles with the last extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The amplified products were stored at 16 $^{\circ}\text{C}$. With this optimized RAPD reaction system the DNA of *L. lucidum* Ait. was amplified to produce rich, clear and repeatable bands.

Key words: *Ligustrum lucidum* Ait.; RAPD; impact factors; system optimization.