

牛血清白蛋白在锁阳 RAPD 分析中的作用

周玉碧^{1,2,3}, 叶润蓉^{1,3}, 卢学峰^{1,3}, 刘洋^{1,2,3}, 彭敏^{1,3}* (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 青海西宁 810001)

摘要 [目的]为了研究牛血清白蛋白(BSA)在 RAPD 分析技术中的作用。[方法]通过锁阳 RAPD 分析中添加 BSA, 观察其对 RAPD 扩增的改善情况。[结果]结果表明, 在锁阳 RAPD 分析过程中, 添加 BSA 可显著改善锁阳的 PCR 扩增效果, 并降低 *Taq* 酶的用量, BSA 最佳使用浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。[结论]添加 BSA 以改善植物 RAPD 分析的方法是可行的; 该研究为 BSA 在 RAPD 分析技术中的应用提供依据。

关键词 牛血清白蛋白; 锁阳; RAPD

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)28-08908-02

Effect of BSA on RAPD Analysis of *Cynomorium songaricum*

ZHOU Yu-bi et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract The objective of the study is to study the effect of BSA on Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Cynomorium songaricum* Rupr. was studied, the result provided a reference basis for the better use of bovine serum albumin (BSA). The results showed that 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ was the suitable concentration of BSA used in RAPD of *Cynomorium songaricum* Rupr. BSA not only improved RAPD of *Cynomorium songaricum* Rupr., but also reduced the dosage of *Taq* DNA polymerase. It is concluded that BSA can be used to improve plant RAPD analysis. It is feasible to add BSA to improve RAPD analysis of plants. This study has provided background for the application of BSA in RAPD analysis.

Key words BSA; *Cynomorium songaricum*; RAPD

锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)为锁阳科植物,具补肾阳、益精血、润肠通便之功效,主要分布于我国西北各省区的沙漠地区和半荒漠化地区,属于资源储量较丰富的沙地植物资源之一。RAPD 是 20 世纪 90 年代发展起来的分子标记技术^[1-2],具有效率高、特异性强、样品用量少及容易检测的特点,被广泛应用于遗传多样性研究领域^[3]。进行 RAPD 分析,必须建立稳定的 PCR 扩增体系,以提高结果的重复性和可靠性。由于植物 DNA 常含有内源多酚化合物,影响其 PCR 扩增。据报道,在反应体系中添加各种有效成分^[4],可以获得更理想的实验效果。有研究表明,牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)被应用于酶及 PCR 反应系统中,可以起到减少内源抑制物的干扰作用^[5-9]。为此,笔者研究 BSA 在锁阳 RAPD 分析中的作用,以期 BSA 在植物药材 RAPD 分析中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 锁阳于 2006 年 5 月采自甘肃安西县(瓜州)锁阳城,分析样品为晒干的肉质茎,存于 -70 超低温冰箱中,备用。引物及试剂均购于上海 Sangon 公司。DNA Marker DL2000 购于 TaKaRa 公司,BSA 为 BM 公司产品。

1.2 总 DNA 提取与质量检测 总 DNA 提取。采用高盐低 pH 值法^[10]提取锁阳总 DNA,最后将提取物溶于 50 μl TE 中保存备用; 质量检测。采用紫外分光光度法进行 DNA 质量检测。测定其 A_{260} 及 A_{280} 值, DNA 纯度以 A_{260}/A_{280} 比值判断。测定结果表明,试验提取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8,质量完全满足 RAPD 分析的要求。

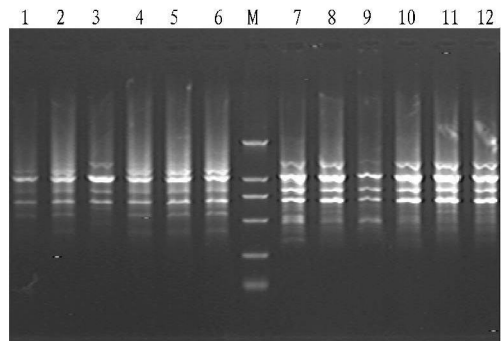
1.3 RAPD 扩增及反应条件 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司生产的 iCyclerTM。锁阳 RAPD 扩增程序为:94 预变性 5 min; 94 变性 40 s; 36 复性 50 s; 72 延伸 1.5 min, 40 个循环; 最后, 72 延伸 5 min。

锁阳的 RAPD 扩增条件: 25 μl PCR 反应体系, 1 \times *Taq* 酶缓冲液, 0.25 mmol/L 4 \times dNTP, 20 ng 模板 DNA, 20 pmol 引物, MgCl₂ 1.0 mmol/L, *Taq* 酶用量见试验中具体设置。

1.4 PCR 产物的鉴定 取 8 μl 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 制胶时在 1 \times TAE 中加入 5 mg/ml 溴化乙锭。电泳结束后置于凝胶成像系统 (White/Ultraviolet Transilluminator, 美国 UVP 公司生产) 中观察, 并照相保存。

2 结果与分析

2.1 *Taq* 酶用量及添加 BSA 对 RAPD 的影响 在锁阳 DNA 的 PCR 扩增过程中, 为得到 *Taq* 酶的适宜添加量, 设置了 6 个酶单位梯度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 U) 试验。结果表明 (图 1), *Taq* 酶用量在 0.5~2.0 U 范围内, 锁阳 RAPD 条带随 *Taq* 酶用量的增加而增强; 当 *Taq* 酶用量达到 2.0 U 时, 可获得较强的 RAPD 条带; 其后, 随 *Taq* 酶用量增加, RAPD 条带虽有所增强但不显著。因此, 最适 *Taq* 酶用量为 2.0 U。



注: 1~6 为锁阳的 RAPD 扩增结果 (引物 S262), *Taq* 酶用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 U; M 为 DL2000 分子量标准; 7~12 为 *Taq* 酶用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 U, 均添加 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA。

图 1 *Taq* 酶用量及添加 BSA 对锁阳 RAPD 扩增的影响

为了获得更佳的试验效果, 在含有各 *Taq* 酶用量的 RAPD 反应体系中分别加入等量的 BSA (2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。结果表明 (图 1), 添加 BSA 后的主要条带位置及数量变化较小, 但使扩增片段的 RAPD 条带明显增强, 特别是对较弱条带的影响

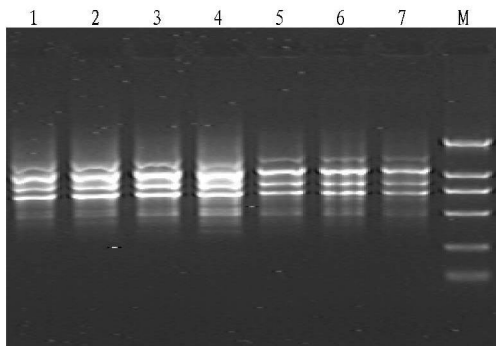
基金项目 中国科学院西北高原生物研究所知识创新工程领域前沿项目 (CXLY-2002-7)。

作者简介 周玉碧 (1978 -), 男, 甘肃文县人, 博士研究生, 研究方向: 生态学植物分子生物学。*通讯作者。

收稿日期 2007-05-22

较大。此外,在含有 0.5 U *Taq* 酶的体系中添加 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA 后,锁阳 RAPD 扩增后电泳条带的清晰度超过了含有 3.0 U *Taq* 酶而不添加 BSA 时的效果(图 1 中编号 7 和 6)。由此可见,添加 BAS 不仅有助于提高锁阳 RAPD 扩增效果,而且可以明显降低 *Taq* 酶的用量。

2.2 BSA 对 RAPD 条带的影响 为了筛选出适宜的 BSA 浓度(*Taq* 酶用量均为 2.0 U),设置了 7 个 BSA 浓度梯度(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 及 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。结果表明(图 2),当 BSA 浓度为 0.5~3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时,均能使 RAPD 条带增强,但浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时效果最佳,浓度为 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时,RAPD 条带稍有扩散;浓度为 4.0~6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时,PCR 扩增产物会出现乳白色沉淀,RAPD 条带开始减弱,特别是当浓度为 5.0 和 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时,乳白色沉淀结成团状,影响电泳时取样。因此,建议在 RAPD 扩增中控制 BAS 的使用量为 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。



注:1~6 为锁阳的 RAPD 扩增结果(引物 S262),BSA 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 及 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;M 为 DL2000 分子量标准。

图 2 BSA 浓度对锁阳 RAPD 扩增的影响

3 小结与讨论

植物 DNA 中常含有能与相应蛋白质结合而使 *Taq* 酶失活的内源多酚化合物。关于 BSA 的作用机制,Kreader 认为可能是 BSA 作用于多酚体系,BSA 通过其上富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物阴离子相互作用或通过疏水作用力消除的作用,阻止其与 *Taq* 酶结合,而使 *Taq* 酶活性提高^[6];Al-Soud 等认为 BSA 可以封闭 *Taq* 酶抑制物的作用,从而改善 PCR 过程中酶的稳定性^[5]。在进行 RAPD 实验时,通常不添加辅助成分。但由于各植物材料的特殊性,添加辅助成分可

起到去除干扰物质的作用,取得更理想的实验结果。该试验结果表明,添加 BSA 不仅可明显减少 *Taq* 酶使用量,降低试验成本,而且对主要条带的位置及数量影响较小,进一步验证了上述报道的相关结论。因此,该方法有望推广运用于其他植物类药材的 RAPD 分析体系中。

据报道,BSA 的添加量一般以 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 为宜^[7]。由于植物种类特性的不同,BSA 的最佳使用浓度亦不同,如花生的适宜浓度为 2.0~3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ^[7],与该试验结果基本一致;水杉和七子花的 BSA 最佳使用浓度分别为 0.6 与 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ^[8],彩棉为 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ^[9],与该试验结果差异较大。依据 BSA 的作用机制,提取 DNA 中内源多酚类化合物或杂质成分较多时,添加 BSA 浓度可能需相应提高。根据相关报道,RAPD 扩增体系中的 BSA 浓度 > 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时,通常产生沉淀^[8]或弱带消失^[7],而且 BSA 浓度变化对 RAPD 条带的数量影响较大^[8-9]。然而,该试验结果表明,BSA 浓度对锁阳 RAPD 条带数量的影响较小。此外,不同厂家生产 BSA 的质量差异,也可能对 PCR 扩增结果产生不同影响。因此,在植物 RAPD 分析中,应根据植物种类、所提取 DNA 质量及 BSA 来源等方面的因素,确定其最佳使用浓度。

参考文献

- [1] WILLIAMS J G, 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.
- [2] WELSH J, McCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 7213 - 7218.
- [3] 王慧中,卢江杰,施农农,等.利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系[J].中草药,2006,37(4):588 - 592.
- [4] 尹冬明,李淑娴,郑阿宝,等.四甲基氯化铵在杨树 RAPD 扩增反应中的作用[J].植物资源与环境学报,2001,10(2):11 - 13.
- [5] AL-SOUD W A, RÅSTRÖM P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells[J]. J Clin Microbio, 2001, 39(2):485 - 493.
- [6] KREADER C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein[J]. Appl Environ Microbio, 1996, 62(3):1102 - 1106.
- [7] 叶冰莹,陈由强,朱锦懋,等.花生 RAPD 反应条件的研究[J].花生科技,2000,5(1):23 - 25.
- [8] 边才苗,李均敏,金则新,等.牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用[J].遗传,2002,24(3):279 - 282.
- [9] 蔡剑辉,谢丽琼,赵惠新,等.外源 DNA 导入彩棉后 RAPD 分析体系的优化[J].核农学报,2006,20(3):211 - 214.
- [10] 王培训,黄丰,周联,等.植物中药材总 DNA 提取方法的比较[J].中药新药与临床药理,1999,10(1):18 - 20.

GB/T 7714 - 2005

专著中析出文献的著录格式

析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].析出文献其他责任者//专著主要责任者.专著题名:其他题名信息.版本项.出版地:出版者,出版年:析出文献的页码[引用日期].获取和访问路径.

示例:

[1] 程根伟.1998 年长江洪水的成因与减灾对策研究[M]//许厚泽,赵其国.长江流域洪涝灾害与科技对策.北京:科学出版社,1999:32 - 36.

[2] 钟文发.非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮.运筹学的理论与应用:中国运筹会第五届大会论文集.西安:西安电子科技大学出版社,1996:468 - 471.

[3] WEINSTEIN L, SWERTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganism[M]//SODEMAN W A, SODEMAN W A. Pathologic physiology:mechanisms of disease. Philadelphia:Saunders,1974:745 - 772.