

土鳖虫 DNA 的 RAMP-PCR 反应体系的建立及优化

王 慧¹, 苏双良¹, 任慧君², 赵志壮¹, 白秀娟^{1*}

1. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

2. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘 要: 目的 建立并优化土鳖虫基因组 DNA 的 RAMP-PCR 反应体系及扩增程序, 为土鳖虫遗传多样性的研究提供依据。方法 以雌性土鳖虫为材料, 常规酚/氯仿提取基因组 DNA。使用 RAMP 引物 (ISSR807+RAPD A₅), 采用正交优化方法对影响 PCR 反应的 Mg²⁺、dNTPs、引物、DNA 聚合酶、模板进行体系优化, 同时选择最佳的引物退火温度。结果 最适引物 (ISSR807+RAPD A₅) 组合进行土鳖虫的 RAMP-PCR 分析的反应体系为总体积 25 μL, 包括 10×缓冲液 2.5 μL、Mg²⁺ 1.00 mmol/L、dNTPs 2.00 mmol/L、引物 0.50 μmol/L、TaqDNA 聚合酶 1.00 U、DNA 模板 1.50 ng/μL, 最佳退火温度为 46.8 °C。结论 本实验建立的最佳 RAMP-PCR 反应体系稳定、重复性好, 可用于土鳖虫种质资源鉴定和遗传多样性研究。

关键词: 土鳖虫; 正交试验; 体系优化; RAMP-PCR 体系; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0835-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.018

Establishment and optimization of RAMP-PCR reaction system for DNA of *Eupolyphaga sinensis*

WANG Hui¹, SU Shuang-liang¹, REN Hui-jun², ZHAO Zhi-zhuang¹, BAI Xiu-juan¹

1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Objective To provide the basis for the genetic diversity research of *Eupolyphaga sinensis* by establishing and optimizing the random amplified microsatellite polymorphism RAMP-PCR reaction system and amplification procedure for genomic DNA.

Methods Phenol chloroform extraction of genomic DNA was performed on female *E. sinensis*. Based on RAMP Primer (ISSR807 + RAPD A₅), the orthogonal test was adopted to optimize the RAMP-PCR amplification system on *E. sinensis* in five factors (Mg²⁺, dNTPs, primer, Taq DNA polymerase, and template DNA) at four levels, and the suitable anneal temperature of the primer was selected. **Results** The optimal Primer (ISSR807+RAPD A₅) for RAMP-PCR system (25 μL reaction volume) of *E. sinensis* was: 10 × PCR buffer (2.5 μL), Mg²⁺ (1.0 mmol/L), dNTPs (2.0 mmol/L), primer (0.5 μmol/L), Taq DNA polymerase (1 U), and template DNA (1.5 ng/μL); The optimized anneal temperature was 46.8 °C. **Conclusion** The established and optimized RAMP-PCR reaction system is stable and repeatable, which could provide the basis for the analysis of germplasm resources and genetic diversity of *E. sinensis*.

Key words: *Eupolyphaga sinensis* Walker; orthogonal test; system optimization; RAMP-PCR system; genetic diversity

土鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walker, 俗名土元、地鳖虫等, 分类学归属节肢动物门昆虫纲蜚蠊目鳖蠊科, 是一味传统的活血化瘀类中药材, 以雌虫干燥体入药^[1], 其药用历史悠久, 首载于《神农本草经》, 具有破血散瘀、攻坚解凝的功效^[2]。据报道土鳖虫水煎剂对肾病囊肿具有抑制作用^[3], 临床上广泛用于、舌癌、胃癌、肝癌的治疗^[4-8]。由于土鳖虫种质资源丰富, 地域分布广, 不同地理种群间其体

型、种群颜色和生长发育存在一定差异^[9], 但缺乏分子水平的深入研究。因此, 有必要对其种质资源和遗传多样性进行研究, 为土鳖虫的合理开发和利用提供参考。

随机扩增微卫星多态性 (random amplified microsatellite polymorphism, RAMP) 是建立在聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 基础上的新的 DNA 分子标记方法, 具有操作简便、检

收稿日期: 2013-10-18

作者简介: 王 慧 (1989—), 女, 在读硕士, 主要研究方向为经济动物饲养与遗传育种。Tel: 18304620468 E-mail: wanghui063@163.com

*通信作者 白秀娟 Tel: (0451)55191636 E-mail: bxj630306@163.com

测快速、稳定性强、多态性及共显性高的特点^[10-11]。它将 RAPD 和 SSR 相结合, 所得谱带可以显示 RAPD 的多态性, 又隐含或长或短的核心重复序列, 且能增加小相对分子质量区域清晰可辨的带纹数目, 可用于区分亲缘关系较近的物种^[12]。另有研究报道指出, 与 RAPD 相比, RAMP 更适合研究遗传背景不太清楚的物种的遗传多样性^[13-15]。但 RAMP 引物组合不同获得的带型不同, 且锚定引物的退火温度比随机引物的退火温度高 10~15 °C, 解链温度 (T_m) 值会影响引物的特异性和扩增条带多态性^[16]。因此, 为了获得最丰富的遗传信息和确保 RAMP 标记结果的可靠性, 有必要对 RAMP-PCR 反应体系进行优化。本研究选用 RAMP 方法, 以土鳖虫 DNA 为模板, 通过多对引物组合筛选出最适 RAMP 引物组合 (ISSR807+RAPD A₅), 利用正交试验设计, 对 RAMP 反应体系进行了优化, 并对 PCR 反应程序中的退火温度进行筛选, 以期获得适合土鳖虫的 RAMP 反应体系, 最后用 10 份土鳖虫材料对优化后的体系进行验证, 为土鳖虫遗传多样性的研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

土鳖虫活体购于山东省临沂市中药材市场, 经东北农业大学白秀娟教授鉴定为土鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的雌性活体。-20 °C 猝死冻存, 用于基因组的提取及 RAMP-PCR 研究。

1.2 仪器与试剂

所需仪器包括 PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像仪。所使用的引物 ISSR806~815 和 RAPD A₁~A₂₀、B₁~B₂₀ 是根据哥伦比亚大学发布的 ISSR 引物序列和 RAPD 引物序列, 由北京华大基因合成, 通过预试验, 筛选出 PCR 目的条带整齐清晰且多态性高的 RAMP 引物组合为 ISSR807+RAPD A₅。dNTPs 购于哈尔滨海基生物科技有限公司, TaqDNA 聚合酶、Mg²⁺ 购自北京金式全生物科技有限公司。

2 方法

2.1 DNA 的提取及检测

按照常规酚/氯仿抽提法进行总 DNA 的提取^[17], 使用分光光度计, 检测 DNA 浓度。根据测定的 A_{260}/A_{280} 值, 估测 DNA 质量, 一般 A_{260}/A_{280} 在 1.6~1.8, 可以满足实验要求。根据记录的 A_{260} 值及稀释倍数, 换算出待测 DNA 的浓度, 并进行相应的稀释, 以 50 ng/μL 分装, 工作液 4 °C 保存, DNA 原液于 -20 °C 保存。

2.2 RAMP-PCR 正交试验设计

针对影响 RAMP-PCR 的 5 个主要因素 (Mg²⁺、dNTP、引物、TaqDNA 聚合酶、模板 DNA) 在 4 个水平上进行正交设计, 采用 L₁₆(4⁵) 正交表进行试验, 设计方案见表 1, 除反应体系表中的因素外, 还有 10×缓冲液 (Mg²⁺) 2.5 μL, 加灭菌去离子水至 25 μL 体系。

表 1 RAMP-PCR 反应体系的正交试验

Table 1 Orthogonal test of RAMP-PCR reaction system

编号	模板 DNA / (ng·μL ⁻¹)	Mg ²⁺ / (mmol·L ⁻¹)	dNTPs / (mmol·L ⁻¹)	引物 / (μmol·L ⁻¹)	TaqDNA 酶 / U
1	0.75	1.00	1.00	0.25	0.25
2	0.75	1.50	1.50	0.50	0.50
3	0.75	2.00	2.00	0.75	0.75
4	0.75	2.50	2.50	1.00	1.00
5	1.00	2.00	1.50	0.25	1.00
6	1.00	2.50	1.00	0.50	0.75
7	1.00	1.00	2.50	0.75	0.50
8	1.00	1.50	2.00	1.00	0.25
9	1.25	2.50	2.00	0.25	0.50
10	1.25	2.00	2.50	0.50	0.25
11	1.25	1.50	1.00	0.75	1.00
12	1.25	1.00	1.50	1.00	0.75
13	1.50	1.50	2.50	0.25	0.75
14	1.50	1.00	2.00	0.50	1.00
15	1.50	2.50	1.50	0.75	0.25
16	1.50	2.00	1.00	1.00	0.50

2.3 RAMP-PCR 扩增

使用引物 ISSR807+RAPD A₅ 进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μ L。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 48 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2.4 RAMP-PCR 优化体系稳定性的验证

用 10 份土鳖虫基因组 DNA 对所建立的反应体系的可靠性和稳定性进行检测, 反应程序同 RAMP-PCR 扩增反应程序。

3 结果与分析

3.1 土鳖虫基因组 DNA 的提取与检测

本实验提取的基因组 DNA 经紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值均在 1.6~1.8, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 可见整齐的基因组 DNA 条带。DNA 可用于后续实验。

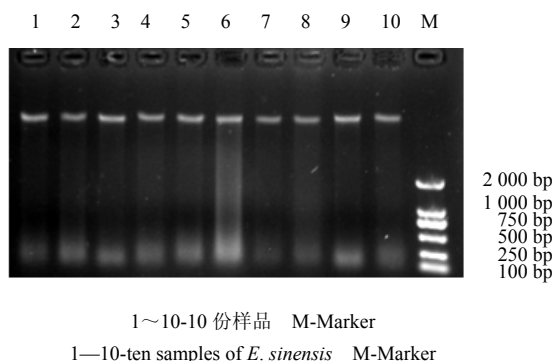


图 1 土鳖虫总 DNA 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 1% Agarose gel electrophoretogram of total DNA from *E. sinensis*

3.2 PCR 正交试验的直观分析

RAMP-PCR 正交试验结果见图 2, 由于 5 种影响因素按不同的添加量进行组合, 因此这 16 个体系的扩增效果存在明显差异。体系 13 扩增效果差, 无条带; 体系 1~6、9、15、16 虽有带, 但过于模糊且多态性低, 扩增效果较差; 综合比较, 体系 7、8、10、11、12、14 的条带清晰, 特异性好, 其中体系 14 的扩增效果最好, 条带多, 特异性高。因此确定土鳖虫 RAMP-PCR 的最佳体系为 DNA 模板 1.50 ng/ μ L, Mg^{2+} 1.00 mmol/L, dNTPs 2.00 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, $10\times (Mg^{2+})$ 缓冲液 2.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 1.00 U, 并加去离子水至 25 μ L。

3.3 体系中不同因素的影响

对影响 RAMP-PCR 扩增的 5 个因素模板 DNA、

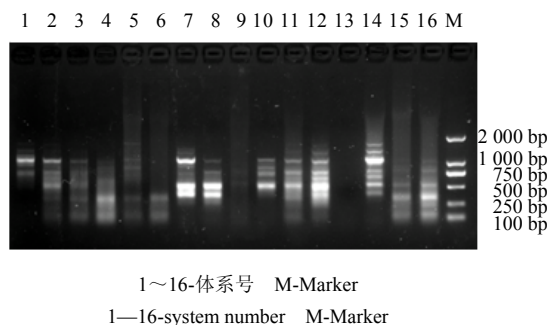


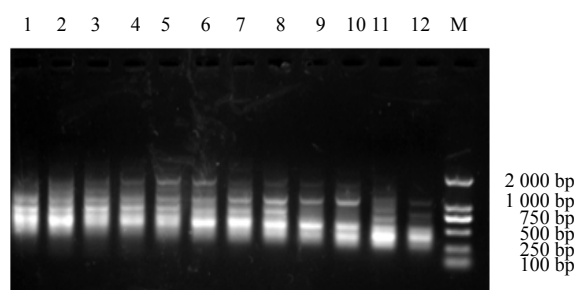
图 2 RAMP-PCR 正交试验电泳结果

Fig. 2 Electrophoretogram of RAMP-PCR orthogonal test

Mg^{2+} 、dNTPs、引物、TaqDNA 聚合酶设置不同的添加量组合。结果表明, 模板 DNA 在一定的用量范围内均能扩增出条带, 对 RAMP-PCR 的扩增无显著影响。引物浓度严重影响扩增产物的质量, 浓度过低时, 与模板的结合位点结合不充分, 降低扩增的效果; 浓度过高会增加引物二聚体的形成^[18], 由图 2 可知, 引物浓度为 0.50 μ mol/L 扩增条带清晰且多态性增强, 为最适宜引物浓度。 Mg^{2+} 浓度是制约 PCR 扩增效果的重要因素。Taq DNA 聚合酶需要 Mg^{2+} 的激活, 引物与模板双链杂合体的解链及退火温度均受二价阳离子的影响^[19-21]。当 Mg^{2+} 浓度 ≥ 2.0 mmol/L, 扩增的条带增多, 但带弱且不清晰, 浓度为 1.00、1.50 mmol/L 时, 扩增条带清晰明亮, 尤其以 1.00 mmol/L 效果最佳。TaqDNA 聚合酶的添加量直接关系实验的结果, 随着浓度的逐渐增加, 条带逐渐变得清晰, 当酶量为 1.00 U 时, 条带最整齐明亮。dNTPs 作为 PCR 反应的原料, 其浓度直接关系扩增产物的量和特异性, 同时过量 dNTPs 会对 Mg^{2+} 造成拮抗作用, 综合考虑, 选择 dNTPs 浓度为 2.00 mmol/L 最适宜。

3.4 退火温度的确定

根据正交试验结果, 选择合适的反应体系, 设定退火温度 (45 ± 10) $^{\circ}$ C, PCR 仪自动生成 12 个温度梯度 40.0、40.2、40.9、42.0、43.2、44.4、45.6、46.8、48.0、49.1、49.8、50.0 $^{\circ}$ C。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳结果对比 (图 3), 当退火温度较低时, 扩增的条带弱且弥散, 随着退火温度的升高, 扩增条带逐渐清晰且多态性增多, 但超过 47 $^{\circ}$ C 后条带虽然清晰可多态性减少。因此确定 RAMP 引物组合的适宜退火温度为 46.8 $^{\circ}$ C。



1~12-对应的退火温度 40.0、40.2、40.9、42.0、43.2、44.4、45.6、46.8、48.0、49.1、49.8、50.0 °C M-Marker

1—12-the corresponding temperatures are 40.0, 40.2, 40.9, 42.0, 43.2, 44.4, 45.6, 46.8, 48.0, 49.1, 49.8, and 50.0 °C M-Marker

图3 RAMP-PCR 退火温度的筛选

Fig. 3 Optimized anneal temperature of RAMP-PCR

3.5 RAMP-PCR 优化体系的检测

采用引物组合 ISSR807+RAPD A₅ 在体系 14 的基础上进行 10 份土鳖虫个体的 RAMP-PCR 扩增, 扩增结果用 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测体系的稳定性(图4)。如图所示, 不同模板 DNA 的扩增条带存在遗传多样性差异, 但均能获得清晰明亮、重复性好、多态性高的条带, 说明经过优化的 RAMP-PCR 体系 14 稳定性好, 可用于后续实验。

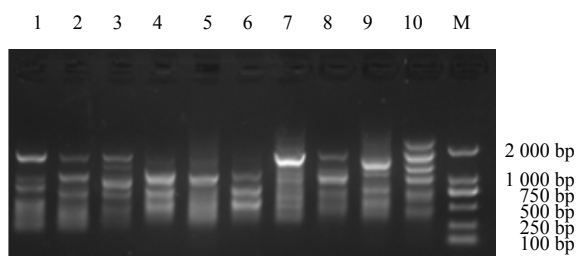


图4 10份土鳖虫个体最优体系扩增的结果

Fig. 4 Amplification of ten samples of *E. sinensis* with optimal RAMP-PCR reaction system

4 讨论

RAMP 标记是一种建立在 PCR 基础上将 SSR 标记和 RAPD 标记的优点结合在一起的新型分子标记技术^[22-23], 具有较高的稳定性和可重复性, 更能揭示物种间和物种内的多态性, 适合于遗传背景尚不太清楚的物种的研究^[14]。但对于不同的物种, 需选用不同的微卫星引物和 RAPD 引物组合^[12], 且 RAMP 易受反应体系中各因素的配比和 PCR 反应程序的影响。因此, 在运用 RAMP 标记进行某物种

研究时, 先筛选出适合该物种的 ISSR 引物和 RAPD 引物组合, 再根据引物选取适宜的退火温度, 确立和优化适用于该物种的 RAMP-PCR 体系是获取丰富、科学、稳定和准确的 RAMP 标记遗传信息, 并为其种质资源和遗传多样性研究提供可靠依据的必不可少的前期工作。

本实验选用 20 对 RAPD 引物和 10 对 ISSR 引物, 进行引物组合的筛选, 确定最佳引物组合为 ISSR807+RAPD A₅。同时采用 5 因素 4 水平正交设计对反应体系中相互影响的模板用量、Mg²⁺浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、TaqDNA 聚合酶进行了梯度设置。其中, 模板 DNA 的用量对扩增结果的影响较小, 而 Mg²⁺浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、TaqDNA 聚合酶的用量对 RAMP-PCR 的影响较大。经过正交体系表的重复试验, 确定适合引物组合 (ISSR807 + RAPD A₅) 进行土鳖虫 RAMP-PCR 分析的最佳反应体系为: DNA 模板 1.50 ng/μL, 10×(Mg²⁺) 缓冲液 2.5 μL, Mg²⁺ 1.00 mmol/L, dNTPs 2.00 mmol/L, 引物 0.5 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.00 U, 并加去离子水至反应总体积 25 μL。最佳退火温度为 46.8 °C。同时经过 10 份土鳖虫个体的验证, 建立了反应稳定、重复性好的 RAMP-PCR 反应体系。该体系为 RAMP 分子标记技术的发展和下一步土鳖虫遗传多样性分析和构建遗传图谱提供技术铺垫。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 周瑞玲, 陈玉兴, 曾晓会, 等. 土鳖虫多肽对家兔血瘀模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6): 51-53.
- [3] 徐成刚, 梅长林, 赵海丹. 土鳖虫水煎剂对人多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(2): 200-202.
- [4] 葛钢锋, 余陈欢, 吴巧凤. 土鳖虫醇提物对体外肿瘤细胞增殖的抑制 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 826-828.
- [5] 林静华, 吴映娥, 蔡应木, 等. 地鳖虫纤溶活性蛋白组分的提取及对肿瘤细胞的抑制作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(12): 1088-1090.
- [6] 张冬梅, 李穗晶, 黄雅莉. 地鳖虫活性蛋白对人舌癌细胞 Tea-8113 的抑制作用 [J]. 中药新药与临床应用, 2007, 18(4): 257-259.
- [7] 邹玺, 刘宝瑞, 钱晓萍, 等. 土鳖虫提取液对人胃低分化腺癌细胞 BGC-823 的抑制作用 [J]. 时珍国医国

- 药, 2006, 17(9): 1695-1696.
- [8] 胡文静, 钱晓萍, 邹 玺, 等. 重楼、土鳖虫对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖抑制的协同作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(4): 234-237.
- [9] 胡玉伟. 中华真地鳖体型大小地理变异及相关免疫反应研究 [D]. 武汉: 华中农业大学植物科技学院, 2011.
- [10] Matsumoto C, Nabika T, Mashimo T, *et al.* Construction of a rat genetic map by using randomLy amplified microsatellite polymorphism markers [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(7): 531-535.
- [11] Labra M, Vannini C, Grassi F, *et al.* Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(7): 1512-1518.
- [12] 王明霞, 柳李旺, 龚义勤, 等. RAMP 与 REMAP 分子标记技术及其应用 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 859-865.
- [13] 罗文永, 胡 俊, 李晓方. 微卫星序列及其应用 [J]. 遗传, 2003, 25(5): 615-619.
- [14] 王红梅, 白秀娟. 应用 RAMP 标记分析水貂与彩貂种属间的遗传多样性 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(8): 41-44.
- [15] 侯万伟, 樊军锋, 张小娟, 等. 杨树 RAMP 体系的建立与优化 [J]. 华北农学报, 2008, 23(10): 217-219.
- [16] Becker J, Henu M. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley [J]. *Genome*, 1995, 38(5): 991-998.
- [17] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [18] 马 巍, 王春强, 马 宁. 山羊基因组 DNA RAMP-PCR 反应体系的建立 [J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(1): 6-8.
- [19] 童阿玛, 王柳英. 草地早熟禾 ISSR-PCR 反应体系优化 [J]. 青海大学学报, 2009, 27(3): 55-58.
- [20] 唐 辉, 陈宗游, 史艳财, 等. 正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.
- [21] 张香东, 刘 庚, 常素慧, 等. 水蛭 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 215-218.
- [22] Wu K S, Jones R, Danneberger L, *et al.* Detection of microsatellite polymorphisms without cloning [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(15): 3257-3258.
- [23] Davila J A, Loarce Y, Ferrer E. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98(2): 265-273.