

茶叶叶绿体DNA的PCR-RFLP反应体系优化

陈盛相, 齐桂年*, 李欢
(四川农业大学园艺学院茶学系, 四川雅安 625014)

摘要: 通过正交设计对影响茶树聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)反应体系的主要因素进行优化, 快速确立适合茶叶叶绿体DNA PCR-RFLP分析的扩增体系和酶切体系。结果表明: 最佳PCR扩增体系为100ng模板DNA、200 μ mol/L dNTPs、1.5mmol/L MgCl₂、50ng叶绿体引物、3U *Taq* DNA聚合酶、加ddH₂O至25 μ L; 最佳酶切体系为6 μ L扩增产物用量、2U限制性内切酶量、1 \times 限制性内切酶buffer、加ddH₂O至15 μ L, 37 $^{\circ}$ C酶切6h。利用优化的反应体系, 对30个茶树品种叶绿体DNA进行PCR-RFLP扩增, 可获得清晰扩增图谱和多态性酶切图谱。

关键词: 茶树; 叶绿体DNA; PCR-RFLP; 优化

Optimization of RFLP-PCR Reaction System for cpDNA in Tea Plants

CHEN Sheng-xiang, QI Gui-nian*, LI Huan
(Department of Tea Science, College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Optimal reaction system of PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) for cpDNA in tea plants was investigated by orthogonal array design. Results showed that the optimal amplification system was 100 ng DNA template, 200 μ mol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 50 ng primer, 3U *Taq* DNA polymerase, and addition of ddH₂O up to total volume of 25 μ L. The optimal digestion system included 6 μ L amplified product, 2 U endonuclease, 1 \times endonuclease buffer in digestion solution, digestion time of 6 h and digestion temperature of 37 $^{\circ}$ C, and addition of ddH₂O up to total volume of 15 μ L. Under the optimal reaction system, 30 camellia cultivars were analyzed and polymorphic digestion maps were obtained.

Key words: tea plant; chloroplast DNA; PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism); optimization

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0073-04

利用通用引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增叶绿体基因组的特异区域, 使人们可以通过叶绿体DNA的多样性进行探索植物的分类和系统发育成为可能^[1-3]。由于叶绿体单亲遗传模式和低突变率, 叶绿体DNA被认为是研究系统发育和群体遗传学理想的系统。近年来, 利用通用引物对叶绿体DNA进行聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析被广泛用于许多植物的物种鉴定^[4]、遗传多样性^[5-8]、系统发育研究^[9-11]。

虽然PCR-RFLP扩增使用通用引物, 但不同植物材料扩增条件存在差异, 需要通过实验对其PCR扩增及酶切反应中的条件进行优化。适用于茶叶叶绿体DNA的RFLP-PCR反应体系迄今未见报道, 本研究通过正交设计对PCR扩增体系的主要因素(*Taq* DNA聚合酶、dNTPs浓度、引物浓度)以及酶切体系中主要因素(扩增产物量、内

切酶酶量、酶切时间)进行优化, 快速建立适用于茶叶叶绿体DNA的PCR-RFLP反应体系, 为RFLP-PCR在茶叶叶绿体DNA研究中的应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

将采自四川农业大学茶树品种园的30个茶树品种一芽二叶夏梢, 用硅胶干燥并保存于干燥器中^[12]。茶树品种名称及来源见表1。

Tris-HCl、NaCl、EDTA、CTAB、PVP、无水乙醇、 β -巯基乙醇、氯仿、异戊醇、苯酚、液氮、抗坏血酸、异丙醇、*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、10 \times PCR buffer(含MgCl₂)、叶绿体引物、*Taq* I、1 \times TAE缓冲液、琼脂糖、EB、DNA marker(DL2000)。所用引物均由上海生工生物工程公司合成。

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 四川省科技厅项目(2006-YZGG-8)

作者简介: 陈盛相(1981—), 男, 博士研究生, 研究方向为茶树生物技术。E-mail: csx810905@163.com

*通信作者: 齐桂年(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为茶叶精深加工及茶树生物技术。E-mail: guinian5612@sina.com

表1 茶树品种名称及来源

Table 1 Names and origins of tea cultivars

编号	名称	来源	编号	名称	来源
1	蒙山9号	四川	16	福鼎大白茶	福建
2	蒙山23号	四川	17	元宵茶	福建
3	蒙山11号	四川	18	乌牛早	浙江
4	龙井43	浙江	19	浙农117	浙江
5	迎霜	浙江	20	东湖早	湖南
6	福选9号	福建	21	政和大白茶	福建
7	安吉白茶	浙江	22	福建水仙	福建
8	春波绿	福建	23	黄叶水仙	广东
9	梅占	福建	24	蜀永307	四川
10	楮叶齐	湖南	25	劲峰	福建
11	福鼎大毫茶	福建	26	英红1号	广东
12	菊花春	浙江	27	英红2号	广东
13	龙井长叶	浙江	28	黔湄303	贵州
14	浙农113	浙江	29	黔湄419	贵州
15	平阳特早	浙江	30	海南大叶	海南

1.2 仪器与设备

H.H.S11-2型电热恒温水浴锅 上海医疗器械厂; Power Pac基础型电泳仪、Sub-cell GT电泳槽、MJ PTC-200 PCR仪 美国Bio-Rad公司; 5415高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; UV2300紫外-可见分光光度计 上海天美科学仪器有限公司; Image Master VDS凝胶成像系统 美国Amersham Pharmacia Biotech公司。

1.3 方法

1.3.1 总DNA提取

总DNA的提取参考黄建安等^[13]的方法。

1.3.2 PCR-RFLP反应体系的优化

1.3.2.1 PCR扩增反应体系的优化

表2 PCR扩增反应体系的 $L_{25}(5^3)$ 正交试验设计

Table 2 PCR reaction system of orthogonal tests

试验号	因素		
	TaqDNA聚合酶量/U	dNTPs浓度/(μ mol/L)	引物量/ng
1	1	100	25
2	1	200	50
3	1	300	75
4	1	400	100
5	1	500	125
6	2	100	25
7	2	200	50
8	2	300	75
9	2	400	100
10	2	500	125
11	3	100	25
12	3	200	50
13	3	300	75
14	3	400	100
15	3	500	125
16	4	100	25
17	4	200	50
18	4	300	75
19	4	400	100
20	4	500	125
21	5	100	25
22	5	200	50
23	5	300	75
24	5	400	100
25	5	500	125

参照Parani等^[14]的方法。按 $L_{25}(5^3)$ 正交表对25个反应体系进行正交试验(表2)。随机以福鼎大白茶总DNA为模板, trnL-trnF(5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3', 5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3')为叶绿体引物^[15]。所有反应体系为25 μ L, 包括100ng模板DNA, 1.5mmol/L MgCl₂, 1 \times PCR buffer和足量的ddH₂O。扩增反应在PTC-220 PCR仪上进行。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C预变性3min, 然后40个循环(94 $^{\circ}$ C变性1min, 55 $^{\circ}$ C退火1min, 72 $^{\circ}$ C延伸3min), 最后72 $^{\circ}$ C延伸7min。取2 μ L扩增产物在2.0%琼脂糖凝胶上电泳, 电泳缓冲液为1 \times TAE, 电压为30V。

1.3.2.2 酶切体系的优化

参照Parani等^[14]的方法。按 $L_{16}(4^3)$ 正交表对16个酶切体系进行正交试验(表3)。随机选用限制性内切酶Taq I对福鼎大白茶最佳扩增产物进行酶切。所有酶切反应体系为15 μ L, 包括1 \times 限制性内切酶buffer和足量ddH₂O。扩增产物在限制性内切酶最适宜反应温度37 $^{\circ}$ C进行酶切, 然后取2 μ L酶切产物在2.0%琼脂糖凝胶上电泳。

表3 酶切反应体系的 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计

Table 3 Digestion system of orthogonal tests

试验号	因素		
	扩增产物量/ μ L	内切酶量/U	酶切时间/h
1	5	0.5	2
2	5	1	4
3	5	1.5	6
4	5	2	8
5	6	0.5	4
6	6	1	2
7	6	1.5	8
8	6	2	6
9	7	0.5	6
10	7	1	8
11	7	1.5	2
12	7	2	4
13	8	0.5	8
14	8	1	6
15	8	1.5	4
16	8	2	2

1.4 各样品PCR-RFLP产物扩增结果的检测

PCR-RFLP产物在2.0%琼脂糖凝胶上电泳, EB染色, ImageMaster VDS凝胶成像仪上观察拍照。

2 结果与分析

2.1 总DNA的提取



1~30为表1中的茶树品种编号。

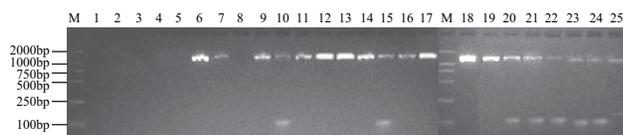
图1 30个茶树品种总DNA电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total genomic DNA from 30 tea cultivars

采用改良的CTAB法从各茶树品种所提取的DNA条带清晰整齐，完整性较好，大小为21kb，可以用于PCR-RFLP反应体系的优化(图1)。

2.2 PCR扩增反应体系的优化

按正交表 $L_{25}(5^3)$ 进行正交试验，所有扩增产物在2.0%凝胶上电泳，结果见图2。结果表明，PCR反应体系12、13、17、18、19都可以扩增出清晰、稳定、可重复的条带。其中，反应体系12所用的试剂的量比反应体系13、17、18、19少。从节约试剂用量、降低实验成本考虑上，选择反应体系12为茶树叶体DNA的最佳PCR扩增反应体系，即在25 μ L反应体系中含有100ng模板DNA、200 μ mol/L dNTPs、1.5mmol/L $MgCl_2$ 、50ng叶绿体引物和3U *Taq*DNA聚合酶。



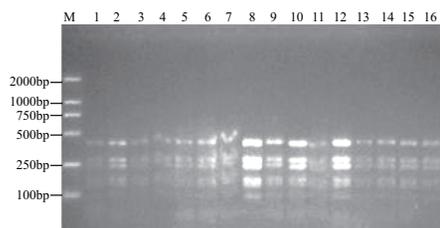
1~25为表2中的试验号；M为DL2000 marker。

图2 $L_{25}(5^3)$ 正交试验电泳结果

Fig.2 Electrophoretic results of the products from $L_{25}(5^3)$ orthogonal array design

2.3 酶切体系的优化

按 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行正交试验，所有酶切产物在2.0%的凝胶上电泳，结果见图3。结果表明，酶切体系8、10、12都出现清晰、稳定的酶切条带。其中，酶切体系8的酶切条带最清晰，所用的试剂的量比酶切体系12少，而且所耗的时间比酶切体系10短。从节约试剂用量、降低试剂成本和缩短实验周期，选择酶切体系8为茶树叶体DNA的最佳酶切体系，即酶切体系中包括6 μ L扩增产物用量，2U限制性内切酶量，1 \times 限制性内切酶buffer，加ddH₂O定容至15 μ L，37 $^{\circ}$ C酶切6h。



1~16为表3中的试验号；M为DL2000 marker。

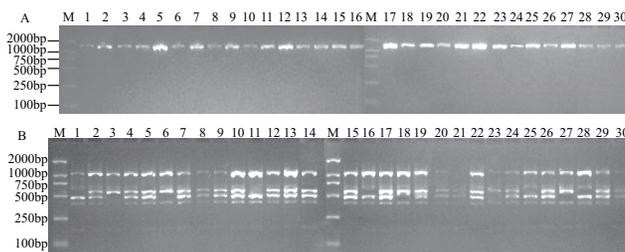
图3 $L_{16}(4^3)$ 正交试验电泳结果

Fig.3 Electrophoretic results of the products from $L_{16}(4^3)$ orthogonal array design

2.4 各样品PCR-RFLP产物扩增结果的检测

采用PCR扩增反应体系12，用trnL-trnF进行对各样品提取的总DNA进行扩增反应，都能扩增出清晰图谱，结

果见图4A。采用酶切体系8，用限制性内切酶*Taq* I对各扩增产物进行酶切消化，都能产生多个酶切位点，而且酶切图谱具有多态性，结果见图4B。说明优化的PCR-RFLP反应体系可直接用于叶绿体DNA的PCR-RFLP分析。



1~30为表1中的茶树品种编号；M为DL2000 marker。

图4 trnL-trnF的扩增图谱(A)和trnL-trnF/*Taq* I酶切结果(B)

Fig.4 Amplified products of primer pairs trnL-trnF of genomic DNA from 30 tea cultivars

3 讨论

PCR-RFLP反应涉及诸多因素，每一个因素的反应参数对整个体系的稳定性和重复性都有影响，确定合适的反应参数是确保茶树叶体DNA的PCR-RFLP分析准确的前提。为了减少试验次数、节约试剂用量、降低实验成本，本研究采用正交设计对各主要影响因素(*Taq*DNA聚合酶、dNTPs浓度、引物浓度、扩增产物量、内切酶酶量、酶切时间)进行优化。在PCR-RFLP的反应体系中，DNA模板质量是保证PCR-RFLP扩增的重要因素，各茶树总DNA样本均能得到良好扩增；*Taq*DNA聚合酶量要适量，小于1U时无扩增条带，大于4U使产生非特异性条带；dNTPs浓度或引物量不易过大，过大会产生非特异性条带；扩增产物量少酶切条带不清晰，过多会影响酶活性；限制性内切酶的量过少达不到酶切的效果，过多会造成浪费；酶切时间过短反应不完全，过长会造成时间浪费。总之，茶树叶体DNA的PCR-RFLP反应体系的优化既要保证扩增图谱的清晰和酶切片段多态性，重复性和稳定性好，又要兼顾节约成本和尽量缩短实验周期的原则。

参考文献：

- [1] BADENES M L, PARFITT D E. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation[J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90(7/8): 1035-1041.
- [2] TSUMURA Y, KAWAHARA T, WICKNESWARI R, et al. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(1/2): 22-29.
- [3] HEINZE B. A data base for PCR primers in the chloroplast genome[DB]. (2001)[2011-10-09]. <http://bfw.ac.at/200/1859.html>.
- [4] PARANI M, RAJESH K, LAKSHMI M, et al. Species identification

- in seven small millet species using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism of *trnS-psbC* gene region[J]. *Genome*, 2001, 44(3): 495-499.
- [5] XU D H, ABE J, KANAZAWA A, et al. Identification of sequence variations by PCR-RFLP and its application to the evaluation of cpDNA diversity in wild and cultivated soybeans[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102(5): 683-688.
- [6] HUANG J C, SUN M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea series* Batatas (Convolvulaceae) as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(7): 1050-1060.
- [7] WU Wei, ZHENG Youliang, CHEN Li, et al. PCR-RFLP analysis of cpDNA and mtDNA in the genus *Houttuynia* in some areas of China[J]. *Hereditas*, 2005, 142: 24-32.
- [8] 甘娜, 谭向红, 陈其兵, 等. 应用RAPD标记和细胞质基因组PCR-RFLP技术研究大花蕙兰的遗传多样性[J]. *园艺学报*, 2006, 33(2): 349-355.
- [9] 崔彬彬, 李云, 金晓洁, 等. 白杨叶绿体和线粒体DNA的多态性及遗传性分析[J]. *北京林业大学学报*, 2006, 28(6): 9-14.
- [10] PANDA S, MARTIN J P, AGUINAGALDE I. Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method[J]. *Genet Res Crop Evol*, 2003, 50(5): 489-495.
- [11] SU Yingjuan, WANG Ting, ZHENG Bo, et al. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA trnL-F noncoding sequences[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 34(2): 323-333.
- [12] CHASE M W, HILLS H H. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies[J]. *Taxon*, 1991, 40(2): 215-220.
- [13] 黄建安, 黄意欢, 罗军武, 等. 茶树基因组的高效提取方法[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 29(5): 402-407.
- [14] PARANI M, LAKSHMI M, ZIEGENHAGEN B, et al. Molecular phylogeny of mangroves VII. PCR-RFLP of *trnS-psbC* and *rbcL* gene regions in 24 mangrove and mangrove-associate species[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(3/4): 454-460.
- [15] TABERLET P, GIELLY L, BOUVET J P. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(5): 1105-1109.