中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）44(3)：251～257（1995）

# 玉米核酸逢機增殖多型性（RAPD）遺傳歧異分析系統之建立[1]

陳　述[2]　胡凱康[3]

**摘要**：本研究以玉米自交系（Mo17）爲材料，以 OPERON A-18爲核酸引子（primer），利用快速省時之空氣溫度循環裝置（Air Thermo-Cycler）進行聚合酵素連鎖反應（Polymerase Chain Reaction, PCR），希望建立玉米多條帶（band）圖譜之核酸逢機增殖多型性（Random Amplified Polymorphic DNA，RAPD）分析系統，以便進行後續之玉米種原遺傳歧異分析。試驗結果認爲 $Mg^{++}$ 濃度爲3mM、核酸引子濃度爲4$\mu$M、融合（annealing）溫度爲36℃、融合時間爲0秒、變溫循環45次爲進行分析之最適條件，且採此分析條件成功地以核酸引子 OPERON A-02於7個玉米自交系（B57、B76、H95、HCBSA、Mo17、R98-13、朴1343）間建立了清晰的多條帶圖譜而偵得彼此間之差異。

**關鍵詞**：玉米、核酸逢機增殖多型性。

Williams *et al.*（1990）首先提出以人工合成的隨意序列作爲核酸引子進行聚合酵素連鎖反應，並將基因型間依此種方式產生之差異稱之爲核酸逢機增殖多型性。隨著研究目的、植物材料、核酸引子組合之不同，進行核酸逢機增殖多型性分析之最適條件亦不同。學者們認爲影響產物專一性的主要因子有二，即 $Mg^{++}$ 濃度與融合條件之設定（Saiki 1989，Innis and Gelfand 1990）。然上述前人研究之探討乃針對單一條帶之專一產物而言，其進行 PCR 試驗的溫度循環部份係均利用金屬加熱的循環裝置來完成，反應時間長達2-6小時。當以空氣爲傳熱媒介之溫度循環裝置（Wittwer *et al.* 1989，1990）發展後，進行 PCR 反應的時間大爲減少，Wittwer 與 Garling（1991）便針對此種裝置之溫度循環條件進行詳盡的探討，Rasmussen 與 Reed（1992）亦針對緩衝液之成分與濃度提出建議，且再次證實 $Mg^{++}$ 濃度與融合條件之設定是影響產物專一性的主要因子，但此時的研究仍以單一條帶之專一產物爲探討對象。本研究以玉米自交系爲材料，利用前述之空氣溫度循環裝置進行 PCR 反應，希望建立多條帶圖譜之核酸逢機增殖多型性分析系統，以作爲日後偵測玉米種原間遺傳歧異及品種鑑定之參考。測試的內容包括 $Mg^{++}$ 濃度、核酸引子濃度、融合之溫度與時間及變溫循環之次數，希望能得到清晰可辨的多條帶圖譜以供判別分析。

## 材料與方法

植物材料爲玉米自交系 Mo17，採用育苗二週後之完全展開葉片以 Doyle *et al.*(1990)之方法抽取 DNA。此法即是以 2g 新鮮葉片剪碎後，於研缽中加入液態氮磨碎，加入 15ml 之 CTAB 抽取

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1797 號。
2. 本所作物種原室助理。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 國立臺灣大學農藝系副教授。

液（2%hexadecyltrimechylammonium bromide〔CTAB〕，1.4M NaCl，20mM EDTA，100 mM Tris-OH，1% Polyvinyl-Polypyrrolidone，0.2% Mercaptoethanol，pH 調整至8.0），於65°C下加熱45分鐘，再以20ml chloroform-isoamyl alcohol（v/v=24/1）萃取一次後以2/3體積（約10ml）之 isopropanol 沈澱 DNA，沈澱物用75%酒精與10mM醋酸銨清洗兩次後溶於1ml TE（10mM Tris-OH，0.1mM EDTA，pH8.0），並以10$\mu$g/ml RNA 分解酵素處理30分鐘後再以酒精沈澱一次，溶解於 TE 緩衝液後即可用來進行 PCR 反應。

本試驗所使用之核酸引子乃自 OPERON 公司所購得，爲人工合成之逢機序列，代號 A-18，長度爲10個核苷酸，G+C%爲60%，序列成分爲5′-AGGTGACCGT-3′。變溫循環裝置採用以熱空氣傳導熱量的 Air Thermo-Cycler（Idaho Technology, model 1605）。

PCR 之條件依三方向進行最佳化；即(1)$Mg^{++}$ 濃度與核酸引子濃度，(2)融合之溫度與時間，(3)變溫循環次數。茲分述如下：

**一、$Mg^{++}$ 濃度與核酸引子濃度**

於無菌操作台上將50ng DNA 模板，0.4單位 Taq 聚合酵素，各0.5mM 的 dNTP，50mM Tris-HCl（pH 8.3），250$\mu$g/ml Bovin Serum Albumin 及各濃度之 $Mg^{++}$ 與核酸引子均勻混合成10$\mu$l 之反應溶液後移入毛細管中，兩端以火封口，再將其置入變溫循環裝置中。反應溶液中之 $Mg^{++}$ 濃度爲1，2，3，5，7mM，核酸引子濃度爲0.5，1，2，4，6$\mu$M，爲一共計25種處理組合之複因子試驗設計。變溫循環之融合（annealing），延伸（extention）與裂解（denaturing）的溫度與時間分別爲36°C，0秒；74°C，45秒及94°C，0秒。變溫循環之次數爲45次。0秒之設定係指當熱風變溫循環裝置內部之空氣到達指定溫度後立即進入下一階段的變溫，並不保持指定溫度而言。

**二、融合溫度與時間**

反應溶液之各項濃度依前一試驗所得之最佳結果配製，但融合之溫度設定爲33°C，36°C與39°C三種，融合之恆溫時間則爲0秒與10秒，共 6 種處理組合。鎂離子與核酸引子濃度則依前一階段之試驗結果而定。

**三、變溫循環次數**

前述二項試驗結束後，以所得之最佳條件進行第三部份的測試，即變溫循環的次數之測試。共分爲30次，45次及60次三種方式進行測試，期望能找出可產生足夠產物的最少循環次數。

增殖產物的偵測係以聚丙醯烯銨（Polyacrylamide Gel Electrophoresis，PAGE）膠片電泳後採銀染方式顯像觀察，即當聚合酵素連鎖反應結束後，將產物（10$\mu$l）由毛細管移入微量離心管中，加入 2$\mu$l 6X 染色液（0.12% Xylene Cyanol FF，0.12% Bromophenol Blue，60mM EDTA，15% Ficoll 400）與等量（12$\mu$l）之飽和 urea，以5.25%T（acrylamide 總濃度）、4.8%C（bis-acrylamide 濃度）之 polyacrylamide 膠體於 Hoefer SE 250 迷你電泳槽70V恆定電壓下進行電泳2個半小時，待 Xylene Cyanol FF 將至底部時停止電泳，再採 Brant *et al.*（1991）所提出之 PAGE 快速銀染法進行顯像。

爲確定上述建立的分析系統，隨意選取由 OPERON 公司購得之代號 A-02的逢機序列作爲核酸引子，其序列爲5′—TGCCGAGCTG—3′，並由國立臺灣大學農藝系作物育種研究室自國內外引進之120個玉米自交系中隨意選挑 7 個自交系作爲試驗材料，利用前述測試後所建立之分析條件探討是否可偵得 7 個自交系間之遺傳岐異。

## 結果與討論

$Mg^{++}$ 濃度與核酸引子濃度之測試結果發現（圖 1），當 $Mg^{++}$濃度爲1mM時，完全沒有產物之出現；當 $Mg^{++}$ 濃度爲2mM時，核酸引子低濃度（0.5，1$\mu$M）之處理組合仍無產物出現，至核酸引子爲2$\mu$M始有少許條帶出現；而當 $Mg^{++}$ 濃度爲3mM時產物便開始大量出現，隨著核酸引子濃度之增加，條帶的數目也隨之增多，於4$\mu$M時之條帶數目最多，但濃度升至6$\mu$M時，條帶的數目又

開始減少；當 $Mg^{++}$ 濃度爲5mM時，清晰條帶出現的數目較 $Mg^{++}$ 濃度爲3mM時少，產物呈模糊分佈（smear）之現象亦較爲嚴重；至 $Mg^{++}$ 濃度爲7mM時甚至出現了所有產物皆呈模糊分佈以致看不見清晰條帶之情況。此結果與前人研究（Saiki 1989，Innis and Gelfand 1990，Rasmussen and Reed 1992）頗爲相符，認爲當 $Mg^{++}$ 濃度過高時會出現許多非專一的產物，因此造成了產物呈模糊分佈之情形，而 $Mg^{++}$ 濃度過低則因產物產量太少而無法偵測出。綜合以上之討論，決定以核酸引子濃度爲4$\mu$M、$Mg^{++}$ 濃度爲3mM之條件進行後續之研究。

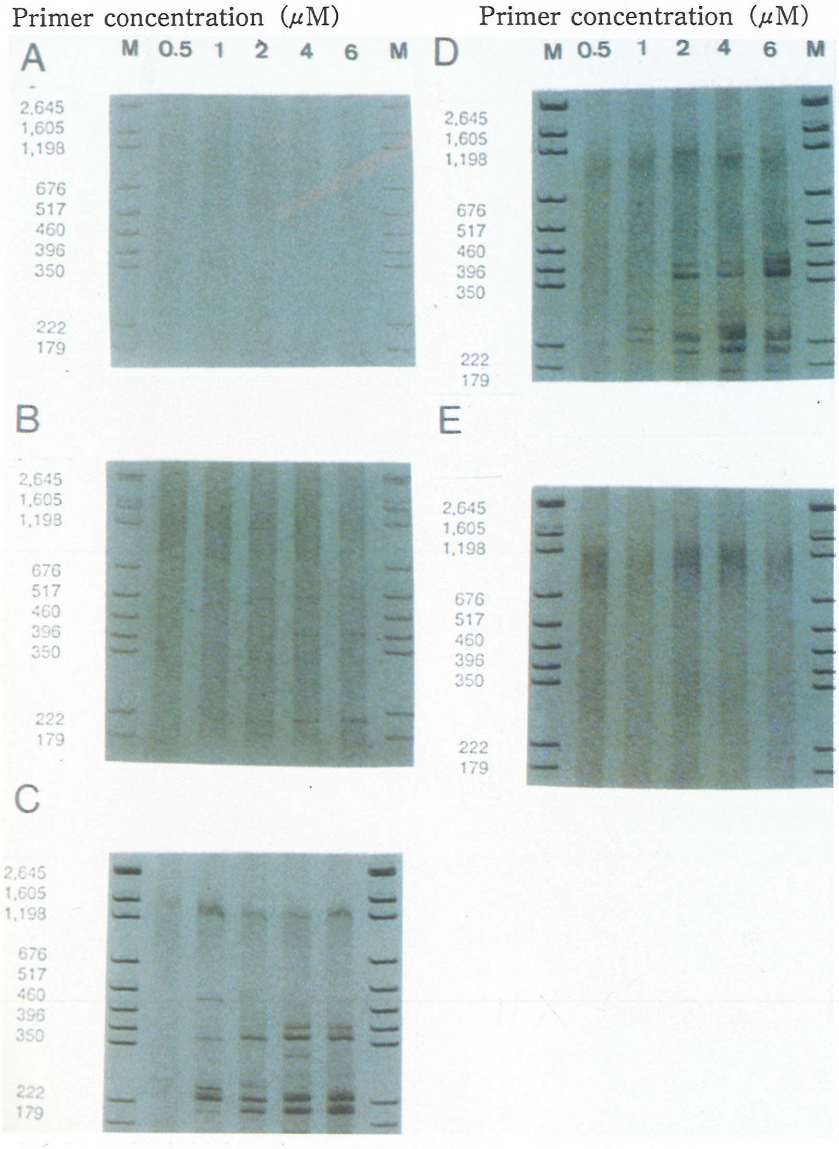



圖1. 聚合酵素連鎖反應 $Mg^{++}$ 濃度與核苷酸引子濃度之試驗結果。

Fig. 1. Effect of $Mg^{++}$ and primer concentration on DNA amplification. Genomic DNA from maize inbred line Mo17 was amplified with primer OPERON A-18 (5′−AGGTGACCGT−3′) using different $Mg^{++}$ concentration 1、2、3、5、7 mM (Fig. 1A、1B、1C、1D、1E) and different primer concentration 0.5、1、2、4、6$\mu$M. M indicated molecular markers. Other amplification conditions were described in Materials and Methods except for annealing temperature 36°C、annealing time 0 second and cycle numbers 45.

融合溫度與時間之測試結果發現（圖 2），39°C時所出現的條帶數目最少，隨著溫度之下降，條帶的數目隨之增加，此結果亦與前人研究（Rasmussen and Reed 1992）之結果相符，認爲當融合溫度愈低時，非專一之產物會增加，因此出現的條帶數目增多。由於33°C時已出現了少許產物呈模糊分佈之現象，因此決定採取36°C進行後續之研究，又比較0秒與10秒之結果發現，其所得條帶之數目與位置差異不大，因此決定採取0秒之處理較爲省時。

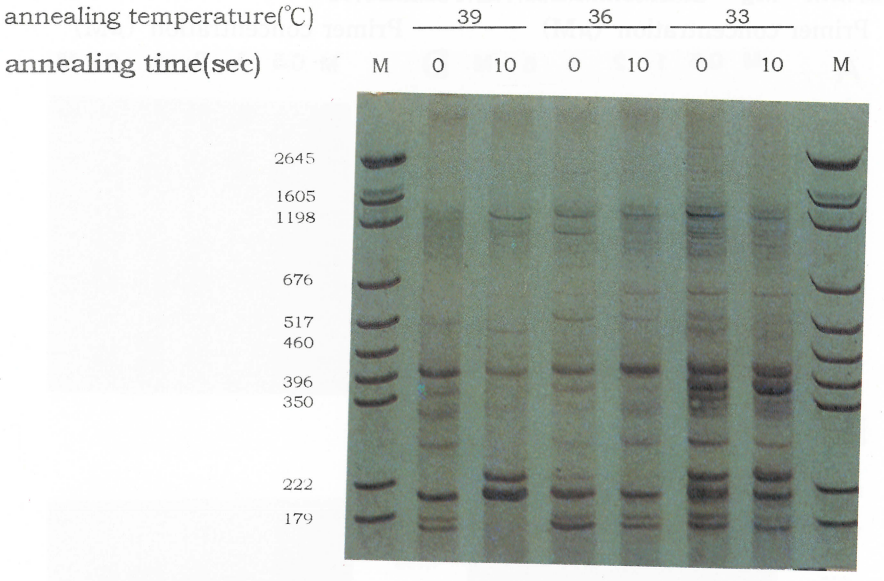



圖2. 聚合酵素連鎖反應融合溫度與融合時間之試驗結果。

Fig. 2. Effect of annealing temperature and time on DNA amplification. Genomic DNA from maize inbred line Mo17 was amplified with primer OPERON A-18 using different annealing temperature 39、36、33°C and different annealing time 0、10 seconds. M indicated molecular markers. Other amplification conditions were described in Materials and Methods except for $Mg^{++}$ concentration 3mM、primer concentration 4$\mu$M and cycle numbers 45.

變溫循環次數之測試結果發現（圖 3），當循環次數爲30時，無法偵測到產物之存在，當循環次數爲45時可偵得清晰的條帶，而循環次數爲60時則發生產物過多以致影響辨認之情形，爲了偵得清晰可辨之條帶並減少溫度循環所耗的時間，決定採取循環次數爲45之處理。

綜合以上針對 $Mg^{++}$ 濃度、核酸引子濃度、融合溫度與時間、變溫循環次數之測試結果，認爲 $Mg^{++}$ 濃度爲3mM、核酸引子濃度爲4$\mu$M、融合條件爲36°C、0秒、循環次數爲45時爲進行玉米自交系核酸逢機增殖多型性分析之最適條件，而利用上述之分析系統，以 OPERON A-02 作爲核酸引子偵測 7 個自交系間遺傳岐異的結果於圖 4 ，各自交系皆可產生清晰可見的多條帶圖譜，且藉此偵得彼此間之遺傳岐異。

本研究以玉米自交系 Mo17爲材料，以OPERON A-18 爲核酸引子詳盡探討了 $Mg^{++}$ 濃度、核酸引子濃度、融合之溫度與時間、變溫循環次數各因子對於建立多條帶圖譜間之互動關係並求得一最適之分析條件，且採此分析條件成功地以 OPERON A-02 於 7 個玉米自交系間建立了清晰的多條帶圖譜而偵得彼此間之差異，希望此分析條件可提供日後欲進行玉米核酸逢機增殖多型性分析之參考，但誠如前人研究所言（Saiki 1989，Innis and Gelfand 1990，Rasmussen and Reed 1992），隨著植物材料、核酸引子序列成份、長度之不同，其所須之分析條件亦不盡相同，因此上述的分析條件

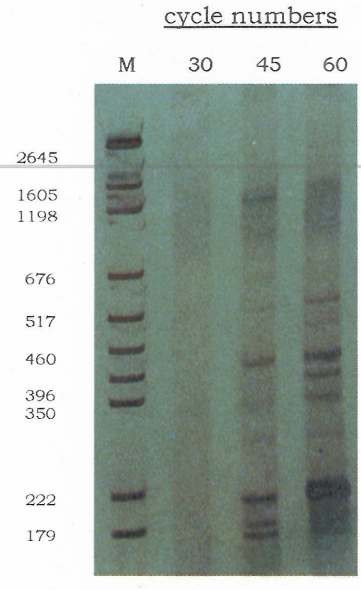



圖3. 聚合酵素連鎖反應變溫循環次數之試驗結果。

Fig. 3. Effect of cycle mumbers on DNA amplification.
Genomic DNA from maize inbred line Mo17 was amplified with primer OPERON A-18 using different cycle numbers 30、45、60. M indicated molecular markers. Other amplification conditions were described in Materials and Methods except for $Mg^{++}$ concentration 3mM、primer concentration 4$\mu$m、annealing temperature 36°C and annealing time 0 second.

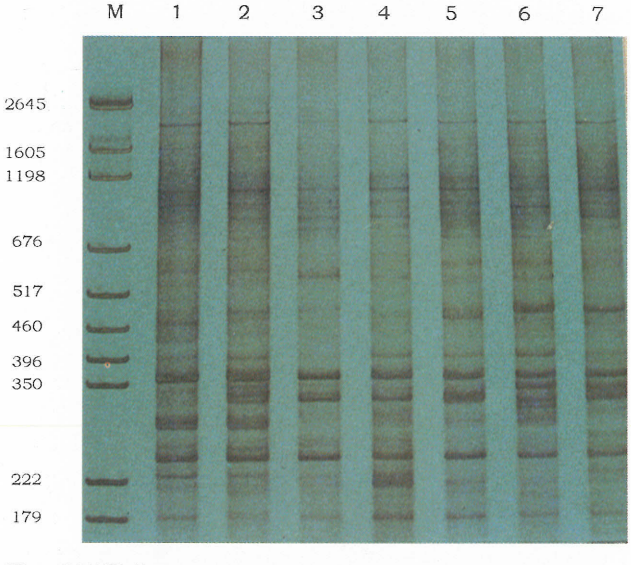



圖4. 以核酸引子 OPERON A-02 偵測7個玉米自交系間多型性之結果。

Fig. 4. Fingerprinting analysis of various nucleic acid templates.
Genomic DNA from maize inbred line B57 (Lane 1)、B76 (Lane 2)、H95 (Lane 3)、HCBSA (Lane 4)、Mo17 (Lane 5)、R98-13 (Lane 6)、Ds1343 (Lane 7) was amplified using primer OPERON A-02 with sequense 5′-TGCCGAGCTG-3′. Amplification conditions were $Mg^{++}$ concentration 3mM、primer concentration 4 $\mu$M、annealing temperature 36°C、annealing time o second and cycle numbers 45. Other conditions were described in Materials and Methods. M indicated molecular markers.

並不是一成不變的，尙須隨著自交系與核酸引子之不同而稍作修飾，以求得最清晰的多條帶圖譜，本研究針對如何修改各因子對於建立多條帶圖譜所造成的影響亦提供了可思考的途徑，此外，對於影響產物專一性之 $Mg^{++}$ 濃度與融合條件而言，建議針對 $Mg^{++}$ 濃度作修改測試較爲省時。

此外，本研究增殖產物之偵測係以 PAGE 電泳配合銀染方式顯像觀察，其結果頗爲清晰。本研究亦曾嘗試利用瓊脂糖膠體（agarose）電泳偵測增殖產物，結果發現所偵得條帶之數目較以 PAGE 電泳所偵得之條帶數目減少許多，且可偵得之條帶間產物呈模糊分布之狀況亦較嚴重。由於本研究係希望建立多條帶圖譜之分析系統，因此建議利用 PAGE 電泳配合銀染方式顯像觀察可得數目較多、較清楚之多條帶圖譜。

## 引用文獻

1. Brant, J. B., C. A. Gustaro, and M. G. Peter. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196 : 80-83.
2. Doyle, J. J., and J. L. Doyle. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 : 13-15.
3. Innis, M. A., and D. H. Gelfand. (1990) Optimization of PCR. In : PCR protocols (ed. by Innis, M.A., Gelfand, D.H.and Sninsky, J.J.). p. 12. Academic Press, New York.
4. Rasmussen, R., and G. Reed. (1992) Optimizing rapid cycle DNA amplification reactions. The Rapid Cyclist 1 : 79-91.
5. Saiki, R. K. (1989) The design and optimization of the PCR. In:PCR technology (ed. by Erlich, H.A.) . PP.7-16. Mistockton Press, New York.
6. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K.J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.
7. Wittwer, C. T., G. C. Fillmore, and D. R. Hillyard. (1989) Automated polymerase chain in capillary tubes with hot air. Nucleic Acids Res. 17 : 4353-4357.
8. Wittwer, C. T., G. C. Fillmore, and D. R. Hillyard. (1990) Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transer to small samples. Anal. Biochem. 186 : 328-331.
9. Wittwer, C. T., and D.J. Garling. (1991) Rapid cycle DNA amplification : time and temperature optimization. Biotechniques 10 : 76-83.

# Optimization of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis System for Maize (*Zea mays* L.) Genetic Diversity[1]

Shu Chen[2] and Kae-Kang Hwu[3]

## Summary

The objective of this study is to optimize Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting analysis system of maize. Various conditions of polymerase chain reaction were tested in a thermo-cycling instrument using maize inbred line Mo17 and a tenbase random primer. The amplification condition optimized for the number of bands was 3mM $Mg^{++}$, 4$\mu$M primer, annealing、extending and denaturing at 36°C、72°C、94°C for 0、45 and 0 second, respectively, for 45 cycles. Differences were detected among maize inbred lines B57、B76、H95、HCBSA、Mo17、R98-13 and Ds1343 with primer OPERON A-02.

Key words : *Zea mays* L., Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

1. Contribution No. 1797 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Research Assistant, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.