

研究报告

A Letter

落叶松总 DNA 的提取及 ISSR-PCR 引物筛选

李红艳¹, 罗旭¹, 王丙锋², 王艳敏¹, 孙海滨¹

1. 黑龙江省林业科学研究所, 哈尔滨, 150081

2. 黑龙江省农业科学院农药应用研究中心, 哈尔滨, 150086

✉ 通讯作者: lihongyan426@yahoo.com.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 77 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0077

收稿日期: 2011 年 05 月 10 日

接受日期: 2011 年 05 月 25 日

发表日期: 2011 年 06 月 17 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

李红艳等, 2011, 落叶松总 DNA 的提取及 ISSR-PCR 引物筛选. 分子植物育种 Vol.9 No.77 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0077)

摘要 以针叶树落叶松当年生新梢为试材, 对落叶松总 DNA 提取方法和 ISSR-PCR 引物筛选进行了试验。改良 CTAB 法可以在较短时间内提取到高纯度的 DNA 产物, 用于 ISSR-PCR 扩增时其稳定性和重复性都很好。利用 50 个 ISSR 引物对来自黑龙江省林口县青山林场的 10 个个体进行 PCR 扩增, 筛选出了多态性丰富、条带清晰且重复性良好的 8 个引物。本研究为落叶松种质资源的评估及遗传多样性分析奠定基础。

关键词 落叶松; DNA 提取; ISSR 分子标记; 引物筛选

DNA Extraction and ISSR-PCR Primer Screening of Larch

Li Hongyan¹, Luo Xu¹, Wang Bingfeng², Wang Yanmin¹, Sun Haibin¹

1. Forestry Research Institute of Heilongjiang Province, Harbin, 150081, P.R. China

2. Research Center of Pesticide Application, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086, P.R. China

✉ Corresponding author, lihongyan426@yahoo.com.cn; ✉ Authors

Abstract The methods of DNA extraction and primer screening of ISSR-PCR has been made using fresh leaves of the larch as experiment materials. The improved CTAB method could obtain pure DNA in short time and more suitable for ISSR-PCR. Fifty ISSR primers were used to screen the suitable primers with 10 samples of Larch in Qingshan Forest Farm of Heilongjiang Province Linkou County, of which 8 ISSR primers with high resolution and multiple polymorphic bands were screened. The present study could be used in the research for evaluation of germplasm resources and analysis of genetic diversity in Larch.

Keywords Larch; DNA extraction; ISSR marker; primer screening

研究背景

落叶松为松科落叶松属的落叶乔木, 是我国东北、内蒙古林区以及华北、西南的高山针叶林的主要森林组成树种, 是东北地区主要三大针叶用材林树种之一。ISSR (Inter-simple Sequence Repeats, 内部简单重复序列) 分子标记技术是 1994 年 Zietkiewicz 等提出的, 该技术具有模板 DNA 用量少, 实验操作简单、快速、高效, 遗传多态性高, 重复性好等特点。已在多种动植物的种质鉴定(孙淑霞等, 2011; He et al., 2007)、遗传多样性分析(李志辉等, 2009; 杨传平等, 2005)、遗传作图和基因定位(马红勃等, 2008; 连莲, 2008)研究方面得到广泛应用。

高质量的总 DNA 及稳定的引物是获取可靠分子标记结果的前提, 虽然已有对落叶松进行分子标记研究的若干报道(那冬晨等, 2006; 张磊等, 2008), 但关于详细研究落叶松 DNA 提取方法的报道较少。因此, 本文拟研究获得提取高质量落叶松总 DNA 的方法并筛选适合 ISSR-PCR 反应体系的引物, 为进一步用 ISSR 技术进行落叶松生产中的品种快速鉴定和种质资源的保护利用奠定基础。

1 结果与分析

1.1 落叶松 DNA 的提取

改良 CTAB 法提取的落叶松基因组 DNA 主带清晰, 无明显拖尾, 未降解, 无 RNA, 点样孔也没

有过多的样品残留(图 1), 说明提取的 DNA 质量较高, 完整性较好, 没有较多的蛋白质等污染。紫外分光光度检测 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.75~1.95 之间, 表明 DNA 样品纯度较高, 可用于 ISSR 引物的筛选分析和其他相关试验。

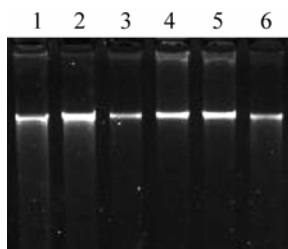


图 1 部分样品基因组 DNA 电泳结果

注: 1~6 号泳道分别为 1~6 号样品

Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA

Note: Lane 1~6: Sample 1 to sample 6

1.2 引物筛选

采用已知的落叶松 ISSR-PCR 的最适反应体系(林萍等, 2005), 从 50 条引物中筛选出 8 条有效引物(表 1), 其扩增条带清晰、稳定、重复性好、多态性丰富。

1.3 样品扩增

采用已知的落叶松 ISSR-PCR 的最适反应体系和筛选出的 8 条引物对林口青山的 1~10 号样品进行扩增, 可见扩增条带清晰可辨, 多态性丰富, 差异明显(图 2), 说明本实验提取的 DNA 和引物筛选的质量较好, 可以进行种质鉴定、遗传多样性分析

表 1 筛选出的 8 条 ISSR 引物

Table 1 Selected eight ISSR primers

引物代码 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	总谱带数 Total	多态性谱带数 Variable
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	7	6
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	8	7
UBC818	CACACACACACACACAG	8	8
UBC826	ACACACACACACACACC	6	4
UBC827	ACACACACACACACACG	5	4
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	7	6
UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	9	9
UBC856	ACACACACACACACACYA	8	8

等方面的研究。

2 讨论

2.1 DNA 提取方法改进

高纯度、高产率的基因组总 DNA 是分子生物学实验关键的第一步。不同的植物, 提取的方法各异, 对于同一植物, 不同实验室所用仪器、试剂不同, 提取方法也不尽相同。在实际应用中, 要进行适当的改进方能获得较纯的产物。DNA 的提取质量受许多因素影响, 在提取基因组 DNA 过程中, 各步骤微小的改变都能产生明显的效果。我们针对落叶松针叶不易磨碎、富含多酚、多糖、色素及蛋白质的特点, 在 CTAB 法的基础上通过增加以下步骤提取总 DNA。①在研磨时加入石英砂, 可使液氮研磨针叶时能够尽可能地磨碎, 保证其充分裂解; ②向提取液中加入抗氧化剂 β -巯基乙醇, 可有效防止提取过程中材料与氧接触, 自发氧化褐变或在多酚氧化酶(PPO)作用下发生酶促褐变, 生成褐色的醌类物质等; ③利用在乙醇的盐溶液中 DNA 的沉淀速度远远大于色素、多糖和酚类等其它物质的原理, 在用无水乙醇沉淀 DNA 时加入低浓度乙酸钠, 这样进一步去除了多糖、色素等其它杂质; ④DNA 沉淀后用 RNase 消化, 排除了 RNA 的干扰。这种方法提取的 DNA 初提物呈白色, 纯化后没有褐化现象, 收率得以提高, 经 0.8%凝胶电泳和紫外分光光度计检测, DNA 的质量和纯度都较好。

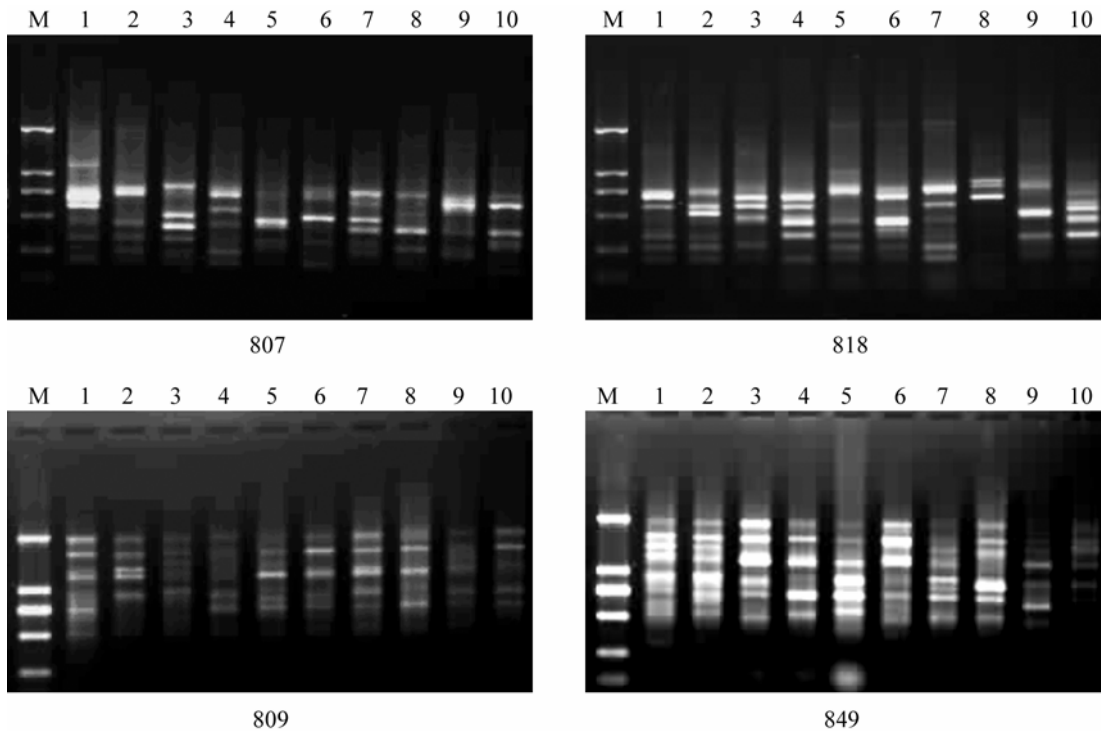


图2 引物 807, 809, 818, 849 对 1~10 号样品扩增结果
Figure 2 Electrophoresis of 1~10 samples by primer 807, 809, 818, 849

2.2 ISSR 引物的筛选

试验以改进 CTAB 法提取的落叶松 DNA 为模板, 对 50 条引物进行了筛选, 共筛选出 8 条条带清晰、多态性丰富、重复性好的引物。通过引物的适合筛选, 可以应用 ISSR 标记技术进行落叶松育种早期鉴定, 为缩短育种年限、提高育种效率提供可能; 可以快速、准确地分析落叶松不同群体之间以及同一群体内不同种质材料的遗传多样性水平和遗传分化程度, 明确其亲缘关系, 从而为落叶松种质资源鉴定、遗传图谱构建、分子标记辅助育种和基因工程等研究领域提供分子生物学依据。

3 材料与方方法

3.1 材料

3.1.1 试验材料

供试材料为落叶松当年生新梢, 2009 年 6 月采自黑龙江省林口县青山林场, 置于冰上带回实验室, 保存于超低温(-70℃)冰箱中。

3.1.2 主要药品及试剂

(1)CTAB 抽提缓冲液: 2% CTAB(m/v), 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1.5 mol/L NaCl, 20

mmol/L EDTA; (2)TE: 10 mmol/L Tris-HCl; 1.0 mmol/L EDTA; (3)氯仿: 异戊醇=24:1; (4) β -巯基乙醇, TAE 电泳缓冲液、琼脂糖、EB 等。所用药品均为国产分析纯。(5)ISSR 引物由上海生工 (Sangon)合成, 用于 ISSR-PCR 反应的 Taq 酶、dNTP 以及 DL 2000 均为 TaKaRa 公司生产。

3.2 方法

3.2.1 DNA 的提取

用改进的 CTAB 法提取材料的总 DNA。具体步骤如下:

①在 1.5 mL 无菌离心管中加 700 μ L CTAB 裂解液和 20 μ L 的 β -巯基乙醇, 65℃浴热 10 min。

②从-70℃冰箱中取出材料后用研钵加液氮和石英砂研磨成粉末状, 向步骤①中的每个离心管中加约 0.04 g, 颠倒均匀, 65℃恒温水浴 30 min, 其间定时温和摇匀。

③溶液冷至室温, 加入 700 μ L 的氯仿-异戊醇 (24:1), 轻轻振荡 10 min。

④12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入氯仿-异戊醇, 重复抽提 2 次。

⑤将上清中加入 3 滴 3 mol/L 醋酸钠和 700 μ L 无水乙醇, 沉淀 30 min, 12000 r/min 离心 15 min, 弃上清。

⑥在沉淀中加入 75%的乙醇 700 μ L 清洗沉淀 2 次, 12 000 r/min 离心 30 s 后轻轻倒去乙醇。

⑦室温自然干燥离心管内的 DNA 沉淀, 加入 50 μ L TE, 使 DNA 充分溶解。

⑧加入 2~3 μ L RNase (10 μ g/ μ L), 5 μ L 10 \times Buffer, 37 $^{\circ}$ C 下 1~2 h。

⑨加入等体积氯仿, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 加入 3 倍体积无水乙醇, 混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。

⑩室温气干, 加入 30 μ L 灭菌的去离子水, 使 DNA 充分溶解。

3.2.2 DNA 质量、纯度检测

取 2 μ L 模板 DNA 在 0.8%的琼脂糖凝胶中, 于 5 V/cm 电压下电泳, 检测总 DNA 的质量。利用 Eppendorf 紫外分光光度计(德国)测定 DNA 纯度和含量, 以 OD_{260} 值计算总 DNA 浓度, 以 OD_{260}/OD_{280} 值判断总 DNA 的纯度。

3.2.3 引物筛选方法

参照哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列合成一系列引物, 用林萍优化的落叶松 ISSR-PCR 反应体系(林萍等, 2005)分别进行扩增, 从中筛选合适的引物。供试的 ISSR 引物序列情况见(表 2)。

表 2 试验所用引物及序列
Table 2 Primers and sequence

引物代码 Pprimers	碱基序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物代码 Primers	碱基序列(5'-3') Sequence (5'-3')
UBC803	ATATATATATATATATC	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC804	TATATATATATATATAA	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
UBC805	TATATATATATATATAC	UBC838	TATATATATATATATARC
UBC807	AGAGAGAGAGAG AGAGT	UBC839	TATATATATATATATARG
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTRA
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTT	UBC849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	UBC852	TCTCTCTCTCTCTCRA
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT
UBC818	CACACACACACACACAG	UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC819	GTGTGTGTG TGTGTGTA	UBC855	ACACACACACACACACYT
UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	UBC856	ACACACACACACACAYA
UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	UBC859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	UBC861	ACCACCACCACCACCACC
UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
UBC826	ACACACACACACACACC	UBC869	GTT GTT GTT GTT GTT GTT
UBC827	ACACACACACACACACG	UBC872	GATAGATAGATAGATA
UBC828	TGTGTG TGTGTGTGTA	UBC873	GACAGACAGACAGACA
UBC829	TGTGTG TGTGTG TGTGC	UBC878	GGATGGATGGATGGAT
UBC833	ATATATATATATATATYG	UBC882	VBVATATATATATATAT
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG

作者贡献


李红艳、罗旭及王丙锋是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 李红艳和王艳敏完成数据分析, 论文初稿的写作; 孙海滨参与实验设计, 试验结果分析; 李红艳是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由黑龙江省自然科学基金项目(C200530)资助。

参考文献

- He X.H., Li Y.R., Guo Y.Z., Ou S.J., and Li R.B., 2007, Identification of closely related mango cultivars by ISSR, *Guihaia J*, 27(1): 44-47
- Li Z.H., Chen Y., Zhang D.L., Yang M.H., Jiang Y., Ding G.J., and Tan X.F., 2009, ISSR analysis of genetic diversity of *Pinus massoniana* on gupeng and langshui nature populations in Guangxi, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 25(16): 116-119 (李志辉, 陈艺, 张冬林, 杨模华, 蒋焱, 丁贵杰, 谭晓风, 2009, 广西马尾松天然林古蓬和浪水种源群体遗传多样性 ISSR 分析, *中国农学通报*, 25(16): 116-119)
- Lian L., 2008, *Betula platyphylla* linkage map ISSR AFLP pseudo-testcross, Thesis for M.S., Northeast Forestry University, Supervisor: Yan X.F., and Wei Z.G., pp.32-35 (连莲, 2008, 白桦 ISSR 和 AFLP 遗传图谱构建, 硕士学位论文文, 东北林业大学, 导师: 阎秀峰, 魏志刚, pp.32-35)
- Lin P., Zhang H.G., and Xie Y.H., 2005, Study on optimization for ISSR reaction system of *Larix* using orthogonal design, *Sengwu Jishu (Biotechnology)*, 15(5): 34-37 (林萍, 张含国, 谢运海, 2005, 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系, *生物技术*, 15(5): 34-37)
- Ma H.B., Qi J.M., Li Y.K., Liang J.X., Wang T., Lan T., Chen S., Tao A.F., Lin L.H., and Wu J.M., 2008, Construction of a molecular genetic linkage map of tobacco based on SRAP and ISSR markers, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 34(11): 1958-1963 (马红勃, 祁建民, 李延坤, 梁景霞, 王涛, 兰涛, 陈顺, 陶爱芬, 林荔辉, 吴建梅, 2008, 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗传连锁图谱构建, *作物学报*, 34(11): 1958-1963)
- Na D.C., Yang C.P., Jiang J., and Xia D.A., 2006, Analysis on the genetic diversity of *Larix gmelinii* provenance by using ISSR markers, *Linye Keji (Forestry Science & Technology)*, 31(1): 1-4 (那冬晨, 杨传平, 姜静, 夏德安, 2006, 利用 ISSR 标记分析兴安落叶松种源的遗传多样性, *林业科技*, 31(1): 1-4)
- Sun S.X., Li J., Chen D., Xie H.J., Tu M.Y., and Jiang G.L., 2011, Molecular identification of peach germplasm by ISSR Markers, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 27(4): 173-177 (孙淑霞, 李靖, 陈栋, 谢红江, 涂美艳, 江国良, 2011, ISSR 分子标记技术在桃品种鉴定中的应用, *中国农学通报*, 27(4): 173-177)
- Yang C.P., Wei L., Jiang J., Liu G.F., and Zhao G.Y., 2005, Analysis of genetic diversity for nineteen populations of *Pinus sibirica* du tour with technique of ISSR, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 33(1): 1-3 (杨传平, 魏利, 姜静, 刘桂丰, 赵光仪, 2005, 应用 ISSR-PCR 对西伯利亚红松 19 个种源的遗传多样性分析, *东北林业大学学报*, 33(1): 1-3)
- Zhang L., Zhang H.G., Li X.F., Jiang J., and Wei Z.G., 2008, Research on ISSR identification technology of larch species and clones, *Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research)*, 28(2): 216-221 (张磊, 张含国, 李雪峰, 姜静, 魏志刚, 2008, 落叶松种间及无性系间 ISSR 鉴别技术的研究, *植物研究*, 28(2): 216-221)
- Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20(2): 176-183

 5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>