



李婷, 徐榕青, 林文津, 张亚敏. 福建道地药材枇杷叶ISSR反应体系的建立与优化[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(4): 315-319

福建道地药材枇杷叶ISSR反应体系的建立与优化

Establishment and Optimization of ISSR Reaction System for Eriobotryae Folium from Fujian

投稿时间: 2011-06-28 最后修改时间: 2011-12-27

DOI:

中文关键词: [枇杷叶](#) [简单重复间隔序列](#) [反应体系](#) [优化](#)

英文关键词: [Eriobotryae Folium](#) [ISSR](#) [reaction system](#) [optimization](#)

基金项目: 福建省卫生厅中医药科研课题(WZZd0902)

作者	单位	E-mail
李婷 , 徐榕青 [*] , 林文津 , 张亚敏	福建省医学科学研究院, 福建省医学测试重点实验室, 福州 350001	422503946@qq.com

摘要点击次数: 155

全文下载次数: 234

中文摘要:

目的 建立适于福建产枇杷叶的ISSR分析的PCR反应体系, 筛选适宜引物, 并确定最佳退火温度。方法 改良的CTAB法提取嫩叶中DNA, 通过单因子实验分别找出合适的ISSR-PCR反应条件, 利用梯度PCR确定引物最佳退火温度。结果 适于枇杷叶ISSR最佳的反应体系为: 总反应体积为25 μL , 其中模板DNA 60 ng, Taq DNA聚合酶0.9 U, 引物浓度 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP浓度 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10\times\text{Buffer}$ (含 Mg^{2+}) $2.5 \mu\text{L}$, 加入灭菌去离子水至25 μL 。扩增程序为: 预变性 94°C 7 min, 变性 94°C 1 min, 复性最佳退火温度1 min, 延伸 72°C 1 min, 35个循环, 72°C 延伸10 min。在100条引物中筛选出14条扩增条带清晰且条带数目较多的引物, 最佳退火温度为 $48\sim 58^\circ\text{C}$ (因引物不同而异)。结论 建立了枇杷叶ISSR最佳反应体系, 筛选出14条引物并确定了最佳退火温度, 为应用ISSR技术鉴定枇杷叶的种质资源和遗传多样性研究奠定了基础。

英文摘要:

OBJECTIVE To establish and optimize the ISSR-PCR reaction system for Eriobotryae Folium; to screen the suitable primers and determine their optimal annealing temperatures. METHODS Genomic DNA was extracted by CTAB method from Eriobotrya leaves. The main influencing elements in different levels were tested by single factor experiment. The gradient PCR was used to determine the optimal annealing temperatures of each selected primer. RESULTS The optimized PCR reaction system: total response volume 25 μL , including 60 ng template DNA, DNA polymerases dosage for 0.9 U, $10\times\text{Buffer}$ (including Mg^{2+}) for 2.5 μL , sterilization deionized water to 25 μL . The optimal amplified procedure was as follows: after a pre-denaturing of 7 min at 94°C , 35 cycles were performed with denaturing of 1 min at 94°C , annealing of 1 min according to denaturing temperature of different primers, extension of 1 min at 72°C , a final extension step of 10 min at 72°C . Forteen primers which showed clearer and more bands from 100 primers were selected and the optimal annealing temperatures were $48\sim 58^\circ\text{C}$ (changed among different primers). CONCLUSION The stable and reproducible optimal ISSR-PCR reaction system and suitable annealing temperatures of 14 selected primers from 100 are established for Eriobotryae Folium which had laid the good foundation for ISSR analysis on studies of germplasm resources identification and genetic diversity.

版权所有 © 2008 中国现代应用药学杂志社 浙ICP备12047155号

编辑出版：中国现代应用药学杂志社(杭州市中河中路250号改革月报大楼10楼)

电话：0571-87297398 传真：0571-87245809 电子信箱：xdyd@chinajournal.net.cn

技术支持：北京勤云科技发展有限公司