

龙牙百合DNA的提取及ISSR-PCR体系的建立

李恩香, 贾文杰, 蒋满英, 赖士杰, 杨莉萍, 杨柏芸*

(1. 南昌大学生命科学学院, 江西南昌330031; 2. 南昌大学理学院, 江西南昌330031)

摘要 [目的] 研究龙牙百合总DNA的提取方法, 建立优化的ISSR-PCR反应体系和程序, 为种质资源研究奠定基础。[方法] 利用改良的CTAB法提取龙牙百合基因组DNA, 并对影响ISSR扩增反应的各种因素进行优化。[结果] 获得了高质量的龙牙百合基因组DNA; 优化的龙牙百合ISSR-PCR反应体系为: 25 μ l 体系中含60 ng 模板DNA, 0.4 μ mol/L ISSR引物, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U Taq 酶, 0.2 mmol/L dNTPs; 反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性5 min; 然后进行40个循环: 94 $^{\circ}C$ 变性50 s, 52 $^{\circ}C$ 复性45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸75 s; 循环结束后72 $^{\circ}C$ 延伸8 min。[结论] 建立了适合于龙牙百合的ISSR-PCR反应体系及程序, 为种质资源研究奠定了基础。

关键词 龙牙百合; DNA提取; ISSR-PCR

中图分类号 S682.2+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-14907-02

DNA Extraction from *Lilium brownii* var. *viridulum* and the Establishment of ISSR PCR System

LI En-xiang et al (School of Life Science, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract [Objective] This research aimed to study the extraction methods of total DNA from *Lilium brownii* var. *viridulum*, establish the optimized ISSR-PCR reaction system and procedure and lay the foundation for the germplasm resources study. [Method] The genomic DNA was extracted from *L. brownii* var. *viridulum* by using improved CTAB method. Different factors that affected ISSR amplification reaction were optimized. [Result] High quality genomic DNA was obtained from *L. brownii* var. *viridulum*. The optimized ISSR-PCR reaction system for *L. brownii* var. *viridulum* was as follows: 60 ng DNA template, 0.4 μ mol/L ISSR primer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U Taq DNA polymerase and 0.2 mmol/L dNTPs in 25 μ l system. The reaction procedure was as follows: pre-denaturing at 94 $^{\circ}C$ for 5 min; 40 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}C$ for 50 s, annealing at 52 $^{\circ}C$ for 45 s and extending at 72 $^{\circ}C$ for 75 s; extending at 72 $^{\circ}C$ for 8 min after the cycles. [Conclusion] The optimal ISSR-PCR reaction system and procedure for *L. brownii* var. *viridulum* were established and laid the foundation for germplasm resources study.

Key words *Lilium brownii* var. *viridulum*; DNA extraction; ISSR-PCR

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本植物,具有很高的食用、药用和观赏价值^[1-2]。百合含有糖类、蛋白质、脂类、钾、钙、磷等多种营养成分和矿质元素,具有润肺止咳、清脾除湿、补中益气、清心安神以及增强免疫力和抗癌等作用^[3-4]。全世界约有百合属植物115种,原产于我国具有悠久历史的有35种^[5]。百合在我国具有悠久的栽培历史,主要优良品种有兰洲百合、宜兴百合、龙牙百合、湖洲百合等^[6],其中龙牙百合(*L. brownii* var. *viridulum* Baker)是极为名贵的一种,为野百合(*Lilium brownii*)的变种,亦称“湖南百合”。龙牙百合主产于湖南邵阳和江西万载、泰和等地^[7],是这些地区出口创汇的重要产品。龙牙百合的栽培历史悠久,从而产生出一些新的品系,如高片、中片和柳叶等^[8]。因此,利用分子生物学手段对龙牙百合进行种质资源鉴定是非常必要的。该研究旨在为龙牙百合的种质资源鉴定、不同百合间的遗传分析及根据遗传变异进行新品种选育提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 以栽培于江西省丰城县罗山的龙牙百合为试材,共19个个体。摘取植株的鲜嫩叶片,放入封口袋中,硅胶干燥后备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA的提取及检测。采用改良的CTAB法提取基因组DNA,具体步骤为:取0.05 g硅胶干燥的叶片,置于1.5 ml离心管中加液氮研磨成粉末,加入65 $^{\circ}C$ 预热的0.8 ml 2 \times CTAB缓冲液(pH值8.0)、10 μ l - 巯基乙醇,轻轻摇动使溶液

分散均匀,转入5 ml离心管中,再加入0.8 ml 2 \times CTAB缓冲液,65 $^{\circ}C$ 水浴20 min,水浴过程中每隔5 min轻轻摇动;冷却至室温,加等体积的氯仿-异戊醇(24:1),混合均匀,12 000 r/min离心10 min;吸取上层水相转入新的5 ml离心管,加等体积的氯仿-异戊醇(24:1)再抽提和离心1次;取上清液,加入0.5体积的5 mol/L NaCl,混匀,加入等体积预冷的异丙醇,轻轻摇匀,放置2 h或过夜;10 000 r/min离心10 min,使DNA附着在离心管管底,弃水相;加70%乙醇洗涤2次,用无水乙醇洗涤1次,风干;用适量的0.1 \times TE溶解DNA, -20 $^{\circ}C$ 长期保存备用。通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计对DNA进行检测。

1.2.2 ISSR-PCR体系的优化。引物参照哥伦比亚大学提供的序列(UBC 801-UBC 900),由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物使用浓度为5 μ mol/L。经初步筛选,以引物UBC 836[序列为(AG)₈YA, T_m = 53.88]作为试验引物。Taq DNA聚合酶、dNTPs及相应缓冲液购自上海博彩生物有限公司。反应体系为25 μ l,其中10 \times buffer 2.5 μ l,引物浓度为0.4 μ mol/L,为确定PCR反应中其他因素(Taq酶、DNA模板、 Mg^{2+} 和dNTPs)的最佳水平,采用正交设计L₁₆(4⁴)对龙牙百合ISSR-PCR反应体系的4因素4水平进行优化设计,见表1。

ISSR扩增的最初反应程序为:94 $^{\circ}C$ 预变性5 min;然后进行45个循环:94 $^{\circ}C$ 变性50 s, 52 $^{\circ}C$ 复性45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸75 s;循环结束后72 $^{\circ}C$ 延伸8 min。筛选出优化的体系后,再进行温度梯度(50、51、52、53、54 $^{\circ}C$)试验和循环次数(35、40、45次)的调整。PCR扩增在PE2700 PCR仪上完成。PCR扩增产物用0.1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 DNA的提取结果 图1为龙牙百合基因组DNA的琼脂糖凝胶电泳检测结果。由图1可知,DNA主带清晰明亮,无明显的拖尾现象,点样孔基本无滞留。紫外分光光度计检

基金项目 江西省教育厅项目(GJ08059)。

作者简介 李恩香(1970-),男,广西桂林人,博士,副教授,从事植物学研究工作。*通讯作者。

鸣谢 感谢江西省分子生物学与生物化学重点实验室和江西省生物学实验教学示范中心给予的帮助。

收稿日期 2008-09-25

测结果显示,所提取的19份龙牙百合基因组DNA的 OD_{260}/OD_{280} 介于1.7~1.9之间。这些结果表明,采用改良CTAB法可以获得高质量的龙牙百合基因组DNA。

表1 龙牙百合ISSR PCR 正交试验设计

Table 1 The orthogonal test design for ISSR PCR of *L. brownii* var. *viridulum*

编号 Code	Taq DNA polymerase U	DNA template ng	Mg ²⁺ mmol/L	dNTPs mmol/L
1	1.0	30	1.5	0.12
2	1.0	60	2.0	0.20
3	1.0	90	2.5	0.32
4	1.0	120	3.0	0.40
5	1.2	30	1.5	0.12
6	1.2	60	2.0	0.20
7	1.2	90	2.5	0.32
8	1.2	120	3.0	0.40
9	1.5	30	1.5	0.12
10	1.5	60	2.0	0.20
11	1.5	90	2.5	0.32
12	1.5	120	3.0	0.40
13	1.8	30	1.5	0.12
14	1.8	60	2.0	0.20
15	1.8	90	2.0	0.32
16	1.8	120	3.0	0.40

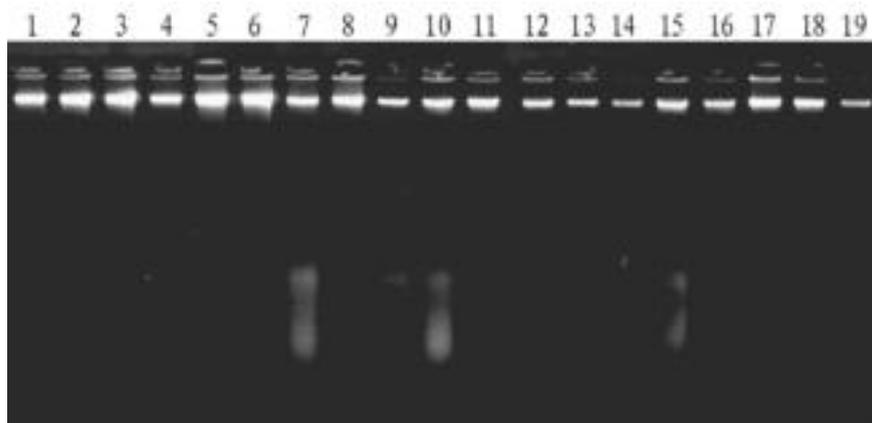


图1 龙牙百合基因组DNA电泳结果

Fig.1 Electrophoretogram of genomic DNA from *L. brownii*

2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交优化 试验表明,ISSR-PCR 反应体系(25 μ l)中各成分分别为ddH₂O 15.7 μ l,10 \times buffer 2.5 μ l,MgCl₂ 2 μ l (2.0 mmol/L), dNTPs 0.5 μ l (0.2 mmol/L), Primer 2 μ l (0.4 μ mol/L), DNA 2 μ l (60 ng/25 μ l), Taq DNA polymerase 0.3 μ l (1.5 U)时,所获取的条带最清晰,重复性好,条带较多并有一定的多态性。其余体系中出现了不同程度的拖带、条带不清晰或条带太少、无多态性现象。

2.3 退火温度及循环次数对ISSR-PCR 扩增的影响 通过梯度试验发现,当退火温度为52 $^{\circ}$ C、循环次数为40次时,PCR 扩增结果最佳。此时,扩增产物量大,电泳条带清晰,非特异性扩增少。该研究得到的优化反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后进行40个循环:94 $^{\circ}$ C 变性50 s,52 $^{\circ}$ C 复性45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸75 s;循环结束后72 $^{\circ}$ C 延伸8 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

2.4 ISSR-PCR 体系稳定性的检测结果 为了进一步检测所建立的ISSR-PCR 反应体系的稳定性,利用优化的体系对提取的19份龙牙百合DNA 样品进行了PCR 扩增,结果见图2。由图2可知,优化后的体系反应稳定,条带清晰,适合运用ISSR 分子标记技术对龙牙百合进行种质资源鉴定,以及

不同百合间的分类研究。

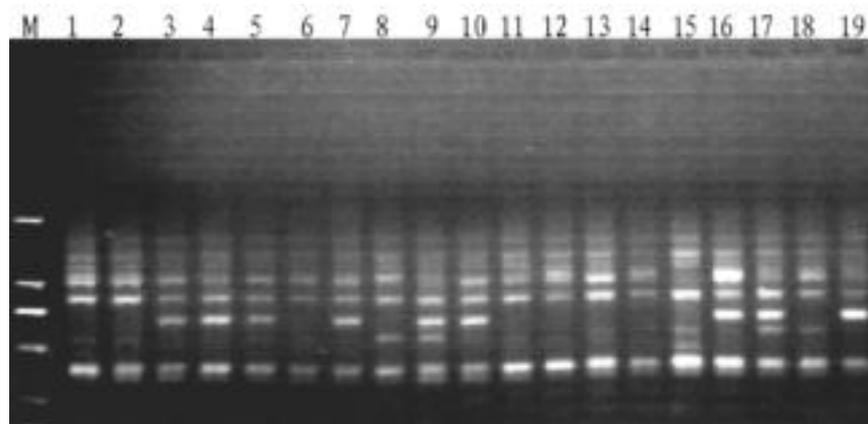


图2 引物UBC 836 对19份龙牙百合DNA 扩增结果

Fig.2 The amplification results of 19 DNA samples from *L. brownii* with primer UBC 836

3 结论与讨论

(1) 高质量的DNA 是进行分子标记研究的基础,直接影响PCR 扩增结果。该研究采用改良的CTAB 法提取基因组DNA,针对龙牙百合植物叶片的特点,进行了一些改进,如在获得DNA 沉淀的过程中(“1.2.1”中的)加高盐除去多糖^[9],从而获得高质量的DNA。

(2) 除DNA 模板外,影响ISSR-PCR 反应体系的因素很多,如Taq 酶的活性、Mg²⁺、dNIP 及引物浓度等,而且这些因素之间存在相互作用。Taq 酶浓度过低,不能获得足够的扩增产物,而过高又容易出现非特异性扩增;Taq 酶依赖于Mg²⁺,dNIP 的浓度直接影响反应中起重要作用的Mg²⁺ 浓度;模板或引物的浓度过高或过低都不利于引物与模板的结合。该研究没有对引物的浓度进行梯度试验,因为引物浓度试验已经在其他多种植物的ISSR-PCR 中进行了研究。此外,由于不同厂家、不同批次生产的Taq 酶活性存在差异,或者由于长时间的放置降低了其活性,因此,在使用不同厂家或不同批次的Taq 酶时应进行预试验和针对性的调整。

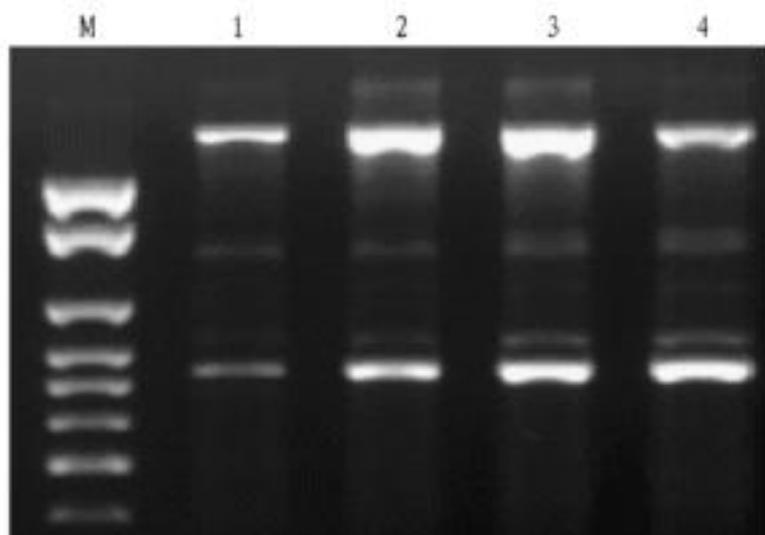
(3) 反应程序也是影响ISSR-PCR 结果的重要因素,其中突出表现在退火温度和循环次数上。退火温度决定了引物能否正确地结合到模板上,退火温度过低容易产生非特异性结合,过高不利于引物与模板结合。因此,扩增的退火温度可根据引物的T_m值进行大致确定,不同引物的退火温度不同,但一般都稍低于其T_m值。该研究所用引物UBC836 的T_m值为53.88,退火温度为52 $^{\circ}$ C。现在很多PCR 仪均可进行温度梯度扩增,这对于确定不同引物的退火温度是非常方便的。扩增的循环次数是影响扩增结果又一重要因素。循环次数少,扩增的产物就少;循环次数多,扩增的产物多,但非特异性扩增也多,易出现拖带现象。为了确保有足够的扩增产物,该研究初期使用的扩增循环次数为45次,后经梯度试验调整为40个循环。

(4) 该研究探索了龙牙百合植物基因组DNA 的提取方法,获得了高质量的DNA;同时通过正交试验,建立了适合龙牙百合ISSR-PCR 的反应体系和反应程序。这为龙牙百合种质资源的鉴定、百合属内种间关系的研究提供了科学依据,也为选育优良的百合品种创造了条件。

参考文献

- [1] 赵祥云,王树栋,陈新露.百合[M].北京:中国农业出版社,2000.
[2] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养[M].北京:中国植物出版社,1991.

DNA 聚合酶在所设置的浓度范围内均有良好的扩增效果。浓度较低时,效率降低,延伸不完全,扩增产物较少,可能是由于 Mg^{2+} 浓度恒定时, Taq 酶减少会使 Mg^{2+} 对酶的激活能力相对减弱造成的。因此,浓度过低可能不产生扩增产物;浓度过高时,可能非特异性会增加,出现弥散。该试验中, Taq 酶的最适用量为 0.2μ 。



注:泳道1~4的 Taq 酶用量依次为 $0.1, 0.2, 0.4, 0.8 \mu$ 。

Note: The amount of Taq polymerase in lane 1 - 4 are $0.1, 0.2, 0.4, 0.8 \mu$, respectively.

图5 不同 Taq 酶浓度的 RAPD-PCR 反应体系的扩增结果

Fig 5 The amplification results of RAPD-PCR system with different concentrations of Taq polymerase

百合 RAPD-PCR 反应最适的反应体系为 20μ 的反应体系中含模板 DNA 2.0μ , Mg^{2+} 2.0μ , dNTP 1.2μ , 引物 2.0μ , Taq DNA 聚合酶 0.2μ 。

3 结论与讨论

(1) 该试验和有关资料均表明^[2-4], Mg^{2+} 浓度过高或过低均会影响扩增结果。 Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, Mg^{2+} 浓度过低,对 Taq 酶的活化作用不够,过高又会抑制该酶的活性。 Mg^{2+} 除直接影响 PCR 的特异性和效率外,还有利于引物和模板的结合及增加引物和模板结合后的稳定性,这对于使用非特异性引物的 RAPD 反应来讲, Mg^{2+} 显得更重要。但是反应体系中所示 Mg^{2+} 浓度并不一定是参加反应的游离 Mg^{2+} 浓度,因为反应体系中 DNA 模板的浓度、纯度、引物、dNTP 均会影响 Mg^{2+} 浓度。该试验中 Mg^{2+} 的最适浓度为 2.5 mmol/L 。

(上接第14908页)

- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 53 - 63.
- [4] 丁贵平, 袁建兴, 李利东, 等. 药食同源的百合[J]. 中国食物与营养, 2004(9): 51 - 52.
- [5] 陈心启, 梁松筠, 许介眉, 等. Liliaceae A.L. Jussieu[C]// 吴征镒, Raven P H. Flora of China. 北京: 科学出版社, 圣路易斯: 密苏里植物园出版社, 2000: 135.
- [6] 罗丽萍, 杨柏云, 蔡奇英, 等. 龙牙百合热处理及茎尖培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2005(1): 72 - 73, 104.
- [7] 童巧珍, 周日宝, 高彦宁, 等. 龙芽百合质量的研究[J]. 中医药导报, 2003, 12(6): 1 - 2, 10.
- [8] 李润根, 杨世平, 王小文. 万载百合及其栽培技术[J]. 中国蔬菜, 1995

dNTP 是作为 RAPD 扩增的反应底物, 它的用量直接影响扩增产物的多少、扩增特异性的高低以及合成的忠实性。dNTP 浓度过低会影响合成效率, 直接影响扩增产物的浓度, 甚至会因 dNTP 过早耗尽而使产物单链化而影响扩增效果; dNTP 浓度过高, 容易与 Mg^{2+} 结合, 降低 Mg^{2+} 浓度, 抑制 Taq 酶活性, 会使核苷酸错误掺入, 引起碱基的错配, 产生新的条带。 Taq 酶的活性与用量是关系到扩增能否正常进行的重要因素, 不同的生产厂家对酶浓度的标定可能不同, 因此在实验的过程中, 应针对所用的 Taq 酶确定用量。 Taq 酶浓度过低导致效率降低, 延伸不完全, 扩增产物减少; 使用高浓度的 Taq 酶, 不仅造成经济上的浪费, 而且容易产生非特异性扩增产物的积累, 影响实验结果^[5]。在该试验中, 从试验效果和经济角度考虑, Taq 酶适宜用量为 $1U$ 。

(2) 单因素逐项优化其表达方式直观, 能从几个水平中轻易择优; 但另一方面也忽略了各因素的相互作用。该研究单因素优化的结果与笔者之前所做的正交设计所得的结果是一致的, 也说明了单因素逐项优化设计的可行性。在反应条件一旦确定后, 整个试验过程中就应保持不变, 同时还应注意尽可能地使用同一厂家的药剂和同一 PCR 仪等设备, 以提高分析结果的重复性和可靠程度。

参考文献

- [1] 邹喻苹. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16 - 17.
- [2] 王跃进, LAMIKANRA OLUSOLA. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究[J]. 农业与生物技术学报, 1997, 5(4): 387 - 391.
- [3] 张彦萍, 刘海河. 西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 51 - 53.
- [4] 宋国立, 崔荣霞, 王坤坡. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 273 - 275.
- [5] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 1999: 35 - 36.
- [6] 刘湘丹, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合鳞叶总 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 12 - 14.
- [7] WANG S X, LIU Y, GENG X L, et al. Optimization of RAPD reaction system on genomic DNA of *Agropyre chaxingu* Huang[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 31 - 34.
- [8] 韩凌, 雷家军. 卷丹百合 RAPD-PCR 反应体系的正交优化[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 87 - 88.
- [9] YAN MM, WEI G C, PAN X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant—Modified CTAB method[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 39 - 41.
- [10] SHI K M, ZHOU Y F. An improved method of extracting *Atenisia abrotanum* Genomic DNA[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 36 - 38.
- [11] 刘湘丹, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合鳞叶总 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 12 - 14.
- [12] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tachiderms fasciatus* Heckel[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 37 - 39, 95.
- [13] 邓明文, 吴祝华, 席梦利, 等. 岷江百合 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 林业科技开发, 2007, 21(6): 6.