

# 适于 ISSR-PCR 扩增的百合基因组 DNA 的提取

陈名红<sup>1,2</sup>, 李玉<sup>1</sup>, 刘多<sup>1</sup>, 熊华斌<sup>1</sup>, 李成云<sup>2</sup>

(1. 云南民族大学 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650031;

2. 云南农业大学 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:**为了方便稳定地获得适合于 ISSR-PCR 扩增的高质量百合基因组 DNA, 以卷丹百合为试材, 在传统的 CTAB 法基础上进行了改良和优化, 筛选出较理想的 DNA 提取方法。结果表明: 用改良 CTAB 法提取的百合基因组 DNA 电泳条带清晰, 无降解现象,  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.7~2.0 之间, 用于 ISSR-PCR 扩增时其稳定性和可重复性都很好, 说明 DNA 纯度和产率完全满足百合 ISSR-PCR 扩增分析的要求, 为百合属植物遗传多样性分析和品种分子鉴别等研究奠定了基础。

**关键词:**百合; 基因组 DNA; DNA 提取; ISSR

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0108-03

百合 (*Lilium* spp.) 是单子叶植物亚纲百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 植物的总称, 为多年生鳞茎草本植物, 是一种集药用、食用及观赏于一体的花卉<sup>[1]</sup>。近年来, 随着人们对百合药食及观赏价值认识的不断深入, 市场需求日益增加, 百合已由原来的野生或零星种植逐渐发展成为目前的规模化种植格局。ISSR 是由 Ziekiewicz E 等<sup>[2]</sup>于 1994 年基于 SSR 标记创建的一种新型分子标记技术, 其基本原理就是在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1~4 个随机核苷酸作为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增, 然后进行电泳、染色, 根据谱带的有无及相对位置差异来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性。ISSR 技术具有重复性高、稳定性好、操作简便快捷、成本较低、模板 DNA 用量小、安全性较高等诸多优点而被广泛应用于植物遗传多样性、系统发育、品种鉴定、基因定位、遗传作图等研究中<sup>[3-6]</sup>。在利用 ISSR 技术分析样品间多态性的时候通常要求提取一定数量和高质量的模板 DNA, 尤其是在进行群体遗传学研究中需要的研究样本量大, 除了对模板 DNA 的质量和数量有要求外, 还需要提取方法简便易行<sup>[7]</sup>。

目前植物基因组 DNA 的提取方法有很多, 不同的植物材料所适合的提取方法也不同<sup>[8]</sup>。现以改进的

CTAB 法对百合基因组 DNA 进行了提取, 并且用引物 UBC811 进行了基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增, 以期找到一种适合于百合 ISSR-PCR 扩增的提取方法, 为百合属遗传多样性分析、品种鉴别、群体遗传结构分析、亲缘关系和系统发育等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以栽培于云南民族大学民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室的卷丹百合 (*Lilium tigrinum*) 为试验材料, 共 8 个材料。采取新鲜幼嫩无病虫害的叶片, 放入塑料封口袋, 硅胶干燥后备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA, 具体步骤为: 取 0.2 g 硅胶干燥的叶片, 在液氮中迅速研磨成细粉末后转入 1.5 mL 离心管中; 加入 600  $\mu$ L 65℃ 预热的 2×CTAB 提取缓冲液 (2% CTAB, W/V, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2%  $\beta$ -巯基乙醇 V/V), 迅速混匀, 置于 65℃ 水浴 1 h, 期间每隔几分钟摇动 1 次; 冷却, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 振荡混匀 10 min; 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入 3/4 体积的异丙醇, 混匀后 -20℃ 静置 30 min; 10 000 r/min 离心 5 min, 70% 乙醇洗 3 次; 自然风干后加 30~50  $\mu$ L 1×TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA), 室温静置 2 h, 使 DNA 充分溶解; 每管内加 1 mg/mL 的 RNA 酶 1  $\mu$ L, 37℃ 下消化 30 min, 65℃ 水浴处理 10 min 使酶失活, -20℃ 保存备用。

**第一作者简介:**陈名红 (1974-), 男, 土家族, 在读博士, 副教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: cmhkm@yahoo.com.cn.

**责任作者:**李成云 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: li.chengyun@gmail.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (30860161); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011Y212)。

**收稿日期:**2012-08-20

1.2.2 DNA 纯度和浓度检测 琼脂糖凝胶电泳检测。取 2  $\mu\text{L}$  DNA 样品加 1  $\mu\text{L}$  Gold View 核酸染料,在 1.0% 琼脂糖凝胶上,于 3~5 V/cm 的电场中电泳 1 h,在凝胶成像系统中观察、照相。紫外分光比色检测:以 ddH<sub>2</sub>O 为对照,测定 DNA 样品在 260 和 280 nm 波长下的 OD 值,并计算二者的比值。

1.2.3 ISSR-PCR 扩增 引物参照哥伦比亚大学提供的序列(UBC 801~900),由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物使用浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ 。经初步筛选,以引物 UBC 811(序列为 5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3')作为引物。扩增体系: Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 引物浓度 0.8  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 DNA 浓度 1.5 ng/ $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 后于 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 51 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 35 个循环, 再在 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min, 后于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.4 ISSR-PCR 扩增产物的检测 取 3  $\mu\text{L}$  扩增产物加 1  $\mu\text{L}$  Gold View 核酸染料,在 1.5% 琼脂糖凝胶上,于 3~5 V/cm 的电场中电泳 1 h,在凝胶成像系统中观察、照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 质量

图 1 为卷丹百合总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果。由图 1 可知,采用该试验中改良的 CTAB 法提取的总 DNA 质量好,在 1% 的琼脂糖胶电泳上主带清晰明亮, RNA 去除干净,无降解现象或降解很少,分子量大于 23 kb,且质量比较稳定,所有样品的带除浓度有所差别外,带型基本整齐一致。

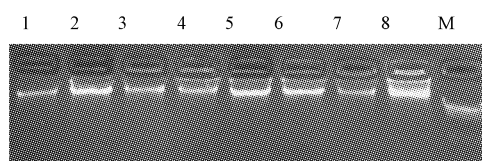


图 1 卷丹百合基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

注:1~8:8 个样品基因组 DNA 的电泳条带;M: $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker。

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of genomic DNA from *Lilium lancifolium* Thunb.

Note:1~8:The electrophoresis strips of 8 samples;M: $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker.

### 2.2 基因组 DNA 纯度和浓度

用紫外分光比色法对所提取的 8 份卷丹百合基因组 DNA 纯度进行定量检测,由表 1 可知,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值均介于 1.70~1.94 之间, DNA 浓度均达到 0.61  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  以上,所获得的 DNA 质量和纯度均达到了

ISSR-PCR 扩增的模板要求。表明采用改良 CTAB 法可以获得高质量的百合基因组 DNA。

表 1 改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA 纯度和浓度

Table 1 Purity and concentration of genomic DNA extracted by modified CTAB method

样品号	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1	0.132	0.068	1.94	0.66
2	0.160	0.085	1.88	0.80
3	0.131	0.077	1.70	0.66
4	0.145	0.079	1.84	0.73
5	0.171	0.089	1.92	0.86
6	0.157	0.088	1.78	0.79
7	0.121	0.066	1.83	0.61
8	0.185	0.102	1.81	0.93

### 2.3 ISSR-PCR 扩增结果

图 2 为引物 UBC811(序列为 5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3')扩增产物电泳结果。结果表明,采用上述改良 CTAB 法所获得的 DNA 样品,在同一引物 UBC811 及相同反应条件下进行 ISSR-PCR 扩增,均得到了稳定清晰的扩增条带。可见采用此法所提取的 DNA 质量好,纯度高,适于进行 ISSR-PCR 扩增等分子生物学试验。

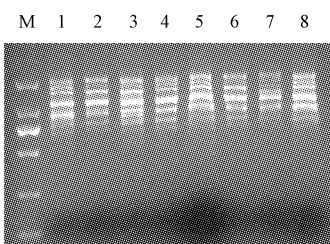


图 2 引物 UBC811 扩增产物电泳图

注:M:Marker DL 2 000;1~8:1~8 号模板与其相对应的某一引物的 ISSR 扩增产物电泳结果。

Fig. 2 Electrophoretogram of amplified products of primer UBC811

Note:M:Marker DL 2 000;1~8:the electrophoresis results of ISSR amplified products of 1~8 templates and the corresponding primers.

## 3 讨论

基因组 DNA 的提取是 ISSR-PCR 扩增成功的基础,ISSR-PCR 扩增的效果与模板 DNA 的提取方法、提取质量及 DNA 的纯度和完整性有着密切的关系<sup>[7]</sup>。采用传统 CTAB 法提取植物基因组 DNA 时,大量的多糖等杂质往往也同时被沉淀下来<sup>[9]</sup>。百合叶片内含有较多的多糖、酚类等次生代谢产物,这些次生产物会氧化生成一些褐色的非可溶性物质与 DNA 结合,使 DNA 难溶或产生不同程度的褐变,影响所提的 DNA 的含量和纯度<sup>[10]</sup>。试验过程中曾使用传统的 CTAB 法提取基因组 DNA,结果显示所提取的 DNA 溶液黏稠,电泳条带

拖尾现象明显,DNA产量少, $OD_{260}/OD_{280}$ 值远小于1.6,且将其进行ISSR-PCR扩增时,产物电泳无条带,说明采用传统的CTAB法难以获得高质量的百合基因组DNA。该试验最终采用液氮快速研磨,提取过程中加入了抗氧化剂 $\beta$ -巯基乙醇,可使多糖含量明显降低,而DNA的质量明显提高,利用引物UBC811进行ISSR-PCR扩增时其稳定性和可重复性都很好,表明了所提取的百合基因组DNA的纯度及浓度已完全满足ISSR-PCR扩增的需要。此外,为分析样品的状态对DNA提取效果的影响,试验过程中采用了干叶和鲜叶2种不同状态的样品,利用上述改良的CTAB法在同等条件下提取基因组DNA,紫外分光比色检测结果表明,干叶的DNA提取量比鲜叶要多,但二者的 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均在1.70~2.00之间,符合ISSR-PCR扩增的模板质量和浓度要求,说明经干燥处理后的样品虽状态发生变化,但对DNA提取的产量和质量并无明显影响。综合分析结果表明,改良CTAB法(CTAB提取液:2% CTAB,1.4 mol/L NaCl,20 mmol/L EDTA,pH 8.0,100 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,2%  $\beta$ -巯基乙醇)非常适合百合基因组DNA的提取,且提取的DNA纯度和产率都较高,能够获得较高质量的基因组DNA,为百合属植物遗传多样性分析、品种鉴别、群体遗传结构分析、亲缘关系和系统发育等研究奠定了良好基础。

## 参考文献

- [1] 赵祥云,王树栋,陈新霞,等.百合[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [2] Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994(20):176-183.
- [3] Pradeep R M, Sarla N, Siddiq E A. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128:9-17.
- [4] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:440-449.
- [5] Tsumura Y, Ohba K, Straus S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:40-45.
- [6] Devarumath R M, Nandy S, Rani V. RAPD, ISSR and RFLP finger-printings as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *Assamica* (Assam-India type)[J]. Plant Cell Rep, 2002, 21:166-173.
- [7] Fernandez M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104:845-851.
- [8] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002:742-744.
- [9] 孙敬三,桂耀林.植物细胞工程实验技术[M].北京:科学出版社,1995:298.
- [10] 姜福星.百合种质资源遗传多样性ISSR研究[D].南京:南京林业大学,2006.

## Extraction of Genomic DNA for ISSR-PCR Reaction in *Lilium*

CHEN Ming-hong<sup>1,2</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, LIU Duo<sup>1</sup>, XIONG Hua-bin<sup>1</sup>, LI Cheng-yun<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650031; 2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Agro-biodiversity and Pests Control, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

**Abstract:** In order to obtain high quality genomic DNA suitable for ISSR-PCR reaction conveniently and stably in *Lilium*, taking *Lilium tigrinum* as materials, the course of DNA extraction was improved and optimized based on the traditional CTAB method and an ideal method was obtained here. The results showed that the  $OD_{260}/OD_{280}$  of genomic DNA extracted by the modified CTAB method ranged from 1.7 to 2.0 with clear electrophoresis strip and its stability and repeatability were very good when used for ISSR-PCR reaction, accounting for its purity and content were all up to the standards for ISSR-PCR analysis. The research laid the foundation for the study on genetic polymorphism analysis, cultivar identification, etc. of *Lilium* at the molecular level.

**Key words:** *Lilium*; genomic DNA; DNA extraction; inter-simple sequence repeat