

亚麻 ISSR 的反应体系优化及引物筛选

姜卫东

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:对亚麻 ISSR 反应条件进行了优化。同时利用 3 个有代表性的亚麻样品从 60 条 ISSR 引物中筛选出 13 条多态性好、重复性高的引物,为亚麻的分子鉴定奠定了基础。

关键词:亚麻;基因组 DNA;ISSR 反应;筛选

中图分类号:S563.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)05-0010-03

亚麻是我国重要的纤维作物,同时也是重要的经济作物。对亚麻种质资源的正确评价是亚麻育种的关键,分子方法能直接从 DNA 水平上反映各材料间的遗传差异,从而消除环境或人为因素造成的误差。ISSR 标记是 Zietkiewicz E 等^[1]提出的一种 DNA 分子标记技术,具有 RAPD 技术的优点,又可克服 SSR 和 RAPD 技术的某些缺点。由于其标记所揭示的多态性效率较高,在对绝大多数缺乏遗传学研究背景的濒危植物遗传多样性水平评价中,RAPD 和 ISSR 发挥着极为重要的作用^[2-3],近年来在作物 DNA 标记上也得到较多应用^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试亚麻品种有:原 2003-84、K-6542、SXY8,均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。

1.1.2 酶与试剂 rTaq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 提取试剂盒,100 bp ladder、琼脂糖及常规试剂购于 Tiangen 生化科技有限公司。

1.1.3 PCR 引物 60 条 ISSR 引物委托上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 亚麻总 DNA 提取与检测 亚麻总 DNA 提取参照 Tiangen DNA 提取试剂盒试验步骤。分别取 0.6 g 3 个亚麻品系的叶片提取总 DNA,提取的 DNA 分装贮于 -20℃;亚麻总 DNA 的浓度检测采用琼脂糖凝胶电泳法,琼脂糖凝胶电泳

方法参照文献[6],取 1 μL 提取的各基因组 DNA 在 0.8% Agarose 上进行电泳,用标准分子量 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 进行比较,进而检测所提取各基因组 DNA 的浓度和完整性。

1.2.2 ISSR 反应条件 为确定最佳的 PCR 反应体系,设置 4 个 Taq 酶浓度:0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$;4 个 dNTP 浓度:0.15、0.20、0.25、0.30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选用 U853 引物,其浓度设 4 个:0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;退火温度设 3 个:50、55、60℃。根据扩增结果,选择出最佳的 PCR 反应体系。PCR 扩增程序为:94℃ 4 min;94℃ 40 s,50、55、60℃ 1 min,72℃ 90 s,40 个循环;72℃ 10 min。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应优化

2.1.1 不同 Taq 酶浓度对扩增结果的影响 Taq 酶浓度共用 4 个梯度,从图 1 中可以看出 1.0 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时能扩增出条带,但不清晰,当增加到 1.5 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时扩增效果较好,因此确定 1.5 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 是最佳浓度。

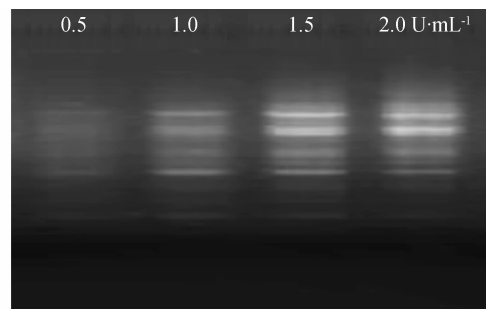


图 1 Taq 酶浓度对 PCR 反应的影响

2.1.2 不同引物浓度对扩增结果的影响 引物浓度设 4 个梯度,图 2 中显示 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时未扩出条带,0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩的条带不清晰,0.5 和 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增的效果好,但二者没有

收稿日期:2009-12-16

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2008AA6CH06)

作者简介:姜卫东(1979-),男,黑龙江省哈尔滨市人,学士,研究实习生,主要从事亚麻育种研究。E-mail: flaxjwd@126.com。

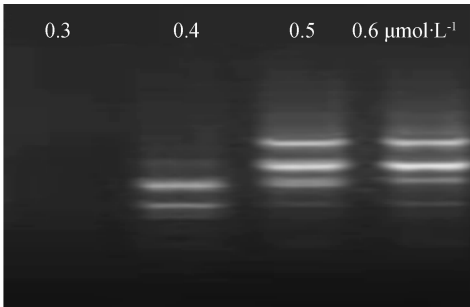


图 2 引物浓度对 PCR 反应的影响

明显区别,因此确定 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最佳浓度。

2.1.3 不同 dNTP 浓度对扩增结果的影响

dNTP 浓度设了 4 个梯度,图 3 中 dNTP 浓度为 0.15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增条带少,而且条带模糊,而 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增的条带数目多而且清晰,因此 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最佳浓度。

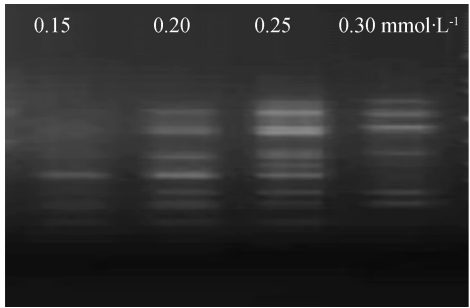


图 3 dNTP 浓度对 PCR 反应的影响

2.1.4 不同退火温度对扩增结果的影响

退火温度设 3 个梯度,由图 4 可知,55℃ 是最佳退

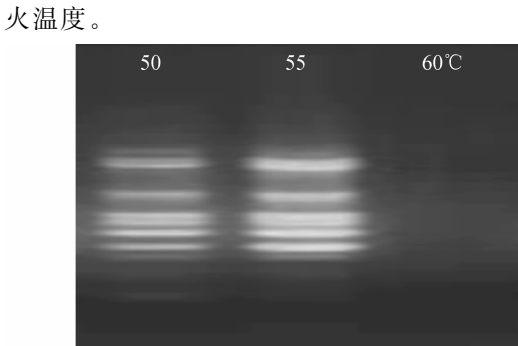


图 4 退火温度对 PCR 反应的影响

2.2 优化后亚麻最佳 ISSR 反应条件及 PCR 程序

通过 Taq 酶浓度优化、dNTP 浓度优化、引物浓度优化,优化出适宜亚麻 ISSR 的 PCR 反应体系 PCR 体系(20 μL): 10 \times Buffer 2 μL , Mg^{2+} (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), dNTP (0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), ISSR 引物 (0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Genome DNA (50 ng), Taq 1.5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。通过退火温度梯度试验优化出适宜亚麻 ISSR 的 PCR 程序,确定优化后的 PCR 程序为 94℃ 4 min; 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。

2.3 筛选出适宜亚麻 ISSR 的引物

该试验筛选出适宜亚麻 ISSR 的引物 13 条,其序列见表 1。

表 1 筛选出的 ISSR 引物序列

| 引物编号 | 引物序列 | 引物编号 | 引物序列 |
|-------|--------------------|------|--------------------|
| U 822 | TCTCTCTCTCTCTCTCA | U854 | TCTCTCTCTCTCTCTCRG |
| U 824 | TCTCTCTCTCTCTCTCG | U857 | ACACACACACACACACYG |
| U 835 | AGAGAGAGAGAGAGAGYC | U859 | TGTGTGTGTGTGTGTGRC |
| U 836 | AGAGAGAGAGAGAGAGYA | U886 | VDVCTCTCTCTCTCTCT |
| U 841 | GAGAGAGAGAGAGAGAYC | U888 | BDBCACACACACACACA |
| U848 | CACACACACACACACARG | U889 | DBDACACACACACACAC |
| U853 | TCTCTCTCTCTCTCTCRT | | |

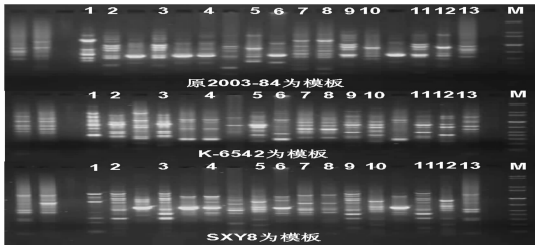


图 5 原 2003-84、K-6542、SXY8 为模板进行 PCR 所筛选 ISSR 引物结果

1: U822, 2: U824, 3: U835, 4: U836, 5: U841, 6: U848, 7: U853, 8: U854, 9: U857, 10: U859, 11: U886, 12: U888, 13: U889, M: 100 bp ladder

从 60 条 ISSR 引物中选取扩增结果较好的引物(见图 5),综合原 2003-84、K-6542、SXY8, 3 个品种为模板的结果,60 条 ISSR 引物中有 13 条(序列见表 1)扩增出的条带清晰,多态性好,重复性高。

3 结论与讨论

植物材料 DNA 的提取质量往往是决定 PCR 成功与否的关键。由于亚麻叶片中含有大量单宁、多糖类及色素等物质,同时蛋白质含量也较高,且越老的叶片中这些杂质含量越高,这些物质

易与 DNA 结合形成粘稠的胶状物,既难溶解,又会抑制 Taq 酶活性,从而影响 PCR 反应的质量。因此该试验以亚麻的幼嫩叶片为材料提取 DNA,并且采用 Tiangen 公司生产的 DNA 提取试剂盒,这样既保证了试验质量,又提高了试验效率。

通过优化适宜亚麻 ISSR 的 PCR 体系和程序,利用筛选出的适宜亚麻的 ISSR 引物可以对亚麻种质资源进行分子鉴定,并为亚麻种质资源的亲缘关系提供分子依据。

参考文献:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalske A, Iabuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20:178-183.
- [2] Fritsch P, Riese L H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics[M]//Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. London: Oxford University Press, 1996:54-73.
- [3] Hedrick P W. Conservation genetics and molecular techniques: A perspective[M]//Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. London: Oxford University Press, 1996:459-477.
- [4] CHEN Xiang-ming, ZHENG Guo-sheng, MENG Li. RAPD-PCR analysis of genetic diversity of different colour 35 tree paeonia cultivars[J]. Sci Agric Sin, 2002, 35(5): 546-551.
- [5] LI Jin-bo, JIANG Liang-rong, LI Chun-hai, et al. Comparisons of genetic analysis based on ISSR and SSR in PGMS and TGMS rice lines[J]. Moeul Plant Breed, 2003, 1(1): 42-47.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

Optimization and Primer Screening of the ISSR Reaction System in Flax

JIANG Wei-dong

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The ISSR reaction conditions of flax were optimized. 13 primers out of 60 were screened out by 3 typical flax varieties which had high level polymorphism and repeatability. This research made the foundation for the molecular identification of flax.

Key words: flax; genome DNA; ISSR reaction; screening

(上接第 9 页)

Comparison Study on the Content of Endogenous Hormones in Transgenic Double Genes of *Populus tomentosa* Carr. during the Rooting Culture

JIA Xiang-nan¹, XIN Bei¹, MA Sheng-jun¹, LI Wei¹, CHEN Xiao-yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Forest Tree Breeding of Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. College of Forestry of South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: In order to study the rooting and physiological changes of the transgenic *rolB-pttGA20ox* double genes *Populus tomentosa* Carr., the content of endogenous hormones in the controlled strains PT-16 and the transgenic *rolB-pttGA20ox* double genes *Populus tomentosa* Carr. RG-4 were measured. The results showed that in the hormone-free medium, root processus of RG-4 formed in 8 days, 3 days earlier than the controlled strains, and the rooting rate, the average length and the number of roots were also higher than those of the controlled strains. The content of endogenous IAA in RG-4 was rising during the formation of adventitious root, but decreasing after the root processus, and the content in the beginning and peak time were significantly higher than those of the controlled strains. The content of GA₃ in RG-4 was decreasing before the root formation while increasing after the root formation, which was just opposite to the controlled strains. The content of ABA fluctuated during the root formation, but at the beginning, the content of ABA in RG-4 was lower than that in PT-16. The ratio of IAA and ABA of RG-4 kept a high level before the formation of root processus, but decreased after the root processus.

Key words: transgenic double genes; *Populus tomentosa* Carr.; endogenous hormones