

# 文冠果 DNA 提取及 RAPD 和 ISSR 反应体系构建

郭井亮, 阮成江

(大连民族学院 资源植物研究所, 辽宁 大连 116600)

**摘要:**为研究文冠果种质遗传多样性,以新疆奇台文冠果自然栽培居群的 48 个单株为材料,采用改良 CTAB 法提取文冠果基因组 DNA,并对其 RAPD 和 ISSR 反应体系进行了优化。研究结果表明:文冠果的 RAPD 最适反应体系为:PCR 扩增总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,包含 30 ng 的模板 DNA,  $10\times\text{PCR buffer}$  2  $\mu\text{L}$ ,  $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$ ,  $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{dNTP}$  和  $Taq\text{ DNA 聚合酶}$  1U; ISSR 最适反应体系为:PCR 扩增总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 30 ng 的模板 DNA,  $10\times\text{PCR buffer}$  2  $\mu\text{L}$ ,  $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$ ,  $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{dNTP}$  和  $Taq\text{ DNA 聚合酶}$  1U。在最适反应体系下, RAPD 和 ISSR 分析具有良好的稳定性和可重复性。

**关键词:**文冠果; DNA; RAPD; ISSR

**中图分类号:**S794 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0027-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0027

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)属无患子科文冠果属落叶灌木或小乔木,是原产于我国北方黄土高原地区的乡土树种。文冠果种子含油率为 30.4%,种仁含油率为 55%~66%,并含有丰富的亚油酸和亚麻酸,可作为优良食用油,在工业上可作为生产生物柴油、高级润滑油、油漆和肥皂等化工产品的优质原材料<sup>[1]</sup>。昆虫传粉的文冠果花为雌雄同株,雄花的雌蕊退化,雌花的花粉囊不开裂。文冠果坐果率非常低,通常小于 5%,在果树中非常罕见,故称“千花一果”,其主要原因是文冠果存在自交不亲和的现象<sup>[2]</sup>。我国大面积种植文冠果始于 20 世纪 60 至 70 年代,但“千花一果”导致的低产低效大大降低了种植户管抚文冠果的积极性,仅 20 世纪末,被荒废和砍伐损失的文冠果达 4 万  $\text{hm}^2$ ,占当时全国文冠果种植面积的 50%以上。结合国家林业局的退耕还林和发展生物质能源林,新疆在 21 世纪初种植的约 0.67 万  $\text{hm}^2$  文冠果已到结果期,但产量非常低。尽管前人对文冠果 DNA 提取、RAPD 和 ISSR 反应体系进行了优化<sup>[3-6]</sup>,但这两种分子标记具有不稳定性 and 实验室中可重复性差的特性。为了分析文冠果自然栽培居群低产的原因,本试验以新疆奇台自然栽培文冠果为材料,利用改良 CTAB 方法提取文冠

果基因组,建立了适合于文冠果的 RAPD 和 ISSR 最佳反应体系,旨在为利用 ISSR 和 RAPD 技术分析文冠果居群遗传多样性提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为新疆奇台文冠果自然栽培居群内的不同个体。该自然居群是 2000 年利用种子实生苗建成,2007 年自然栽培居群的文冠果开始结实,2010 年之后进入盛果期。2014 年 7 月,从自然居群内随机选取了 76 个文冠果单株(编号为 1~76),采收叶样。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取** 采用改良 CTAB 法提取文冠果叶片基因组 DNA。具体步骤:①取 1.5 mL 离心管,加入 700  $\mu\text{L}$   $3\times\text{CTAB}$  和 12  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,放入水浴锅中预热 5 min;取 2~3 片干燥文冠果叶用液氮研磨并取适量粉末加入离心管中,65℃水浴 40 min,离心( $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4℃, 10 min);②取上清液 600  $\mu\text{L}$  于新离心管中,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇,摇匀成乳白色,离心;③取上清液 500  $\mu\text{L}$  到新离心管中,加等体积酚:氯仿:异戊醇,摇匀后离心;④取上清液 300  $\mu\text{L}$  到新离心管中,加入 2 倍体积(600  $\mu\text{L}$ )无水乙醇、1/10 体积(30  $\mu\text{L}$ ) NaAc ( $\text{pH}5.2$ ,  $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),沉淀 2 h 以上( $-20^\circ\text{C}$ );⑤沉淀之后取出离心,弃上清,加入 500  $\mu\text{L}$  70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次(10~20 min),再用 500  $\mu\text{L}$  无水乙醇洗涤沉淀 2~3 次,自然风干,加入 50  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解,过夜(先 2 h 室温,后于 4℃);⑥用 Thermo Nano-Drop 200 紫外可见分光光度计(Gene Company Limited 公司生产)测定 DNA 的纯度以及浓度,

收稿日期:2015-08-28

**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划专题资助项目(2015BAD07B01);辽宁省自然科学基金资助项目(2014020135);辽宁省大学生创新创业训练计划资助项目(S201412026000022)

**第一作者简介:**郭井亮(1992-),男,辽宁省沈阳市人,学士,从事资源植物分子育种研究。E-mail:461738609@qq.com。

**通讯作者:**阮成江(1972-),男,河南省信阳市人,博士,教授,博士研究生导师,从事油料能源植物种质创新与开发利用研究。E-mail:ruan@dlnu.edu.cn。

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行检测,使用 UVP Gelpoc-It2 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司)拍照,以检查 DNA 的完整性;⑦ -20℃ 下保存备用。

1.2.2 RAPD 和 ISSR 反应体系优化 为了获

表 1 RAPD-PCR 和 ISSR-PCR 体系的  $Mg^{2+}$ 、dNTP 和 *Taq* 酶浓度梯度变化值

Table 1 Concentration change of  $Mg^{2+}$ 、dNTP and *Taq* polymerase in RAPD-PCR and ISSR-PCR system

项目 Items	RAPD-PCR 体系 RAPD-PCR system						ISSR-PCR 体系 ISSR-PCR system					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
$Mg^{2+}/(mmol\cdot L^{-1})$	1.5	2	3	4	5	6	1	1.5	2	2.5	3	3.5
dNTP/ $(\mu mol\cdot L^{-1})$	80	100	120	160	200	240	100	150	200	250	300	350
<i>Taq</i> 酶(U)	0	0.75	1.00	1.25	1.50	-	0.50	1.0	1.5	2	2.5	-

RAPD-PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ L,组分分别为:DNA 30 ng,引物 0.2  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>,10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu$ L。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 120 s,45 个循环(94℃ 变性 30 s、36.9℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 90 s)后在 72℃ 延伸 300 s,PCR 扩增结束后在 4℃ 条件下保存。ISSR-PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ L,组分分别为:DNA 30 ng,10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu$ L,引物 0.2  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,40 个循环(94℃ 变性 1 min、退火 1 min、72℃ 延伸 90 s)后 72℃ 延伸 7 min,PCR 扩增结束后在 4℃ 条件下保存。PCR

得适用于文冠果的最佳 RAPD-PCR 和 ISSR-PCR 反应体系,分别参考高晓欣等<sup>[3]</sup>和芦娟等<sup>[4]</sup>的方法,通过单因子设计对 RAPD 和 ISSR 反应体系,并进行优化实验,设计的  $Mg^{2+}$ 、dNTP 和 *Taq* 酶各反应组分浓度梯度见表 1。

产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,用 UVP Gelpoc-It2 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司)拍照。

2 结果与分析

2.1 改良 CTAB 法提取文冠果基因组 DNA

改良 CTAB 法提取的文冠果基因组 DNA 的主条带清晰(见图 1),排列比较整齐,迁移率低,完整性较好,DNA 无降解,点样孔中的糖类、酚类等杂质污染较少;DNA 样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值均在 1.8 以上,表明所提取 DNA 模板质量和纯度均符合要求进一步 PCR 要求。

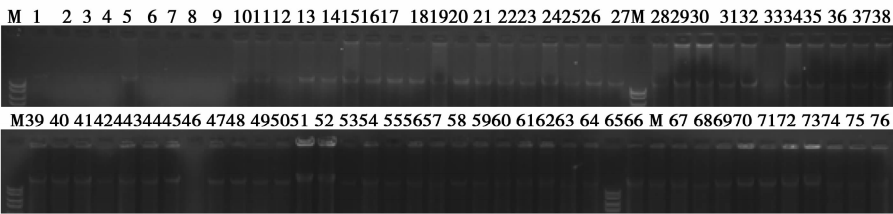


图 1 文冠果 DNA 检测  
Fig. 1 DNA detection of *Xanthoceras sorbifolia*

2.2 RAPD-PCR 最佳反应体系

通过单因子设计方法对文冠果 RAPD-PCR 反应体系进行优化,由图 2 结果表明,当  $Mg^{2+}$  浓度为 2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 时,扩增的条带较其他浓度清晰且完整性较好(见图 2A),dNTP 浓度为 100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 时,得到的扩增条带更为清晰明亮(见图 2B),*Taq* 酶的最适浓度为 1U(图 2C)。文冠果 RAPD-PCR 最佳反应体系为:总体积 2  $\mu$ L,其中 DNA 30 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>、10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu$ L、2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>  $Mg^{2+}$ 、100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTP、*Taq* DNA 聚合酶 1U,其余体积用超纯水补足。最佳扩增程序为:94℃ 预变性 120 s,然后 45 个循环:94℃ 变性 30 s、36.9℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 90 s,后在 72℃ 延伸 300 s,结束后在 4℃ 条件下保存。

根据 RAPD-PCR 最佳反应体系,将 48 个文

冠果 DNA 样品进行 PCR 扩增,所选用的引物编号为 RAPD242。扩增后的 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖浓度下进行凝胶电泳,以 DNA Marker 2 000 指示 DNA 条带的分子量大小。电泳完成以后,在凝胶成像仪上拍照,所得到的扩增产物条带见图 2D,扩增条带比较清晰,条带大小介于 250~1 000 bp,具有较好的多态性,能够满足后续研究中,利用 RAPD 分析文冠果居群遗传变异和遗传多样性等对 RAPD-PCR 反应体系的要求。

2.3 ISSR-PCR 最佳反应体系

通过单因子设计方法对文冠果 ISSR-PCR 反应体系进行优化的结果表明,当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.0~1.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 并无扩增条带,当  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0~3.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 时,扩增的条带数明显增

多,且清晰明亮(见图 3A),因此在 20  $\mu\text{L}$  的反应体系中,2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为最佳;dNTP 浓度为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,扩增的条带多且清晰(见图 3B),*Taq* 酶浓度为 1 U 时,扩增的条带最理想(图 3C)。因此,适用于文冠果叶片的 ISSR-PCR 最佳反应体系为:总体积 20  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 30 ng,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,引物 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 1U,其余部分由超纯水补足。ISSR-PCR 扩增反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,40 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、53 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,最后在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存。

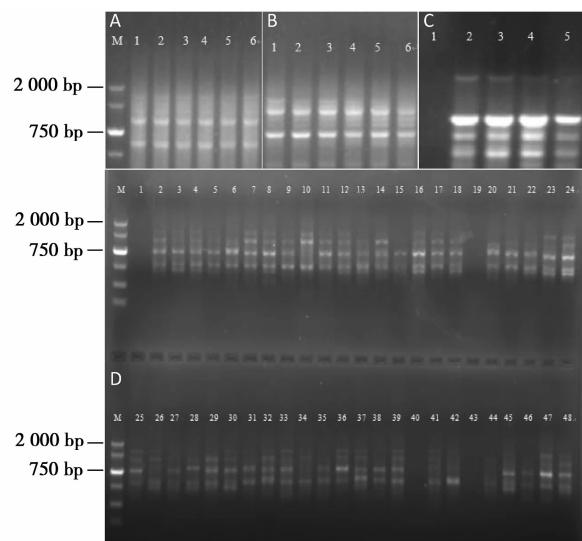
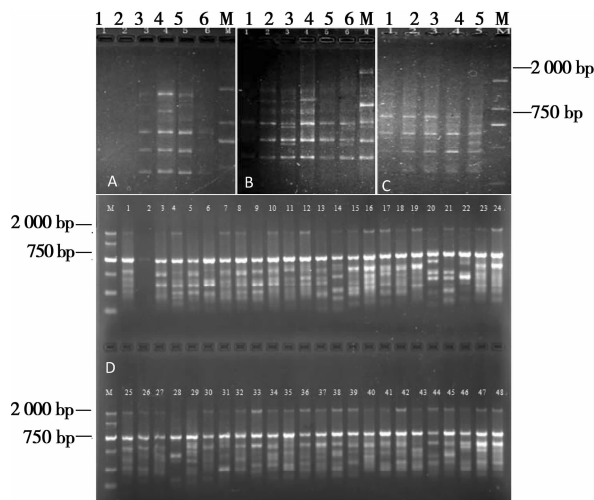


图 2 文冠果 RAPD-PCR 结果

Fig. 2 RAPD-PCR results of *Xanthoceras sorbifolia*

根据文冠果最佳 ISSR-PCR 扩增反应体系,利用 UBC873 引物对 48 份文冠果 DNA 模板进行 PCR 扩增,扩增 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,扩增结果见图 3。扩增的条带比较清晰,大小介于 100~750 bp,并具有较好的多态性,能够满足后续研究利用 ISSR 标记分析文冠果遗传变异和种质多样性等方面的对 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序的技术要求。



A:1~6  $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别为 1.0、1.5、2.5、3.0 和 3.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;B:1~6 dNTP $^{+}$  浓度分别为 100、150、200、250、300 和 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;C:1~5 *Taq* 酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 U;D:ISSR 引物 UBC873 对 48 个文冠果个体基因组 DNA 扩增的琼脂糖凝胶电泳图;M:DL 2 000 DNA marker

A:  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations in the 1~6 lanes are 1.0, 1.5, 2.5, 3.0 and 3.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; B:1~6 the dNTP $^{+}$  concentrations in the 1~6 lanes are 100, 150, 200, 250, 300 and 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; C: *Taq* enzyme concentrations in the 1~5 lanes are 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 U, respectively; D: Gel of 48 individuals of *Xanthoceras sorbifolia* tested by ISSR analysis using the primer UBC873; M:DL 2 000 DNA marker

图 3 文冠果 ISSR-PCR 结果

Fig. 3 ISSR-PCR results of *Xanthoceras sorbifolia*

### 3 结论与讨论

利用改良 CTAB 法对文冠果基因组 DNA 进行了提取,通过单因子设计方法对 RAPD 和 ISSR 反应体系进行了优化,构建了适合文冠果 RAPD 和 ISSR 分子标记研究的反应体系,可为研究文冠果种质遗传多样性和居群结构变异提供分子标记的技术支持,对文冠果资源开发利用具有重要意义。

文冠果 RAPD 的最适反应体系为:PCR 扩增体系的总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 30 ng 的模板 DNA,10 $\times$  PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 1 U,不足的体积超纯水补足。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 120 s,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,36.9 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,45 个循环后在 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 300 s,结束后在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存。

文冠果 ISSR 最适反应体系为:PCR 扩增的总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 20 ng 的模板 DNA,10 $\times$  PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 1 U,扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,52~56 $^{\circ}\text{C}$  退火 35 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,接着进行 40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

# 低温胁迫下酸浆叶片蛋白差异分析

徐 磊<sup>1</sup>,谭福忠<sup>1</sup>,郑 巍<sup>1</sup>,师 臣<sup>1</sup>,崔洪秋<sup>1</sup>,张志刚<sup>1</sup>,赵 越<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316;2. 黑龙江省科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**为进一步研究酸浆抗寒机理,以 25℃ 室温条件(对照)和 5℃ 低温处理条件下酸浆幼苗叶片为材料,运用蛋白质双向电泳结合质谱技术分析低温胁迫下酸浆叶总蛋白差异表达。结果表明:表达量存在显著差异的蛋白质点有 16 个,与对照组相比,表达量增加的蛋白质点 9 个,表达量减少的蛋白质点 6 个,新增蛋白质点有 1 个。经过鉴定,这些差异表达的蛋白质分别属于代谢相关蛋白、信号转导蛋白、能量相关蛋白、结合蛋白、抗性相关蛋白等。

**关键词:**酸浆;差异蛋白质;双向电泳

**中图分类号:**S567 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0030-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0030

近些年来由于环境恶化,气候的不稳定因素越来越多,骤然降温的天气常出现,给农业生产造成巨大危害,低温胁迫已经成为农业增产的重要限制因素。提高植物抗寒性、抗冷性是解决这些问题的最有效的方法之一。目前,人们对植物低

温抗性研究主要集中在玉米、小麦、水稻、番茄、黄瓜、果树等作物上,在植物低温逆境条件下生理生化指标的变化研究比较明确,但迄今为止还没有明确的关于植物发生低温伤害的原理及植物的抗冻机制的相关报道<sup>[1]</sup>。在低温逆境条件下,植物通常会改变自身的一系列代谢过程来适应低温伤害,同时就会伴随着植物细胞内蛋白质种类和数量上的变化,蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,蛋白质组学在植物低温胁迫的研究已逐步被应用,并取得很好的研究成果<sup>[2]</sup>。

**收稿日期:**2015-05-28  
**第一作者简介:**徐磊(1985-),男,黑龙江省青冈县人,硕士,研究实习员,从事玉米育种与生物技术研究。E-mail:

参考文献:

[1] 王文丽,吴松全,寇莹莹,等. 文冠果种质资源的 RAPD 分析[J]. 辽宁林业科技,2012(1):11-12.

[2] 周庆源,傅德志. 文冠果生殖生物学的初步研究[J]. 林业科学,2011,46(1):158-162.

[3] 高晓欣,张芸香,郭晋平. 文冠果 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2011,31(4):315-320.

[4] 芦娟,柴春山,吴文俊,等. 文冠果反应体系的建立及优化[J]. 中国农学通报,2014,30(1):32-36.

[5] 芦娟,柴春山,吴文俊,等. 文冠果干燥叶片高质量 DNA 提取方法研究[J]. 湖南农业科学,2013(5):1-3,4.

[6] 张芸香,刘晶晶,白晋华,等. 应用均匀设计优化文冠果 ISSR-PCR 反应体系[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2014,34(3):315-320.

## DNA Extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and Optimization of RAPD and ISSR Reaction Systems

GUO Jing-liang, RUAN Cheng-jiang

(Institute of Plant Resources of Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

**Abstract:** In order to study the genetic diversity of *Xanthoceras Sorbifolia* germplasms, taking 48 individuals as materials growing in natural cultivated population in the Qitai county of Xinjiang germplasm nursery. Leaves DNA of each sample were extracted using the modified CTAB method, RAPD and ISSR reaction systems were optimized. The results showed that the optimal RAPD reaction system was in the total volume of 20  $\mu$ L for PCR amplification, containing 30 ng template DNA, 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 1U *Taq* enzyme. The optimal ISSR analysis reaction system was in the total volume of 20  $\mu$ L for PCR amplification, containing 30 ng template DNA, 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 1U *Taq* enzyme. In these optimum reaction systems, RAPD and ISSR analysis had stability and repeatability very well.

**Keywords:** *Xanthoceras sorbifolia*; DNA; RAPD; ISSR