

思彬彬,张靠稳,孟北乾. 雌根结线虫 DNA 的提取方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):27-28.

# 雌根结线虫 DNA 的提取方法

思彬彬, 张靠稳, 孟北乾

(北方民族大学生物科学与工程学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**从番茄的根结中挑取雌根结线虫,通过 WLB 法提取其 DNA。结果显示,用该方法提取的雌根结线虫 DNA 条带整齐单一,可用于后续 PCR 反应。

**关键词:**根结线虫;DNA 提取;ISSR-PCR

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0027-01

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是一类在农作物上危害极大的植物寄生性线虫。线虫基因组 DNA 的提取方法主要有 2 种:对大量线虫可通过 DNA 提取试剂盒来获取基因组 DNA,对单条线虫常使用裂解液裂解线虫法来提取基因组 DNA。为了简化根结线虫 DNA 提取的过程,本试验利用根结中的雌根结线虫进行 DNA 提取相关的 ISSR-PCR 扩增。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试线虫

本试验采用的线虫为雌根结线虫,取自番茄根结。

### 1.2 雌根结线虫 DNA 的提取及检测

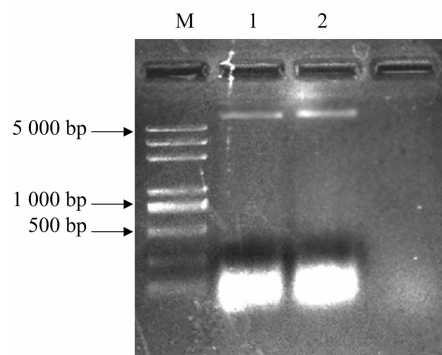
**1.2.1 大量雌虫 DNA 的提取** 参照芮凯所介绍的方法<sup>[1]</sup> 稍作修改,步骤主要包括:约挑取 50 头雌根结线虫于 1.5 mL 离心管中,该离心管预先加入 1 滴 WLB(线虫裂解液);用移液枪吸出此离心管中的 WLB,用自制的工具在冰浴下研磨线虫,加入 WLB 混匀<sup>[2]</sup>;65 ℃ 水浴 1.5 h;取出离心管,加入 200 μL 的 3 mol/L 醋酸钠,冰浴 20 min;取出离心管,于 13 000 r/min,4 ℃ 下离心 15 min,取上清液加入到另一个 1.5 mL 离心管中;向该离心管中加入 600 μL 的异丙醇,该异丙醇一直保存在 -20 ℃ 冰箱中,然后冰浴或者放在 -20 ℃ 冰箱中保持 30 min;加入蛋白酶 K,取出离心管后在 13 000 r/min,4 ℃ 下离心 15 min,吸出上清液,保留沉淀物<sup>[2]</sup>;用无水乙醇洗涤沉淀物,待乙醇挥发后,用双蒸水 50 μL 溶解沉淀物(DNA)。取 10 μL DNA 样品于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分离,以检测 DNA 的浓度。

**1.2.2 ISSR-PCR 扩增** ISSR-PCR 扩增采用 25 μL 的反应体系:2 μL  $Mg^{2+}$ 、2.5 μL 10 × buffer、2 μL DNA、2 μL dNTP、14 μL 无菌双蒸水、2 μL 引物、0.5 μL *Taq* 酶。所用引物为 ISSR 引物 834,扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,53 ℃ 90 s,72 ℃ 90 s,41 个循环;72 ℃ 7 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 雌根结线虫 DNA 电泳分析

由图 1 可知,通过本方法提取的雌根结线虫 DNA 条带整洁单一,清晰度较好,亮度略差一些,但完全可用于后续的 ISSR-PCR 扩增反应。

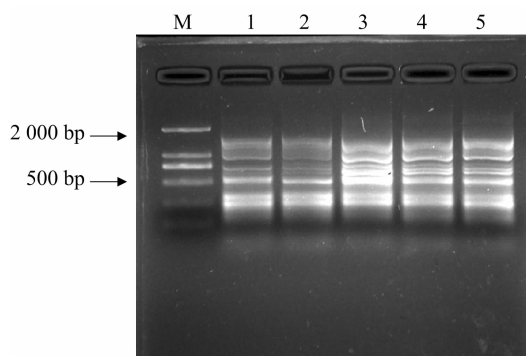


M—DL 5 000; 1~2—雌虫DNA

图1 雌根结线虫DNA电泳图示

### 2.2 ISSR-PCR 电泳分析

由图 2 可见,本方法提取的雌根结线虫 DNA 完全可用于后续的 ISSR-PCR 扩增反应。



M—DL 2 000; 1~5—引物 834 扩增结果

图2 雌虫DNA模板ISSR-PCR电泳结果

收稿日期:2012-11-23

基金项目:北方民族大学校级科研项目(编号:2010Y045)。

作者简介:思彬彬(1977—),硕士,讲师,主要从事植物病理学研究。

Tel: (0951) 2067893; E-mail: sbinbin115@163.com.

## 3 结论

在分子生物学研究中,DNA 的质量是直接影响试验结果

李 昂, 张 安, 唐 君, 等. Fosmid 基因组文库构建及应用现状[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 28-30.

# Fosmid 基因组文库构建及应用现状

李 昂<sup>1,2</sup>, 张 安<sup>1</sup>, 唐 君<sup>1</sup>, 周志林<sup>1</sup>, 赵东兰<sup>1</sup>, 曹清河<sup>1,2</sup>

(1. 江苏徐州甘薯研究中心, 江苏徐州 221121; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:**稳定的大片段基因组文库是生物基因组学研究的基础材料平台。近年来 Fosmid 载体由于其插入片段大小适中、易于构建、稳定性好、拷贝数可诱导等优点, 越来越广泛地被应用于物理作图、基因挖掘、辅助测序等工作。本文就 Fosmid 克隆载体发展历程、Fosmid 文库的功能及其在各领域的应用现状、发展前景等方面展开论述, 主要呈现构建 Fosmid 基因组文库的作用及应用现状。

**关键词:**Fosmid 克隆载体; 基因组文库; 发展史; 应用现状

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0028-03

稳定的大片段基因组文库是生物基因组学研究的基础材料平台<sup>[1]</sup>。不同文库间区别主要在于载体系统的不同。自从 1973 年 Cohen 等引入质粒 pSC101 作克隆载体<sup>[2]</sup>以来, 克隆载体的结构和效率方面已有了很大的发展。现在使用的载体除了噬菌体载体<sup>[3]</sup>和黏粒载体<sup>[4]</sup>以外, 还有酵母人工染色体(YAC)<sup>[5]</sup>、细菌人工染色体(BAC)<sup>[6]</sup>和哺乳动物人工染色体(MAC)<sup>[7]</sup>等人工染色体系统, 噬菌体 P1 克隆系统<sup>[8]</sup>和由 P1 发展而来的 PAC 载体<sup>[9]</sup>, 以大肠杆菌小 F 因子为基础构建的载体(Mini F-based Plasmid)<sup>[10]</sup>和具有 F 因子和黏粒特征的 Fosmid 载体<sup>[11]</sup>等。Fosmid 基因组文库即是应用 Fosmid 克隆载体构建而成的基因组文库, 近年来广泛应用于各物种基因组文库构建之中。本文主要论述 Fosmid 克隆载体发展史及应用现状, 并对其发展前景稍作展望。

## 1 Fosmid 克隆载体发展史

Fosmid 克隆载体是 Kim 等将 pBAC 引入 pUCcos 构建的载体系统<sup>[11]</sup>, 该系统稳定性好, 但单拷贝性严重影响了其应用推广<sup>[12]</sup>。近年来 Epicentre 公司对 Fosmid 载体进行了改造, 推出了 pCC1FOS(图 1)及 pCC2FOS 2 种载体(图 2), 并配套推出 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit 和 CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit 2 种试剂盒。

收稿日期: 2012-12-18

基金项目: 国家“948”计划(编号: 2011-G1-20); 国家“863”计划(编号: 2012AA101204); 国家现代农业产业技术体系建设项目(编号: CARS-11-B-02); 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(10)452]。

作者简介: 李 昂(1990—), 男, 河南通许人, 硕士研究生, 研究方向为甘薯生物技术。E-mail: ang900302@163.com。

通信作者: 曹清河, 博士, 副研究员, 主要从事甘薯种质创新研究。E-mail: cqhe75@yahoo.com。

的关键因素之一。人们常根据不同的试验目的、要求、材料选用不同的方法。长期以来, 根结线虫 DNA 的提取对象都是 2 龄幼虫, 然而在本试验中, 无需孵化 2 龄幼虫, 便可得到线虫的 DNA, 对根结线虫的分子生物学研究提供一定的技术支持, 同时可节约试验时间, 降低试验成本。

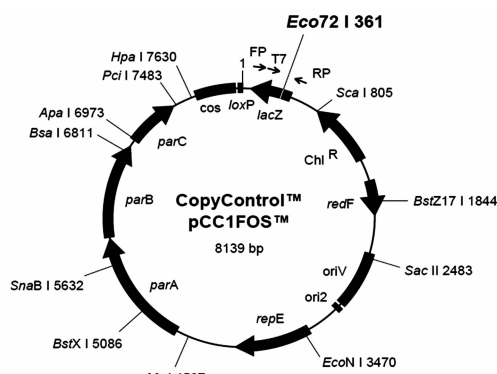


图1 pCC1FOS载体图谱(图中未标示出所有酶切位点)

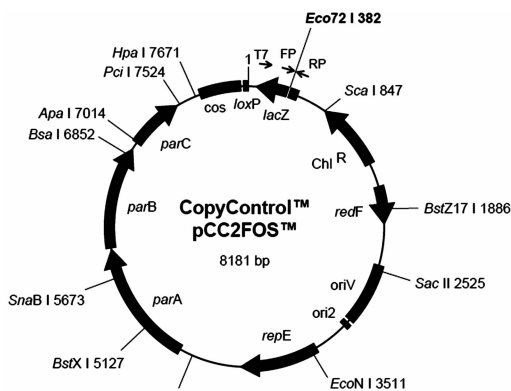


图2 pCC2FOS载体图谱(图中未标示出所有酶切位点)

pCC1FOS 及 pCC2FOS 均共享单拷贝和高拷贝的优点, 除基于 F 因子的单拷贝复制子 ori2 外, 还有一个可诱导的 oriV 高拷贝复制起始点, 可诱导达到高拷贝(10~200 个), 诱导物为 *trfA* 基因产物, EPI300™-T1R *E. coli* 包含 *trfA* 基因,

## 参考文献:

- [1] 芮 凯. 海南岛番石榴病原根结线虫种类鉴定研究[D]. 广州: 华南热带农业大学, 2005.
- [2] 王江岭, 张建成, 顾建峰. 单条线虫 DNA 提取方法[J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32-35.