

# 木荷ISSR 反应体系的建立与优化

李建辉<sup>1,2</sup>, 金则新<sup>\*</sup>, 李钧敏<sup>1</sup> (1. 杭州师范学院生命科学学院, 浙江杭州 310018; 2. 台州学院生态研究所, 浙江临海 317000)

**摘要** 在利用ISSR 技术对木荷的遗传多样性进行研究的试验过程中, 对影响PCR 扩增效果的一些因素诸如模板DNA 用量、引物用量、牛血清白蛋白浓度、Taq DNA 聚合酶用量、4 × dNTP 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度以及退火温度等指标进行筛选和优化, 确立了可用于木荷ISSR PCR 分析最适宜的PCR 反应条件: 10 μl PCR 反应体积中, 1 × Taq 酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 值9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X 100), 0.75 U Taq DNA 聚合酶, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 ml/L 4 × dNTP, 6 pmol 引物, 2 mg/ml 牛血清白蛋白, 10 ng 模板DNA; 适宜木荷ISSR 扩增的退火温度为56.3。

**关键词** 木荷; ISSR; 优化

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)19-4857-02

## Establishment and Optimization of ISSR Reaction System of *Schinus molle*

Li Jianhui et al. (College of Life Science, Hangzhou Teachers College, Hangzhou, Zhejiang 310018)

**Abstract** In order to study the genetic diversity of *Schinus molle* with ISSR technique, the factors which affected the ISSR amplification such as template DNA dosage, primers dosage, bovine serum albumin concentration, unit of Taq DNA polymerase, dNTP concentration, Mg<sup>2+</sup> concentration and annealing temperature were selected and optimized. The results showed that the conditions being suitable for ISSR PCR of *Schinus molle* were as follows: 1 × Taq buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, 50 mmol/L KCl and 0.1% Triton X100), 0.75 U Taq DNA polymerase, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 ml/L 4 × dNTP, 6 pmol primers, 2 mg/ml BSA and 10 ng template DNA. The suitable annealing temperature of *Schinus molle* in the ISSR PCR reaction system was 56.3.

**Key words** *Schinus molle*; ISSR; Optimization

木荷(*Schinus molle*) 是隶属山茶科(Theaceae) 的常绿乔木, 适应性强, 分布广泛, 是我国中亚热带东部常绿阔叶林的常见种。其材质优良, 可用于建筑和园林绿化, 也可用于营造防火林带<sup>[1]</sup>。研究木荷分子水平的遗传变异, 对于中亚热带常绿阔叶林的重建和发展、生物多样性的保护及其资源的可持续利用具有重要意义。

简单重复序列区间扩增多态(ISSR) DNA 分析是由 Zietkiewicz 等<sup>[2]</sup> 于1994 年建立的一种分子标记技术, 具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需DNA 量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点, 同时也具有SSR 的稳定性<sup>[3]</sup>。因此, 近年来已迅速应用于品种鉴定<sup>[4]</sup>、物种遗传多样性<sup>[5]</sup> 等领域的研究。

虽然ISSR 扩增步骤与RAPD 技术相似, 但不同植物材料及不同引物的扩增条件存在差异, 需通过实验对影响PCR 扩增效果的一些因素诸如模板DNA 用量、引物用量、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、4 × dNTP 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度以及退火温度等指标进行筛选和优化。迄今为止, 适用于木荷的ISSR-PCR 反应体系尚未见报道, 笔者探讨了适用于木荷ISSR 反应的最佳体系, 为今后利用ISSR 标记技术开展木荷种群遗传变异分析和构建物理图谱奠定基础。

## 1 材料与方

**1.1 供试材料** 木荷嫩叶, 采自浙江省临安市大明山。采后用保鲜袋封装, 立即带回实验室, 洗净、晾干后, 置于-70 超低温冰箱中, 备用。

**1.2 模板DNA 的制备与定量** 采用改进的SDS 法抽提木荷基因组DNA<sup>[6-8]</sup>。所提取的DNA 经0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 在上海天能GIS 凝胶成像分析系统中拍照, 经软件分析

荧光面积, 与标准DNA 分子量参照比较而定量, 稀释成20 ng/μl, 贮存于-20 冰箱中, 备用。

**1.3 试验处理** 退火温度设12 个处理, 分别为48.1、48.5、49.6、50.7、52.4、54.4、56.3、58.3、60.6、62.0、62.7、63.2; Mg<sup>2+</sup> 浓度梯度设置3 个处理, 分别为1.5、2.2、2.5 mmol/L; 4 × dNTP 浓度梯度设置3 个处理, 分别为0.1、0.15、0.2 mmol/L; 模板DNA 用量梯度设置3 个处理, 分别为6、10、16 ng; Taq DNA 聚合酶用量设置3 个梯度, 分别为0.25、0.5、0.75 U; 引物用量设置3 个处理, 分别为6、12、18 pmol; BSA 浓度梯度设置3 个处理, 分别为0.1、2 mg/ml。

**1.4 ISSR 反应** ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, Set No.9, No.801-900) 提供的序列, 由上海生工生物工程公司合成。原初ISSR 扩增反应体系为10 μl 的PCR 反应体积中, 0.5 U Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.15 ml/L 4 × dNTP, 12 pmol 引物(上海Sangon 公司), 2 mg/ml 牛血清白蛋白, 10 ng 模板DNA。该试验所用的PCR 仪为美国Thermo 公司生产的P×2 梯度PCR 仪。PCR 扩增反应程序为: 94 预变性5 min, 1 个循环, 94 变性30 s, 55 退火45 s, 72 延伸1.5 min, 共35 个循环, 72 最后延伸5 min。扩增后的PCR 产物在4 中保存。

**1.5 PCR 产物的鉴定** 扩增反应结束后, 在1.6% 琼脂糖凝胶(0.5 × TBE, 含0.5 ng/L 溴化乙锭) 中分离扩增产物, 用上海天能GIS 凝胶成像分析系统拍照记录。

## 2 结果与分析

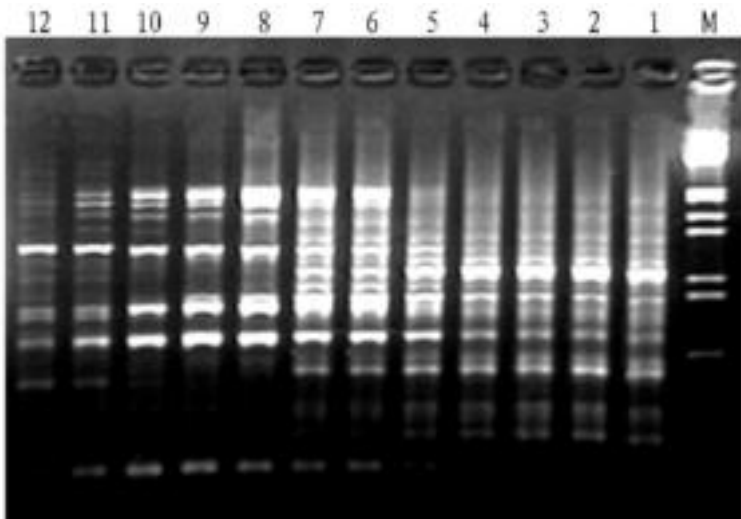
**2.1 退火温度对ISSR 扩增的影响** 引物的退火温度极大地影响着ISSR 反应的进行, 随引物的不同, 退火温度也会不一样, 因而确定一个合适的退火温度非常必要。首先根据原初的PCR 反应条件进行引物的初筛, 选择能看到清晰条带的引物UBC835 进行退火温度的测定。该实验从48.1~63.2 共15.1 的温度梯度里, 研究了不同的退火温度对ISSR 扩增的影响。结果表明: 当退火温度为54.4 和56.3 时, 均扩增出清晰而明亮的条带; 当退火温度高于56.3 或低于54.4

基金项目 浙江省自然科学基金项目(Y504220); 浙江省教育厅科研项目(20040287)。

作者简介 李建辉(1979-), 男, 浙江仙居人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生态学。\* 通讯作者, 教授, E-mail: jzx@tzc.edu.cn。

收稿日期 2006-06-30

时,扩增条带减少,亮度减弱(图1)。考虑到在允许的范围  
内,选择较高的退火温度可减少引物和模板之间的非特异性  
结合,提高PCR反应的特异性<sup>[9]</sup>,因此,笔者确定适宜木荷  
ISSR-PCR分析的退火温度为56.3。而根据公式  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ <sup>[9]</sup> 计算的引物 UBC835 理论退火温度为56。  
由此可见,对于木荷而言,引物 UBC835 的理论退火温度和  
实际退火温度基本一致。对于其他不同的引物,应先根据  
公式计算引物的理论退火温度,对于具相似退火温度的引物  
采用56.3 进行筛选,选择清晰、不弥散的引物进行下一步  
研究;而对于退火温度相差较大的,则再次采用梯度PCR去  
进行退火温度的筛选。



注:1~12的退火温度依次为48.1、48.5、49.6、50.7、52.4、54.4、  
56.3、58.3、60.6、62.0、62.7、63.2;M为DNA/EcoRI+  
HndIII标准分子量参照物。

图1 不同退火温度对木荷ISSR扩增的影响

**2.2  $Mg^{2+}$  浓度对ISSR扩增的影响**  $Mg^{2+}$  浓度是制约ISSR  
PCR扩增结果的一个重要因素。从图2可以看出,1.5  
 $mmol/L$   $Mg^{2+}$  浓度效果最佳,可扩增出明亮清晰且稳定的条  
带;当  $Mg^{2+}$  浓度升高至2.0和2.5  $mmol/L$  时,条带数量变化  
不大,但扩增背景明显增高,这可能是由于  $Mg^{2+}$  浓度偏高带  
来的非特异性扩增所引起的。因此,该试验确定  $Mg^{2+}$  的最  
适浓度为1.5  $mmol/L$ 。

**2.3 dNTP 浓度对ISSR扩增的影响** dNTP是ISSR-PCR反  
应的原料底物,dNTP浓度的变化对ISSR条带的数量和强弱  
有一定的影响(图2)。当4  $\times$  dNTP浓度为0.2  $mmol/L$  时,扩  
增的条带最为明亮清晰,且无非特异性扩增;当4  $\times$  dNTP浓  
度为0.1和0.15  $mmol/L$  时,条带数量减少。因此,4  $\times$  dNTP  
的浓度以0.2  $mmol/L$  较为适宜。

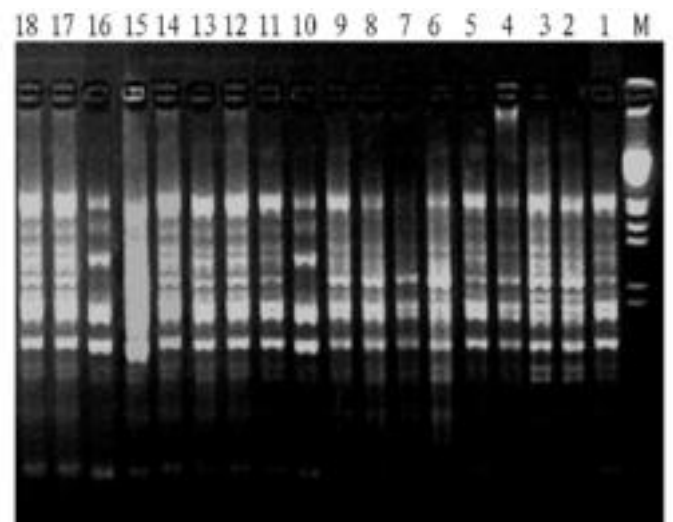
**2.4 Taq DNA聚合酶用量对ISSR扩增的影响** 在ISSR-  
PCR反应体系中,Taq DNA聚合酶用量直接影响到扩增反应  
的成功与否。由图2可见,在10  $\mu$ l的反应体积中,当Taq  
DNA聚合酶用量为0.25 U时,ISSR扩增条带有些模糊不清,  
这可能是用量过低所致;当Taq DNA聚合酶用量增加至0.5  
U时,条带有所增加;当Taq DNA聚合酶用量增加至0.75 U  
时,条带明显增强,清晰明亮,效果最佳。因此,该试验Taq  
DNA聚合酶用量采用0.75 U。

**2.5 BSA 浓度对ISSR扩增的影响** BSA对于酶活性有一  
定的促进作用<sup>[10]</sup>,同时可以降低ISSR扩增的背景。从图2  
可以看出,当BSA浓度为0  $ng/ml$  时,扩增的条带较弱,有些  
条带丢失;当BSA浓度为1  $ng/ml$  时,条带增加;当BSA浓度  
增加至2  $ng/ml$  时,条带明显增多,清晰度增强。所以最终选

择最适的BSA浓度为2  $ng/ml$ 。

**2.6 引物用量对ISSR扩增的影响(图2)** 引物用量直接关  
系到扩增产物的质量。当引物用量为6  $pmol$  时,ISSR条带最  
为清晰明亮(图2);当引物用量增加至12和18  $pmol$  时,扩增  
条带变化不大,但扩增背景明显提高。所以引物的最适用量  
为6  $pmol$ 。

**2.7 模板DNA用量对ISSR扩增的影响** 模板DNA用量是  
影响ISSR-PCR扩增的最重要因素之一。从图2可以看出,当  
模板DNA用量为6  $ng$  时,扩增的条带较少,亮度较弱;当模板  
DNA用量为10和16  $ng$  时,均可扩增出清晰的条带,同时随  
着模板DNA用量的增加,扩增背景也明显提高。因此,该研  
究采用的木荷模板DNA用量为10  $ng$ 。



注:M为DNA/EcoRI+HndIII标准分子量参照物;1~3,  $Mg^{2+}$   
浓度分别为1.5、2.0、2.5  $mmol/L$ ;4~6,4  $\times$  dNTP浓度分别为0.1、  
0.15、0.2  $mmol/L$ ;7~9,Taq DNA聚合酶用量分别为0.25、0.5、  
0.75 U;10~12,BSA浓度分别为0、1、2  $ng/ml$ ;13~15,引物用量  
分别为6、12、18  $pmol$ ;16~18,模板DNA用量分别为6、10、16  $ng$ 。

图2 不同因素对木荷ISSR扩增的影响

### 3 结论

ISSR分子标记技术基于PCR反应,其扩增条带虽较  
RAPD标记稳定,但是也受反应条件变化以及物种不同的影  
响。该试验结果证明,采用不同的反应体系会对ISSR扩增  
产生较大的影响,从而影响ISSR分析的准确性,而ISSR带谱  
的准确性与稳定性是进行遗传多样性分析的前提条件。为  
了利用这一分子标记对木荷进行遗传多样性分析,获得重复  
性和可靠性较高的ISSR带谱,有必要对其影响因子进行筛  
选和优化,确立最适宜的ISSR反应体系。

该试验选择56.3 为最佳退火温度,经过对反应体系  
的筛选和优化,确立了可用于木荷ISSR分析较适宜的扩增条  
件:10  $\mu$ l PCR反应体积中,1  $\times$  Taq DNA聚合酶配套缓冲液(10  
 $mmol/L$  Tris-HCl,pH值9.0,50  $mmol/L$  KCl,0.1% Triton X-100),  
0.75 U Taq DNA聚合酶(华美生物工程公司),1.5  $mmol/L$   
 $MgCl_2$ ,0.2  $mmol/L$  4  $\times$  dNTP,6  $pmol$  引物(上海Sangon公司),10  $ng$   
模板DNA,2  $ng/ml$  牛血清白蛋白。以此条件对同一木荷植株  
DNA进行3次ISSR分析,结果可靠,带型稳定清晰。

### 参考文献

- [1] 赵明水,周忠辉,程晓渊,等.天目山自然保护区木荷防火林保水改土  
功能[J].浙江林学院学报,2000,17(1):42-45.
- [2] ZETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple  
sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J].  
Genomics,1994,20:176-183.
- [3] 何予卿,张宇,孙海,等.利用标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J].

( 上接第4858 页)

农业生物技术学报,2001,9(2):123-127.

- [4] AMMIRAJUJ S S, DHOLAKIN B B, SANTRA D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 726-732.
- [5] HIA G S. Genetic variation and clonal diversity of *Pennisetum glaucum* (Poaceae) detected by ISSR markers [J]. Ann Bot, 2001, 87: 585-590.
- [6] 刘康德, 李建国, 彭世清, 等. 油梨基因组 DNA 的提取及 RAPD 分析

[J]. 热带作物学报, 1999, 20(4): 57-61.

- [7] 李均敏, 金则新, 柯世省. 濒危植物七子花 RAPD 条件的优化 [J]. 植物学通报, 2002, 19(4): 452-456.
- [8] 金则新, 李均敏, 钟章成. 大血藤 RAPD 条件的优化 [J]. 浙江林学院学报, 2003, 20(2): 141-145.
- [9] 卢盛栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458-463.
- [10] 边才苗, 李均敏, 金则新, 等. 牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用 [J]. 遗传, 2002, 24(3): 279-282.