

青钱柳 ISSR-PCR 反应体系的优化

谈探^{1,2}, 金则新^{2*}, 李钧敏² (1.北京林业大学自然保护区学院, 北京 100083; 2.台州学院生态研究所, 浙江临海 317000)

摘要 采用改进的 SDS 法提取青钱柳基因组 DNA, 测试青钱柳 ISSR 扩增的最适退火温度, 并采用单因素试验, 测试了模板 DNA、Mg²⁺、dNTP、BSA、引物、Taq 酶 6 个因素对青钱柳 ISSR 扩增的影响。结果表明: 合适的退火温度为 56.3 °C; 适宜的扩增体系为: 10 μl PCR 反应体积中, 1×Taq 酶配套缓冲液浓度为 (10 mmol/L Tris·HCl, pH 值 9.0, 浓度为 50 mmol/L KCl, 0.1 % Triton X-100), 12 ng 模板 DNA, 浓度为 1.5 mmol/L MgCl₂, 浓度为 1.0 mmol/L 4×dNTP, 1mg/ml BSA, 15 pmol 引物, 0.75 U Taq 酶。

关键词 青钱柳; ISSR; 反应体系; 优化

中图分类号 Q94-336 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)24-6450-02

Optimization of the ISSR-PCR Reaction System of Cyclocarya paliurus

TAN Tan et al (College of Natural Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract The genomic DNA of Cyclocarya paliurus was extracted with the improved SDS method. Based on its DNA, the ISSR amplification reaction system was optimized. The fitting annealing temperature was confirmed and the effect of Mg²⁺ concentration, dNTP concentration, BSA dosage, primer dosage, Taq DNA polymerase dosage and DNA templates dosage on ISSR amplification were tested with the single factor method. The result was that, the fitting annealing temperature was 56.3 °C and the optimal reaction system of ISSR for Cyclocarya paliurus was determined as follows: 1×Taq polymerase corresponding buffer (10 mmol/L Tris·HCl pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1 % Triton X-100), 12 ng template DNA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.0 mmol/L 4×dNTP, 1 mg/ml BSA, 15 pmol primer, 0.75 U Taq DNA polymerase in total 10 μl reaction volume. Thus, the establishment of ISSR-PCR reaction system settled the genetic diversity foundation for Cyclocarya paliurus.

Key words Cyclocarya paliurus; ISSR; Reaction system; Optimization

ISSR 技术是利用复杂基因组中锚定的简单重复序列设计引物, 在 SSR 寡核苷酸的 3' 或 5' 末端随机锚定 2~4 个碱基, 促使 SSR 两侧反向排列的基因组片段的扩增。ISSR 引物序列较长, 具有高重复性和稳定性, 可用于辨别相关物种的基因型^[1]。

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) 是胡桃科青钱柳属植物, 为我国特有的单种属植物, 是天然保健食品资源。笔者以青钱柳的 DNA 为模板, 探讨了 ISSR-PCR 反应体系中 6 种因素对扩增的影响, 以期获得青钱柳扩增的最佳反应体系。

1 材料与方

1.1 材料 于浙江省临安市大明山风景区内海拔 900 m, 坡向为 NE42° 采集植株幼叶, 装在保鲜袋中, 封口, 放置于样品贮藏箱中 (箱中有超低温冰袋维持冷藏条件), 带回实验室, -80 °C 保存, 用于 DNA 的提取。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与定量。 采用改进的 SDS 法提取青钱柳的总 DNA, 经 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳, 用 GIS 凝胶成像分析系统 (上海天能科技服务公司生产) 拍照定量, -20 °C 保存备用。

1.2.2 ISSR 原初扩增条件及 PCR 扩增程序。 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学提供的序列, 由上海生物工程有限公司合成。原初的扩增反应条件是 10 μl PCR 反应体积, 包括: 1×Taq 酶配套缓冲液 (浓度为 10 mmol/L Tris·HCl, pH 值 9.0, 浓度为 50 mmol/L KCl, 0.1 % Triton X-100), 浓度为 1.5 mmol/L MgCl₂, 浓度为 0.6 mmol/L 4×dNTP, 浓度为 2 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA), 10 ng 模板 DNA, 20 pmol 引物 (上海 Sangon 公司生产), 0.75 U Taq 酶 (上海华美公司生产)。初步设定的 ISSR-PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环;

72 °C 完全延伸 5 min。

扩增反应在 P×2 梯度热循环仪 (美国, Thermo 公司生产) 中进行, 扩增产物在 1.6 % 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 g/mL 溴化乙锭) 中电泳 (电泳缓冲液为 0.5×TBE), 采用 λDNA/EcoR I+Hind III 作标准分子量参照物, 用 GIS 凝胶成像分析系统拍照保存。

1.2.3 退火温度的确定。 采用 PCR 温度梯度模式, 自动设定温度, 生成的温度梯度为 48.1、48.5、49.3、50.7、52.4、54.4、56.3、58.3、60.6、62.0、62.7、63.2 °C。其余 PCR 扩增程序同“1.2.2”, 以确定最合适的退火温度。

1.2.4 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化。 采用单因素试验, 共设计了 6 个因素各 4 个水平 (表 1)。其余条件同“1.2.2”。

表 1 ISSR-PCR 体系优化的因素和水平

	水平			
	1	2	3	4
Mg ²⁺ 浓度//mmol/L	1.5	1.75	2	2.25
dNTP 浓度//mmol/L	0.4	0.6	0.8	1.0
BSA 浓度//mg/ml	1	2	3	4
模板 DNA 用量//ng	6	12	18	24
引物用量//pmol	10	15	20	25
Taq 酶用量//U	0.50	0.75	1.00	1.25

注: BSA 为牛血清白蛋白。

2 结果与分析

2.1 退火温度的确定 根据原初反应条件进行引物的初筛, 选择能看到清晰条带的引物 UBC825 进行退火温度的确定, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 退火温度对扩增的影响很大。在 48.1~49.3 °C, 低分子量的条带清晰明亮, 但高分子量条带的条带缺失; 在 50.7~60.6 °C, 条带数目最多, 并且随着温度从 50.7~56.3 °C, 条带的清晰度与亮度逐渐增加, 至 56.3 °C 时, 条带亮度最高, 清晰度也最高; 随着温度的继续升高, 条带亮度逐渐减弱; 当温度达到 62.7 和 63.2 °C 时, 条带数目明显减少, 亮度减弱。因此, 青钱柳最适的退火温度为 56.3 °C。

2.2 模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响 随模板 DNA 量的

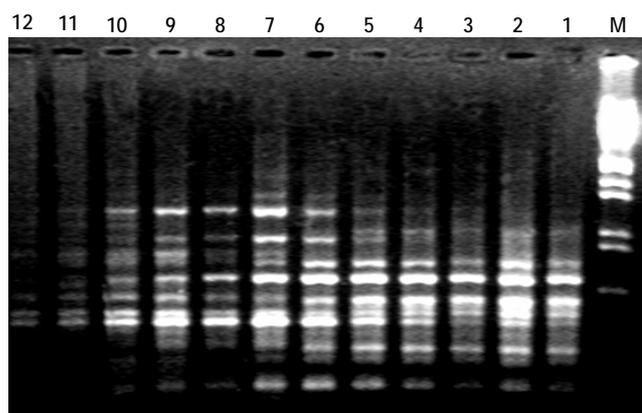
基金项目 浙江省自然科学基金资助项目 (Y504220)。

作者简介 谈探 (1982-), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生态学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-09-17

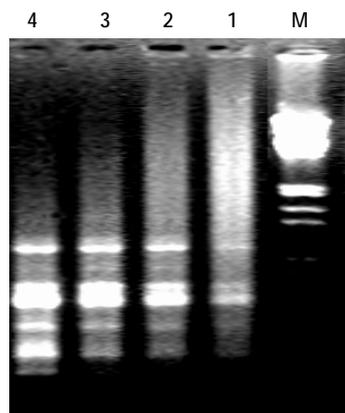
增加,其条带的亮度也逐步增加。当 DNA 量为 6 ng 时,条带很弱,背景值很高;当 DNA 量为 24 ng 时,条带很亮,背景值

虽低,但也一片模糊(图 2)。所以,青钱柳扩增的模板 DNA 量最适为 12 ng。



注:M 为 λ DNA/EcoRI+Hind III 标准分子量参照物;1~12 为退火温度分别为 48.1、48.5、49.3、50.7、52.4、54.4、56.3、58.3、60.6、62.0、62.7、63.2℃。

图 1 退火温度对青钱柳 ISSR 扩增的影响



注:M 为 λ DNA/EcoRI+Hind III 标准分子量参照物;1~4 为模板 DNA 量分别为 6、12、18、24 ng。

图 2 模板 DNA 量对青钱柳 ISSR 扩增的影响

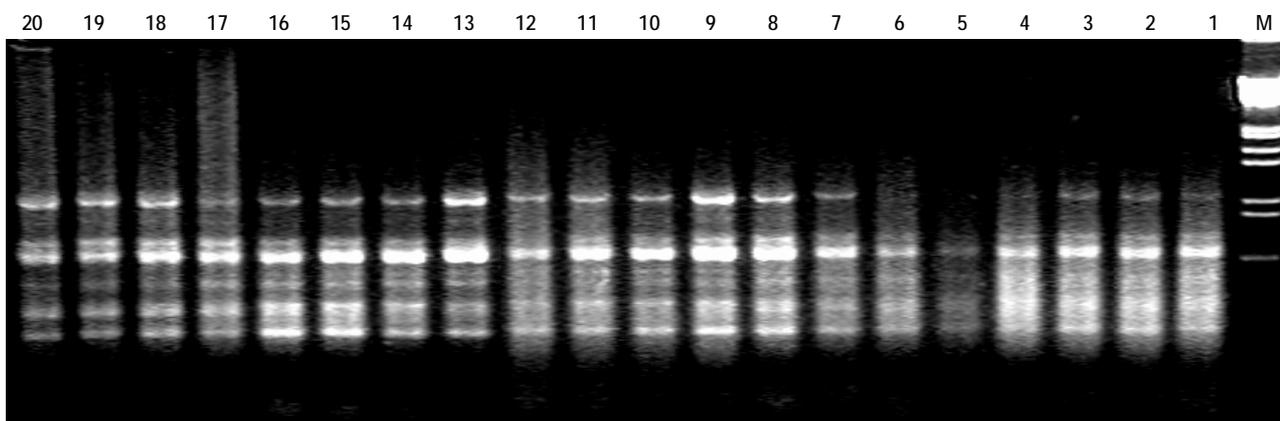
2.3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响 Mg^{2+} 浓度变化对扩增的影响不大,条带的数量和强弱相似(图 3)。因此,采用最低 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L 进行青钱柳 ISSR 的扩增。

2.4 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响 dNTP 浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱影响较大(图 3)。当 dNTP 浓度为 0.4 mmol/L 时,一片模糊,没有条带;当 dNTP 浓度为 0.6 mmol/L 时,开始出现条带,但条带很弱;当 dNTP 浓度 > 0.6 mmol/L 时,条带开始清晰起来;当 dNTP 浓度为 1.0 mmol/L 时,条带

清晰,而且明显比其他 3 个梯度亮度高。因此,青钱柳 dNTP 最适宜浓度为 1.0 mmol/L。

2.5 BSA 浓度对 ISSR 扩增的影响 BSA 用量的 4 个梯度,条带数量基本上没有变化,同时,随 BSA 用量的逐步提高,条带也越来越弱。当 BSA 浓度为 1 mg/ml 时,其亮度要比其他 3 个梯度的亮(图 3)。故青钱柳的最适 BSA 浓度为 1 mg/ml。

2.6 引物用量对 ISSR 带的影响 引物用量对条带数量的



注:M 为 λ DNA/EcoRI+Hind III 标准分子量参照物;1~4 为 Mg^{2+} 浓度分别为 1.50、1.75、2.00、2.25 mmol/L;5~8 为 dNTP 浓度分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L;9~12 为 BSA 浓度分别为 1、2、3、4 mg/ml;13~16 为引物用量分别为 10、15、20、25 pmol;17~20 为 Taq 酶的用量是 0.50、0.75、1.00、1.25 U。

图 3 几种因素对青钱柳 ISSR 扩增体系的影响

影响不大(图 3)。当引物为 10 pmol 时,高分子量条带亮度较大;当引物 > 10 pmol 时,高分子量条带亮度减弱;引物 > 15 pmol 时,低分子量条带亮度加强;过高的引物用量会造成非特异性扩增。因此,综合这 4 个梯度的条带,选择引物用量 15 pmol 进行青钱柳扩增。

2.7 Taq 酶单位对 ISSR 扩增的影响 Taq 酶单位的变化,对条带的数量影响不大(图 3)。Taq 酶单位的 4 个梯度中,0.50 U 梯度条带亮度弱,其余 3 个梯度高分子量条带亮度接近;另外,这 4 个梯度只有 0.75 U 的背景值相对较低。因此考虑到经济因素,选择 0.75 U Taq 酶用于青钱柳遗传多样性的扩增。

3 结论与讨论

研究结果显示,青钱柳 ISSR 分析适宜的退火温度为 56.3℃;青钱柳 ISSR 分析较适宜的扩增体系为:10 μ l PCR 反应体积,1 \times Taq 酶配套缓冲液 10 mmol/L Tris·HCl pH 9.0,浓度为 50 mmol/L KCl,0.1% Triton X-100,12 ng 模板 DNA,浓度为 1.5 mmol/L $MgCl_2$,浓度为 1.0 mmol/L 4 \times dNTP,浓度为 1 mg/ml BSA,15 pmol 引物,0.75U Taq 酶。

参考文献

- [1] TAPAN K M. Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* L.) O.Kuntze by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction[J]. *Euphytica*, 2002(128): 307-315.