

牡丹 ISSR-PCR 反应体系正交优化设计

王佳¹, 胡永红^{2*}, 张启翔¹ (1.北京林业大学, 北京 100083; 2.上海植物园, 上海 200231)

摘要 以凤丹(*Paeonia ostii*)基因组 DNA 为模板, 采用正交试验设计方法, 研究牡丹 ISSR 反应体系的影响因素, 建立了适合牡丹的 ISSR 反应体系及程序。10 μ l 反应体系为: 1 \times 反应缓冲液, 2.5 mmol/L Mg²⁺, 0.4 mmol/L dNTPs, 1.0 U Taq 聚合酶, 0.75 μ mol/L 引物, 10~20 ng 模板 DNA。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 45~60 $^{\circ}$ C (不同引物退火温度各异) 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。通过梯度退火试验, 确定不同引物的退火温度。

关键词 牡丹; ISSR-PCR; 正交设计; 反应体系

中图分类号 Q946-33 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)24-6465-02

Study on Optimization for ISSR Reaction System of Peony with Orthogonal Design

WANG Jia et al (College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract With *Paeonia ostii* genomic DNA as a template, the orthogonal design was used to optimize ISSR amplification system of Peony. A suitable ISSR reaction system was established, namely 10 μ l reaction system containing 1 \times PCR buffer, 2.5 mmol/L Mg²⁺, 0.4 mmol/L dNTPs, 1.0 U Taq DNA polymerase, 0.75 μ mol/L primer, 10~20 ng DNA template. PCR reactions were pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 45 s, annealing at 45~60 $^{\circ}$ C for 45 s and extension at 72 $^{\circ}$ C for 90 s, with a 7 min final extension at 72 $^{\circ}$ C, and then saved at 4 $^{\circ}$ C. The optimal annealing temperature for ISSR-PCR reaction was proposed by gradient PCR. Each primer has different annealing temperature.

Key words Peony; ISSR-PCR; Orthogonal design; Reaction system

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属亚灌木, 观赏价值高, 园艺化程度高, 大多为高度杂交的品种。许多牡丹品种因亲缘关系较近, 仅靠花型、花色、叶型等传统的形态指标难以区分, 这样既影响品种正确识别, 也给品种保护和利用等带来困难, 而分子标记技术可有效地用于品种鉴定, 同时也可以指导育种工作, 特别是在杂交育种过程中, 如果对选配亲本的亲缘关系不了解, 盲目杂交, 不利于保持品种的遗传多样性。目前, 分子标记技术应用在牡丹种及品种间亲缘关系研究、遗传多样性分析及杂交后代鉴定等多方面, 主要标记有 RFLP^[1]、RAPD^[2-4]、AFLP^[5]、ISSR 等^[6,7]。

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat, 简单序列重复区间扩增) 是 Zietkiewicz 等于 1994 年在 SSR 基础上创建的, 基于 PCR 扩增的一种新型分子标记技术。目前已广泛用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、生物进化及分子生态学等研究中^[8]。

ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子标记技术, 其扩增结果易受 Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 等因子的影响。因此, 在将该技术应用于一种植物材料的研究之前, 应先建立一个合适的 ISSR-PCR 反应体系, 以期获得可靠的结果。正交试验设计具有均衡分散、综合可比及效应明确等特性, 既减小了试验规模, 又不使信息损失的太多, 克服了单因素试验顾此失彼、试验规模巨大的缺点^[9,10], 从而最快找到最优水平组合^[11]。为此, 笔者利用正交试验设计对上述各因子反应条件进行优化, 建立适合牡丹的 ISSR 反应体系, 为牡丹品种的分子鉴定和遗传关系的分析等研究奠定了重要的技术基础, 也为其他物种 ISSR 反应体系的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 以凤丹(*Paeonia ostii*)叶片总 DNA 为材料。

1.2 基因组 DNA 模板的提取 牡丹基因组总 DNA 提取

采用 CTAB 微量法(4% CTAB; 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 50 mol/L EDTA; 1.5 mol/L NaCl; 2% PVP; 4% β -巯基乙醇)。所提模板 DNA 的质量采用琼脂糖凝胶电泳法检测(图 1)。①将 650 μ l (65 $^{\circ}$ C 预热) 4 \times CTAB 提取液加入到研磨好的叶片粉末中(成熟叶片研磨时加少量 PVP)。混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。②吸取上清至新管, 加入 650 μ l 氯仿/异戊醇(24:1), 离心 12 000 r/min, 10 min。③吸取上清至新管, 加入 600 μ l 氯仿/异戊醇(24:1), 离心 12 000 r/min, 10 min。④吸取上清至新管, 加入等体积异丙醇或 2 倍体积无水乙醇和 1/10 体积 NaAc, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min。⑤离心 12 000 r/min, 5 min。⑥沉淀用 800 μ l 70% 乙醇洗 2~3 次。⑦在空气中风干或用烘箱烘干, 加 50 μ l TE (含 RNase)。⑧ 65 $^{\circ}$ C 消化 30 min, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。

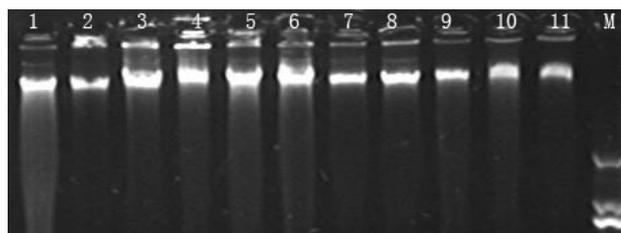


图 1 不同牡丹品种的模板 DNA

1.3 优化 ISSR-PCR 反应体系的正交设计 为确定牡丹 ISSR-PCR 反应的最适扩增条件, 经初步筛选, 引物 UBC850 [GT]₈YC, 其中(Y=CT)]作为此次正交试验的引物。分别对 Mg²⁺ 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、引物浓度、dNTPs 浓度和模板 DNA 用量等 5 个主要影响因子各 4 个水平作正交试验。选用 L₁₆(4⁵) 正交表, 设计 PCR 扩增体系各成分的因素-水平正交设计试验(表 1, 表 2)。反应体系为 10 μ l, 除表中所列因素外, 每管还有 1 \times PCR Buffer, 不足体积用无菌双蒸水补足^[12]。

1.4 ISSR-PCR 的扩增反应 实验所用 ISSR 引物均由上海生物工程有限公司合成, 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物序列, dNTPs、buffer、

基金项目 上海市绿化管理局科学技术项目 F050304)。

作者简介 王佳(1982-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 园林植物遗传育种。* 通讯作者。

收稿日期 2006-09-22

表 1 ISSR 反应的主要影响因子浓度梯度

浓度梯度	Mg ²⁺ mmol/L	Taq DNA 聚合 酶//U/10 μ l	dNTPs mmol/L	引物 μ mol/L	模板 DNA 用 量//ng/10 μ l
1	1.5	0.5	0.1	0.25	10
2	2.0	1.0	0.2	0.50	20
3	2.5	1.5	0.3	0.75	30
4	3.0	2.0	0.4	1.0	40

表 2 PCR 扩增体系各成分因素——水平正交设计 L₁₆(4⁵)

编号	Mg ²⁺ mmol/L	TaqDNA 聚合 酶//U/10 μ l	dNTPs 浓度 mmol/L	引物浓度 μ mol/L	模板 DNA 用 量//ng/10 μ l
1	1.5	0.5	0.1	0.25	10
2	1.5	1.0	0.2	0.50	20
3	1.5	1.5	0.3	0.75	30
4	1.5	2.0	0.4	1.0	40
5	2.0	0.5	0.2	0.75	40
6	2.0	1.0	0.1	1.0	30
7	2.0	1.5	0.4	0.25	20
8	2.0	2.0	0.3	0.50	10
9	2.5	0.5	0.3	1.0	20
10	2.5	1.0	0.4	0.75	10
11	2.5	1.5	0.1	0.50	40
12	2.5	2.0	0.2	0.25	30
13	3.0	0.5	0.4	0.50	30
14	3.0	1.0	0.3	0.25	40
15	3.0	1.5	0.2	1.0	10
16	3.0	2.0	0.1	0.75	20

注:表中共有 16 个处理,每个处理 2 个重复,共 32 管,按表中的数据加样。

MgCl₂ 和 Taq DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司。(Marker) DL2000 为天为时代公司生产。PCR 扩增反应应用美国 MJ Research 公司生产的 PTC-225 型扩增仪。

扩增程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 45 s,45~60℃(不同引物退火温度各异)复性 45 s,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 7 min;4℃保存。扩增反应结束后,将扩增产物

在含有溴化乙锭(EB)的 1.5%~2.0%琼脂糖凝胶中电泳分离,DNA 分子量标记为 DL2 000,以 3~5 V/cm 的电压电泳 1.5 h。电泳结束后,在紫外分析仪上观察扩增条带,并用 UVP 紫外自动成像仪采集图像。

1.5 退火温度梯度筛选 在正交试验结果分析的基础上,从 40 个引物中筛选出适合牡丹 ISSR-PCR 反应的引物 12 个,再利用 MJ Research PTC-225 扩增仪进行退火温度梯度试验,设置退火温度在 42.0~61.0℃,扩增仪自动生成 12 个梯度。选取其中 6 个梯度:45.1、50.0、53.2、55.9、58.0、60.6℃。所用 PCR 扩增体系为正交设计所得的最佳体系。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果分析(图 2) 依据琼脂糖电泳条带的强弱和杂带的多少做直观分析。Mg²⁺浓度较低时,会降低 Taq DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少(如 1,2);浓度过高时,反应特异性降低,出现非特异性扩增(如 13,15,16)。由图 2 可见,Mg²⁺浓度 2.5 mmol/L,条带最清晰,亮度也最高。处理 1、2 的 Mg²⁺和 dNTP 浓度较低,浓度过低会降低 PCR 产物的产量,同时,dNTP 能与 Mg²⁺结合,减少反应条带。处理 5、6 背景弥散,其引物浓度和模板 DNA 用量均较高,引物浓度过高会引起错配和非特异性扩增,DNA 用量过高其中所含杂质亦过高,影响 PCR 结果。处理 9 引物浓度过高,产生非特异性扩增,条带模糊不清晰。处理 11、12 TaqDNA 聚合酶和 DNA 浓度均过高,非特异性扩增多且一定程度上抑制 PCR 反应,条带少且背景弥散。处理 3、4、7、8、14 只能扩增出较弱谱带或几乎扩增不出条带。综合考虑各因素,处理 10 号条带最清晰且亮度较高,杂带较少,为最佳组合,即 1 U Taq 酶,1×buffer,10 ng/10 μ l 模板 DNA,2.5 mmol/L

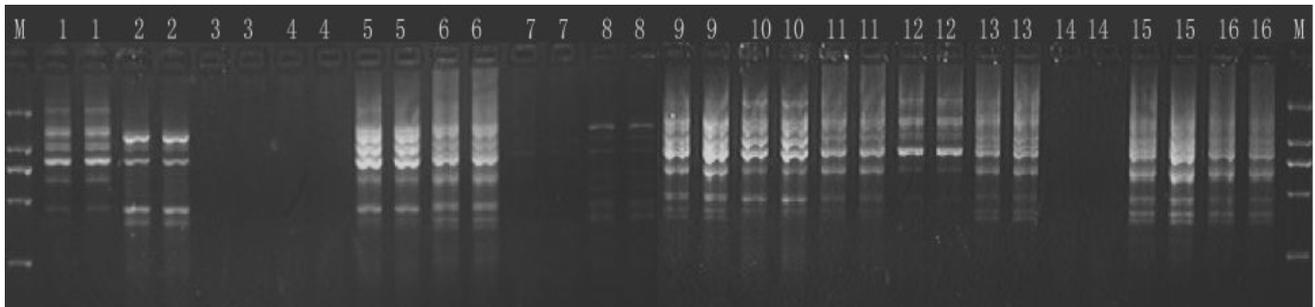


图 2 ISSR 标记 5 因素 4 水平正交电泳结果(M 为 DL2000)

Mg²⁺,0.4 mmol/L dNTPs,0.75 μ mol/L 引物。

2.2 退火温度的确定 同一引物对于不同的物种,退火温度可能不同^[3]。根据正交试验结果,选择处理 10 进行退火温度试验。由图 3 得出,退火温度较低时,产生的杂带多,背景较深(45~60℃);当退火温度逐渐升高时,扩增的特异性升高,杂带减少,弥散背景减少。由于 ISSR 的引物较长,所以退火温度要适当地提高。实验表明不同引物的最佳退火温度不同,不能以单一的退火温度进行所有引物的试验,每个引物的最佳退火温度均需筛选(表 3)。

3 讨论与结论

3.1 牡丹叶片 DNA 提取 DNA 的质量直接影响 PCR 反应的质量。通常情况下,嫩叶 DNA 提取较容易;成熟老叶因其叶中多酚、多糖等高分子物质明显增多,使得提取较高质量的 DNA 困难。试验表明,研磨叶片时加少量 PVR 最好不

表 3 引物序列及最佳退火温度

引物序列(5'-3')	退火温度/℃
807 (AG) ₈ T	60
811 (GA) ₈ C	58
812 (GA) ₈ A	58
825 (AC) ₈ T	55
827 (AC) ₈ G	60
846 (CA) ₈ RT	58
850 (GT) ₈ YC	58
859 (TG) ₈ RC	53
864 (ATG) ₈	55
881(GGGTG) ₃	60
895AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	53
899CATGGTGTGGTCATTGTCCA	45

注:其中 R=AG, Y=CT。

溶性的)和抗坏血酸(Vc)、较高浓度的 CTAB 提取液等(含有 4% β -巯基乙醇及 2%PVP)均有利于去除老叶中多糖及

(下转第 6484 页)

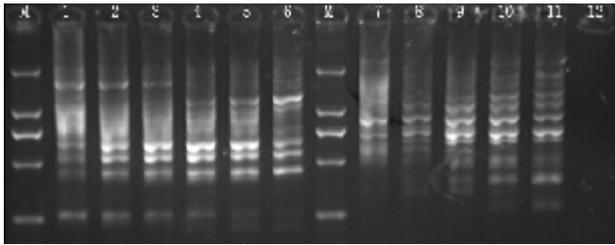


图 3 退火温度对 ISSR 反应的影响

多酚物质。沉淀时采用异丙醇效果好于无水乙醇(嫩叶正好相反),因异丙醇更易于沉淀小分子量物质,减少多糖等高分子物质的沉淀。DNA 中的 RNA 消化对 PCR 反应影响很小。

3.2 牡丹 ISSR-PCR 反应体系 在 PCR 反应体系中,DNA 模板用量过少,引物与模板结合机率降低,导致扩增产物的稳定性下降;用量过多,又可能将模板中杂质过多地带入反应体系,导致扩增产物稳定性下降,或过量扩增,使电泳图谱呈弥散状^[3]。本研究表明:牡丹 ISSR 体系具有较宽的模板用量范围,在 10 ng/10 μ l 就可以扩增出较好条带,大大节约了模板用量。

由文献分析所知^[8-11],TaqDNA 聚合酶用量一般为 1.0 U,而 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响,对牡丹 ISSR 扩增结果影响很大, Mg^{2+} 是 TaqDNA 聚合酶实现聚合反应所必须的,但它的有效浓度又与 PCR 体系中的模板用量(含有一些杂质)、dNTPs 用量等有关,尤其受 dNTPs 浓度的影响,因为 dNTPs 分子中的磷酸基团能定量地与 Mg^{2+} 结合,使实际反应中 Mg^{2+} 的浓度下降。因此将 Mg^{2+} 浓度作为该正交试验的首要影响因子(表 2)。试验结果表明, Mg^{2+} 1.5~2.0 mmol/L 浓度相对较低,产生的条带少或几乎没有; Mg^{2+} 2.5 mmol/L 为最佳浓度,条带清晰且多;大于 2.5 mmol/L,出现非特异性扩增。

引物浓度过高会导致引物二聚体的形成,且易引起碱基错配和产生非特异性扩增;引物浓度过低,其与 DNA 模板结合位点少,扩增产量下降,并有可能出现弥散现象。通常引物浓度范围在 0.25~1.0 μ mol/L。该试验结果表明引物

和 dNTPs 的浓度差异对牡丹 ISSR 扩增的影响不很明显。

退火温度因引物变化而变化,大多数 ISSR 引物适合较高的退火温度,有时高于其 T_m 值,且同一物种所有引物退火温度也不同。如该试验中 UBC899 引物的最适退火温度为 45 $^{\circ}$ C,远远低于其 T_m 值。因此在某种具体物种的反应体系建立时,不同引物的退火温度应逐一筛选。

该试验利用正交试验设计方法特点^[2],对影响 ISSR-PCR 反应的主要因素进行优化筛选,能够较快地找到比较理想的实验组合,因此比单一因素试验更加简便快速。

参考文献

- [1] 王子平.牡丹复合体的分子进化和系统学研究——细胞核核糖体基因变异的分析[D].北京:中国科学院植物所,1996.
- [2] 邹喻苹,蔡美琳,王子平.芍药属牡丹组的系统学研究——基于 RAPD 分析[J].植物分类学报,1999,37(3):220-227.
- [3] HOSOKI T, KIMURA D, HASEGAWA R, et al. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis[J]. Japan Soc Hort Sci, 1997, 66(2):393-400.
- [4] ZHENG GUOSHENG, CHEN XIANGMING, MENGLI. RAPD-PCR Analysis on genetic relationships between cultivars of tree peony[J]. Agricultural Science in China, 2002, 1(7):792-797.
- [5] 朱红霞.牡丹、芍药品种 DNA 指纹图谱绘制的初步研究[D].北京:北京林业大学,2004.
- [6] 索立志,周世良.杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J].林业科学研究,2004,17(6):700-705.
- [7] 杨淑达,施苏华.滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J].生物多样性,2005,13(2):105-111.
- [8] 王建波.ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J].遗传,2002,24(5):613-616.
- [9] 王家保,王令霞,刘志媛,等.芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J].生物技术,2005,15(5):37-41.
- [10] 杨传平,潘华,魏志刚.白桦 ISSR-PCR 反应体系的优化[J].东北林业大学学报,2005,33(6):1-3.
- [11] 林萍,张含国,谢运海.正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J].生物技术,2005,15(5):34-37.
- [12] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001:16,36-41,68.
- [13] 续九如,黄智慧.林业试验设计[M].北京:中国林业出版社,1995:71-73,184.
- [14] 冯晨静,张元慧,徐秀英,等.14 份杏种质的 ISSR 分析[J].河北农业大学学报,2005,28(5):52-56.