

引物浓度与退火温度对 ISSR 扩增片段大小的选择性

彭海, 张静, 李晓斐, 陈禅友* (江汉大学医学与生命科学学院, 湖北武汉 430056)

摘要 用 ISSR 法, 在不同浓度与不同退火温度下, 对长豇豆中基因组的不同分子量片段进行扩增, 结果表明, 引物浓度对扩增片段大小具有强烈选择性, 对退火温度也具有一定的选择性。

关键词 引物; ISSR; 扩增片段

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)17-05089-02

Selectivity of Primer Concentration and Annealing Temperature to ISSR Amplified Fragment Length

PENG Hai et al (College of Medicine and Life Science, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056)

Abstract Fragments of different molecular weight in asparagus bean genome were amplified using ISSR method under different primer concentrations and annealing temperatures. Result showed that primer concentration had strong selectivity to amplified fragment length and had certain selectivity to annealing temperature.

Key words Primer; ISSR; Amplified fragment

ISSR 是由 Zietkiewicz 等提出的用于扩增 2 个距离较近的相邻 SSR 位点间序列的一种方法^[1], 比 RFLP 便宜, 比 RAPD 重复性高^[2-3], 且 ISSR 多态性高, 较其他分子标记更适合遗传多样性较低的栽培品种内的遗传分析^[4-5], 因而被广泛应用于分子标记研究中。目前还没有引物浓度与退火温度对 PCR 扩增片段分子量大小影响效果报道。笔者研究了引物浓度与退火温度对 PCR 扩增片段分子量大小的影响, 以期其有助于深入了解 PCR 原理和对有检测片段大小要求的 PCR 反应的应用。

1 材料与方法

1.1 材料 长豇豆品种为江汉大学培育的长豇豆新品种柳翠^[6], 种子于室内发芽至 2 片真叶时收集叶片。紫外可见分光光度计 (SP-1910UVPC, 上海光谱仪器有限公司); PCR 反应仪 5331, Eppendorf, 美国。

1.2 基因组 DNA 的提取 按植物基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: DP305-02, TIANGEN, 北京) 的操作手册提取与纯化叶片中基因组 DNA。纯化后的 DNA 利用紫外可见分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 的光密度值以检测其纯度并计算其浓度。

1.3 引物序列、引物浓度与退火温度梯度 采用 Ajibade 等证明在豇豆属内扩增效果较好的 15 条 ISSR 引物 (表 1)^[6], 每条引物共设 4 种浓度, 分别为: 4.00、0.400、0.040 和 0.004 $\mu\text{mol/L}$; 12 种退火温度, 分别为: 46.0、46.3、47.4、49.2、51.5、54.1、56.8、59.5、62.0、64.1、65.7 和 66.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 ISSR 分析 除引物浓度与退火温度外, ISSR 分析参照 Ajibade 等进行^[6], 但为了多次电泳比较, PCR 反应体系扩大为 50 μl , 反应混合物于 PCR 反应仪中进行。每一反应重复 3 次。反应结束后, 10 μl 扩增产物用 2% 的琼脂糖在 0.5 \times TBE buffer 中 5 V/cm 的电压电泳 2.5 h 后于 UVP 凝胶成像系统中拍照。

2 结果与分析

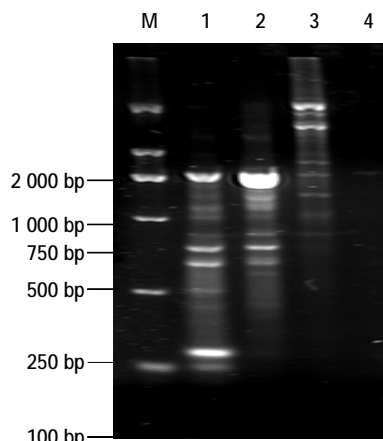
2.1 引物浓度对扩增片段大小的选择性 图 1 表明, 不同的引物浓度对不同分子量片段的扩增有强烈的选择性。并

表 1 ISSR 引物编号与碱基序列

编号	序列	编号	序列
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	861	ACCACCACCACCACCACC
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
817	CACACACACACACACAA	880	GGAGAGGAGAGGAGAGA
825	ACACACACACACACACT	885	BHBGAGAGAGAGAGAGA
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	888	BDBCACACACACACACA
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	889	DBDACACACACACACAC
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	891	HVHTGTGTGTGTGTGTG
856	ACACACACACACACACYA		

注: 序列来源于英国哥伦比亚大学。Y=嘧啶, R=嘌呤, B=无 A, D=无 C, H=无 G, V=无 T。

且这种选择性在 15 条试验引物中都表现出一致的趋势, 即引物浓度低的时候更有利于大分子量的片段的扩增, 相反, 引物浓度高时, 则更有利于小分子量片段的扩增。例如当 808 引物浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 的时候, 扩增片段分子量大小在 100~1 000 bp 之间; 当浓度降低为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的时候, 扩增片段长度增加到 300~1 000 bp, 而引物浓度进一步降低为 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 的时候, 扩增片段长度增加为 500~2 000 bp。



注: M 为 DL2000 Marker; 泳道 1-4 为引物浓度为 4.00-0.004 $\mu\text{mol/L}$ 的扩增结果。

图 1 引物浓度对扩增片段大小的选择性

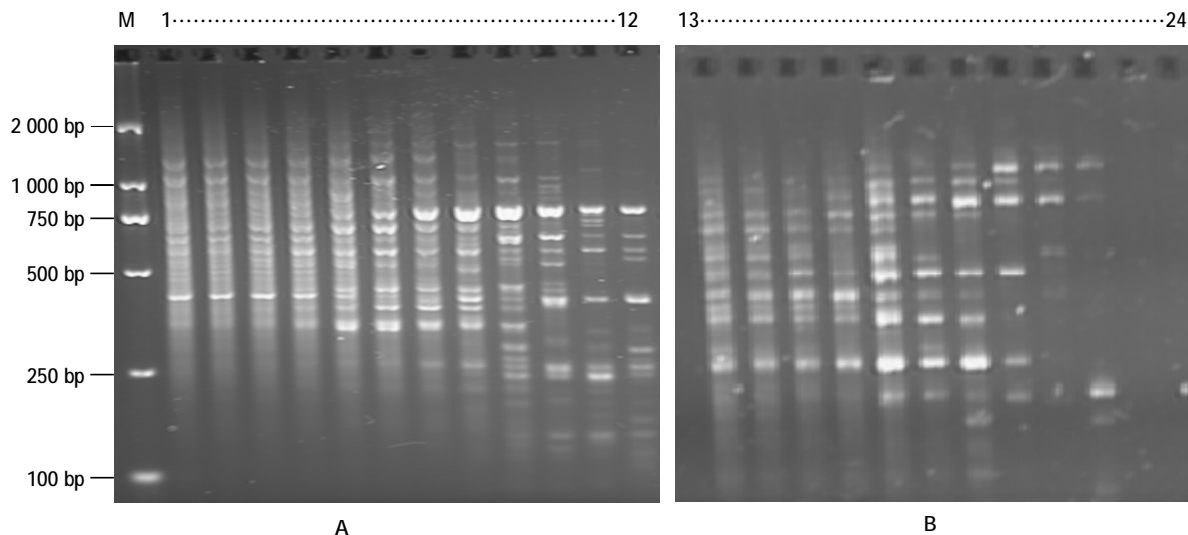
2.1 退火温度对扩增片段大小的选择性 一般来说, 在较高的退火温度下, 由于扩增的特异性增强, 条带逐渐减少, 这与前人的研究相同。然而不同退火温度对扩增片段大小也具有选择性, 但不如引物浓度的选择性强烈。大部分引物 (14 条, 占 93.33%) 在一定温度范围内, 当退火温度逐渐增高时, 小片段扩增逐渐增多, 大片段逐渐减少。温度对片段

基金项目 武汉市科技攻关项目 (20062002097) 资助。

作者简介 彭海 (1975 -), 男, 四川遂宁人, 博士研究生, 研究方向: 植物遗传育种。* 通讯作者, 教授, E-mail: ccy@jhun.edu.cn。

收稿日期 2007-03-14

大小的选择性还表现为小分子量的片段在高温下扩增效率增强。如引物 808,当退火温度超过 58 ℃时,小于 250 bp 的小片段才出现并且随温度的上升扩增量逐步增大,同时超过 1 500 bp 的大片段逐渐消失(图 2 A)。但引物 825 占 15 条引物的 6.67%)与这个规律不同,即在较高温度下大片段有效的扩增了,且小片段并没有增加(图 2 B)。



注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1-12 与 13-24 分别为引物 808 与 825 在退火温度为 46~66.5 ℃的扩增结果。

图 2 退火温度对扩增片段大小的选择性

子量的片段时,选择较高的引物浓度并配合较高的退火温度。已有报道中没有关于引物浓度与退火温度对扩增片段大小选择性这一特殊现象的报道,因此对其机理的研究将有利于深入了解 PCR 原理,也有助于对有检测片段大小要求的 PCR 扩增的应用。

参考文献

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-83.
- [2] YANG W, De OLIVEIRA A C, GODWIN I, et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghums[J]. *Crop Science Society of America* 1996, 36(6): 1669-1676.
- [3] SALIMATH S S, DE OLIVEIRA A C, GODWIN I D, et al. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers[J]. *Genome*, 1995, 38(4): 757-63.
- [4] GONZALEZ A, WONG A, DELGADO-SALINAS A, et al. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean this research was funded by the Mc Knight foundation collaborative crop research program[J]. *Crop Sci*, 2005, 45(2): 606-615.
- [5] AJIBADE S R, WEEDEN N F, CHITE S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna* [J]. *Euphytica*, 2000, 111(1): 47-55.
- [6] 陈禅友. 豇豆新品种——柳翠[J]. *长江蔬菜*, 2006(7): 7.
- [7] HIGUCHI R. Using PCR to engineer DNA [M]//ERLICH H A, editor. *PCR Technology: principles and applications for DNA amplifications*. New York: Stockton Press, 1989: 61-70.
- [8] FOORD O S, ROSE E A, eds. Long-distance PCR, in *PCR Primer* [M]. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.