

萱草ISSR-PCR 最佳反应体系的建立

黎海利, 董丽*, 谭飞理 (北京林业大学国家花卉工程研究中心, 北京 100083)

摘要 [目的] 为利用ISSR 标记研究萱草的遗传多样性和辅助育种奠定基础。[方法] 从萱草中提取基因组DNA, 建立萱草的ISSR-PCR 反应体系, 并通过正交试验对其进行优化。[结果] 萱草的最佳ISSR-PCR 反应体系为: ddH₂O 16.8 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl, 10 × buffer 2.5 μl, 10 μmol/L Pi ner 0.3 μl, 50 ng/L DNA 3 μl, Taq 酶1 U, 总体积25 μl。萱草的最佳ISSR 扩增反应程序为: 94 °C 变性5 min, 94 °C 变性45 s, 48.3 °C 退火1 min, 72 °C 延伸2 min, 共38 个循环, 最后72 °C 延伸7 min。该反应程序下进行的ISSR 扩增, 扩增产物最多, 银染的效果最好。[结论] 该研究建立了萱草ISSR-PCR 的最佳反应体系和反应程序, 通过ISSR 扩增可获得清晰、稳定的条带。

关键词 萱草; ISSR; 最佳反应体系

中图分类号 S682.1+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04884-02

Establishment of the Optimum Reaction System for ISSR PCR of *Hemerocallis fulva* L.

Li Hai-li et al (National Research Center of Horticulture Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for studying the genetic diversity and the assistant breeding of *Hemerocallis fulva* L. by using ISSR markers. [Method] The genomic DNA was extracted from *H. fulva*. ISSR-PCR reaction system of *H. fulva* was established and optimized in the orthogonal test. [Result] The optimum reaction system for ISSR-PCR of *H. fulva* was as follows: ddH₂O 16.8 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl, 10 × buffer 2.5 μl, 10 μmol/L Pi ner 0.3 μl, 50 ng/L DNA 3 μl, Taq enzyme 1U, with the total volume of 25 μl. The optimum reaction procedure for ISSR amplification of *H. fulva* was as follows: denaturation for 5 min at 94 °C, 30 cycles of denaturation for 45 s at 94 °C, anneal for 1 min at 48.3 °C, extension for 2 min at 72 °C, finally extension for 7 min at 72 °C. Through ISSR amplification under this reaction procedure, the amplified products were most and the silver-staining effect was best. [Conclusion] The optimum reaction system and reaction procedure for ISSR-PCR of *H. fulva* was established in this research and clear and stable bands could be obtained through ISSR amplification.

Key words *Hemerocallis fulva* L.; ISSR; Optimum reaction system

ISSR 标记技术是 Zietkiewicz 于 1994 年提出的, 该技术具有操作简单、成本低、条件稳定、快速、灵敏、检测多态能力强、所需 DNA 模板量少等优点, 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、进化及分子生态学研究^[1]。

萱草花色艳丽、适应性强, 在园林绿化中极受欢迎, 而我国萱草的育种相对落后, 大部分品种引自国外。培育具有自主知识产权的萱草品种成为当务之急, 而揭示萱草的遗传背景是育种的重要前提。国内用分子标记对萱草进行遗传多样性分析的研究较少, 笔者试图建立适合萱草的 ISSR-PCR 反应体系, 为萱草 ISSR 标记进行遗传多样性分析、揭示亲缘关系、研究萱草属植物分类和系统发育、种质资源的开发利用及辅助育种等奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 栽培品种 *Hemerocallis* 'Holiday Delight'、'All American Baby'、'Purple Waters', 取新鲜叶片, 以上品种来自北京植物园种苗繁育基地。

1.2 DNA 的提取及检测 用天根公司植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305) 进行 DNA 的提取。DNA 的检测用 0.8% 琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液 1 × TAE, 上样量 7 μl, 电压 80 V, 1 h, 最后在 Gel Doc 2000™ 型凝胶成像系统上拍照, 用 Quantity One 系统软件进行处理分析。

1.3 ISSR 扩增体系的建立及优化 用于 ISSR-PCR 反应的 Taq 酶 (500 U) 购自泽星公司, dNTP (2.5 mmol/L each) 购自天根公司, ISSR 引物由奥科公司合成 (参考哥伦比亚大学引物^[2])。经初步筛选出的引物 [UBC864, 即 (ATG)₅] 作为此次正交试验的固定引物, 标准分子量 (Marker) 100 bp ladder 购自

天根公司, 模板 DNA 稀释为 50 ng/L。

为确定 PCR 反应中各因素的最佳水平, 采用正交设计 L₉(3⁴) 对萱草 ISSR-PCR 反应体系的 4 因素 3 水平进行优化试验 (表 1)。

1.4 PCR 产物的检测 产物中加入 5 μl Loading buffer, 95 °C 变性 10 min 后立即置于冰浴中待用, 取 6 μl 变性产物在 6% 变性聚丙烯酰胺上电泳, 预电泳电压 2 000 V, 恒定功率 100 W 约 30 min, 70 W 电泳 1.5 h, 电泳结束后, 对胶板进行固定、脱色、水洗、银染、冲洗、显影、定影、干燥等银染程序。

表 1 PCR 正交设计

Table 1 The orthogonal design for PCR

编号 No.	Taq E U Taq DNA polymerase	DNA μ DNA template	dNIP μ	引物 μ Pi ner
1	0.5	1.0	1.0	0.3
2	0.5	2.0	1.5	0.4
3	0.5	3.0	2.0	0.5
4	1.0	1.0	1.5	0.5
5	1.0	2.0	2.0	0.3
6	1.0	3.0	1.0	0.4
7	1.5	1.0	2.0	0.3
8	1.5	2.0	1.5	0.5
9	1.5	3.0	1.0	0.4

2 结果与分析

2.1 最佳体系 (25 μl) 试验表明, PCR 各成分分别为 ddH₂O 16.8 μl, dNTP (2.5 mmol/L each) 2.0 μl, 10 × buffer 2.5 μl, Pi ner (10 μmol/L) 0.3 μl, DNA (50 ng/L) 3 μl, Taq E 1U 时所获取的条带最清晰, 亮度最大, 条带数量多。其余均出现不同程度的拖带及条带不清晰现象。

2.2 最佳退火温度的确定 对萱草 ISSR-PCR 最佳反应体系进行梯度退火, 得到最佳退火温度为 48.3 °C。此时得到的

基金项目 国家林业局 948 项目 [2002-08(2)]。

作者简介 黎海利 (1981 -), 女, 广西宜州人, 博士研究生, 研究方向: 园林植物与观赏园艺。* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2008-02-27

扩增产物量大,电泳后的条带多,整齐。

2.3 ISSR 扩增反应程序 94 预变性5 min;94 变性45 s,48.3 退火1 min,72 延伸2 min,38 个循环;72 延伸7 min。此程序下进行的扩增,产物最多,银染效果最好。

3 讨论

模板DNA的质量与浓度是试验成败的关键之一,该试验采用DNA浓度为150 ng/25 μ ,可取得较理想的结果。

Taq DNA 聚合酶是PCR反应中不可缺少的,浓度过高会引起非特异性扩增,过低则合成产物量减少,一般用量为每25 μ 0.5~2.5 U,但不同公司或不同批次的产品常有很大差异,由于酶的浓度对PCR反应影响极大,因此需进行一定的探索性试验,找出适合试验的用量,该体系中以1 U为最佳用量。

引物是PCR特异性反应的关键,PCR产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。要保证PCR反应能准确、特异、有效地对模板DNA进行扩增,试验要选出与试验材料对应的引物进行有效扩增,试验初步选出引物UBC864,另外,ISSR分析应选出更多的引物,揭示物种的遗传多样性。

退火温度是影响PCR特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至40~60,可使引物和模板发生结合。由于模板DNA比引物复杂得多,引物和模板之间的碰撞结合机会远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间取决于引物的长度、碱基组成及其浓度,还有靶基因序列的长度。

(上接第4835页)

(Pa.S)对标准浓度(μ g/ml)进行线性回归,得到线性回归方程和相关系数。

在样品中加入10种农药混合标准溶液,使样品中添加农药标准样品的浓度为0.01 ng/kg,然后按“1.2.2”条件处理样品,以DB-17获得的色谱图按信噪比3倍条件计算方法检出限。10种有机磷农药保留时间、线性回归方程、相关系数及方法检出限测定结果见表1。

表2 有机磷农药回收率测定结果

Table 2 Recovery test for organophosphorus pesticides

农药 Pesticide	添加水平0.05 Addition level		添加水平0.10 Addition level		添加水平0.50 Addition level	
	平均值 Mean	RSD	平均值 Mean	RSD	平均值 Mean	RSD
乐果	112.60	4.27	116.88	2.26	110.50	5.20
敌敌畏	90.13	5.74	96.23	2.97	95.33	5.38
对硫磷	98.52	6.07	97.95	3.80	102.50	4.21
甲拌磷	89.02	10.99	97.00	1.48	98.49	2.00
倍硫磷	110.00	10.69	100.60	0.98	101.20	3.20
乙酰甲胺磷	98.20	10.27	111.20	4.41	98.98	5.33
甲胺磷	94.36	4.22	101.60	8.13	92.51	7.21
久效磷	110.00	3.75	109.30	7.20	107.50	9.02
甲基对硫磷	104.10	1.50	112.90	4.67	109.44	5.00
硫磷	87.18	5.74	101.80	5.08	103.30	4.98

注:添加水平单位均为 ng/kg (n=3)。

Note: Units of addition level are all ng/kg (n=3).

不同引物退火温度不同,该试验所用引物UBC864的最佳退火温度为48.3,时间为1 min。

Mg²⁺浓度对反应的特异性及产量有显著影响。一般以1.5~2.0 mmol/L为好,浓度过高,反应特异性降低;浓度过低,产物减少。10×Buffer一般随Taq DNA聚合酶供应。该试验直接采用Taq DNA聚合酶供应的缓冲液就能满足要求,提高了试验效率。

高浓度dNTP易产生错误掺入,过高则可能引起非特异性扩增;但浓度过低,将降低反应产物的产量。dNTP能与Mg²⁺结合,使游离的Mg²⁺浓度降低。因此,dNTP的浓度直接影响到在反应中起重要作用的Mg²⁺浓度。

利用正交设计方案,初步建立了萱草ISSR标记的PCR反应体系。这一反应体系受各种因素的影响,包括DNA的浓度、Taq酶的用量、dNTP浓度、引物、退火温度、扩增循环的周期数等,均会影响扩增产物的数量和质量。因此要优化反应体系和反应程序,增强试验的可重复性。该试验为萱草建立最佳反应体系和反应程序,能对萱草进行有效的ISSR扩增,获得清晰稳定的条带以及为萱草的相关分子研究打下基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 周延清. DNA分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 145.

2.2 10种有机磷农药在水果中回收率的测定 在苹果等样品中添加标准工作液,添加水平分别为0.05、0.10、0.50 ng/kg,充分混匀放置0.5 h后按“1.2.2”步骤进行测定。每个添加水平测定3次(表2)。

由表2可知,添加水平0.05、0.10、0.50 ng/kg的3次平行测定的回收率为87.18%~116.88%,变异系数为0.98%~10.99%,说明该试验方法具有较好的准确度和精确度。为了得到较好的回收率,氮气浓缩乙腈是关键,最好不要完全吹干,还剩2~3滴乙腈时即取出,使剩余乙腈在室温下自然挥发掉。如果完全吹干或吹干一段时间后再取出,对测定回收率有影响,特别对测定敌敌畏、甲拌磷的回收率影响较大,使其测定值偏低。

3 结论

试验结果表明,采用乙腈提取,气相色谱法测定水果中有机磷农药残留量的方法,试剂用量少,分析速度快,操作简便,特别适合批量样品的检测分析。

参考文献

- [1] 王慧,鲁毅强,张朝晖,等. 气相色谱法测定韭菜中有机磷农药残留量[J]. 北京科技大学学报, 2006, 28(5): 427-429.
- [2] 陈伟琪,侯小凤,张珞平. SMPE/GC联用测定蔬菜中残留有机磷农药的方法研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(4): 510-515.
- [3] 洪蔚萍,陈枝华,杨忠强. 气相色谱法同时测定蔬菜中多种有机磷、拟除虫菊脂类农药残留[J]. 色谱, 2004, 22(3): 289.
- [4] 农业部农药检定所. 农药残留量实用检测方法手册: 第1卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [5] 陈皓,周琪,王萍亚,等. 气相色谱法测定蔬菜和水果中的有机磷残留农药[J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(5): 585.