

春兰ISSR PCR 反应体系的建立和优化

马丽娅, 孙小琴, 贾文杰, 李恩香, 杨柏云* (南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330031)

摘要 [目的] 为进一步从分子水平上研究春兰种群的遗传多样性奠定基础。[方法] 以春兰基因组 DNA 为模板, 通过单因子试验研究 ISSR 反应体系中主要成分对扩增结果的影响, 以寻找适合春兰 ISSR 分析的反应体系。[结果] 春兰的 ISSR 反应体系较适宜的扩增条件为: 25 μ l PCR 反应体积中, 15.78 μ l 双蒸水, 2.5 μ l 1 \times CR buffer, 1.1 U Taq DNA 聚合酶, 100 ng 基因组 DNA, 2.0 mmol/L MgCl₂, 150 μ mol/L dNTPs, 2 μ mol/L 引物。最佳扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 40 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 复性温度比各引物的 T_M 值略低 1 ~ 2 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。[结论] 该优化系统的建立为进行春兰鉴定及种质遗传多样性分析提供了一个标准化程序。

关键词 春兰; ISSR; 反应体系优化

中图分类号 S682.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-14912-03

Establishment and Optimization of ISSR PCR Reaction System for *Cymbidium goeringii*

MA Li-ya et al (College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract [Objective] The aim was to lay the foundation for the further study of population genetic diversity of *Cymbidium goeringii* from the molecular level. [Method] With the genomic DNA of *C. goeringii* as template, the influence of the main components in the ISSR reaction system on the amplification result was studied by single factor experiment to search for the reaction system suitable for ISSR analysis of *C. goeringii*. [Result] The suitable amplification conditions of ISSR reaction system in *C. goeringii* was as 15.78 μ l double distilled water, 2.5 μ l 1 \times PCR buffer, 1.1 U Taq DNA polymerase, 100 ng genomic DNA, 2.0 mmol/L MgCl₂, 150 μ mol/L dNTPs, 2 μ mol/L primer in the 25 μ l PCR reaction volume. The optimum amplification programme was that after pre-denaturing of 5 min at 94 $^{\circ}$ C, 40 cycles were performed with denaturing of 45 s at 94 $^{\circ}$ C, denaturing temperature of 1 ~ 2 $^{\circ}$ C lower than the different primer's T_M value, annealing of 45 s, extension of 75 s at 72 $^{\circ}$ C, a final extension step of 7 min at 72 $^{\circ}$ C and preservation at 4 $^{\circ}$ C. [Conclusion] The establishment of the optimization system laid the standardization program for the identification of *C. goeringii* and the analysis of its genoplasm genetic diversity.

Key words *Cymbidium goeringii*; ISSR; Optimal reaction system

春兰(*Cymbidium goeringii*)属于兰科(Orchidaceae),兰属(*Cymbidium*),是多年生草本植物。在我国有悠久的栽培历史,具有很高的观赏价值和经济价值,但由于过度开采,其种质资源遭到了很大破坏。对物种进行遗传多样性和遗传结构的研究是探讨其适应性、生存力的基础,也是分析濒危物种致濒机制的基础,从而帮助制定科学有效的保护策略和措施,常用手段有 RFLP、AFLP、RAPD、SSR、ISSR 等^[1]。

目前,关于兰科植物的研究主要集中在形态学、分类学、生理学、孢粉学、区系地理学和繁殖生物学等方面,而关于居群遗传学的研究则较少,其中绝大多数是采用等位酶的方法^[2-4]。关于 ISSR 技术的应用已有较多报道,而采用 ISSR 技术对野生春兰的遗传多样性和居群遗传结构进行的研究目前尚少有报道^[5-7]。笔者拟建立了重复性高、结果清晰且稳定的 ISSR 反应体系,以期为进一步从分子水平上研究春兰种群的遗传多样性以及探索切实可行的保护策略提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 春兰实验样品采自江西省吉安市井冈山兰圃,每个兰圃采集 15 ~ 20 个样本,同时采集凭证标本供研究用。采集比较幼嫩的叶片提取 DNA,样品用硅胶干燥法进行干燥^[8]。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取与检测。采用 CTAB 法提取春兰基因组 DNA。用 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量;用分光光度计测定其纯度和浓度(DNA 纯度用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值来估算;DNA 浓度(μ g/ml) = OD₂₆₀ \times 50 \times 稀释倍数),计算 DNA 获得

率(DNA 量/所用叶片量 \times 100%)。

1.2.2 ISSR PCR 条件筛选。根据相关文献报道和实验要求对 DNA 扩增中的一些参数进行梯度设置,并严格控制其他参数和反应条件,确保实验的准确性和可比性。根据预试验结果设置了浓度梯度。Taq polymerase 的浓度分别为 0.15、0.18、0.20、0.22、0.25 μ l, DNA 的浓度分别为 20、40、80、100、120、150、300、600 ng, Mg²⁺ 的浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L, dNTPs 的浓度分别为 100、120、150、180、210、240 mmol/L。每次选择的 T_M 值比引物 T_M 值低 1 ~ 2 $^{\circ}$ C。

1.2.3 ISSR PCR 扩增。将各样品 DNA 稀释 20 倍至 20 ng/ μ l。取 1.5 ml 已灭菌的 eppendorf 管,依次加入 ddH₂O 10 \times 缓冲液、dNTPs、Taq 酶,混匀后分装入各扩增薄壁管中,依次加入模板,按循环次序放入 PCR 扩增仪中,按以下程序进行扩增。扩增完毕,将样本取出,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

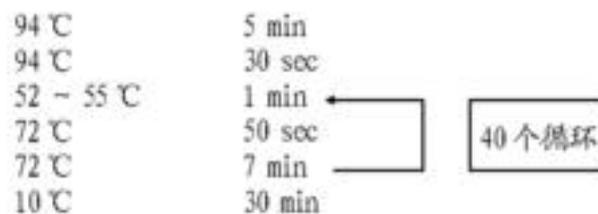


图1 ISSR PCR 扩增程序

Fig.1 ISSR PCR amplification program

1.2.4 ISSR 引物筛选。ISSR 引物根据加拿大 British Columbia 大学公布的序列设计,由上海生物工程技术服务有限公司合成,编号为 UBC 808-UBC ISSR22,共 66 条引物。

1.2.5 电泳和拍照。以 DL2000(大连宝生生物有限公司提供)为分子标记,用含有 0.1% EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳(0.6 g 琼脂糖,40 ml 1 \times TAE 反应缓冲液)。在 100 V 稳压和 100 mA 电流下电泳约 55 min,电泳后的凝胶在凝胶成像仪下拍照并保存。

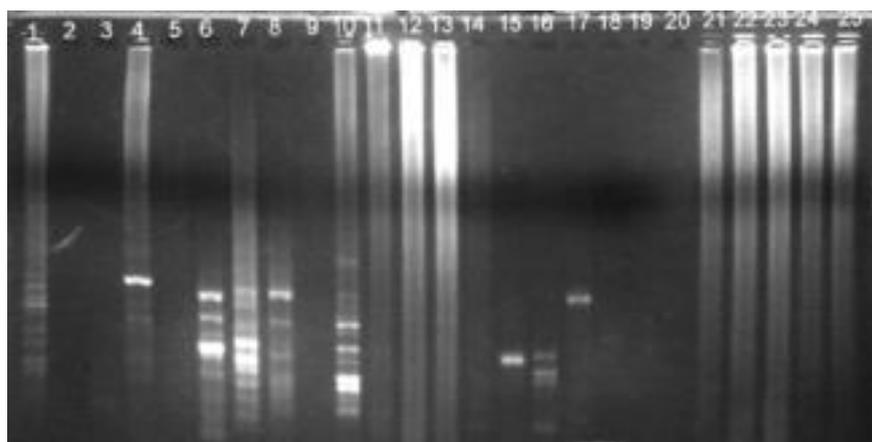
基金项目 国家环保总局项目(20061A0013)。

作者简介 马丽娅(1986-),女,云南师宗人,学士,研究方向:细胞工程。* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-28

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果 设置0.22、0.25、0.28、0.3 μ 4个 Taq 酶浓度, 首先用817、818、819、820、821、822、823、824、825、826 10个引物进行扩增。扩增结果显示, 当 Taq 酶浓度为0.22 μ 时效果较好, 如图2和图3所示。从图中可看出1、6、7、8、5条带明显, 分别由引物817、822、823、824、826 扩增得到; 故选择 Taq 酶浓度为0.22 μ , 进行下一步试验, 同时筛选827、828、829、830、834、835、876、840、841 为扩增引物, 扩增结果如图3所示。从66个ISSR引物中, 筛选出了14个稳定性高、重复性好的引物, ISSR引物及其序列如表1所示。

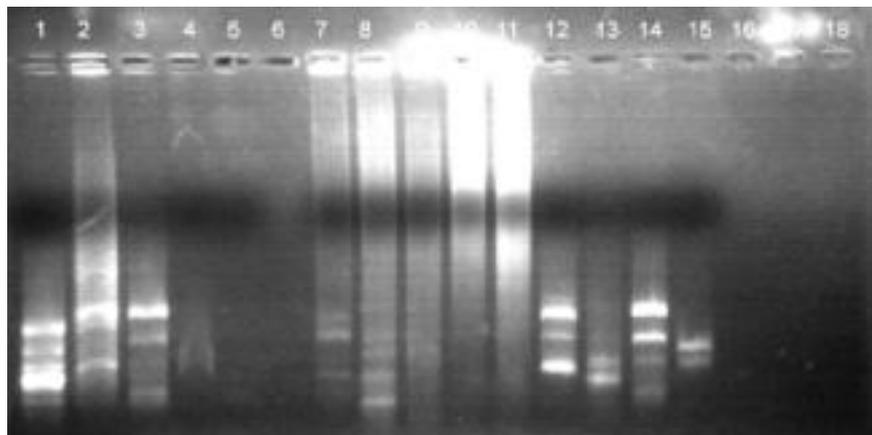


注:1~10:0.22 μ ; 11~20:0.25 μ ; 21~25:0.28 μ 。

Note: 1-10, 0.22 μ ; 11-20, 0.25 μ ; 21-25, 0.28 μ 。

图2 引物筛选结果图

Fig. 2 The screening result of primers



注:1~5:0.28 μ ; 6~18:0.30 μ 。

Note: 1-5, 0.28 μ ; 6-18, 0.30 μ 。

图3 引物筛选结果图

Fig. 3 The screening result of primers

表1 筛选出的ISSR引物及其序列

Table 1 The screened ISSR primers and their sequences

序号No.	序列Sequences
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
842	GAG ACA GAG ACA GAG AYG

注:N=(A,C,T,G); R=(A,G); Y=(C,T); B=(C,G,T); D=(A,G,T); H=(A,C,T); V=(A,C,G)。

Note:N=(A,C,T,G); R=(A,G); Y=(C,T); B=(C,G,T); D=(A,G,T); H=(A,C,T); V=(A,C,G)。

2.2 Taq 酶对ISSR PCR 反应的影响 在不同 Taq 酶浓度梯度下, PCR 扩增结果如图4所示, 由图4可知, 扩增结果随 Taq 酶浓度升高呈梯度变化, 当 Taq 酶浓度为0.15 μ 时基本检测不到电泳条带; 当 Taq 酶浓度为0.18、0.20、0.25 μ 时有条带出现, 但条带数目较少且不清晰, 非特异性扩增较多。当 Taq 浓度为0.22 μ 时, PCR 扩增产物能得到清晰稳定的条带, 且无非特异性扩增, 背景较暗。因此, Taq 酶浓度在该组实验中的最适浓度为0.22 μ (5 U μ)。

2.3 模板 DNA 浓度对ISSR PCR 反应的影响 由图5可知, 当模板浓度在40~100 ng 时, 均能得到清晰稳定的条带, 基本无非特异性扩增, 产物稳定; 当模板浓度大于100 ng 时, 虽也能扩增出条带, 但随模板浓度的升高, 条带弥散现象也随之明显; 当模板浓度为600 ng 时完全不能扩增出条带; 模板浓度为100 ng 时, 扩增出的条带最清晰。

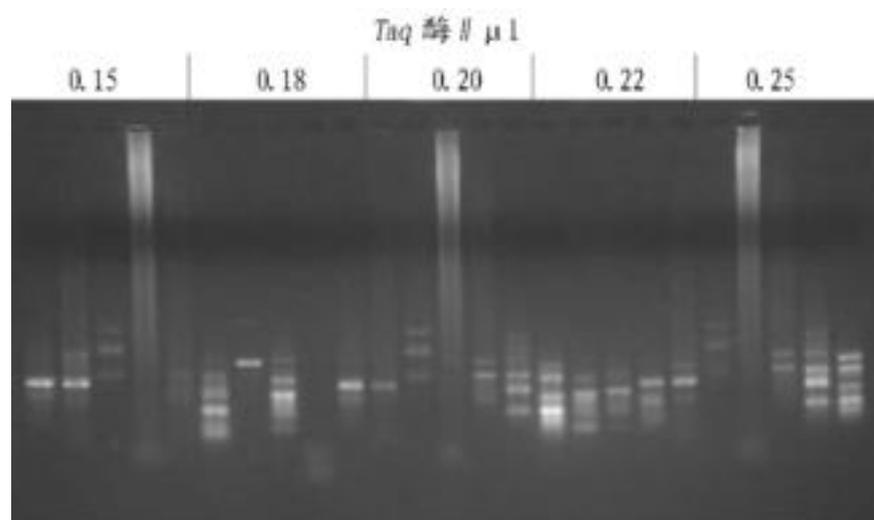


图4 Taq DNA 聚合酶对ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effects of Taq DNA polymerase on ISSR amplification

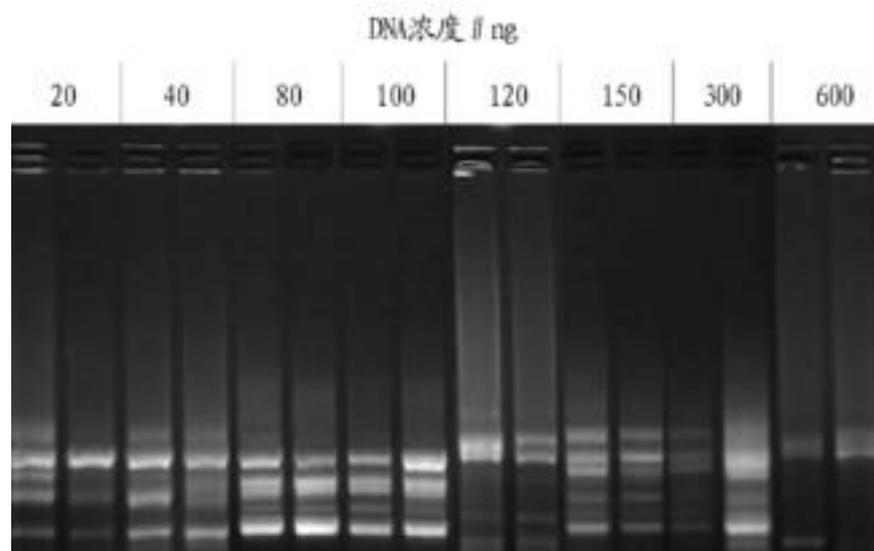


图5 DNA 浓度对ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effects of DNA concentration on ISSR amplification

2.4 Mg^{2+} 浓度对ISSR PCR 反应的影响 由图6可知, 当 Mg^{2+} 浓度为1.0 mmol/L 时, 扩增的谱带背景模糊难辨且不稳定, 基本上无条带出现; 当 Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L 时, 扩增产物出现了清晰稳定的条带, 且无非特异性扩增; 当 Mg^{2+} 浓度为1.5 mmol/L 时, 虽有谱带出现, 但谱带较少且不稳定, 常出现非特异性扩增; 当 Mg^{2+} 浓度为2.5、3.0 mmol/L 时, 仅产生一些小的非特异性片段, 扩增产物的谱带背景模糊难辨且不稳定。因此, 春兰ISSR 分析的最佳 Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L。

2.5 dNTPs 浓度对ISSR PCR 反应的影响 由图7可知, 当 dNTPs 浓度为240 μ mol/L 时, 几乎无扩增产物; dNTPs 浓度为100 μ mol/L 时, 虽有扩增产物, 但扩增产物谱带较弱, 不易辨

认;当dNTPs浓度为120~210 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物均出现清晰的谱带;但dNTPs浓度为180~210 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物不稳定且有非特异性扩增;当dNTPs浓度为150 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物条带清晰、背景较暗、扩增产物稳定、重复性强。因此,dNTPs的适宜浓度为150 $\mu\text{mol/L}$ 。

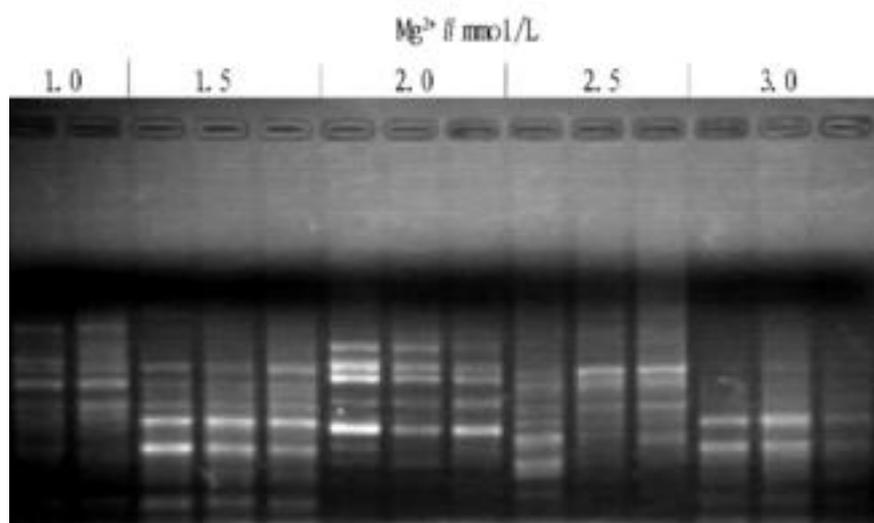


图6 Mg^{2+} 浓度对ISSR扩增的影响

Fig.6 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

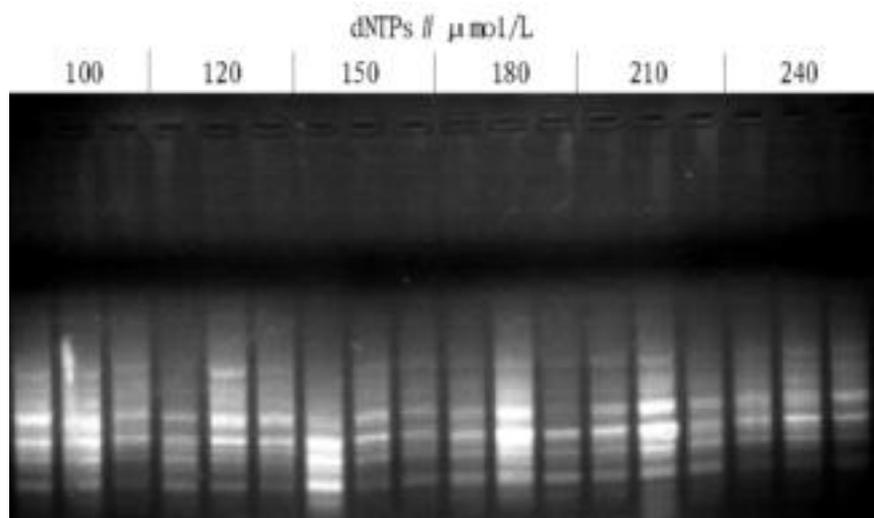


图7 dNTPs浓度对ISSR扩增的影响

Fig.7 Effects of dNTPs concentration on ISSR amplification

3 结论与讨论

(1) 该研究确定春兰ISSR-PCR较适宜的扩增条件为:25 μl PCR反应体系中,双蒸水15.78 μl ,1 \times PCR buffer 2.5 μl ,Taq 1.1 U DNA聚合酶(上海申能博彩科技有限公司),模板DNA 100 ng, MgCl_2 2.0 mmol/L,4种dNTPs各150 $\mu\text{mol/L}$,引物2 $\mu\text{mol/L}$ 。最佳扩增程序为:94 预变性5 min,40个循环:94 变性45 s,复性45 s(复性温度比相应引物的 T_M 值低1~2),72 延伸75 s,循环结束后72 延伸7 min,4 保存。

(2) 由于ISSR-PCR反应受许多因素的影响,使得最佳扩增条件在不同物种中各有不同,为了获得重复性和可靠性较高的ISSR谱带,提高分析的准确性,对不同物种反应体系中各影响因子进行优化,筛选出最适宜的ISSR反应条件是较为重要的。

(3) 在ISSR-PCR反应体系中,使用不同厂家甚至同一厂家不同批次的Taq酶都会得出不同的PCR扩增结果。因此,在试验过程中要尽量选用同一厂家同一批次的Taq酶^[9]。另外,Taq酶用量也直接关系到试验结果,用量多不仅增加试验成本而且容易产生非特异性扩增产物,同时扩增条带的

背景模糊,不易辨认;用量少则会使酶过早地消耗完而且其聚合酶的催化能力不够强,产物合成效率低^[10]。该试验结果表明,Taq酶浓度为0.22~0.25 μl ,均能得到清晰的条带,当Taq酶浓度为0.22 μl 时,扩增效果最好。

(4) 春兰ISSR反应对模板DNA浓度不敏感,在25 μl 反应体系中,含有40~100 ng模板DNA时,均能获得较清晰的谱带,但模板浓度为100 ng时,扩增的条带最多且最清晰。

(5) Mg^{2+} 作为Taq酶的辅助因子,其浓度的大小不仅影响Taq酶活性,还会与反应液中dNTPs、模板DNA及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与PCR产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[11]。引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响, Mg^{2+} 浓度影响反应的特异性和扩增片段的产率^[12]。该试验确定的 Mg^{2+} 的优化浓度为2.0 mmol/L。

(6) 该研究结果表明,过高或过低浓度的dNTPs均使PCR产物电泳结果模糊不清。dNTPs浓度太高容易产生错配,同时dNTPs与Taq酶竞争 Mg^{2+} ,使Taq酶不能充分发挥聚合酶活性,从而出现非特异性扩增,导致扩增失败;浓度太低则扩增产率低,甚至会因dNTPs的过早消耗完而使产物单链化^[13]。

参考文献

- [1] ZHANG Z H, TAN F X, WU L H, et al. Mangrove sea part ISSR conditions of [J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Natural Science)*, 2004, 43(2): 63-66.
- [2] CHEN S C, LUO Y B. Advances in some plant groups in China. I. A retrospect and prospect of orchidology in China [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(S1): 2-20.
- [3] LI A, LUO Y B, XIONG Z T, et al. A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44: 250-252.
- [4] WONG K C, SUN M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86: 1406-1413.
- [5] GILBERT J E, LEWIS R B, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 1125-1131.
- [6] PREVCOST A, WILKINSON M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 107-112.
- [7] XUE D W, GE X J, HAO G, et al. High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Rhynchospora interjacens* by ISSR analysis [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46: 1163-1169.
- [8] 赵树进. 白木香基因组DNA提取方法研究 [J]. *河南工业大学学报*, 2006, 27(3): 13-16.
- [9] 张志红, 谈凤笑, 何航航, 等. 红树植物海漆ISSR条件的优化 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(2): 63-66.
- [10] WEISING K, NYBOM H, WOLFF K, et al. DNA fingerprinting in plants and fungi [M]. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.
- [11] 林万明. PCR操作技术与应用指南 [M]. 北京: 人民医学出版社, 1993: 7-14.
- [12] 卢圣栋. 现代分子生物学技术 [M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458-463.
- [13] 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.
- [14] 李永祥, 李斯深, 李立会, 等. 披碱草属12个物种遗传多样性的ISSR和SSR比较分析 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1522-1527.
- [15] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR PCR system in *Tachycineta fasciatus* heckel [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 37-39, 95.