

松江鲈鱼ISSR-PCR 反应体系的建立及优化研究

郁建锋 鲍峰 韩晓磊 徐建荣* (常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏常熟 215500)

摘要 [目的] 建立及优化松江鲈鱼ISSR-PCR 的反应体系。[方法] 采用ISSR-63 引物, 通过正交试验设计, 分别对 Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 和引物浓度等4 种PCR 原料进行优化, 以确立松江鲈鱼的ISSR-PCR 反应最佳体系, 并通过温度梯度PCR, 筛选适宜的退火温度。[结果] 确定了松江鲈鱼的最适ISSR-PCR 反应体系, 20 μ l 反应体系中含2.5 mmol/L Mg^{2+} , 250 μ mol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 引物, 1.0 U Taq DNA 聚合酶, 30 ng DNA 模板及1 \times PCR buffer, 确立退火温度为50.8 $^{\circ}$ C。利用所建立的ISSR-PCR 反应体系, 通过对24 份野生松江鲈鱼样本的检验, 获得了清晰、重复性好、多态性高的DNA 谱带。[结论] 该研究为松江鲈鱼的遗传多样性分析及种质资源研究奠定了一定的基础。

关键词 松江鲈鱼; 正交试验; ISSR-PCR 体系

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14420-02

Establishment and Optimization of ISSR PCR System in *Trachidermus fasciatus* Heckel

YU Jianfeng et al (Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract [Objective] The aim of this study is to establish and optimize the ISSR PCR system in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus* Heckel). [Method] By using the primer ISSR63, the concentrations of Taq DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTPs and primer were optimized by orthogonal design for establishing the suitable ISSR PCR system in roughskin sculpin; moreover, the suitable anneal temperature was yielded from gradient PCR on temperature. [Result] The optimized ISSR-PCR system (20 μ l reaction volume) in roughskin sculpin was proved to be: 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 250 μ mol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L primer, 1 U Taq DNA polymerase, 30 ng DNA template and 1 \times PCR buffer; and suitable anneal temperature was determined to be 50.8 $^{\circ}$ C. The established system was further confirmed in 24 wild roughskin sculpin samples. [Conclusion] The results lay a foundation for the analysis of genetic diversity and germplasm resources of roughskin sculpin.

Key words *Trachidermus fasciatus* Heckel; Orthogonal design; ISSR PCR system

松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus* Heckel), 属鲈形目(Scorpaeniformes) 杜父鱼科(Cottidae), 是一种生活于浅水底层的肉食性洄游鱼类, 常栖息在与海水相通的湖泊或河流中。然而, 由于江河水质受到污染, 河道内又大量兴建水利设施, 破坏了其原有生境, 导致松江鲈鱼濒临灭绝, 被列为国家二级保护动物^[1-2]。对松江鲈鱼的生物学研究, 目前主要在其分布和繁殖生物学方面^[3]。ISSR 分子标记是在PCR 扩增技术的基础上发展起来的一种操作简单、成本低廉的分子标记技术, 已广泛应用于遗传多样性鉴定、基因作图及分子生态学研究^[4-6]。目前, 有关于松江鲈鱼的DNA 水平的遗传多样性研究的报道不多, 也没有ISSR-PCR 系统建立和条件优化的报道。该研究通过建立并优化松江鲈鱼的ISSR-PCR 反应体系和扩增条件, 以期利用该技术进行松江鲈鱼遗传多样性评价、不同种源鉴定及亲缘关系分析奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 样品为采集于辽宁省丹东市的野生松江鲈鱼。引物ISSR-63(5'-AGAGAGAGAGAGAGCT-3') 购自南京生兴生物技术有限公司; Taq DNA 聚合酶系列和 DNA Maker DL2000 购自 TaKaRa 公司; DGL2000 DNA maker 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 方 法

1.2.1 基因组DNA 提取。以松江鲈鱼肌肉为试验材料, 采用2% SDS 法提取基因组DNA, 用0.8% 琼脂糖电泳检测DNA 质量, 紫外分光光度计测定DNA 浓度。

1.2.2 PCR 反应体系的正交试验设计。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶浓度进行优

化, 方案如表1。根据表1 制备总体积为20 μ l 的PCR 反应体系, 除表1 所列供试因素外, 该体系还含有1 \times PCR buffer 和30 ng 模板DNA, 引物选用ISSR-63。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 52 $^{\circ}$ C 复性45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸90 s, 40 循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸5 min。扩增反应结束后, PCR 产物在含0.05% 溴化乙锭的1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 电极缓冲液为1 \times TAE, 电压5 V/cm, 电泳结束后在凝胶图像分析仪上观测分析并照相。

表1 松江鲈鱼ISSR-PCR 正交试验

Table 1 Orthogonal design of ISSR PCR system in *T. fasciatus*

处理号	因素 Factor				
Treatment No.	Taq DNA 聚合酶 U 20 μ l	dNTPs μ mol/L	引物 μ mol/L	Mg^{2+} mmol/L	
1	0.5	150	0.25	2.0	
2	0.5	200	0.50	2.5	
3	0.5	250	0.75	3.0	
4	1.0	150	0.50	3.0	
5	1.0	200	0.75	2.0	
6	1.0	250	0.25	2.5	
7	1.5	150	0.75	2.5	
8	1.5	200	0.25	3.0	
9	1.5	250	0.50	2.0	

1.2.3 退火温度确定。根据正交试验结果, 选择合适的反应体系, 结合引物的退火温度设定梯度PCR 的温度范围为48~62 $^{\circ}$ C。

1.2.4 优化体系的应用。根据以上试验结果确定ISSR-PCR 的最佳反应体系和扩增条件。对辽宁丹东的24 份野生松江鲈鱼进行DNA 扩增, 检测优化体系的稳定性。

2 结果与分析

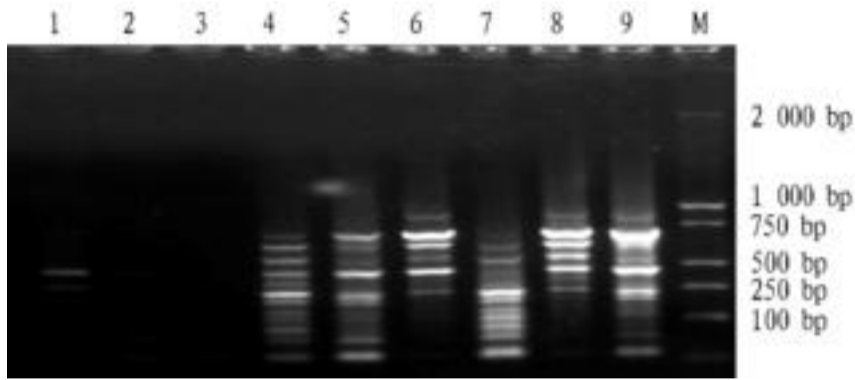
2.1 正交试验结果 PCR 扩增受 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 Taq DNA 聚合酶等因素综合作用的影响。从正交试验的结果(图1) 可知, 9 个处理组合扩增结果存在着明显差异。第1、2、3 组合谱带强度较弱, 其原因可能是 Taq DNA 聚合酶的量过低, 其在PCR 过程中起主要的限制作用, 随DNA 聚合酶浓度

基金项目 江苏省科技厅农业高技术项目(BG2006337)。

作者简介 郁建锋(1978-), 男, 江苏常熟人, 讲师, 从事分子遗传学和免疫学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-16

的提高,PCR 产物的强度也明显增强,背景也增加。而且强度也随引物、 Mg^{2+} 和 dNTPs 的浓度增大而增加;当浓度过高时,明显出现非特异性扩增产物,同时造成背景干扰从试验结果看,对非特异条带的影响程度最大的是引物浓度,第6、8组的引物浓度为 $0.25 \mu\text{mol/L}$,因此非特异性条带相对较少,当引物浓度在 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.75 \mu\text{mol/L}$ 时,在低分子量区明显的条带增多,如第4、5、7 和9 处理组。通过比较,以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则,同时结合试验成本等因素,确定第6 组合为ISSR PCR 的最佳反应体系,即 $20 \mu\text{l}$ 反应体系中含有 $2.5 \text{ mmol/L } Mg^{2+}$ 、 $250 \mu\text{mol/L}$ dNTPs、 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 引物、 $1.0 \text{ U Taq DNA 聚合酶}$ 。



注:1~9 为处理号;M,DL2000 DNA marker。

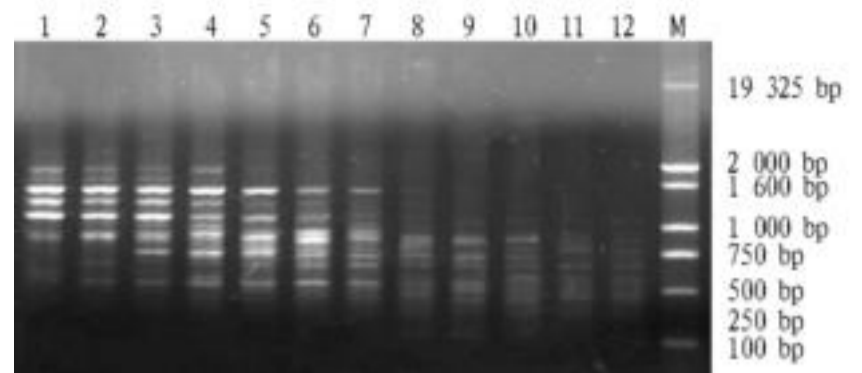
Nte:1-9, Treatment No.; M, DL2000 DNA marker.

图1 松江鲈鱼ISSR PCR 正交试验电泳结果

Fig.1 The electrophoresis pattern of orthogonal test for ISSR PCR of *T. fasciatus*

2.2 梯度 PCR 分析 结果如图2 所示,退火温度较低时($48.0 \sim 48.3$),谱带背景较深且条带不清晰;随着退火温

度的升高($49.3 \sim 62.0$),扩增条带逐渐减少,当退火温度达到 50.8 时扩增背景较低,主带清晰,与引物 T_m 值基本一致;温度过高,条带强度和数量均减少,并且条带不清,可能主要是退火温度影响了引物和模板的结合。因此该研究中退火温度确定为 50.8 。



注:1~12 退火温度分别为 48.0 、 48.3 、 49.3 、 50.8 、 52.5 、 54.2 、 55.8 、 57.5 、 59.2 、 60.7 、 61.7 、 62.0 ; M, DGL 2000 DNA Marker。

Nte:1-12 represent the anneal temperature of 48.0 , 48.3 , 49.3 , 50.8 , 52.5 , 54.2 , 55.8 , 57.5 , 59.2 , 60.7 , 61.7 , 62.0 respectively; M, DGL2000 DNA Marker.

图2 退火温度对PCR 扩增结果的影响

Fig.2 Effects of anneal temperature on PCR amplification results

2.3 优化体系的应用 采用以上确立的优化体系,以引物 ISSR-63 对 24 份松江鲈鱼进行 DNA 扩增。结果如图3 所示,该引物对 24 份松江鲈鱼材料都能扩增出清晰、重复性好、多态性高的 DNA 谱带,表明已确立的ISSR PCR 反应体系稳定可靠,可用于松江鲈鱼遗传多样性分析、种质资源鉴定等研究。

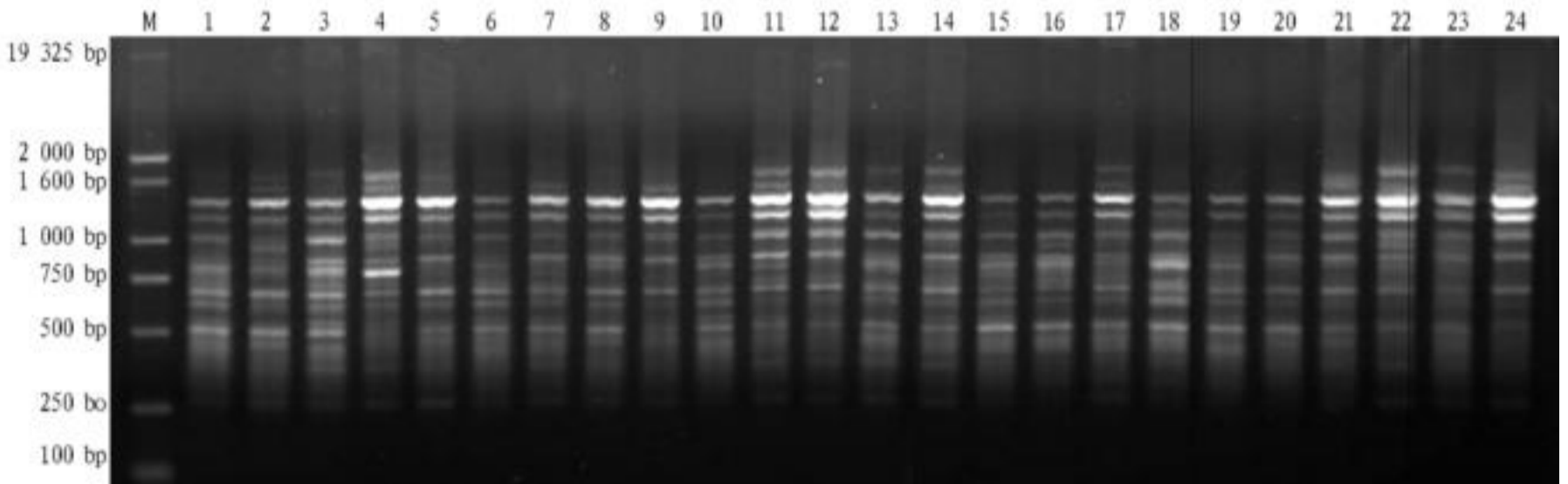


图3 优化ISSR PCR 体系对24 个松江鲈鱼个体的PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification results of the optimized ISSR PCR system in 24 accessions of *T. fasciatus*

3 讨论

该研究利用 Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs、引物等 4 个主要因素对 PCR 结果的影响^[7],通过正交试验设计方法,初步建立并优化了松江鲈鱼ISSR 标记的PCR 反应体系。在这 4 个主要因素中,Taq DNA 聚合酶是保证 PCR 成功的先决条件,其量要适当,过低会造成扩增条带过少,甚至得不到结果,降低 PCR 的灵敏度,但过多则会降低整个 PCR 反应的特异性,同时会出现大量的弥散片段。由于 Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,因此在反应体系中 Mg^{2+} 浓度十分重要, Mg^{2+} 浓度过高,PCR 反应特异性降低,出现非特异性扩增;浓度过低则会降低 Taq DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。有报道^[8]称, Mg^{2+} 最终反应浓度还受到体系中其他成分,尤其是 dNTPs 的影响,因此, Mg^{2+} 浓度的确定应同时考虑这些

因素。dNTPs 会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用,主要原因是 dNTPs 分子中的磷酸基团能定量地与 Mg^{2+} 结合,使实际反应中的 Mg^{2+} 浓度下降^[9]。在 PCR 反应中,dNTPs 作为 PCR 的反应原料,其浓度同样会影响 PCR 结果,浓度过高会导致 PCR 错配,造成非特异性的扩增;浓度过低,又会降低合成效率,扩增效果。该研究中,发现引物浓度对 PCR 的特异性反应起着非常重要作用,当引物浓度 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 时能较好地控制非特异性条带的出现,而达到 $0.50 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.75 \mu\text{mol/L}$ 时分子量在 100 bp 至 200 bp 的非特异性条带明显增多,因此从正交试验的结果可以明显看出,浓度 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 的引物比较适合本反应体系。综上分析和试验得到的结果,最终确立松江鲈鱼的ISSR 标记的PCR 体系为: $20 \mu\text{l}$ 体系中以 Taq DNA

(下转第14465 页)

施肥比重增加,穗粒结构改善,穗型趋大(表5)。从茎蘖消长来看,群体发展随后期施肥比重增加稳发性趋好,成穗率趋高(表6)。说明适度控制前期氮素投入,相应增加后期氮素

运筹比重,宜于群体稳步发展和个体健壮发育,有利于改善产量构成,形成大穗增产模式。

表5 不同氮素运筹对机插稻产量及其构成的影响

Table 5 Effects of different N application on the yield and yield components of machine-transplanted rice

前后期氮素比例 N ratio in the early period to that in late stage	穗数 万/hm ² Spike number	总粒数 粒穗 Total grain number	实粒数 粒穗 Filled grain number	结实率 % Seed-setting rate	千粒重 g 1 000-grain weight	理论产 量 kg/hm ² Theoretical yield	实产 kg/hm ² Actual yield
7.3	262.1	133.6	124.0	92.8	25.6	8 319.0	8 542.5
6.4	272.7	146.6	140.8	96.0	25.4	9 753.0	9 882.0
5.5	264.5	159.8	150.6	94.2	26.2	10 424.0	9 919.5

表6 不同氮素运筹的茎蘖消长情况

Table 6 The tiller growth and decline status with different N application

前后期氮素比例 Nitrogen ratio in early stage to that in late stage	基本苗 万/hm ² Basic seedlings	达到穗数苗 Seedlings with certain spikes		最高苗 万/hm ² Highest seeding number	穗数 万/hm ² Spike number	成穗率 % Spike rate
		时间 Time	叶龄 Leaf age			
7.3	70.0	07-11	10.42	419.9	262.1	62.4
6.4	70.2	07-12	10.32	404.6	272.7	67.4
5.5	63.9	07-13	10.84	382.1	264.5	69.2

3 结语

(1) 机插稻是水稻栽培走优质、高产、高效和规模化、集约化之路的重要途径。其产量构成因子特点与手栽稻相比,表现为穗数显增、穗粒略减、结实率和千粒重差异不明显。

(2) 机插稻产量与总颖花量和穗实粒数呈极显著正相关,与千粒重呈显著正相关。机插稻高产栽培策略适宜走建立适中群体、提高成穗率、主攻大穗、增加千粒重之路,穗数型增产与穗重型增产相结合。

(3) 配套育好标准秧苗,适时抢插,栽足适宜基本苗,是机插水稻高产的基础。适宜的机插规格应掌握在11.7~13.3 cm×30.0 cm、基本苗75万~105万/hm²,有利于建立高产群体,争取更多的低节位分蘖成穗,确保穗足、穗重、穗齐。

(4) 机插稻前期一方面因苗体小、根系不发达而吸肥量

少,另一方面分蘖节位多、分蘖势强、中后期群体大,在肥料运筹上,应适当控制前期氮素投入,降低基蘖肥比例,增加穗肥比重,有利于在足穗基础上攻大穗。土壤肥力中等,单产9 000 kg/hm²以上,投入总氮(纯)270~300 kg/hm²,N:P₂O₅:K₂O为1.0:0.3:0.5,氮素基蘖肥与穗肥比例宜为5.5或6.4,磷素用作穗肥中的促花肥约占1/2,钾素用作长粗肥约占45%。

参考文献

- [1] 于林惠,景启坚,薛艳凤.水稻机插秧实用技术[M].南京:江苏科学出版社,2004.
- [2] 凌励.机插水稻分蘖特点及配套高产栽培技术改进的研究[J].江苏农垦科技,2005(5):106-109.
- [3] 李世峰,刘蓉蓉,吴九林.不同播量与移栽密度对机插水稻产量形成的影响[J].作物杂志,2008(1):71-74.

遗传多样性分析、种质资源鉴定等研究奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 邵炳绪,唐子英.松江鲈鱼繁殖习性的调查研究[J].水产学报,1980,4(1):81-88.
- [2] 王武,刘利平,毕永红.松江鲈鱼(*Fachidrus fasciatus*)的研究进展[J].水产科技情报,2001,28(3):124-129.
- [3] 王金秋,石椿.松江鲈鱼(*Fachidrus fasciatus*)不同组织同工酶的研究[J].复旦学报,2001,40(5):465-470.
- [4] 刘立军,孙珍夏,彭定祥.苕麻ISSR PCR体系的优化[J].农业生物技术科学,2006,22(7):64-68.
- [5] 冒维维,马金骏,陈学好,等.正交设计优化菜薹ISSR反应体系研究[J].分子植物育种,2006,4(6):137-141.
- [6] 张君毅,郭巧生,杭悦宇.半夏ISSR PCR反应体系的建立及条件优化研究[J].江苏农业科学,2007(2):154-157.
- [7] 谢运海,夏德安,姜静.利用正交设计优化水曲柳ISSR PCR反应体系[J].分子植物育种,2005,3(3):445-450.
- [8] 王彦华,侯喜林,徐明宇.正交设计优化不结球白菜ISSR反应体系研究[J].西北植物学报,2004,24(5):899-902.
- [9] YUJ F,BAO F,HANX L,et al.Establishment and optimization of ISSR PCR system in *Fachidrus fasciatus* heckel[J].Agricultural Science & Technology, 2008,9(5):37-39,95.

(上接第14421页)

聚合酶1 U、dNTPs 浓度250 μmol/L、Mg²⁺ 浓度2.5 mmol/L和引物浓度0.25 μmol/L。此外,还有其他一些因素,如模板DNA 的量 and 质也是影响PCR 扩增的重要因素,该研究确定20 μl 反应体系中模板DNA 量为30 ng。

就整个PCR 反应过程而言,也有众多因素对PCR 结果产生影响,如变性、退火和延伸的时间和温度以及循环次数对反应结果都有一定的影响,尤其是退火温度对PCR 结果特别是对PCR 的成功与否和特异性影响很大。当然不同的引物有其适宜的退火温度,需通过试验优化,笔者主要研究了ISSR-63 引物,最终确立其退火温度为50.8℃,其循环次数主要根据以往的研究定位在40 个循环。

采用所确定的ISSR 标记的PCR 体系对野生松江鲈鱼基因组的扩增,能获得清晰、重复性好、多态性高的DNA 谱带,表明已确立的ISSR PCR 反应体系稳定可靠,为松江鲈鱼