

高原鼠兔ISSR引物反应体系的优化与筛选

葛艳丽^{1,2}, 慈海鑫², 唐利洲², 林恭华², 苏建平^{1*}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京100039)

摘要 [目的] 筛选和优化高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*) 适宜的ISSR反应体系, 以在对高原鼠兔进行ISSR分析时获得清晰和多态性好的扩增结果。[方法] 以高原鼠兔基因组DNA为模板, 通过单因素试验, 对体系中的模板浓度、Mg²⁺浓度、dNTPs浓度、Taq酶用量、引物用量、退火温度进行探讨。[结果] 结果表明, 高原鼠兔ISSR PCR扩增的最佳条件为: 25 μl PCR反应体系, 其中4 μl DNA模板, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.25 U Taq聚合酶, 1.5 μmol/L引物, 复性温度4560 (退火温度随引物不同而确定)。用11条引物进行了PCR扩增, 筛选出效果较好的6条引物。[结论] 该反应体系的建立为鼠兔遗传多样性和分子系统学研究提供技术支持。

关键词 高原鼠兔; ISSR; 优化PCR

中图分类号 S813.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14422-03

Optimization and Screening of ISSR Primer Reaction System for *Ochotona curzoniae*

GE Yan-li et al (Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract [Objective] The research aimed to study the suitable ISSR reaction system for *Ochotona curzoniae*, to obtain high resolution and multiple polymorphic bands. [Method] Based on the genomic DNA extracted from *Ochotona curzoniae*, the effects of the main reaction system elements such as Mg²⁺, dNTPs, primer, template DNA, Taq DNA polymerase and annealing temperature were presented by single factor experiment. [Result] The results showed that the optimum conditions of ISSR PCR amplification were as follows: The total volume of the reaction system was 25 μl, consisted of 4 μl DNA template, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.25 U Taq DNA polymerase, 1.5 μmol/L primer and annealing temperature of 45-60. The 11 ISSR primers were used to screen the suitable primers, of which 6 ISSR primers were screened. [Conclusion] This optimal system offered a technical system of ISSR analysis suitable to *Ochotona curzoniae*.

Key words *Ochotona curzoniae*; ISSR; Optimizing PCR

ISSR是Zietkiewicz等^[1]于1994年在SSR基础上创建、基于PCR扩增的一种新型分子标记技术。ISSR具有操作技术简单, 试验成本低, 模板需要量少, 多态性丰富, 试验稳定性高等优点。因此, ISSR技术已广泛应用于品种鉴定, 物种的分类^[2-4]系统学和居群生物学的研究中^[2-4]。

高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)隶属于兔形目(Lagomorpha)鼠兔科(Ochotoridae)鼠兔属(*Ochotona*), 是青藏高原的特有物种, 也是青藏高原及其毗邻地区主要的草原害鼠之一。关于高原鼠兔的研究主要集中在形态、生态、生理生化、行为等领域^[5-8]。笔者以高原鼠兔为研究材料, 对Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA聚合酶、模板DNA的用量等因素的最佳反应条件进行了筛选, 旨在为进一步进行高原鼠兔的遗传多样性和分子系统地理学的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 高原鼠兔样本采自西藏雅鲁藏布江南岸的江孜热龙、浪卡子白地和北岸的尼木续迈、当雄纳木错4个地区。取鼠兔腿部肌肉组织保存在95%的乙醇中。

1.2 ISSR引物 从加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的100条ISSR引物序列中选取11条, 编号分别为UBC809, UBC827, UBC813, UBC812, UBC829, UBC816, UBC823, UBC872, UBC855, UBC884, UBC819, 由TaKaRa公司合成。

1.3 DNA的提取及检测 参照Sambrook等用蛋白酶K苯酚氯仿法^[9]提取基因组总DNA。用0.8%的琼脂糖凝胶对DNA质量进行电泳检测, -20℃保存DNA。

1.4 PCR反应体系与引物筛选 对参与ISSR反应的DNA模板、Mg²⁺、dNTPs和Taq DNA酶用量以及退火温度进行了

优化试验, 各参数优化设计梯度见表1。采用随机筛选的引物UBC809进行优化, 初始反应程序为: 94℃预变性4 min; 94℃变性45 s, 47~61℃退火45 s, 72℃延伸90 s, 共37个循环; 72℃延伸7 min, 4℃保存。扩增产物在1.2%的琼脂糖凝胶(含0.5 g/ml溴化乙锭)中电泳, 电压不超过5 V/cm, 电泳缓冲液为1×TAE, 用一定的DNA梯度作分子量标记(以M表示, 分子量从大到小依次为: 4 000、3 000、2 500、2 000、1 800、1 600、1 400、1 200、1 000、800、600、400、200 bp), 紫外凝胶自动成像仪照相。

表1 ISSR PCR反应体系的优化试验设计

Table 1 The optimization design of ISSR PCR reaction system

反应成分 Reaction component	浓度梯度 Concentration gradients						
	1	2	3	4	5	6	7
模板DNA浓度 μl Template DNA concentration	0.5	1.0	2.5	4.0	5.0	7.5	15.0
Mg ²⁺ 浓度 mmol/L Mg ²⁺ concentration	1.0	1.5	2.0	2.5			
引物浓度 μmol/L Primer concentration	0.5	1.0	1.5	2.0			
dNTPs浓度 mmol/L dNTPs concentration	0.10	0.15	0.20	0.25			
Taq酶浓度 U Taq enzyme concentration	0.50	1.00	1.25	1.50	2.00		
退火温度 Annealing temperature	47	49	51	53	57	59	

2 结果与分析

2.1 模板DNA浓度对ISSR-PCR反应的影响 该试验提取到了较好的总DNA, 电泳图显示DNA带型完整, 清晰一致, 没有拖尾现象, 说明其中蛋白质和RNA的量少或没有, 无明显降解(图1)。该试验没有测量DNA模板的具体浓度, 只是以加模板的体积来作比较, 模板浓度从1个单位(在25 μl反应体系中, 设置了0.5、1.0、2.5、4.0、5.0、7.5、15.0 μl的体积变化)到30倍单位变化时, 所得产物的条带数和位点数基本

基金项目 中国科学院知识创新工程领域前沿项目(CXLY-2002-3)。

作者简介 葛艳丽(1984-), 女, 安徽淮北人, 硕士研究生, 研究方向: 进化生态学和分子生态学。* 通讯作者, E-mail: jpsu@nwipb.ac.cn。

收稿日期 2008-09-22

没有变化,只是在模板浓度低时产物浓度会变低,条带变弱(图2)。由图2 还可知,模板 DNA 浓度对 PCR 产物的特异性和稳定性影响不大。当模板 DNA 的量为 2.50 ~15.0 μ 时,扩增产物条带均比较清晰明亮。考虑到模板过少,分子碰撞的几率低,偶然性大,影响试验的稳定性;模板过多又会降低特异性扩增效率,增加非特异性产物,使电泳图谱背景呈弥散状。因此,该试验选用 4 μ 作为 PCR 反应的用量。

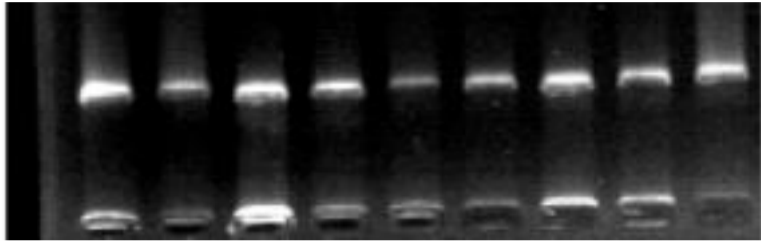


图1 鼠兔 DNA 电泳图

Fig.1 The electrophoretogram of DNA in *Ochotona curzoniae*

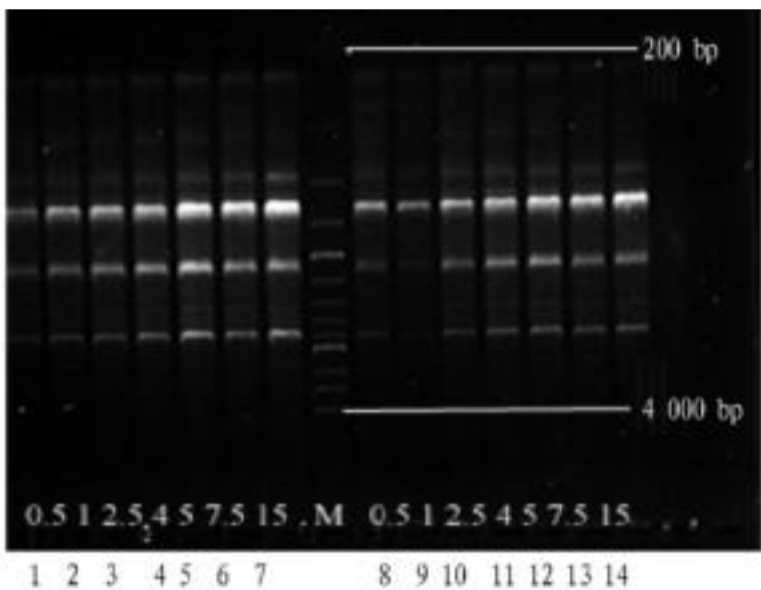


图2 模板 DNA 浓度对扩增结果的影响

Fig.2 Effects of template DNA concentration on the amplification results

2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR PCR 反应的影响 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 的特异性和扩增效率影响很大。在一定的浓度范围内,随着 Mg^{2+} 浓度的增高,扩增的特异性减弱,但扩增片段的产率增加。该试验中,不同的 Mg^{2+} 浓度下均有扩增产物,当 Mg^{2+} 在 1.0 ~1.5 mmol/L 时,条带清晰可见,但在 1.0 mmol/L 时,条带较弱;当 Mg^{2+} 增加至 2.0、2.5 mmol/L 时,谱带亮度明显增加,但背景模糊难辨(图3)。因此,选择 1.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度作为高原鼠兔 ISSR 分析的最佳浓度。

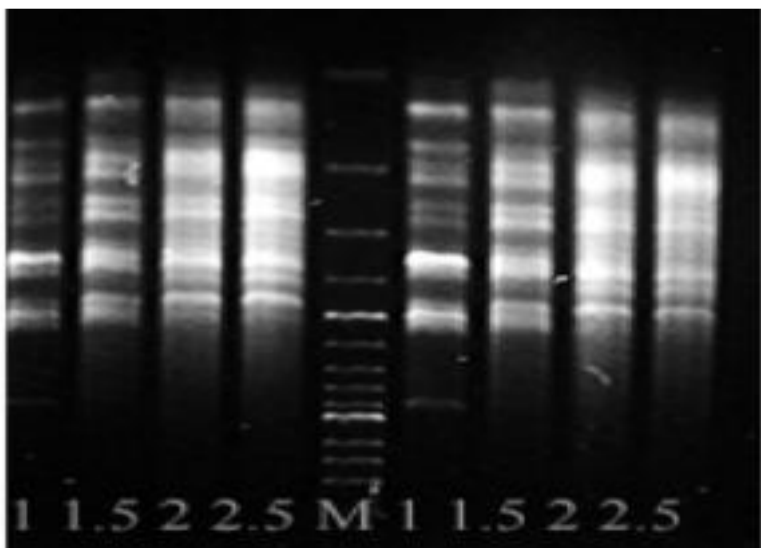


图3 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响

Fig.3 Effects of Mg^{2+} concentration on the amplification results

2.3 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR PCR 反应的影响 Taq DNA 聚合酶是扩增反应的关键因素。从图4 可以看出,在 25 μ 反应体系中使用 0.50 ~2.00 U 的 Taq 均有扩增产

物。在 1.5、2.0 U 时背景较深,在 0.50 ~1.25 U 时带型和强度较好,考虑到酶量过少,其催化能力不够强且影响扩增的稳定性。因此,选用 1.25 U 为最佳 Taq 酶用量。

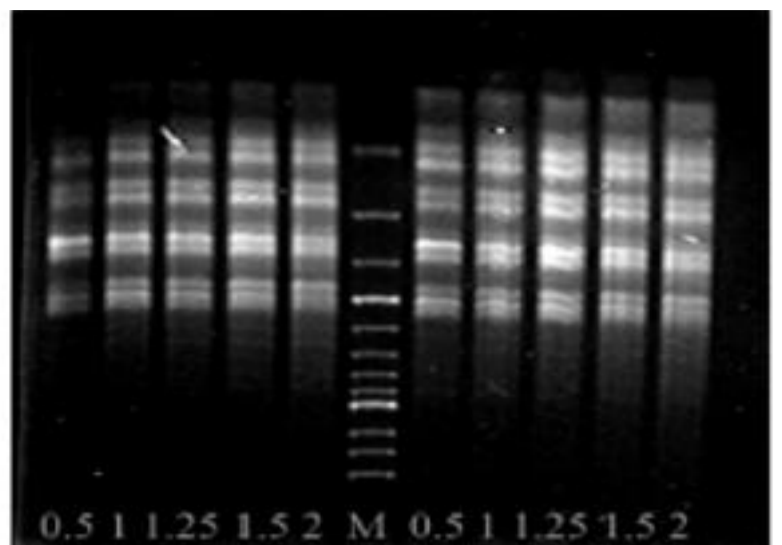


图4 Taq DNA 聚合酶浓度对扩增结果的影响

Fig.4 Effects of Taq DNA polymerase concentration on the amplification results

2.4 dNTPs 浓度对 ISSR PCR 反应的影响 dNTPs 是 PCR 反应的原料,该试验设计了 4 个浓度梯度,扩增结果见图5。从图5 可以看出,在 0.10 ~0.25 mmol/L 的 dNTPs 浓度范围内均有扩增产物,但 dNTPs 浓度为 0.10 和 0.15 mmol/L 时条带相对较弱(尤其是 1800 bp 处条带);dNTPs 浓度为 0.20 和 0.25 mmol/L 时扩增产率较高,条带较亮。由于在 0.25 mmol/L 时条带相对弥散(尤其是 500、550 bp 处条带),所以最适 dNTPs 浓度选为 0.20 mmol/L。

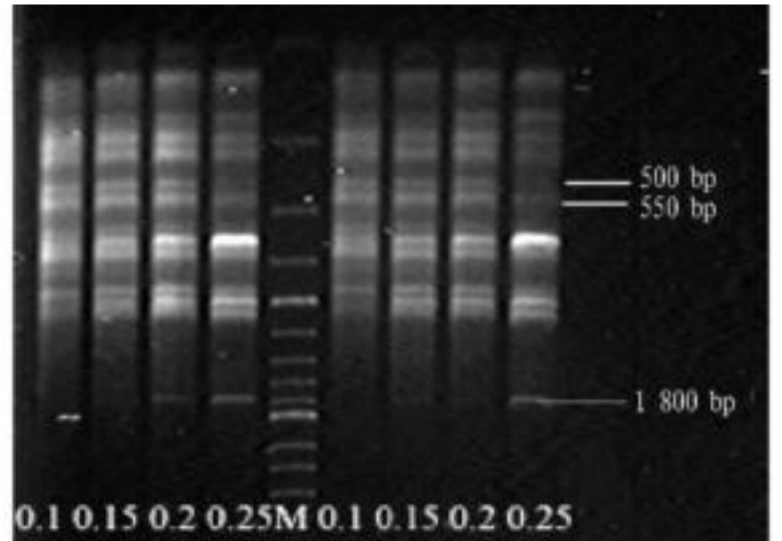


图5 dNTP 浓度对扩增结果的影响

Fig.5 Effects of dNTP concentration on the amplification results

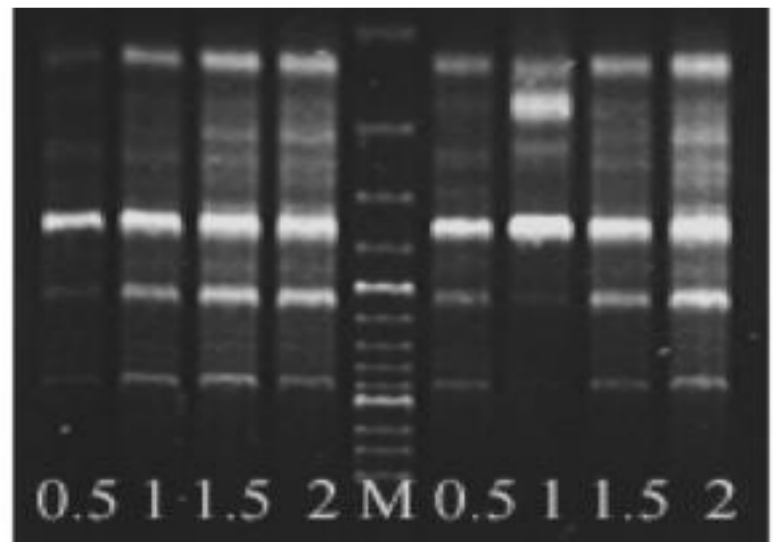


图6 引物浓度对扩增结果的影响

Fig.6 Effects of primer concentration on the amplification results

2.5 引物浓度对 ISSR PCR 反应的影响 引物浓度也是影响 ISSR 扩增的一个重要因素。该试验共设置了 4 个引物梯

度,结果如图6所示。从图6可以看出,引物浓度为0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增条带弱;引物浓度为1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时条带较亮,但在2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时非特异性扩增产物增多,背景模糊,相对而言,在引物浓度为1.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物清晰,亮度适宜,是较为理想的浓度。

2.6 退火温度对ISSR PCR 反应的影响 退火温度与ISSR 指纹的稳定性也至关重要。引物809理论退火温度为52 $^{\circ}\text{C}$,以开始低于 T_m 值5 $^{\circ}\text{C}$,再以2 $^{\circ}\text{C}$ 为增量的原则,对809进行退火温度的筛选,结果如图7所示。从图7可以看出,在47~55 $^{\circ}\text{C}$ 时,温度低,产生非特异扩增,出现片状拖带现象;当温度升高到61 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增的条带数明显减少。在57、59 $^{\circ}\text{C}$ 时扩

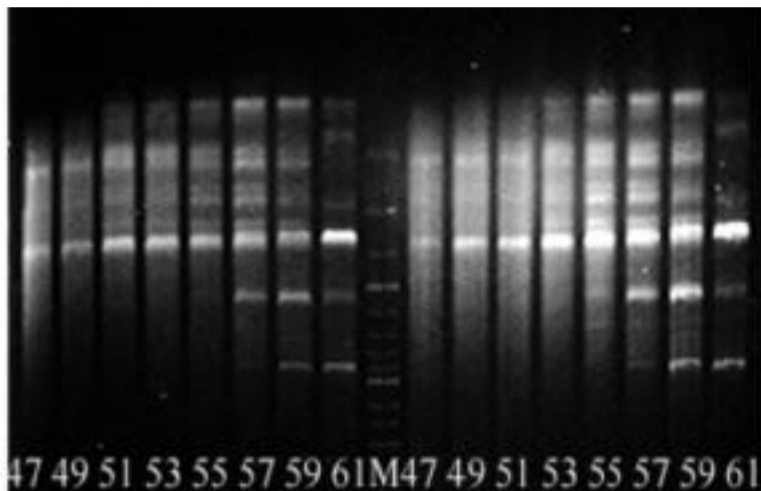
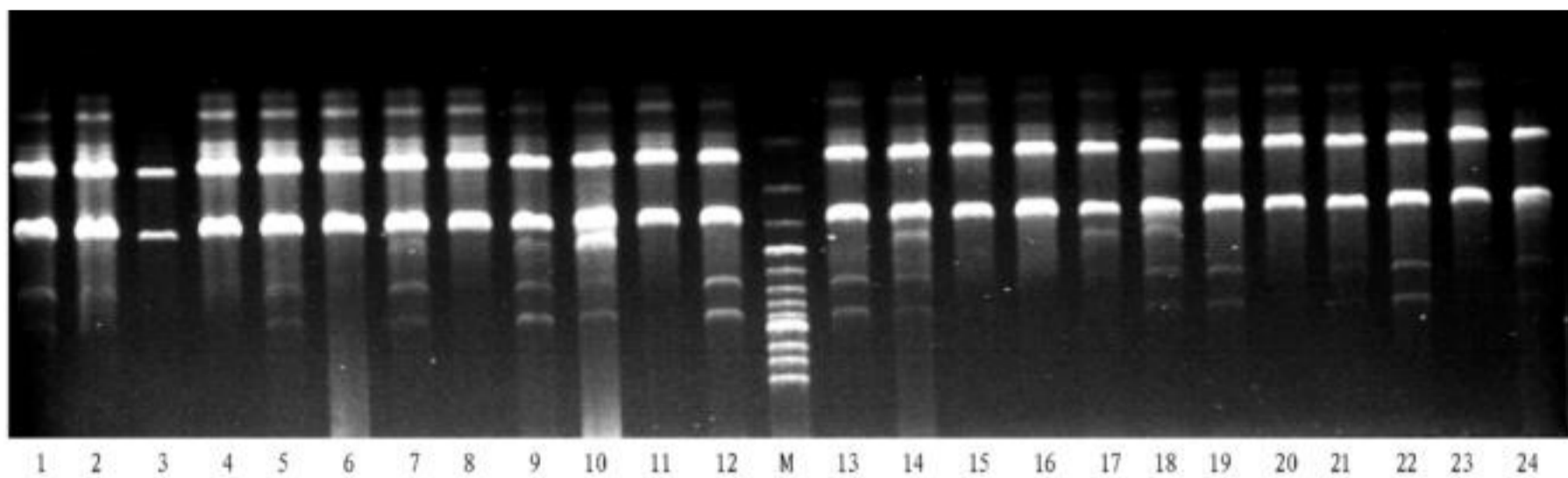


图7 退火温度对扩增结果的影响

Fig.7 Effects of annealing temperature on the amplification results



注:1~17的个体为浪卡子白地种群;18~24为江孜热龙种群。

Note :1 - 17 stand for populations from Bai di Town of Langkazi Courty;18 - 24 stand for populations from Relong Town of Jangzi Courty .

图8 引物 UBC872 在24份鼠兔样品中的ISSR 扩增结果

Fig.8 ISSR amplification results of 24 samples of *O. curzoniae* with primer UBC872

3 结论与讨论

虽然ISSR 具有多态性高、稳定性强的优点,但它的稳定性仍然受到DNA 模板浓度, Mg^{2+} 浓度,dNTPs 浓度,Taq DNA 聚合酶浓度,引物浓度,退火温度等因素的影响,因此试验条件的优化是必要的。

在影响ISSR-PCR 扩增结果的因素中,酶是最主要的影响因素。在其他反应条件一致的情况下,对同一样品使用不同厂家、不同商标的DNA 聚合酶,常常会有不同的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。此外,Taq 酶的用量对PCR 扩增也有很大影响。Taq 酶浓度过高不仅提高了试验成本,而且也容易产生非特异性扩增产物,扩增条带的背景模糊,不易辨认;而Taq 酶浓度过低时,聚合酶的催化能力不够强,导致产物的合成效率

增的条带之间界限分明,背景干净且亮度也适宜。为了提高反应的特异性,选择稍高的温度,以59 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳退火温度。

2.7 优化反应体系的确定 根据上述试验结果,最终确定在25 μl 的反应体系中模板为4 μl , Mg^{2+} 浓度为1.5 mmol/L ,dNTPs 浓度为0.2 mmol/L ,Taq 酶用量为1.25 U,引物浓度为1.5 $\mu\text{mol/L}$,退火温度为59 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.8 引物筛选和体系验证 按照上述优化体系筛选TaKaRa 公司合成的11条引物,经过最佳温度调试,可重复性试验,共筛选出6条扩增条带数多、条带清晰、可重复性好、多态性丰富的高原鼠兔ISSR 引物,见表2。

表2 6条ISSR 引物序列和最佳退火温度

Table 2 Sequences of 6 ISSR primers and the optimum annealing temperature

引物序号 Primer No.	退火温度 Annealing temperature	理论温度 Theoretical temperature
UBC823	57	52
UBC812	56	50
UBC829	59	52
UBC872	45	40
UBC855	60	51
UBC813	58	50

采用上述确定的优化体系,用引物 UBC872 在24 鼠兔资源中进行了扩增,见图8。从图8可以看出,扩增谱带清晰,多态性强,表明该优化体系具有较强的稳定性和可靠性。

下降。

DNA 模板的含量是影响扩增产物及其特异性的一个重要因素,模板中含有一定量的RNA 和少量蛋白质不会对扩增结果产生明显影响,但为避免模板中含有Taq 酶抑制剂,应尽量纯化模板。该试验结果表明,ISSR 对模板的要求并不严格,在一定浓度范围内都可以扩增出条带,只是扩增量有所差异,从而导致条带的亮度不同。

Mg^{2+} 是ISSR 扩增结果中重要的影响因素之一,作为Taq 酶的辅助因子, Mg^{2+} 浓度不仅影响Taq 酶的活性,还能与反应液中的dNTP、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^[10]。

(下转第14430页)

究结果表明,1 株凝结芽胞杆菌经 90、60 min 湿热处理和 120、60 min 干热处理后其活菌数只下降了一个数量级,显示了凝结芽胞杆菌较强的抗热性^[18]。对 Y-1 菌株进行了热耐受试验,结果显示,Y-1 菌株具有很强的耐高温特性,芽孢的这种耐高温特性使得芽孢在饲料生产过程中可以保持很好的活性,使它用于饲料生产成为可能。

表8 Y-1 菌对抗生素的抑菌圈大小

Table 8 The bacteriostatic circle of strain Y-1 against antibiotics

浓度 Concentration	SMZ	抑菌圈 Bacteriostatic circle	
		泰洛菌素 Tlosin	呋 唑酮 Furazolidone
10 ng/ ml	2.85	3.95	2.90
5 ng/ ml	2.82	3.60	2.75
2.5 ng/ ml	2.80	3.44	2.61
1.25 ng/ ml	2.73	3.30	2.82
0.625 ng/ ml	2.65	2.90	2.41
312.5 µg/ ml	2.60	2.80	2.25
156.25 µg/ ml	2.49	2.90	1.95
78.125 µg/ ml	2.40	2.40	1.89
39 µg/ ml	1.60	2.20	1.68
19.5 µg/ ml	1.31	1.85	1.45
9.8 µg/ ml	1.25	1.50	1.35
4.9 µg/ ml	1.25	1.30	1.35
2.5 µg/ ml	1.15	1.30	1.30
1.25 µg/ ml	1.00	1.20	1.20

参考文献

- [1] FULLER R. Probiotics in man and animals[J]. *J Appl Bacteriol*, 1989, 66(5): 365-378.
- [2] SALMINEN S, BOLEY C, BOUITON RUAULT M C, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function[J]. *Br J Nutr*, 1998, 80(S1): 147-171.
- [3] SHORIT C, O'BRIEN J. Handbook of functional dairy products[M]. New York: CRC Press LLC, 2004: 1-29.

(上接第14424 页)

dNTP 作为 PCR 反应的原料之一, 合适浓度的优化也是十分重要的。浓度太高容易产生错配, 从而出现非特异性扩增; 浓度太低则扩增效率低, 甚至会因为 dNTPs 的过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果^[11]。

对于引物浓度而言, 浓度不宜偏高也不能偏低。浓度偏高时, 易引起碱基错配和产生非特异性扩增, 还易形成引物二聚体; 浓度偏低时, 则与 DNA 模板结合位点少, 扩增产量下降, 并有可能出现涂抹现象^[12]。

在 ISSR PCR 扩增中, 退火温度明显影响了扩增结果。退火温度不仅与引物(碱基种类, 序列长短)有关, 还与物种 DNA 的序列有关, 同一引物对不同物种退火温度往往不同。退火温度不同, 产生错配的程度也不同, 通常较低的温度在保证引物与模板结合稳定性的同时, 也会使引物与模板之间未完全配对的一些位点得到扩增, 即产生一定的错误扩增。因此, 在允许的范围内, 选择较高的退火温度可减少引物和模板之间的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性^[13]。

高原鼠兔分子标记的研究国内外报道不多。该试验稳定的 ISSR 体系可以为鼠兔 ISSR 试验的后续工作提供参考, 特别是可为应用 ISSR 技术进行鼠兔遗传多样性研究奠定一定的基础, 并对探讨 ISSR 反应的影响具有一定的参考价值。

- [4] TANNOCK G W. Probiotics: A critical review[M]. Norfolk, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 1999.
- [5] FULLER R. Probiotics 2: applications and practical aspects[M]. London: Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [6] YUAN JUN LEE. Handbook of probiotics[M]. New York: John Wiley & Son, Inc, 1999.
- [7] RIAL D R. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. *J Nutrition*, 2000, 130: 396-402.
- [8] 河南农业大学. 动物微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [9] 杜连祥, 路福平. 微生物实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 9.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65.
- [11] 李阜隶, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 157-158.
- [12] 孟军, 刘淑英. 动物微生态制剂鸡肠源菌的分离与鉴定[J]. *宁夏大学学报*, 2005(12): 365-368.
- [13] 谢晶, 葛绍荣. 多粘类芽胞杆菌拮抗成分分离及其特性[J]. *化学研究与应用*, 2004, 16(6): 775.
- [14] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验手册[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [15] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [16] HOODS K, ZOITOLA E A. Effect of low pH on the ability of lactobacillus acidophilus to survive and adhere to human intestinal cells[J]. *J Food Sci*, 1988, 53(5): 1514-1516.
- [17] EWING W N. The living gut[M]. Nottingham: University Nottingham, 1994.
- [18] 王艳萍, 陈莹, 赵虎山, 等. 一株芽胞乳酸杆菌 TQ33 产芽孢特性及抗性的研究[J]. *中国乳品工业*, 1996, 24(3): 9-12.
- [19] ZHANG T, QU L Y, ZHU Q. Preliminary identification of a native bacterial strain HZBN3[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 34-36.
- [20] 刘燕. 猪益生性芽胞杆菌的筛选与特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [21] DENG C P, HU H X, YAN X Z, et al. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of a strain isolated from diseased larva of *Anoplophora glabripennis* (Mitsch.) [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(2): 67-69, 89.

参考文献

- [1] ZETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] BARTH S, MECHINGER A E, LUBBERSTEDT T H. Genetic diversity in *Aralidopsis thaliana* L. Hyrn. investigated by deaved amplified polymorphic sequence (CAP) and inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 494-505.
- [3] BORNET B, BRANCHARD M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 209-215.
- [4] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 等. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(2): 159-164.
- [5] SMITH A T, FOGGIN J M. The plateau pikia (*Ochotona curzoniae*) is a keystone species for biodiversity on the Tibetan plateau[J]. *Animal Conservation*, 1999, 2: 235-240.
- [6] 杜继增, 李庆芬. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响[J]. *兽类学报*, 1982, 2(1): 35-42.
- [7] 周乐, 殷宝法, 杨生妹, 等. 青藏公路对高原鼠兔种内遗传分化的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(11): 3572-3577.
- [8] 杨洁, 赵新全, 郭松长, 等. 高原鼠兔 ob 基因的组织表达特征[J]. *兽类学报*, 2007, 27(1): 33-38.
- [9] JOE SAMBROCK, DAVID W RUSSELL. Molecular cloning. A laboratory manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2001: 463-470.
- [10] 林万明. PCR 操作技术与应用指南[M]. 北京: 人民医学出版社, 1993.
- [11] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2003, 11(1): 15-19.
- [12] BRUNO W S. High output genetic mapping of polyploids using PCR-Generated markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 105-112.
- [13] LUSD. Current protocols for molecular biology[M]. 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 458-463.