

桂腾琴,伍 伟,卢 鹏,等. 正交设计优化荷花品种 ISSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):71-73.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.019

正交设计优化荷花品种 ISSR-PCR 反应体系

桂腾琴^{1,2,3}, 伍 伟¹, 卢 鹏¹, 王颖娟^{1,3}, 张万芹^{1,3}, 子文童¹, 李 珏¹

(1. 兴义民族师范学院生物与化学学院, 贵州兴义 562400; 2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715;
3. 贵州省民族药用生物资源研究与开发重点实验室, 贵州兴义 562400)

摘要:以东方明珠荷花为试验材料,应用 $L_9(3^4)$ 正交设计,探讨反应体系中引物、*Taq* DNA 聚合酶等 4 个不同因素的 3 个水平对荷花品种反应体系的影响,正交设计所用引物为 UBC843,PCR 结果应用 MINITAB 软件进行方差分析和极差分析。结果表明,荷花最佳 ISSR-PCR 反应体系(25 μ L):2.5 μ L 10 \times buffer,2.0 mmol/L Mg^{2+} ,0.20 mmol/L dNTPs,0.40 μ mol/L 引物,20~80 ng 模板 DNA,1.00 U *Taq* DNA 聚合酶。优化的 ISSR-PCR 反应体系稳定性高、重复性较好,为从分子水平对荷花品种进行各项研究奠定了基础。

关键词:荷花;正交设计;ISSR-PCR;体系优化

中图分类号: S188;Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0071-03

荷花(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)为睡莲科莲属植物,是中国传统的十大名花之一,素有“活化石”之称^[1]。安龙荷花种质资源丰富,但优良品种较少,在长期自然杂交过程中,不仅形成了类型多样的品种,而且品种间的亲缘关系也较为复杂,给荷花种质资源的收集、保存、研究等带来了不便。传统的形态指标容易受到生态环境及基因显隐性影响,不能客观地估计遗传变异性。因此,从分子水平对荷花品种的亲缘关系和遗传多样性进行研究是非常必要的。1994 年 Zietkiewicz 等创建了简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR)技术^[2],它具有稳定性、可操作性、多态性高等优点^[3],但是 ISSR-PCR 易受诸多因素如 *Taq* DNA 聚合酶、引物、退火温度等干扰,而且不同物种 ISSR-PCR 最佳反应体系的差别也很大^[4-5]。正交试验设计可以克服传统单因素试验的不足,考虑各因子的相互作用,具有齐整可比、均衡分散等优点^[6],能通过较少的试验组合快速找到最佳反应体系^[7]。黄宇等以 6 份荷花品种的叶片为材料,采用单因素方法优化 ISSR-PCR 反应体系^[8];孙祖霞等以荷花品种新红的叶片为材料,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计优化荷花相关序列扩增多态性 PCR (SRAP-PCR)反应体系^[9];徐君等也是采用单因素方法优化 ISSR-PCR 反应体系^[10]。迄今为止,关于荷花品种 ISSR-PCR 反应体系正交优化的报道较少,本研究拟用 $L_9(3^4)$ 正交设计优化反应体系,以为后续研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料为东方明珠,其花瓣采于贵州省安龙县招堤荷

花池,花瓣采集后用硅胶干燥,正交设计过程中用到的引物为 UBC 843(CT)₈RA。

1.2 DNA 的提取

东方明珠花瓣 DNA 的提取参考桂腾琴等方法^[11];DNA 纯度、浓度用 UV-4501S 紫外分光光度计测定;DNA 质量用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 正交试验设计

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,各因素-水平组合见表 1。每个处理重复 2 次,反应总体积为 25 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50.6 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min,扩增结束后于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色电泳后,在 Bio-RAD 凝胶成像系统中进行观察和分析。

表 1 荷花 ISSR-PCR 反应体系 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

| 处理号 | 因素 | | | |
|-----|--------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| | Mg^{2+} 浓度 (mmol/L) | <i>Taq</i> 酶浓度 (U/25 μ L) | dNTPs 浓度 (mmol/L) | 引物浓度 (μ mol/L) |
| 1 | 1.5 | 0.75 | 0.15 | 0.20 |
| 2 | 1.5 | 1.00 | 0.20 | 0.30 |
| 3 | 1.5 | 1.50 | 0.25 | 0.40 |
| 4 | 2.0 | 0.75 | 0.20 | 0.40 |
| 5 | 2.0 | 1.00 | 0.25 | 0.20 |
| 6 | 2.0 | 1.50 | 0.15 | 0.30 |
| 7 | 2.5 | 0.75 | 0.25 | 0.30 |
| 8 | 2.5 | 1.00 | 0.15 | 0.40 |
| 9 | 2.5 | 1.50 | 0.20 | 0.20 |

1.4 退火温度的确定

设定 6 个退火温度:47.6、48.6、49.6、50.6、51.6、53.6 $^{\circ}$ C,选用正交设计确定的最佳反应体系对引物 UBC 843(CT)₈RA 退火温度进行筛选试验,其余参数不变。

2 结果与分析

2.1 正交设计分析

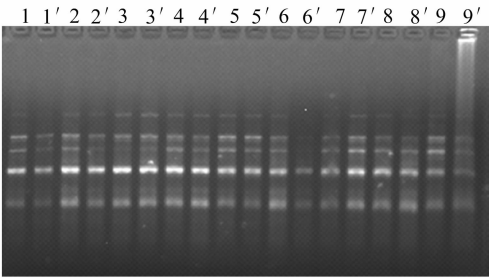
计分参照何正文等方法^[12],根据条带的多少、特异性与

收稿日期:2016-02-15

基金项目:贵州省科技厅联合基金(编号:黔科合 LH 字[2014]7413 号);2015 年国家级大学生创新创业训练计划(编号:201510666015)。

作者简介:桂腾琴(1977—),女,贵州安龙人,硕士,副教授,主要从事植物生物技术的研发。E-mail: guitengqin@189.cn。

清晰程度依次打分:条带多而亮、清晰,记 9 分;最低分记 1 分;2 次重复独立计分。9 个组合的分数(2 次重复)依次为:3、3;8、7;4、6;9、6;5、7;1、1;4、5;8、2。由图 1 可见:第 7 号、第 9 号、第 6' 号、第 9' 号处理效果较差,背景深、条带少,且条带不整齐;第 4 号处理最好,2 次重复扩增条带比较稳定,条带多且清晰。



1~9 处理编号同表 1, 每个处理重复 2 次
图1 正交试验 PCR 产物电泳结果(引物UBC 843)

2.2 各因素不同水平对 PCR 的影响

为确定最佳的 PCR 反应体系,需要对各因素不同水平进行多重比较。极差的大小表明该因素对 PCR 扩增影响的强弱。由表 2 可以看出:引物浓度对 PCR 扩增的影响最强,其次是 *Taq* DNA 聚合酶,影响最弱的是 dNTPs。正交试验扩增的结果用 MINITAB 软件进行方差分析,由表 3 可知:方差分析与极差分析的结果比较一致;引物不同水平间差异在方差分析中达到显著水平($P < 0.05$),其余因素在水平间差异不显著。

2.2.1 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 扩增结果的影响 由表

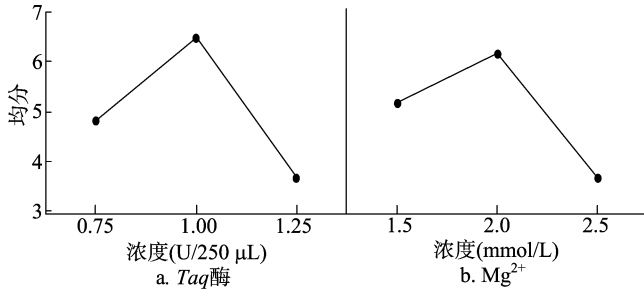


图2 荷花 ISSR-PCR 正交试验设计不同水平对各因素作用下 PCR 扩增结果均分的影响

2.2.3 dNTPs 浓度对 PCR 扩增结果的影响 从图 2 可以看出:dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L(1、6、8 号处理)、0.25 mmol/L(3、5、7 号处理)时,扩增条带少且不稳定;dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L 时,PCR 扩增均分最高,确定其为最佳 dNTPs 浓度。

2.2.4 引物浓度对 PCR 扩增结果的影响 本试验中影响 PCR 扩增的主要因素是引物浓度(表 2)。引物浓度为 0.20、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 时,均值差异不明显;当浓度为 0.40 $\mu\text{mol/L}$ (3、4、8 号处理)时,均值达到最大(图 2)。因此,选择引物最佳浓度为 0.40 $\mu\text{mol/L}$,与李立升等研究结果^[15-16]相同。

2.3 PCR 扩增退火温度的确定

ISSR 引物退火温度对 PCR 扩增结果影响很大。由图 3 可见:当退火温度为 47.6、48.6、49.6 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增不稳定且条带少;当退火温度为 50.6、51.6 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增条带清晰且数量多、稳定。可见,在 ISSR-PCR 扩增中适当提高退火温度可

2 可知,*Taq* DNA 聚合酶浓度在该试验中是影响 PCR 扩增的次要因素。由图 2 可以看出:*Taq* DNA 聚合酶在 1.00 U/25 μL 水平差异明显,而在 0.75 U/25 μL (1、4、7 号处理)、1.50 U/25 μL (3、6、9 号处理)2 个水平差异不明显;*Taq* 酶量为 1.00 U/25 μL (2、5、8 号处理)扩增的条带清晰,条带丰富。综合结果可知,1.00 U/25 μL 为 *Taq* 酶最佳浓度,与刘艺平等的研究结果^[13-14]一致。

表 2 PCR 反应各因素间极差分析结果

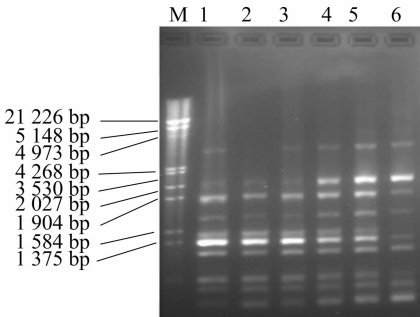
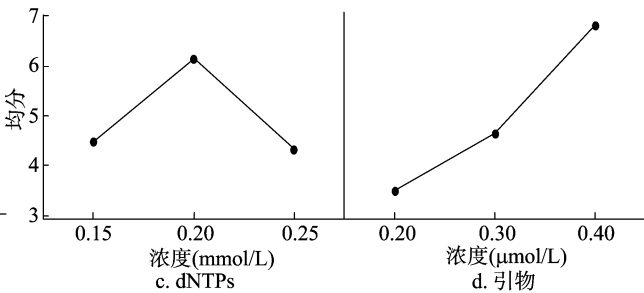
| 数据类别 | <i>Taq</i> DNA 聚合酶浓度(U/25 μL) | Mg^{2+} 浓度(mmol/L) | dNTPs 浓度(mmol/L) | 引物浓度($\mu\text{mol/L}$) |
|------|---|-----------------------------|------------------|---------------------------|
| 极小值 | 3.667 | 3.667 | 4.333 | 3.500 |
| 极大值 | 6.500 | 6.167 | 6.167 | 6.833 |
| 极差 | 2.833 | 2.500 | 1.834 | 3.333 |

表 3 正交设计方差分析结果

| 变异来源 | 自由度 | 方差 | 均方 | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|--------------------|-----|---------|--------|------------|------------|
| <i>Taq</i> DNA 聚合酶 | 2 | 24.333 | 12.167 | 3.650 | 0.069 |
| Mg^{2+} | 2 | 19.000 | 9.500 | 2.850 | 0.110 |
| dNTPs | 2 | 12.333 | 6.167 | 1.850 | 0.212 |
| 引物 | 2 | 34.333 | 17.167 | 5.150 | 0.032 * |
| 误差 | 9 | 30.333 | 3.333 | | |
| 总计 | 17 | 120.000 | | | |

注:“*”表示在 0.05 水平差异显著。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增结果的影响 图 2 显示: Mg^{2+} 浓度 3 个水平对 PCR 扩增影响不明显, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时均分最大; Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,均分呈下降趋势。最终确定 Mg^{2+} 的最佳浓度为 2.0 mmol/L。



1~6 退火温度分别为:47.6、48.6、49.6、50.6、51.6、53.6 $^{\circ}\text{C}$; M— λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III

图3 退火温度对 ISSR 反应的影响(引物为 UBC843)

以增加特异性条带,因此引物 UBC 843 的最适退火温度为 51.6 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 最优体系的确定和稳定性验证

综上所述,荷花品种最佳 ISSR-PCR 反应体系(25 μL): 2.5 μL 10 \times buffer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 mmol/L dNTPs, 0.40 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 20~80 ng 模板 DNA, 1.00 U *Taq* DNA 聚合酶。利用引物 UBC 827 在退火温度为 51.6 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行体系稳定性检测,图 4 表明:体系稳定、效果好,可用于荷花品种亲缘关系和遗传多样性的研究。

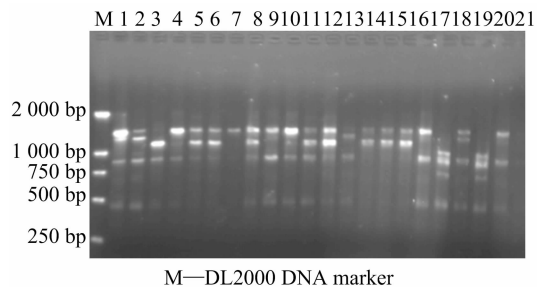


图4 21个荷花品种的 ISSR 扩增图谱(引物为 UBC 827)

3 讨论与结论

正交设计可以克服传统的单因素试验和完全组合设计不足,从复因子试验中挑选出有代表性的水平组合进行试验,节约了成本、时间,具有齐整可比、均衡分散等优点^[6,17]。但是对正交设计扩增结果进行直观分析有一定的主观性和随意性^[18-19],要么可以适当增加试验重复次数,从而增加对 PCR 扩增的评判次数,来减少打分误差,使试验数据更可靠^[4],要么也可以借助分析软件对结果进行分析。

PCR 扩增结果受物种^[4-5,7]、扩增程序、多因子等综合影响,退火温度很小的变动就会引起扩增结果很大的变化。本试验中各因素对 PCR 扩增的影响由强到弱为:引物浓度 > *Taq* DNA 聚合酶浓度 > Mg^{2+} 浓度 > dNTPs 浓度,结果与任凤鸣等的研究结果^[20]相似。而梨的正交试验^[21]和李伟等对锁阳的 ISSR-PCR 优化研究^[5]认为,对 PCR 影响最关键的是 *Taq* DNA 聚合酶,其次是引物浓度。孙清信等研究表明,模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增影响最小^[22-23],对荷花品种模板 DNA 浓度进行单因素优化时也得到相似的结果,模板 DNA 浓度在 20~80 ng/25 μL 均能扩增出条带,且条带清晰;但是如果模板 DNA 不纯,则导致扩增条带少或无扩增条带^[21,24]。出现这些差异要么与物种、引物特异性有关,要么与主观评价有关。因此,为了更好地将正交设计广泛应用于研究中,既可以建立客观的评判标准,也可以提高分析结果的可信度。

综合考虑后得出荷花品种最佳反应体系(25 μL): 2.5 μL 10 \times buffer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 mmol/L dNTPs, 0.40 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 20~80 ng 模板 DNA, 1.00 U *Taq* DNA 聚合酶。该反应体系在其他引物中扩增获得了清晰的条带,为后续研究奠定了坚实基础。

参考文献:

[1]张行言. 中国荷花新品种图志 I[M]. 北京:中国林业出版社,

2011:1-2.

- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [3] Syamkumar S, Sasikumar B. Molecular marker based genetic diversity analysis of *Curcuma* species from India[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(2): 235-241.
- [4] 唐辉, 陈宗游, 史艳财, 等. 正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.
- [5] 李伟, 刘广达, 陈青, 等. 锁阳 ISSR-PCR 反应体系的优化研究[J]. 生物技术通报, 2012(8): 135-140.
- [6] 明道绪. 生物统计附试验设计[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 286-287.
- [7] 王军, 杨荣萍, 洪明伟, 等. 石榴 SPAR-PCR 反应体系的正交设计优化及验证[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(3): 376-379.
- [8] 黄宇, 何天友, 荣俊冬, 等. 荷花 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 亚热带农业研究, 2009, 5(4): 284-288.
- [9] 孙祖霞, 刘兆磊, 陈素梅, 等. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(6): 53-58.
- [10] 徐君, 李静会, 李欣, 等. 荷花 ISSR 引物筛选及反应体系优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 42-44.
- [11] 桂腾琴, 乔爱民, 孙敏, 等. 果梅基因组 DNA 提取方法的比较及 ISSR 分析[J]. 北方园艺, 2008(4): 212-215.
- [12] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 76-77.
- [13] 刘艺平, 李创, 李娜, 等. 荷花遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(4): 139-146.
- [14] 孔德政. 荷花的民族植物学及河南地区品种资源研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011: 100-101.
- [15] 李立升. 21 个荷花品种遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011: 20-20.
- [16] 刁松峰, 邵文豪, 姜景民, 等. 多用途树种无患子 ISSR-PCR 体系建立与检测[J]. 广西植物, 2015, 35(6): 899-904.
- [17] 桂腾琴, 孙敏, 乔爱民. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.
- [18] 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.
- [19] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 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.
- [20] 任凤鸣, 胡开治, 刘燕琴, 等. 传统中药金钱草 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2233-2238.
- [21] 桂腾琴, 孙敏, 陆春连, 等. 梨 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2014, 39(12): 37-42.
- [22] 孙清信, 陈坚, 张辉, 等. 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 870-878.
- [23] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 梓树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91-93.
- [24] 范海艳, 曹福祥, 彭继庆, 等. 博白大果油茶 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(4): 97-103.