

任军方,姜殿强,云 勇. 海南省特有安诺兰 ISSR 体系的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):39-41.

海南省特有安诺兰 ISSR 体系的优化

任军方,姜殿强,云 勇

(海南省农业科学院园林花卉研究所,海南海口 571100)

摘要:以海南省特有安诺兰为基因组材料,采用改进的 CTAB 法提取安诺兰叶片中的基因组 DNA,通过单因素试验,对 ISSR-PCR 反应体系中各影响因子进行优化和筛选,建立适合海南安诺兰的 ISSR-PCR 反应体系:15 μ L PCR 反应体积,10 \times PCR Buffer,200 μ mol/L dNTPs,0.5 μ mol/L 引物,1.5 mmol/L Mg^{2+} ,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶,40 ng 模板 DNA。

关键词:安诺兰;ISSR-PCR;优化

中图分类号: Q949.718.43;S682.310.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0039-03

安诺兰 [*Anota hainanensis* (Rolfe) Schltr] 为兰科安诺兰属植物,海南省特有种,产于海南省中南部低海拔丘陵地区,热带附生兰,附生于低海拔丘陵地区的枫树上。安诺兰在春节前后开花,花朵清丽、密集而芳香,是极好的新春贺岁花卉。

ISSR (inter simple sequence repeat) 标记即简单重复序列区间 DNA 标记,是由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出的一种新型分子标记技术^[1],它利用基于 SSR 而设计的寡核苷酸引物来检测 2 个 SSR 之间的一段短 DNA 序列差异。该技术的优点是所需 DNA 量少、多态性好、无须预知研究对象基因组序列等^[2],因此该技术已被广泛用于品种鉴定^[3]、基因定位及遗传多样性分析^[4-5]。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子标记技术,所以它同其他分子标记技术一样,结果容易受多种因素干扰,如模板 DNA 浓度、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物浓度等都能影响扩增结果,甚至其中一个因素改变都会影响扩增条带的位置或使其消失,从而影响整个试验结果,因此在研究时应先建立合适的反应体系并对其进行优化^[6-10]。本研究对海南省特有安诺兰 ISSR 反应体系进行探索,旨在建立适于安诺兰的 ISSR 反应体系。

1 材料与方

收稿日期:2013-10-17

基金项目:海南省自然科学基金(编号:310062)。

作者简介:任军方(1980—),女,河北石家庄人,助理研究员,研究方向为热带花卉种质资源学。E-mail:renjunfang808@163.com。

通信作者:云 勇,副研究员,研究方向为热带作物种质资源创新与利用。E-mail:yyong-3027@163.com。

1.1 材料

供试安诺兰来自于海南省农业科学院园林花卉研究所兰圃,试验地点在海南省农业科学院园林花卉研究所实验室。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker 等试剂均购于上海生工生物工程有限公司。100 条 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的序列,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 采用改良 CTAB 法提取 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,以 DL 2000 为标准,检查所得 DNA 的分子量、含量、纯度、完整性,并将 DNA 浓度稀释至 40 ng/ μ L。

1.3.2 ISSR-PCR 正交试验设计 采用正交试验建立 ISSR-PCR 反应体系并进行优化,参照陶兴林等人的方法^[11-15]设置各个因素,考察模板 DNA 浓度、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物浓度等 4 个因素对 ISSR 反应体系的影响,设定 5 个水平,建立 $U_{20}(5^4)$ 均匀设计表(表 1、表 2),确立海南安诺兰 ISSR-PCR 反应体系,每个处理重复 2 次。

表 1 安诺兰 ISSR 反应体系正交试验因素水平

水平	A: <i>Taq</i> DNA 聚合酶 (U/ μ L)	B: dNTPs (μ mol/L)	C: 引物浓度 (μ mol/L)	D: 模板 DNA 浓度 (ng/ μ L)
1	0.008	50	0.1	0.8
2	0.020	100	0.3	1.2
3	0.030	150	0.5	1.6
4	0.040	200	0.8	2.0
5	0.060	300	1.0	2.4

[6] Han L Q, Yang G Y, Zhu H S, et al. Selection and use of reference genes in mouse mammary glands [J]. Genetics and Molecular Research, 2010, 9(1): 449-456.

[7] Guan X, Pettigrew J E, Ku P K, et al. Dietary protein concentration affects plasma arteriovenous difference of amino acids across the porcine mammary gland [J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(10): 2953-2963.

[8] Tovar A R, Avila E, Desantiago S, et al. Characterization of methyl-aminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland [J].

Metabolism, 2000, 49(7): 873-879.

[9] López A, Torres N, Ortiz V, et al. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland [J]. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2006, 291(5): E1059-E1066.

[10] Martínez - López I, García C, Barber T, et al. The L - glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT - 1 (EAAT2): expression and regulation in rat lactating mammary gland [J]. Molecular Membrane Biology, 1999, 15(4): 237-242.

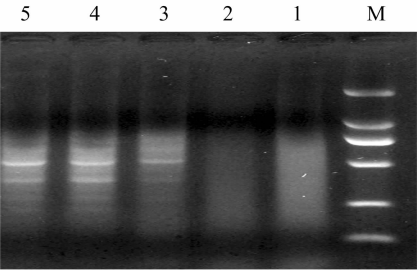
表 2 安诺兰 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计

序号	A: <i>Taq</i> DNA 聚合酶	B: dNTPs	C: 引物浓度	D: 模板 DNA 浓度
1	1	1	3	2
2	1	2	4	5
3	1	3	2	1
4	1	4	5	3
5	1	5	1	4
6	2	1	4	3
7	2	2	1	1
8	2	3	3	4
9	2	4	2	5
10	2	5	5	2
11	3	1	2	4
12	3	2	3	3
13	3	3	5	5
14	3	4	1	2
15	3	5	4	1
16	4	1	1	5
17	4	2	5	4
18	4	3	4	2
19	4	4	3	1
20	4	5	2	3
21	5	1	5	1
22	5	2	2	2
23	5	3	1	3
24	5	4	4	4
25	5	5	3	5

2 结果与分析

2.1 反应体系中各因子对 ISSR-PCR 扩增的影响

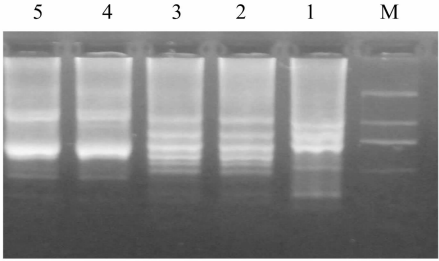
2.1.1 DNA 模板对 ISSR-PCR 扩增的影响 从图 1 可以看出, DNA 模板用量对 ISSR-PCR 扩增条带的影响较大, 15 μL 反应体系中, 模板 DNA 用量为 20 ~ 50 ng, 当模板 DNA 用量为 40 ng 时能扩增出清晰条带, 因此本研究采用的最适模板 DNA 用量为 40 ng。



15 μL 反应体系中的模板 DNA 用量分别为: 1—20 ng; 2—30 ng; 3—40 ng; 4—50 ng; M—marker

图1 不同模板浓度下的 ISSR-PCR 扩增结果

2.1.2 *Taq* DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 扩增的影响 *Taq* DNA 聚合酶用量是影响 ISSR-PCR 扩增的重要因子, *Taq* DNA 聚合酶浓度过低会降低 PCR 扩增产物的合成效率。由图 2 可见, 15 μL 反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.2、0.5、0.75、1.0 U 时的扩增结果不同。当 *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 U 时, 所得扩增条带清晰, 因此确定 *Taq* DNA

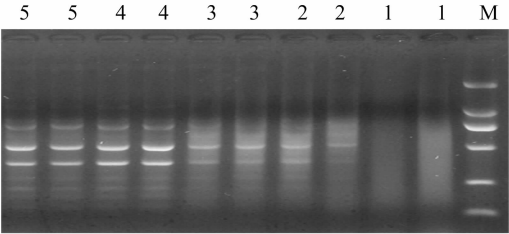


15 μL 反应体系中的 *Taq* DNA 聚合酶用量分别为: 1—0.2 U; 2—0.5 U; 3—0.75 U; 4—1.0 U

图2 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度下的 ISSR-PCR 扩增结果

聚合酶的用量是 1.0 U。

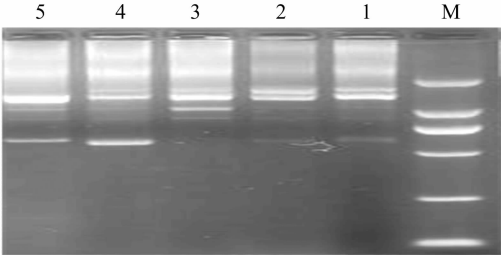
2.1.3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 dNTPs 是 PCR 扩增的原料, dNTPs 浓度过高导致 PCR 错配, dNTPs 浓度过低致使反应不充分, 影响扩增效果, 甚至会因为 dNTPs 过早消耗使产物单链化。为了确定最适合的 dNTPs 浓度, 本研究设置了 5 个 dNTPs 梯度筛选, 结果见图 3。由图 3 可看出, 当 dNTPs 浓度为 200 μmol/L 时扩增条带清晰; 但当 dNTPs 浓度为 50、100 μmol/L 等时, 扩增条带模糊。因此, 本研究中最适 dNTPs 浓度为 200 μmol/L。



1—50 μmol/L dNTPs; 2—100 μmol/L dNTPs; 3—150 μmol/L dNTPs; 4—200 μmol/L dNTPs; 5—300 μmol/L dNTPs

图3 不同 dNTPs 浓度下的 ISSR-PCR 扩增结果

2.1.4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 在 ISSR-PCR 扩增中, 引物浓度会对反应结果产生明显影响, 引物浓度太低不能扩增, 引物浓度过高则会引起非特异扩增, 并形成引物二聚体。本研究采取 5 个梯度对引物扩增条带结果进行比较。从图 4 可以看出, 当引物浓度为 0.5 μmol/L 时, 扩增条带清晰, 且没有二聚体扩增带, 因此本研究中最适引物浓度为 0.5 μmol/L。



1—0.1 mmol/L 引物; 2—0.3 mmol/L 引物; 3—0.5 μmol/L 引物; 4—0.8 μmol/L 引物; 5—1.0 μmol/L 引物

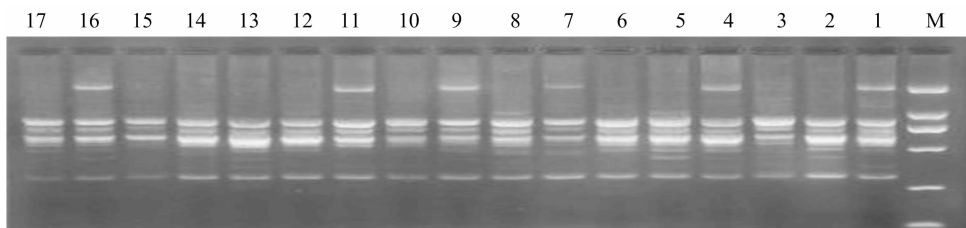
图4 不同引物浓度下的 ISSR-PCR 扩增结果

2.2 最佳反应体系的验证

正交试验得到的最佳海南安诺兰 ISSR-PCR 扩增反应体系为: 总体积 15 μL, 10 × PCR Buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μL,

200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA 40 ng, 其他为超纯水。因此, 本研究用 ISSR 引物 823 在退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$ 时对海南安诺兰陵水群体进行 ISSR

—PCR 扩增, 能够得到清晰、多态性高的 ISSR 条带(图 5), 表明确立的优化体系稳定可靠, 可用于海南安诺兰分子的鉴定和遗传关系的分析等分子研究。



1~17—安诺兰样品

图5 823 引物对海南安诺兰陵水群体的扩增效果

3 结论与讨论

ISSR 技术已被广泛用于植物种质资源鉴定、植物遗传多样性等研究。ISSR 扩增以 PCR 扩增为基础, 因此影响 PCR 扩增的因素如引物浓度、dNTPs 浓度、模板浓度等都会对 ISSR 扩增产生影响。植物种类、试验条件不同, 各因子间相互影响产生的扩增结果也不相同, 本研究中不同处理下的扩增条带存在差异, 因此须要对这些因子进行优化, 选择最佳组合。DNA *Taq* 酶浓度是影响试验结果的重要因素, 其浓度过高容易产生非特异性扩增产物; 浓度过低时, 扩增产物效率下降。dNTPs 浓度太高容易引起错配, 浓度过低会影响扩增效率。引物浓度则会影响扩增产物质量, 浓度偏高会产生非特异性扩增, 浓度太低则无法进行有效扩增。另外, 退火温度、循环次数等也是反应体系建立和优化的重要因素^[16-17]。

本研究采用单因素与正交试验相结合的方法, 对 PCR 各单因子进行研究, 建立了适合海南安诺兰的 ISSR 反应体系, 即: 总体积 15 μL , 10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.0 μL , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA 40 ng, 其他为超纯水。并用 ISSR 引物 823 检验了该体系的稳定性和可靠性, 为海南安诺兰的种质资源分析奠定了基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Shen J, Ding X Y, Liu D Y, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(3): 420 - 422.

- [3] 谭祖猛, 李云昌, 胡 琼, 等. 分子标记在油菜杂种优势利用中的研究进展[J]. *植物学通报*, 2008, 25(2): 230 - 239.
- [4] 梁明山, 曾 宇, 周 翔, 等. 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用[J]. *植物学通报*, 2001, 18(3): 257 - 265.
- [5] 晏慧君, 付 坚, 李 俊, 等. 云南普通野生稻遗传多样性和亲缘关系[J]. *植物学通报*, 2006, 23(6): 670 - 676.
- [6] 宣 朴, 邓 婧, 陈 新, 等. 苦瓜 ISSR 扩增条件优化的研究[J]. *核农学报*, 2006, 20(3): 215 - 217, 168.
- [7] 王 佳, 梁国华, 缪旻珉, 等. 正交设计优化黄瓜 ISSR 体系[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 439 - 442.
- [8] 刘小溪, 李枝林, 贾文杰, 等. 百合 ISSR - PCR 反应体系的优化[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(1): 30 - 33.
- [9] 宁 静, 黄建安, 李 娟, 等. 茶树 ISSR - PCR 反应体系的正交优化[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(4): 414 - 417.
- [10] 李承卓, 史艳财, 邹 蓉, 等. 平果金花茶 ISSR - PCR 反应体系的建立与优化[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(11): 17 - 20.
- [11] 陶兴林, 胡立敏, 朱慧霞, 等. 花椰菜的 ISSR - PCR 反应体系的建立与优化[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(3): 27 - 31.
- [12] 王兴龙, 金则新, 李钧敏, 等. 接骨草 ISSR 扩增条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(4): 49 - 51.
- [13] 乔燕春, 林顺权, 杨向晖, 等. 均匀设计在枇杷 ISSR - PCR 反应体系优化中的应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(1): 123 - 126.
- [14] 王 方, 袁庆华. 冰草 ISSR - PCR 反应体系的建立与优化[J]. *草地学报*, 2009, 17(3): 354 - 357.
- [15] 马 啸. 老芒麦野生种质资源的遗传多样性及群体遗传结构研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [16] 白锦军, 魏安智, 王 佳, 等. 仁用杏 ISSR 分析体系的正交优化[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(6): 1237 - 1244.
- [17] 闫 林, 黄丽芳, 谭乐和, 等. 咖啡 ISSR 与 RAPD - PCR 反应体系优化[J]. *热带作物学报*, 2012, 33(5): 854 - 859.