

张聪子,童巧珍,郭婷,等. 蛇莓 RAPD 与 ISSR-PCR 反应体系优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):50-53.

蛇莓 RAPD 与 ISSR-PCR 反应体系优化

张聪子,童巧珍,郭婷,高显,蔡嘉洛

(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

摘要:采用单因素试验结合正交试验,对 PCR 反应体系中的 5 种主要反应因子 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 浓度进行优化筛选,确立了适合蛇莓基因组 DNA 的 RAPD 和 ISSR 反应体系,RAPD 反应体系(20 μ L): Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTPs 250 μ mol/L、*Taq* 酶 1 U、引物 0.2 μ mol/L、DNA 模板 60 ng;ISSR 反应体系(20 μ L): Mg^{2+} 2.0 mmol/L、dNTPs 250 μ mol/L、*Taq* 酶 0.5 U、引物 1 μ mol/L、DNA 模板 60 ng。利用确立的体系对 24 份蛇莓种质进行扩增,结果条带清晰明亮,多态性好。

关键词:蛇莓;RAPD-PCR;ISSR-PCR;单因素;正交设计;体系优化

中图分类号: S567.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0050-04

蛇莓 [*Duchesnea indica* (Andr.) Focke] 为蔷薇科蛇莓属植物,为民间常用草药,具有清热解毒、消肿散瘀,收敛止血、凉血之功效^[1-2]。长期以来,科研工作者对蛇莓开展了大量研究,近年来,因发现蛇莓具有抗肿瘤活性而更加引起学者们的关注,蛇莓已成为一种开发前途广阔的植物资源。目前,对蛇莓的研究主要集中在栽培及药理等领域,分子方面的研究相对较少。本试验以蛇莓为研究对象,选择对 PCR 扩增体系稳定性影响较大的 5 个因素,包括模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物浓度进行优化,以期确立稳定适合于蛇莓的 ISSR 及 RAPD 分子标记的 PCR 反应体系,为蛇莓的资源鉴定与遗传多样性研究提供技术依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 蛇莓种质 材料取自湖南中医药大学药植园人工栽培的蛇莓新鲜幼嫩叶片,24 组样本均保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中。1-24 号分别为邵阳隆回 1 号、邵阳隆回 2 号、邵阳隆回 3 号、邵阳隆回 4 号、邵东、常德 1 号、常德 2 号、常德澧县、大围山 1 号、大围山 2 号、平江冬塔、平江幕阜山、平江石浆、平江石浆阜西、衡山、永顺西岐、浏阳周洛、株洲、娄底、长沙植物园、长沙市含浦 1 号、长沙市含浦 2 号、长沙望城、长沙县。

1.1.2 试剂 所用试剂均购于北京鼎国生物公司。RAPD-PCR 体系优化选用随机引物 P8,序列为 5'-TCTGTGAGG-3';ISSR-PCR 体系优化选用引物 GRD205 824,序列为 5'-(TC)₈A-3'。

1.2 基因组 DNA 提取

蛇莓植物基因组 DNA 采用试剂盒(北京天根)提取,用核酸蛋白测定仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓

度。将 DNA 稀释成 20 ng/ μ L,贮存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 PCR 扩增及凝胶电泳

ISSR 扩增程序^[3]为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,53 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

RAPD 扩增程序^[4]为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,37 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物均用含有溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶在 0.5 \times TBE 中电泳,点样 10 μ L,电压 4 V/cm,电泳结束后在凝胶成像系统上检测拍照。

1.4 PCR 反应体系的优化

针对 20 μ L 反应体系中的 5 个主要因素 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 浓度,设定 4 个水平,分别建立单因素及正交设计表(表 1、表 2),确立 RAPD 和 ISSR-PCR 反应体系。

1.5 退火温度的优化

以上述反应体系优化确定的 5 个因素的最佳浓度水平为基础,对退火温度进行优化。将 RAPD 退火温度范围设置为 30~45 $^{\circ}$ C,由梯度 PCR 仪随机生成 12 个梯度,分别为 30.0、30.3、31.5、33.0、34.8、36.6、38.4、40.2、42.0、43.5、44.6、45.0 $^{\circ}$ C。

ISSR 退火温度设置为 45.0~61.5 $^{\circ}$ C,由梯度 PCR 仪随机生成 12 个退火温度。分别为 45.0、45.2、46.1、47.5、49.3、51.4、53.6、55.8、57.8、59.6、60.8、61.5 $^{\circ}$ C。

1.6 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系的验证

利用上述已建立的 ISSR 及 RAPD 反应体系,用 RAPD 随机引物 P99;5'-GTCCTGGGT-3'和 ISSR 引物 GRD205835:5'-(TG)₈G-3',对 24 份蛇莓材料 DNA 进行 PCR 扩增,对已确立的 RAPD 和 ISSR 反应体系进行验证。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响 RAPD-PCR 体系中, Mg^{2+} 浓度在 1.0~2.5 mmol/L(图 1,泳道 1 至 4)

收稿日期:2013-11-06

基金项目:湖南省教育厅项目(编号:10C1029)。

作者简介:张聪子(1987—),男,湖北咸宁人,硕士研究生,从事中药资源研究。

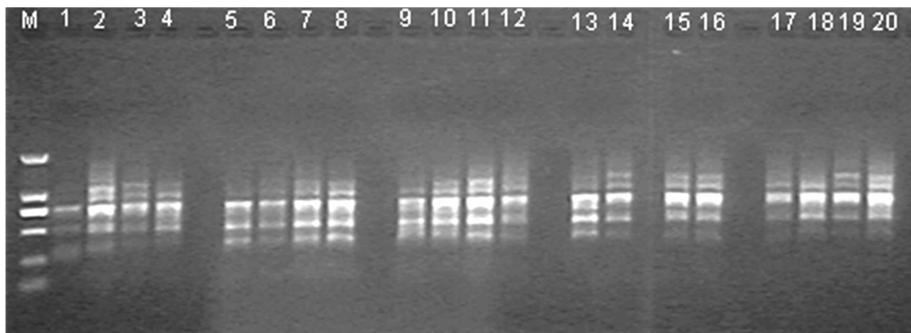
通信作者:童巧珍,博士,副教授,硕士研究生导师,从事中药质量与资源研究。E-mail:qztong88@126.com。

表1 蛇莓 RAPD 和 ISSR-PCR 体系 (20 μL) 优化的因素与水平

编号	因素					E:模板 DNA (ng)
	A: Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	B: dNTPs 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	C: <i>Taq</i> DNA 聚合酶 (U)	D: 引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)		
				RAPD	ISSR	
1	1.0	100	0.25	0.2	0.5	20
2	1.5	150	0.50	0.4	1.0	40
3	2.0	200	1.00	0.6	1.5	60
4	2.5	250	1.50	0.8	2.0	80

表2 蛇莓 RAPD 和 ISSR-PCR 体系 (20 μL) 优化正交试验 $L_{16}(4^5)$ 设计

编号	A: Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	B: dNTPs 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	C: <i>Taq</i> DNA 聚合酶 (U)	D: 引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)		E: 模板 DNA (ng)
				RAPD	ISSR	
1	1.0	100	0.25	0.2	0.5	20
2	1.0	150	0.50	0.4	1.0	40
3	1.0	200	1.00	0.6	1.5	60
4	1.0	250	1.50	0.8	2.0	80
5	1.5	100	1.50	0.4	1.0	60
6	1.5	150	1.00	0.2	0.5	80
7	1.5	200	0.50	0.8	2.0	20
8	1.5	250	0.25	0.6	1.5	40
9	2.0	100	0.50	0.6	1.5	80
10	2.0	150	0.25	0.8	2.0	60
11	2.0	200	1.50	0.2	0.5	40
12	2.0	250	1.00	0.4	1.0	20
13	2.5	100	1.00	0.8	2.0	40
14	2.5	150	1.50	0.6	1.5	20
15	2.5	200	0.25	0.4	1.0	80
16	2.5	250	0.50	0.2	0.5	60



泳道1~4: Mg^{2+} 浓度分别为1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; 5~8: dNTPs浓度分别为100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$; 9~12: *Taq*酶浓度分别为0.25、0.50、1.00、1.50 U; 13~16: 引物浓度分别为RAPD: 0.2、0.4、0.6、0.8 $\mu\text{mol/L}$; ISSR: 0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$; 17~20: DNA浓度分别为20、40、60、80 ng; M: DNA Marker DL2000。图2同

图1 蛇莓RAPD-PCR体系(20 μL)优化单因素试验电泳结果(引物P88)

范围内都可以扩增出条带,在 ISSR-PCR 体系中(图2,泳道1至4), Mg^{2+} 浓度过低时,扩增的条带少而不清晰。

2.1.2 dNTPs 浓度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响 dNTP 是 PCR 反应的原料,浓度过高易产生错配,同时与 *Taq* 酶竞争 Mg^{2+} ,使 *Taq* 酶不能充分发挥聚合活性,导致扩增失败;dNTP 浓度过低时有缺失的带,且条带明显变暗,较为适宜的 dNTP 浓度在 150~250 $\mu\text{mol/L}$ 之间,条带亮而清晰(图1、图2)。

2.1.3 *Taq* 酶浓度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响 *Taq* DNA 聚合酶浓度过高易产生非特异扩增产物的积累,条带背景模糊;浓度过低,酶的催化能力不够则导致合成效率下降,条带

数减少,亮度降低。由图1可见,RAPD-PCR 体系(20 μL)中,*Taq* 酶用量在 0.25 U 时,条带较弱,增加至 0.5~1.50 U 时扩增条带多,清晰明亮;增加至 1.5 U 时条带数减少,背景模糊不清。ISSR-PCR 体系中 *Taq* 酶用量为 1.0 U 时条带最清晰、稳定。因此本试验 *Taq* DNA 聚合酶用量 1.0~1.5 U。

2.1.4 引物浓度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响 引物用量也影响 PCR 扩增效果,当 PCR 引物量太低(如图2,ISSR 泳道13),产物量降低,出现假阴性;引物浓度过高(如图1,RAPD 泳道16)会促进引物错误引导非特异产物合成,还会增加引物二聚体的形成。综合结果表明,引物浓度过低或过高时条

带有缺失和模糊。

2.1.5 模板 DNA 浓度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响

RAPD-RCR 体系(20 μL)中,模板 DNA 量在 20~80 ng(图 1,泳道 17 至 20)之间都可扩增出较为清晰的条带,对扩增结

果无明显影响。在 ISSR-PCR 体系(20 μL)中(图 2),低模板量(20~40 ng,泳道 17-18)扩增效果差,强带变弱,弱带则消失,高模板量(80 ng),扩增效果也不理想,可见 ISSR-PCR 对模板浓度的敏感度比 RAPD 高。

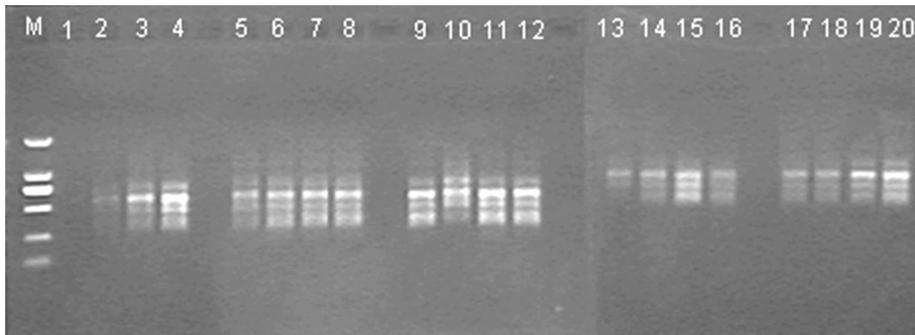


图2 蛇莓ISSR-PCR体系(20 μL)优化单因素试验电泳结果(引物824)

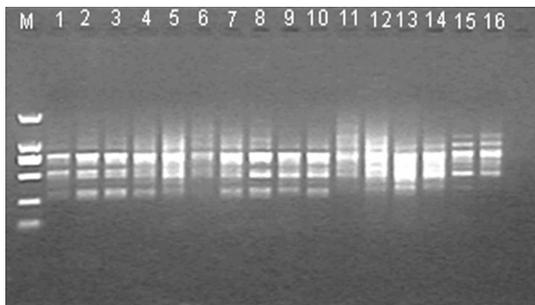
2.2 正交试验

从图 3 可以看出,第 15、16 泳道扩增条带最理想,条带清晰,多态性高,重复性好,基本符合 RAPD 分析的要求。结合单因素试验结果,最后选取 1.5 mmol/L Mg^{2+} 、250 μmol/L dNTPs、1 U *Taq* 酶、0.2 μmol/L 引物、60 ng DNA 模板作为 20 μL 反应体系最佳的优化结果。

通过以上分析,确定蛇莓 RAPD 及 ISSR 反应的最佳体系。RAPD 反应体系(20 μL): Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTPs 250 μmol/L、*Taq* 酶 1 U、引物 0.2 μmol/L、DNA 模板 60 ng; ISSR 反应体系(20 μL): Mg^{2+} 2.0 mmol/L、dNTPs 250 μmol/L、*Taq* 酶 0.5 U、引物 1 μmol/L、DNA 模板 60 ng。

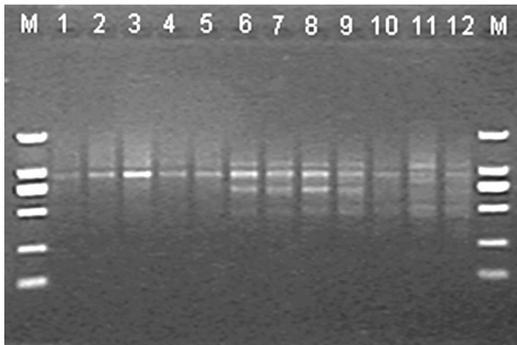
2.3 引物退火温度对 RAPD 及 ISSR 扩增的影响

对 RAPD-PCR 设置的 12 个温度梯度,试验结果(图 5)表明,退火温度为 36.6~42.0 °C(泳道 6 至 8)时,扩增的条带大致相同;温度低于 35 °C 时(泳道 1 至 5),扩增的条带较少;在高温 42~45 °C(泳道 9 至 12)退火时,虽然出现小片段,但部分条带不够稳定,扩增的条带少且较弱。综合考虑本试验结果,使用 37 °C 的退火温度获得的 RAPD 标记条带稳定,多态性合适。



1~16同表2编号; M: DNA Marker DL2000。图4同
图3 蛇莓RAPD-PCR体系(20 μL)优化正交试验电泳

由图 4 可以看出,正交设计的 16 组试验,由于 5 种因素的组合不同,扩增效果存在明显差异:1~4 号组合扩增效果较差,谱带弱,可能是 Mg^{2+} 浓度过低导致;11 和 16 组合扩增的条带清晰、完整、明亮且多态性高,基本符合 ISSR 分析的要求。结合单因素试验结果,最后选取 2.0 mmol/L Mg^{2+} 、250 μmol/L dNTPs、0.5 U *Taq* 酶、1 μmol/L 引物、60 ng DNA 模板作为 20 μL 反应体系最佳的优化结果。



RAPD泳道1~12对应温度为30.0、30.3、31.5、33.0、34.8、36.6、38.4、40.2、42.0、43.5、44.6、45.0 °C;

图5 不同退火温度的RAPD-PCR扩增

退火温度对 ISSR-PCR 的反应体系影响较大(图 6),温度为 45.0~47.5 °C(泳道 1 至 4)时,大片段扩增较模糊;当温度升到 49.3~53.6 °C(泳道 5 至 7)时,扩增效果好,主带清晰;当退火温度高于 55.8 °C(泳道 8 至 12)时,扩增条带逐渐模糊,甚至扩增无条带。根据引物对应参考温度,本试验选用 53 °C 为反应体系的最佳退火温度。

2.4 最佳体系验证

确定退火温度后,采用优化所得的反应体系,用 RAPD 随机引物 P99 和 ISSR 引物 GRD205 835 对 24 份蛇莓材料进行

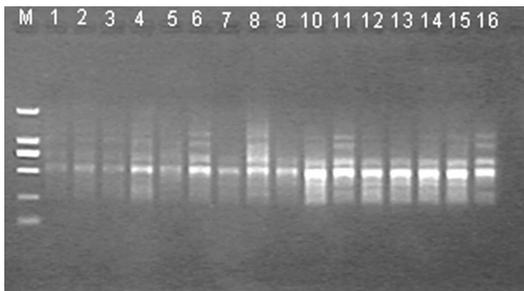
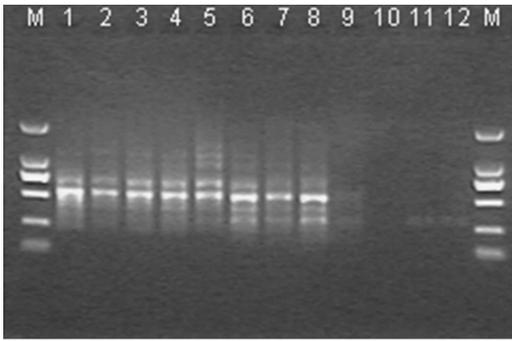


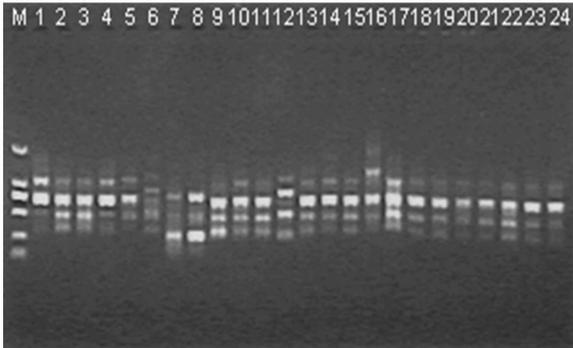
图4 蛇莓ISSR-PCR体系优化正交试验电泳



M: DNA ISSR泳道1~12对应温度为45.0、45.2、46.1、47.5、49.3、51.4、53.6、55.8、57.8、59.6、60.8、61.5°C;
M: DNA Marker DL 2000

图6 不同退火温度的ISSR-PCR扩增

PCR 扩增。图7、图8结果表明,优化所得的最佳反应体系在24个蛇莓样本中均能扩增出稳定、丰富、清晰可辨、多态性强的DNA条带,表明所优化的扩增体系稳定可靠,适合蛇莓种质资源的ISSR及RAPD分子标记的分析。



1~24分别为邵阳隆回1号、邵阳隆回2号、邵阳隆回3号、邵阳隆回4号、邵东、常德1号、常德2号、常德澧县、大围山1号、大围山2号、平江冬塔、平江幕阜山、平江石浆、平江石浆阜西、衡山、永顺西岐、浏阳周洛、株洲、娄底、长沙植物园、长沙市含浦1号、长沙市含浦2号、长沙望城、长沙县;
M: DNA Marker DL2000。图8同

图7 引物P99对24组蛇莓样本的RAPD电泳结果

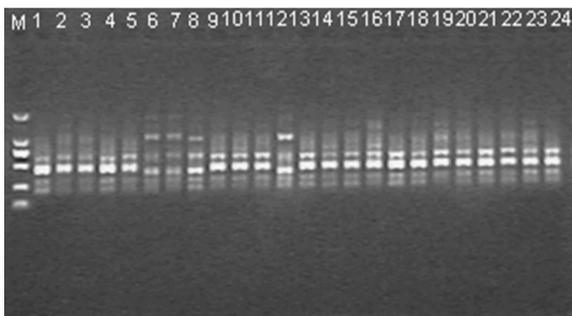


图8 引物GRD205 835对24组蛇莓样本的ISSR电泳结果

3 讨论

当前,仅有姚旭丽等采用单因素试验对蛇莓ISSR-PCR反应体系的主要反应因子进行了优化^[5],但尚未开展ISSR和

RAPD分子标记对蛇莓种质资源的研究,由于该方法并没有考察因素间的相互作用,物种不同反应体系条件也有较大的变化^[6]。本试验选择单因素结合正交试验设计对影响蛇莓RAPD和ISSR反应体系的各个因子进行优化,期望得到最佳的PCR反应体系。

PCR对模板DNA浓度、*Taq* DNA聚合酶要求不高,一般来说,只要提供足够的模板量($<1\ 000\ \text{ng}$), $1.0\sim 1.5\ \text{U}$ ($20\ \mu\text{L}$ 体系)都会得到稳定的条带;但二者浓度过高不仅浪费还会导致非特异性扩增产物积累^[7]。

PCR反应条件中影响最大的是 Mg^{2+} 、dNTPs与引物的浓度^[7],在RAPD-PCR各因素浓度水平相互作用中,高 Mg^{2+} 、低dNTPs浓度,以及低 Mg^{2+} 、高dNTPs浓度条件不能扩增出条带或产生极弱的条带,因为dNTPs过早被消耗完,使产物单链化,甚至得不到产物;而过量的dNTPs对 Mg^{2+} 的螯合作用明显,从而降低了依赖于 Mg^{2+} 的*Taq* DNA聚合酶的活性,也不能扩增出条带^[8-10];而在ISSR-PCR中, Mg^{2+} 浓度太低时,不管引物和dNTPs浓度如何,均不能成功扩增,表明了 Mg^{2+} 在扩增中的重要性。

碱基长度决定了引物的退火温度,RAPD中随机引物大多为10个碱基,退火温度一般为 $36\ ^\circ\text{C}$,过低会导致引物与模板非特异性结合,引起扩增的特异性下降^[11-12];但过高,如大于 $40\ ^\circ\text{C}$ 时会抑制反应,导致无片段。ISSR引物大多数为15~20个碱基长度,比随机引物多,适合较高的退火温度,并且能提高ISSR-PCR反应的特异性及精确度。

参考文献:

- [1]江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:211.
- [2]彭江南,陆蕴如,陈德昌. 蛇莓化学成分的研究[J]. 中草药,1995,26(7):339-341.
- [3]刘婷. 芥菜种质资源遗传多样性的RAPD和ISSR分析[D]. 重庆:西南大学,2009.
- [4]邢志兵. 百里香属7种植物遗传多样性的RAPD和ISSR分析[D]. 内蒙:内蒙古师范大学,2009.
- [5]姚旭丽,李钧敏,郭婷,等. 蛇莓ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2009(2):55-56.
- [6]闫林,黄丽芳,郭婷,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.
- [7]Sambrook J, Russell D W. 分子克隆[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002:596-620.
- [8]杨金华,秦瑞云,付庆云,等. 菠菜ISSR-PCR体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):36-38.
- [9]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.
- [10]张鲁刚,王鸣,陈杭,等. 白菜RAPD反应条件的优化[J]. 西北农业大学学报,2000,28(2):1-7.
- [11]李盛清,张传博,乙引,等. 石斛ISSR-PCR体系的优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):37-39.
- [12]宋贤勇,柳李旺,龚义勤,等. 萝卜基因组DNA RAPD与ISSR-PCR反应体系优化[J]. 种子,2007(2):1-5.