

郑舒文,田有亮,白玉娥,等. 沙地云杉 ISSR-PCR 反应体系的初步优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):48-50.

# 沙地云杉 ISSR-PCR 反应体系的初步优化

郑舒文, 田有亮, 白玉娥, 何炎红

(内蒙古农业大学林学院, 呼和浩特 010019)

**摘要:**以沙地云杉叶基因组 DNA 为材料,采用单因素试验方法对 ISSR-PCR 体系中的主要成分  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物浓度、退火温度进行筛选,建立并优化沙地 ISSR-PCR 反应体系。结果表明,UBC835 是最适引物,适宜退火温度为 50 ℃。沙地云杉 ISSR-PCR 分析的最适反应体系(20 μL PCR 反应体系)为:2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、1.0 U/μL *Taq* DNA 聚合酶、0.25 mmol/L dNTPs、0.25 μmol/L 引物、50 ng/μL 模板 DNA。PCR 扩增程序:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 45 s,50 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 2 min,40 个循环;72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。

**关键词:**沙地云杉;叶基因组 DNA;ISSR-PCR;优化

**中图分类号:** S791.180.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0048-03

沙地云杉(*Picea mongolica*)是中国稀有珍贵树种,集中成片地分布在生态环境恶劣的内蒙古自治区以克什克腾旗的白音敖包自然保护区,形成了罕见的沙地森林。沙地云杉具有耐旱抗寒、防风阻沙、调节气候等特点,并且生存年代久远,所以被称为沙漠上的“绿宝石”和“生物活化石”<sup>[1]</sup>。自引种到辽宁、北京、呼和浩特成功之后<sup>[2]</sup>,沙地云杉不再是内蒙古草原的特有树种。目前,沙地云杉的研究仍停滞在生态学水平,对其遗传多样性的研究尚未见报道。

简单重复序列间区标记技术(inter-simple sequence repeat,ISSR)是由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等于

1994 年发展起来的一种微卫星的分子标记<sup>[3]</sup>。ISSR 标记呈孟德尔式遗传,大部分 ISSR 标记为显性标记。它结合了 SSR 和 RAPD 的优点<sup>[4]</sup>,具有模板 DNA 用量少、质量要求低,扩增产物特异性强,重复性高,试验操作简便,费用较低等特点,又比 RFLP、RAPD、SSR 能更多地提供遗传信息,已被广泛应用于品种鉴定、遗传多样性、系统进化关系、遗传作图、基因定位、标记辅助选择<sup>[5]</sup>等研究,通过遗传多样性手段对沙地云杉作进一步研究。本试验以沙地云杉叶基因组为模板 DNA,分析引物、dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶浓度、退火温度对 ISSR-PCR 扩增的影响,建立适合沙地云杉 ISSR-PCR 的反应体系,为研究沙地云杉的系统进化、物种鉴定和种间杂交育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 试验材料来自内蒙古浑善达克沙地,种子于

收稿日期:2013-11-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160166);内蒙古农业大学创新团队项目。

作者简介:郑舒文(1990—),女,辽宁本溪人,硕士研究生,主要从事森林培育理论与技术的研究。

通信作者:何炎红。E-mail:hyh20012008@imau.edu.cn。

[12]谷祝平,徐涛. 树兰原球茎增殖中体细胞胚发生的研究[J]. 兰州大学学报,1990,28(1):76-79.

[13]Pereira O L, Silva M. Two new hosts, *Epidendrum secundum* and *Epidendrum xanthinum*, for the orchid rust *Sphenospora kevorkianii* (Raveneliaceae) in Brazil[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2009,4(1):62-63.

[14]Hossain M M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae)[J]. African Journal of Biotechnology, 2008,7(20):3614-3619.

[15]Lawrence W Z, Poulter S B, McDonald K I. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus[J]. Hort Science, 2007,42(1):135-139.

[16]Christenson E A. A new orchid from Saül, French Guiana; *Epidendrum oldemanii*[J]. Brittonia, 1994,46(1):54-56.

[17]Chen L R, Chen J T, Chang W C. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2002,38(5):441-445.

[18]魏琪,李凤兰,胡国富,等. 蝴蝶兰快速繁殖研究进展[J]. 园

艺学报,2006,33(4):915-920.

[19]曾宋君,陈之林,吴坤林,等. 兜兰无菌播种和组织培养研究进展[J]. 园艺学报,2007,34(3):793-796.

[20]顾德峰,赵春莉,宋彦君,等. 蝴蝶兰无性快繁规模化生产的研究[J]. 园艺学报,2007,34(1):193-196.

[21]范成明,李枝林,何月秋. 兰花组织培养及分子生物学研究进展[J]. 园艺学报,2003,30(4):487-491.

[22]张志胜,欧秀娟. 墨兰的组织培养[J]. 园艺学报,1995,22(3):303-304.

[23]崔广荣,侯喜林,张子学,等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察[J]. 园艺学报,2007,34(2):431-436.

[24]项艳,於凤安,彭镇华. 墨兰离体快繁研究[J]. 林业科学研究,2003,16(4):434-438.

[25]崔广荣,刘云兵,张俊长,等. 文心兰组织培养的研究[J]. 园艺学报,2004,31(2):253-255.

[26]李军,柴向华,曾宝瑞,等. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术[J]. 园艺学报,2004,31(3):413-414.

[27]梁巧明,刘运权,叶庆生,等. 4 种废料基质对蝴蝶兰和石斛兰生长作用初探[J]. 园艺学报,2006,33(4):890.

40 ℃ 烘箱中烘干后取出,浸于 75% 甲醇中一段时间,然后放在培养箱中培养。将长出的嫩叶放入 - 80 ℃ 保存,以备取用。

1.1.2 试剂 提取基因组 DNA:CTAB 提取液, $\beta$ - 巯基乙醇,1× TE 缓冲液。引物参照哥伦比亚大学 (University of British Columbia,UBC) 公布的 ISSR 引物序列,由北京华大基因有限公司合成。本试验反应体系优化试验固定引物 UBC 835 的序列为:AGAGAGAGAGAGAGC。用于 ISSR - PCR 的试剂:dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、10× PCR buffer、DNA Marker (DL2000) 购自天根 (TIANGEN) 生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 本试验采用 CTAB 法提取沙地云杉基因组 DNA。

1.2.2 DNA 浓度及纯度检测 用紫外分光光度计测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度,检测其浓度和纯度。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量并进行 PCR 扩增,最后稀释至 50 ng/ $\mu$ L 保存在 - 20 ℃ 中备用。

1.2.3 PCR 单因素试验 单因素试验是其他因子保持不变,其中 1 个因子按照一定浓度梯度变化,从而筛选出各因子适合继续优化的最适浓度。本试验是为了筛选出适合于沙地云杉 ISSR - PCR 反应体系的各因素最佳浓度。不同因素浓度水平见表 1。

表 1 ISSR - PCR 反应体系中不同因素浓度梯度

因素	不同因素浓度梯度 (20 $\mu$ L 体系)
引物浓度 ( $\mu$ mol/L)	0.15、0.20、0.25、0.30
$Mg^{2+}$ (mmol/L)	1.0、1.5、2.0、2.5
<i>Taq</i> 酶 (U/ $\mu$ L)	0.50、1.00、1.50、2.00
dNTPs (mmol/L)	0.15、0.20、0.25、0.30

1.2.4 PCR 反应条件 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 45 s,UBC 835 的退火温度是 50 ℃,退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,40 个循环,72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存备用。

1.2.5 扩增产物检测 1.2% 的琼脂糖凝胶在 0.5× TBE 缓冲液中电泳检测,用 UVP 凝胶成像系统照相保存。

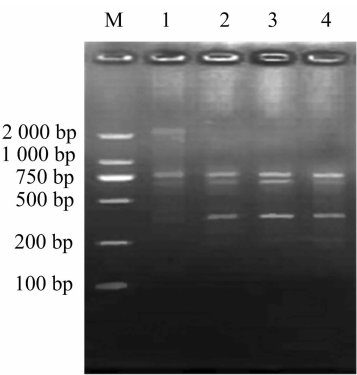
2 结果与分析

2.1 引物浓度的优化

引物浓度是影响 PCR 结果的重要变量之一。浓度过低阻碍引物与模板 DNA 的结合,不能产生有效扩增条带。浓度过高会引起非特异性扩增产物和引物二聚体等的形成<sup>[6]</sup>,使目的 DNA 片段扩增量下降,条带不清晰。由图 1 可见,浓度为 0.15  $\mu$ mol/L 时,扩增条带较弱,不清晰;0.20、0.30  $\mu$ mol/L 条带比 0.15  $\mu$ mol/L 清晰,但有弥散现象,不是很稳定,所以 20  $\mu$ L 反应体积中确定条带稳定的 0.25  $\mu$ mol/L 为最适引物浓度。

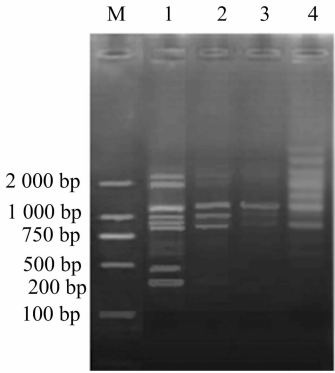
2.2  $Mg^{2+}$  浓度的优化

$Mg^{2+}$  浓度对 PCR 扩增的特异性和产物有显著的影响, $Mg^{2+}$  作为 *Taq* DNA 聚合酶的依赖性因子,不仅影响 *Taq* 酶的活性,反应体系中的 dNTPs、模板 DNA 及引物都会与  $Mg^{2+}$  结合<sup>[7]</sup>。 $Mg^{2+}$  浓度过高反应特异性降低,出现非特异扩增;浓度过低会降低 *Taq* DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。由图 2 可知,4 个  $Mg^{2+}$  浓度,即 2.0、1.0、1.5、2.5 mmol/L 条件



1、2、3、4 分别表示 0.15、0.20、0.25、0.30  $\mu$ mol/L

图 1 不同引物浓度的 ISSR - PCR 电泳图谱



1、2、3、4 分别表示 2.0、1.0、1.5、2.5 mmol/L

图 2 不同  $Mg^{2+}$  浓度的 ISSR - PCR 电泳图谱

下均有扩增产物,但是  $Mg^{2+}$  浓度在 1.0、1.5 mmol/L 时,条带较少;浓度在 2.5 mmol/L 时出现非特异性扩增,浓度在 2.0 mmol/L 时条带清晰,稳定性高。所以  $Mg^{2+}$  用量为 2.0 mmol/L 是最佳浓度。

2.3 *Taq* DNA 聚合酶的优化

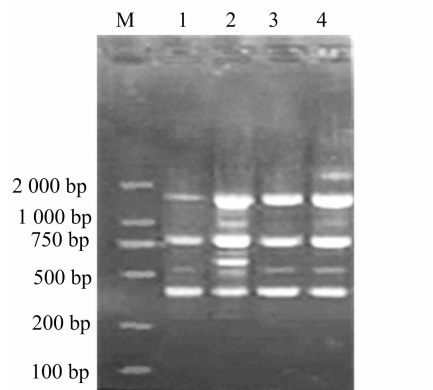
*Taq* DNA 聚合酶的用量是影响扩增的重要因素,浓度过低会使酶过早地消耗完造成合成效率下降,浓度过高容易产生非特异性扩增且增加成本。从图 3 可见,不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度从 0.5、1.0、1.5、2.0 U/ $\mu$ L 均有扩增产物,浓度在 0.5 U/ $\mu$ L 条带相对较弱,1.0、1.5、2.0 U/ $\mu$ L 时扩增出的条带无显著差异,考虑稳定性和成本,而且 1.5 U/ $\mu$ L 的条带亮度高和稳定性强。最终确定 *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 U/ $\mu$ L。

2.4 dNTPs 浓度的优化

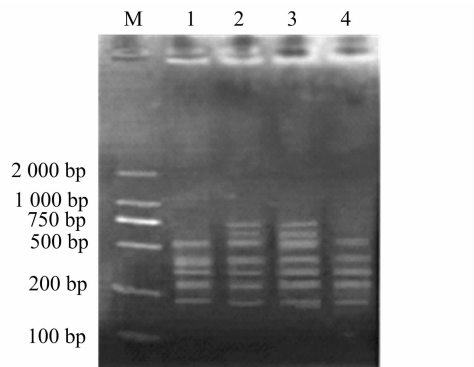
dNTPs 浓度与 PCR 扩增效率有密切关系,dNTPs 能与  $Mg^{2+}$  结合,使游离的  $Mg^{2+}$  浓度降低。浓度高会导致片段缺失,而浓度太低又会导致扩增产率下降<sup>[4]</sup>。从图 4 中可见,dNTPs 浓度为 0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L 均有扩增条带,dNTPs 浓度为 0.15、0.30 mmol/L 时,扩增出的条带较少;在 0.20、0.25 mmol/L 时扩增条带较多,但 0.25 mmol/L 比 0.20 mmol/L 条带清晰。因此确定 dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L。

2.5 退火温度的优化

为了确定引物的最适退火温度,参照所选引物序列计算理论退火温度  $T_m$ , $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ <sup>[8]</sup>。温度低于  $T_m$  值,扩增产物特异性降低,扩增出来的条带较弱;温度过高不利于引物扩增。在本试验中所用引物的  $T_m$  值为 53 ℃,从

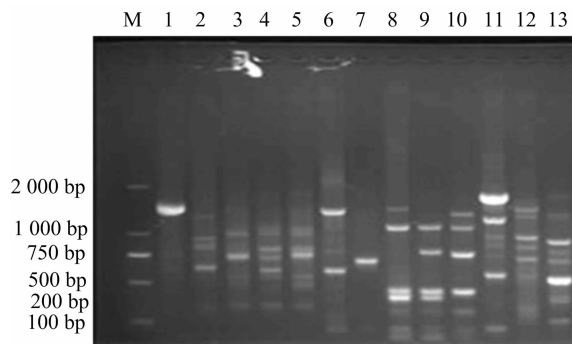


1、2、3、4 分别表示 0.5、1.0、1.5、2.0 U/μL  
图3 不同 *Taq* 酶用量的 ISSR-PCR 电泳图谱



1、2、3、4 分别表示 0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L  
图4 不同 dNTPs 浓度的 ISSR 扩增电泳图谱

41 ~ 53 ℃ 共设定 13 个温度梯度,扩增结果见图 5。41 ~ 47 ℃ 时,条带少且弱。在 48 ~ 53 ℃ 区间,扩增条带数都很多,清晰明亮。最后选择条带清晰稳定的 50 ℃ 作为最佳退火温度。



1~13 表示不同退火温度, 分别对应 41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53 ℃

图5 不同退火温度 ISSR-PCR 反应电泳图谱

### 3 结论与讨论

试验结果表明,通过各个因素的综合对比分析,得出反应体系中 4 个因子的最佳浓度:0.25 μmol/L 引物、2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、1.0 U/μL *Taq* DNA 聚合酶、0.25 mmol/L dNTPs、50 ng/μL 模板 DNA。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 45 s, UBC 835 退火温度是 50 ℃, 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 40 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。

ISSR-PCR 具有高重复性的优点,但其扩增仍受多种因素的影响,如  $Mg^{2+}$  用量、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、退火温度、模板 DNA 等。试验研究发现,模板 DNA 对 ISSR-PCR 扩增的影响不是很大,而 *Taq* DNA 聚合酶和  $Mg^{2+}$  对其有很大的作用。 $Mg^{2+}$  浓度控制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,*Taq* DNA 聚合酶的活性又是 ISSR-PCR 扩增的关键。而 dNTP 是 PCR 反应的原料,浓度过高时容易导致错配,同时 dNTP 会对  $Mg^{2+}$  产生拮抗作用<sup>[9]</sup>,退火温度高低制约扩增条带的分辨率。上述因素相互依赖、相互抑制。为获得重复性好、可靠性高的扩增条带<sup>[10-11]</sup>,本试验采用单因素试验方法来确定各因素的最佳浓度。单因素试验设计可对每个影响因子不同水平进行直观的判断。确定了沙地云杉 ISSR-PCR 各因素的最适浓度,试验结果对沙地云杉进行遗传多样性分析等研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李银科,刘世增,康才周,等. 温度对樟子松和沙地云杉种子萌发特征的影响[J]. 水土保持通报,2011,31(4):73-77.
- [2] 刘瑞芬. 沙地云杉引种实验[J]. 内蒙古林业调查设计,2008,31(6):75-77,80.
- [3] 罗明估,伍贤进,彭 帅,等. 翻白草总 DNA 的提取与 ISSR-PCR 体系的建立与优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(3):895-897,901.
- [4] 桂腾琴,乔爱民,孙 敏,等. 果梅 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 西南大学学报:自然科学版,2007,29(10):124-128.
- [5] 赵 谦,杜 虹,庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 分子植物育种,2007,6(增刊1):123-129.
- [6] 刘 娜,王昌命,普晓兰. 云南松胚乳 DNA 提取与 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 西南林学院学报,2009,29(2):27-30.
- [7] 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.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999:57-58.
- [9] 王 亚,郭志强,王宏伟,等. 单雌蓖麻 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 山西农业科学,2010,38(1):15-18.
- [10] 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.
- [11] 张 蕾,严 萍,韩正洲,等. 两面针 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 广州中医药大学学报,2012,29(1):70-74.