

张娜,李群,高兴旺,等. 葡萄 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交设计优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):47-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.013

葡萄 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交设计优化

张娜,李群,高兴旺,赖晓辉,李佳,丁金鹏

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:建立和优化稳定的葡萄 ISSR-PCR 反应体系,为进一步开展葡萄遗传多样性研究和品种选优提供理论依据。运用改良的 CTAB 法从葡萄嫩叶中提取基因组总 DNA,通过单因素试验分析 dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、DNA 模板用量、*Taq* DNA 聚合酶用量等 5 个因素对葡萄 ISSR-PCR 反应体系扩增结果的影响,并采用正交设计试验方法优化建立葡萄 ISSR-PCR 最佳反应体系。优化的最佳 ISSR-PCR 反应体系(20 μ L)为:10 \times PCR buffer、0.225 mmol/L dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、1.00 μ mol/L 引物、2.75 mmol/L Mg^{2+} 、DNA 模板 30 ng。利用优化的 ISSR-PCR 反应体系能够扩增获得清晰、稳定的 DNA 条带,可用于后续的葡萄种质资源遗传多样性分析。

关键词:葡萄;ISSR-PCR;反应体系;单因素试验;正交设计;优化

中图分类号:S663.103 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0047-04

葡萄属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis* L.)藤本植物,是起源最古老的果树之一,其果实可用于酿酒、鲜食、制汁等,具有重要的经济价值,在世界范围内广泛栽培。由于葡萄的基因组高度杂合,使得其具有丰富的种质资源。种质资源是进行农业生产和创新育种的重要物质保障,也是解决各种病虫害问题有利的“基因武器库”。因此,充分了解葡萄种质资源的遗传信息、分析其种质资源遗传多样性,对有效利用现有的葡萄种质资源以及促进和加快葡萄分子育种进程具有重要意义。目前,分子标记技术已广泛应用于葡萄遗传多样性研究,以期为进一步开展葡萄分子育种奠定了一定的基础。黄远飞利用 RAPD 技术对 53 份葡萄材料进行遗传多样性分析,发现 53 份葡萄材料间具有较高的遗传多样性^[1]。吴子龙等建立了葡萄 SSR 标记和 ISSR 的反应体系,并研究了葡萄种质资源的遗传多样性^[2-3]。张淑静利用 SSR 技术分析了 39

份葡萄品种的遗传多样性,发现这些材料间存在明显的遗传多态性差异^[4]。郭大龙等建立了适用于葡萄的 SRAP 反应体系,为葡萄种质遗传多样性评价、遗传改良等研究提供了基础^[5]。张玉玉等建立了葡萄的目标起始密码子多态性的反应体系,可用于葡萄种质遗传多样性评价^[6]。赖呈纯等也分别建立了适用于葡萄的 ISSR-PCR 反应体系。ISSR 标记技术结合了 SSR 和 RAPD 等 2 种标记技术的优点,但其最关键的步骤是须要针对不同的物种建立相应的 PCR 反应体系^[7-8]。虽然前人已建立了适用于葡萄的 ISSR 技术的 PCR 反应体系,但均未对 Mg^{2+} 这一影响因素进行分析,因此本研究通过优化 ISSR-PCR 反应中的各项参数,建立适用于葡萄 ISSR 技术的最佳反应体系。以新疆葡萄种质资源嫩叶为材料,通过单因素试验和正交设计试验优化葡萄种质资源 ISSR 反应体系,并对 PCR 反应过程中的退火温度进行筛选,为进一步开展葡萄遗传多样性研究和品种选优提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄种质嫩叶采自新疆鄯善县新疆瓜果研究中心葡萄种质资源圃,-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。ISSR 引物序列参考哥伦比亚大学公布的序列,送往华大基因进行合成;所用试剂 dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶(简称 *Taq* 酶)购自宝生物工程(大

收稿日期:2015-08-11

基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项(编号:201130102-1-3)。

作者简介:张娜(1989—),女,新疆奇台人,硕士研究生,主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail:zhangna7887@sina.com。

通信作者:李群,博士,副教授,主要从事植物逆境生理与分子机制研究。E-mail:liqun_007@126.com。

[19] Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 953-971.

[20] Petersen T N, Brunak S, Von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.

[21] Möller S, Croning M D, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. Bioinformatics, 2001, 17(7): 646-653.

[22] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (Web Server

issue): W585-W587.

[23] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1351-1362.

[24] Gascuel O, Steel M. Neighbor-Joining revealed [J]. Molecular Biology & Evolution, 2006, 23(11): 1997-2000.

[25] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: D808-D815.

[26] Miller L H, Su X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden [J]. Cell, 2011, 146(6): 855-858.

连)有限公司,其他药品均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄幼叶基因组 DNA 的提取与检测 采用改良的 CTAB 法提取葡萄幼叶基因组 DNA^[9]。改良的 CTAB 配方为:3% CTAB、100 mmol/L Tris - HCl、20 mmol/L EDTA、2 mmol/L NaCl、4% PVP40、2% β - 巯基乙醇、20 mmol/L 偏重亚硫酸钠;提取步骤参照徐美隆等的方法^[10]进行。取 1.0 μL DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并通过紫外分光光度计检测 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$,从而确定 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 单因素筛选试验 研究 dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物 UBC848[(CA)₈RG]浓度、DNA 模板用量、*Taq* 酶用量 5 个因素对 ISSR - PCR 体系的影响(表 1)。在单因素分析过程中,当对某一个因素进行梯度优化时,其他因素保持不变,得到的最优浓度带入下一个因素的梯度试验,依次进行。扩增程序为:95 ℃预扩增 3 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 90 s,共 40 个循环;最终 72 ℃延伸 10 min^[11]。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后凝胶成像系统拍照保存。

表 1 葡萄 ISSR - PCR 反应体系单因素水平优化变化值

水平	DNA 模板用量 (ng)	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	引物浓度 (μmol/L)	<i>Taq</i> 酶用量 (U)
1	20	0.5	0.05	0.25	0.5
2	40	1.0	0.10	0.50	1.0
3	60	1.5	0.15	0.75	1.5
4	80	2.0	0.20	1.00	2.0
5	100	2.5	0.25	1.25	2.5
6	120	3.0	0.30	1.50	
7	140	3.5	0.35	1.75	

1.2.3 ISSR - PCR 反应体系的正交试验设计 在单因素试验的基础上,对筛选出的 dNTPs 浓度和 Mg^{2+} 浓度等的较优浓度进一步细化,引物浓度和 DNA 模板用量则直接使用单因素筛选的 3 个较适水平。采用 $L_9(3^4)$ 进行正交设计,检测 dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物 UBC848 浓度及 DNA 模板用量对 ISSR - PCR 结果的影响,从中筛选出最佳组合,方案如表 2 所

表 2 ISSR - PCR 反应体系的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

编号	引物浓度 (μmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	DNA 模板用量 (ng)
1	0.75	0.175	1.75	30
2	0.75	0.225	2.25	60
3	0.75	0.275	2.75	90
4	1.00	0.175	2.25	90
5	1.00	0.225	2.75	30
6	1.00	0.275	1.75	60
7	1.25	0.175	2.75	60
8	1.25	0.225	1.75	90
9	1.25	0.275	2.25	30

示,扩增程序与单因素试验结果一致。

1.2.4 ISSR - PCR 反应体系退火温度的优化 利用温度梯度 PCR 扩增仪,对引物 842[(GA)₈YG]设置 11 个温度梯度,即 48.0、48.4、49.3、50.7、52.2、53.8、55.5、57.1、58.6、60.0、60.9 ℃,筛选最佳退火温度。

1.2.5 最佳体系稳定性检测 利用筛选的最佳体系和引物 842 对 24 个不同葡萄品种 DNA 样品进行 PCR 扩增,检测最优体系的稳定性。

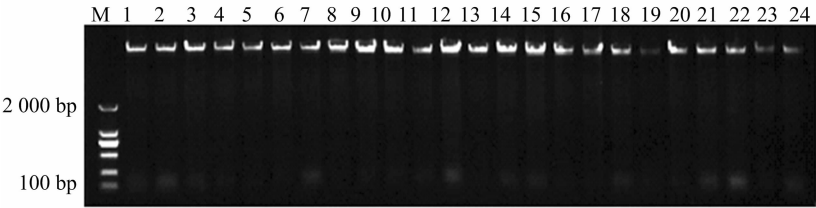
2 结果与分析

2.1 葡萄幼叶基因组 DNA 纯度的检测结果

采用改良的 CTAB 法提取的葡萄幼叶基因组 DNA 无色、透明,经紫外分光光度计检测发现, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.75 ~ 1.88 范围内;琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1)显示,DNA 条带清晰、明亮、整齐、杂质含量低且基本无降解,可用于开展后续试验。

2.2 葡萄 ISSR - PCR 反应体系单因素水平的优化结果

2.2.1 dNTPs 浓度对 ISSR - PCR 反应体系的影响 由图 2 可知,随着 dNTPs 浓度的逐渐增大,扩增的条带数和条带亮度均逐渐增高;当 dNTPs 浓度为 0.05 mmol/L 时,扩增反应不完全,扩增的条带数少且亮度暗;dNTPs 浓度为 0.20 ~ 0.30 mmol/L 时,扩增的条带多且亮度较高,所以初步确定 dNTPs 浓度在 0.20 ~ 0.30 mmol/L 较为合适。

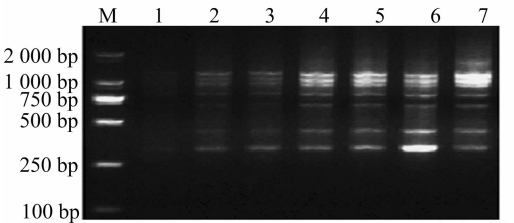


M—DL2000 DNA marker; 1~24—不同葡萄品种DNA

图1 葡萄基因组 DNA 凝胶电泳结果

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR - PCR 反应的影响 从图 3 可以看出, Mg^{2+} 浓度在 0.5 ~ 3.5 mmol/L 范围内增大时,扩增条带明显增多,当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时,扩增条带数达到最高,当 Mg^{2+} 浓度增大至 2.0 ~ 3.5 mmol/L 时,扩增条带数基本不变,但亮度增加。因此,初步确定 Mg^{2+} 浓度在 2.0 ~ 3.0 mmol/L 较为合适。

2.2.3 DNA 模板用量对 ISSR - PCR 反应的影响 不同 DNA 模板用量的扩增结果(图 4)显示,DNA 模板浓度在 20 ~ 120 ng 范围内逐渐增大时,扩增条带数基本不变,但条带



M—DL2000 DNA marker; 1~7—dNTPs 浓度分别为

0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L

图2 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

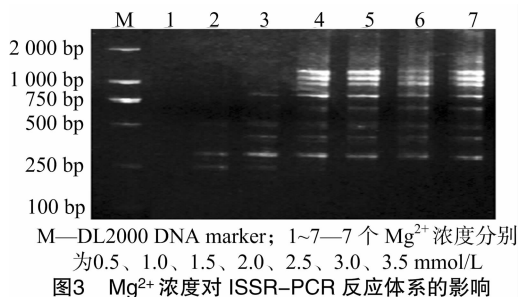
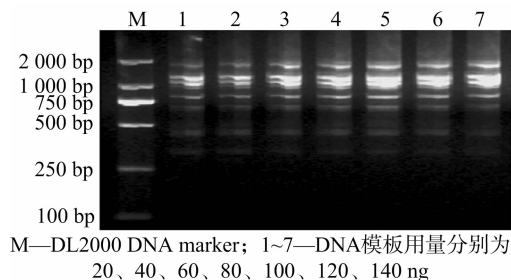
图3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

图4 DNA 模板用量对 ISSR-PCR 反应的影响

亮度有所增加;其中模板浓度在 40 ~ 80 ng 时,条带亮度最佳,继续增至 100 ng 时,条带亮度过高,因此初步确定 DNA 模板浓度在 40 ~ 80 ng 较合适。

2.2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 不同引物浓度扩增结果(图 5)显示,当引物浓度在 0.25 ~ 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 范围内逐渐增大时,PCR 扩增条带的数量增加,亮度也有所增大,当浓度为 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 时条带最多;当引物浓度继续增至 1.75 $\mu\text{mol/L}$ 时,PCR 扩增出的条带数量和亮度变化不明显,因此初步确定引物浓度在 0.75 ~ 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 较合适。

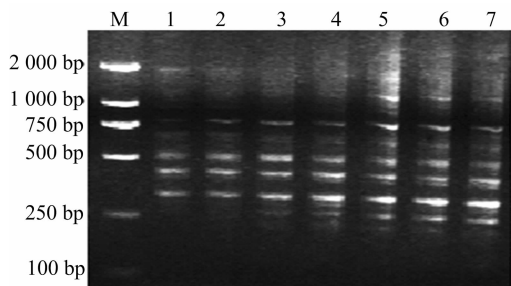


图5 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

2.2.5 *Taq* 酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响 由图 6 可知, *Taq* 酶用量为 0.5 U 时,条带亮度较暗,当 *Taq* 酶用量在 1.0 U 时,PCR 扩增条带亮度明显增大;随着 *Taq* 酶用量的继续增加,PCR 扩增的条带亮度增加不明显,所以最终确定 *Taq* 酶用量为 1 U。

2.3 正交设计试验结果

由图 7 可知,1 号组合片段模糊,2 号、3 号组合小片段未扩增出,4 号、6 号、7 号、8 号、9 号组合大片段扩增结果较模糊,只有 5 号组合条带亮度均匀且稳定。综合考虑条带亮度及丰富度,最终确定 5 号组合为最佳的 ISSR-PCR 反应体系组合,即每 20 μL 的反应体系中含有 10 \times PCR buffer (Mg^{2+} free)、dNTPs 0.225 mmol/L、*Taq* 酶 1.0 U、引物 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 2.75 mmol/L、DNA 模板 30 ng。

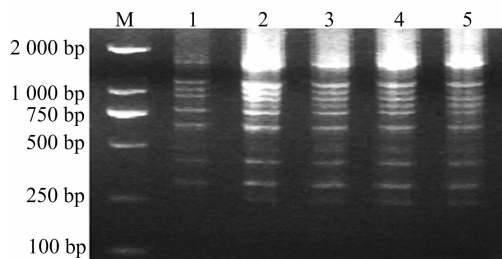
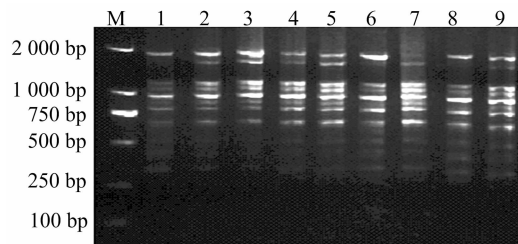
图6 *Taq* 酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响

图7 正交试验设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增结果

2.4 最适退火温度的确定

引物 842 不同退火温度的扩增结果(图 8)显示,当退火温度较低时,ISSR-PCR 扩增的条带模糊,说明扩增的特异性较差;当退火温度较高时,扩增出大片段但条带模糊,说明扩增效率不高;退火温度为 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增条带数较多且条带清晰。因此,确定 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 为引物 842 的最佳退火温度。

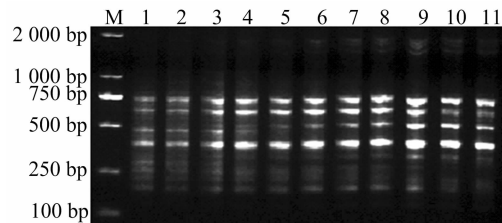


图8 ISSR-PCR 反应体系中不同退火温度的扩增结果

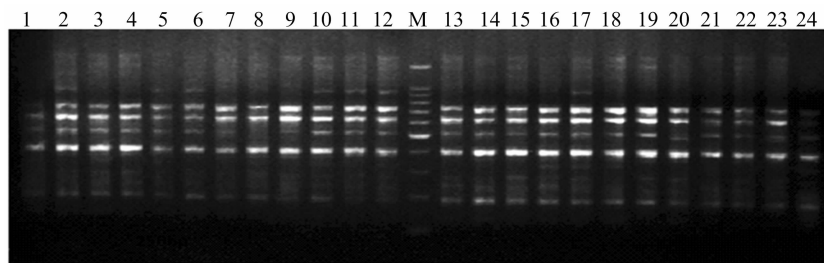
2.5 优化 ISSR-PCR 反应体系稳定性检测结果

以 24 个葡萄品种为材料,检测正交试验设计中组合 5 的 PCR 反应体系的稳定性,结果(图 9)显示,所有品种均能得到较为清晰整齐的条带。说明该正交组合可用于不同葡萄品种中扩增出较好的条带,适用于葡萄的 ISSR 分析。

3 结论与讨论

ISSR 技术是基于 PCR 的一种分子标记,其扩增反应常受引物浓度、DNA 模板用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度及 *Taq* 酶用量等多种因素的影响,此外,反应体系还受退火温度的影响^[12]。因此,本研究针对这些影响因子进行优化设计,并建立葡萄 ISSR-PCR 反应体系,结果表明,引物浓度、DNA 模板用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度及 *Taq* 酶用量对 PCR 扩增反应结果均有不同程度的影响,并筛选出 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 为引物 842 的最佳退火温度。

目前,已有不少研究者建立了适用于葡萄的 ISSR-PCR



M—100 bp DNA Ladder; 1~24—不同葡萄品种

图9 不同葡萄品种扩增结果

反应体系,但均未对 Mg^{2+} 浓度这一影响因素进行分析。通过本研究结果可以看出, Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响较明显,可能是因为 *Taq* 酶需 Mg^{2+} 激活,同时引物与模板的双链杂交体的解链也受二价阳离子的影响^[13]。最终确定 Mg^{2+} 浓度为 2.75 mmol/L,与茶树^[14]、杨树^[15]、枇杷^[16]等物种的最适 Mg^{2+} 浓度接近。

DNA 模板的质量是保证 ISSR-PCR 扩增的重要因素之一,最佳的模板浓度范围取决于研究物种和模板纯度。在 DNA 模板不纯的情况下,宁可使用有效浓度范围内的最低限度,使抑制 *Taq* 酶活性的影响降到最低^[14]。宣继萍等确定苹果 ISSR 反应体系中 DNA 模板用量为 20 ng^[17],刘晓静等确定益智 ISSR 反应体系中 DNA 模板用量为 100 ng^[18],代培红等确定葡萄 ISSR 反应体系中 DNA 模板用量为 30 ng^[8],可见不同物种研究须确定不同的 ISSR-PCR 模板用量。本研究确定 DNA 模板用量为 30 ng,与代培红等的研究结果^[8]一致。

在其他条件不变的情况下,当引物浓度过高时,引物结合模板的效率增高,进而导致大量的非特异性扩增,同时引物本身也容易形成二聚体,导致部分 dNTPs 和 *Taq* 酶被消耗,从而降低模板的扩增效率;当引物浓度过低时,引物与模板不能有效结合,则导致不能有效检测出所有的相应位点,使得多态性降低^[19]。本研究确定引物浓度为 1.00 μ mol/L,高于赖呈纯等对葡萄种质资源 ISSR 体系的研究结果^[7-8],这可能与试验材料、条件不同有关。

已有研究发现,dNTPs 浓度会显著影响 PCR 扩增效率,浓度过高,会造成错误渗入;浓度过低,则会影响扩增产率^[16]。在罗汉果^[12]、龙眼^[20]等物种中确定的最适 dNTPs 浓度为 0.1 ~ 0.8 mmol/L,本研究确定的 dNTPs 浓度为 0.225 mmol/L,在上述研究范围之内,且浓度更精确。

酶的用量也直接关系到试验结果,量多不仅会增加试验成本,还容易产生非特异性扩增产物;量少则会使酶过早地消耗,产物合成效率低^[18]。本研究最终确定 *Taq* 酶用量为 1.0 U,与周俊亚等的研究结果^[12,21]一致。

本研究表明,不同的反应体系扩增的 ISSR 结果有一定的差异,PCR 反应体系的质量直接影响后续 ISSR-PCR 的准确性。在体系研究过程中,一方面要保证体系的完整性,另一方面又要考虑到试验成本问题,须在二者之间找到一个平衡点,因此本研究在单因素试验找出各因素较合适的浓度范围的基础上进行正交设计分析,最终确定最佳的反应体系,且建立的葡萄 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,可为后续的葡萄种质资源分析、品种鉴定、遗传多样性分析、分子育种等方面的研究提供参考。利用正交设计优化得到的 ISSR-PCR 反应体系可在一系列的葡萄品种中扩增获得清晰、稳定的 DNA

条带,可用于后续的葡萄种质资源遗传多样性分析。

参考文献:

- [1] 黄远飞. 葡萄种质资源 RAPD 分析及亲缘关系研究[D]. 长沙: 湖南农业大学,2005.
- [2] 吴子龙,方连玉,王 军,等. 15 份葡萄种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 果树学报,2006,23(4):605-608.
- [3] 吴子龙,王 军,沈育杰,等. 山葡萄种内遗传多样性的 SSR 分析[J]. 果树学报,2008,25(6):821-827.
- [4] 张淑静. 葡萄 SSR 反应体系的建立及遗传多样性分析[D]. 保定:河北农业大学,2008.
- [5] 郭大龙,张君玉,刘崇怀. 葡萄 SRAP 反应体系优化及引物筛选[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(2):379-384.
- [6] 张君玉,郭大龙,龚 莹,等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化[J]. 果树学报,2011,28(2):209-214.
- [7] 赖呈纯,范丽华,谢鸿根,等. 葡萄 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通报,2012(2):159-164.
- [8] 代培红,朱 瑜,姚正培,等. 葡萄种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 南方农业学报,2013,44(8):1258-1262.
- [9] 田淑芬,李树海,高 杨,等. 玫瑰香葡萄不同时期叶片提取 DNA 纯度的比较[J]. 天津农业科学,2003,9(2):5-7.
- [10] 徐美隆,章 雨,倪细炉. 一种高质量葡萄基因组 DNA 提取方法[J]. 北方园艺,2011(15):172-174.
- [11] 王果平,樊丛照,李晓瑾,等. 新疆贝母 DNA 提取及 ISSR-PCR 体系的建立与优化[J]. 种子,2012,31(8):27-30,35.
- [12] 周俊亚,宾晓芸,彭云滔,等. 罗汉果 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2004,22(3):81-84.
- [13] 贺 佳,丁小余,褚必海,等. 泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 南京师大学报:自然科学版,2006,29(3):86-90.
- [14] 姚明哲,王新超,陈 亮,等. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 茶叶科学,2004,24(3):172-176,206.
- [15] 汪结明,项 艳,吴大强,等. 杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J]. 核农学报,2007,21(5):470-473,513.
- [16] 付 燕,罗 楠,杨 琴,等. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 果树学报,2009,26(2):180-185.
- [17] 宣继萍,章 镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):549-550.
- [18] 刘晓静,王文泉,郭凌飞. 益智 ISSR-PCR 反应体系建立与优化[J]. 生物技术,2008,18(3):33-37.
- [19] 隋晓青,王 堃. 克氏针茅 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草业学报,2008,17(3):71-78.
- [20] 曾黎辉,洪自同,许家辉,等. 龙眼 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 中国农学通报,2007,23(9):111-114.
- [21] 赵丽华. 石榴 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化[J]. 北方园艺,2010(19):148-152.