

张晓波, 翟晓朦, 许沛东, 等. 野牛草 ISSR-PCR 反应体系的优化与建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 33-35.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.009

# 野牛草 ISSR-PCR 反应体系的优化与建立

张晓波<sup>1,2</sup>, 翟晓朦<sup>3</sup>, 许沛东<sup>3</sup>, 赵 艳<sup>3</sup>

(1. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学, 海南海口 570228;

2. 海南大学旅游学院, 海南海口 570228; 3. 海南大学农学院, 海南海口 570228)

**摘要:**根据正交试验设计原理探索野牛草 [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] ISSR-PCR 反应体系中各主要成分的最优化用量, 对影响野牛草 ISSR-PCR 反应体系的主要因素 [dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物 (Primers)、 $Mg^{2+}$  的用量] 进行优化, 获得野牛草的 ISSR-PCR 最适反应体系为 20  $\mu$ L 的反应体系, 包括引物 (2.0  $\mu$ mol/L) 4.0  $\mu$ L、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L、 $MgCl_2$  (25 mmol/L) 1.6  $\mu$ L、dNTP (2 mmol/L) 2.0  $\mu$ L 和模板 DNA (20 ng/ $\mu$ L) 3.0  $\mu$ L。该优化体系的建立为利用 ISSR 分子标记进行野牛草种质资源遗传多样性研究、种质资源鉴定等奠定了基础。

**关键词:**野牛草; ISSR-PCR; 反应体系; 正交优化

**中图分类号:**S688.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)03-0033-03

野牛草 [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] 为禾本科 (Gramineae) 画眉草亚科 (Eragrostoideae) 野牛草属 (*Buchloe*) 多年生草本植物, 由于植株低矮、易繁殖、蔓延快且具有极强的抗旱性, 是国内外公认的典型环保型草坪草, 广泛用于园林、庭院、运动场和固土护坡的优良暖季型草坪<sup>[1]</sup>。目前, 关于野牛草的形态特性<sup>[2]</sup>、坪用性状<sup>[3]</sup>、引种繁殖<sup>[4]</sup>、生态功能<sup>[5]</sup>、抗逆性<sup>[6-10]</sup>等方面研究较多, 而对于野牛草种质资源

遗传多样性评价、鉴定等分子水平方面研究报道较少。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 是在微卫星标记 (simple sequence repeat, SSR) 基础上发展起来的分子标记, 具有揭示的多态性高、精确度高、检测方便的优点<sup>[11]</sup>。目前, 广泛应用于植物品种鉴定、保护、遗传多样性、进化及其他分子水平的研究中, 如在紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、高羊茅 (*Festuca ovina*)、冰草 [*Agropyron crstatum* (L.) Gaertn.]、黑麦草 (*Secale cereale* L.) 等牧草及草坪草的研究中 ISSR 分子标记得到了广泛应用<sup>[12]</sup>。

尽管 ISSR 具有许多优点, 但由于其本质还是基于 PCR 反应的一种分子标记, 不同类型植物的 PCR 反应体系会具有一定的差异, 所以为了 ISSR 分析结果的可靠性及可重复性, 在进行遗传多样性分析等研究之前预先对 PCR 反应体系进

收稿日期: 2015-10-06

基金项目: 海南大学青年基金 (编号: qnjj1149)。

作者简介: 张晓波 (1978—), 男, 山西岢岚人, 博士研究生, 副教授, 从事草坪管理相关研究, E-mail: angiaao@126.com。

通信作者: 赵 艳。E-mail: yanbo315@126.com。

表 4 不同部位 RNA 的浓度和纯度

样品	浓度 (ng/ $\mu$ L)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
叶片	193	1.99	2.00
茎	213	2.08	2.11
根	185	2.16	2.03
花	258	1.89	1.98

## 3 讨论

组织的破碎程度、RNase 的活性、多糖和蛋白质等大分子物质的存在<sup>[4]</sup>都会影响 RNA 提取的质量。TRIzol 试剂盒法比较简单方便, 耗时也较短, 但是可能由于步骤比较简单, 对杂质的去除不够彻底<sup>[5-6]</sup>。改良后的 TRIzol, 加了苯酚, 能更好去除蛋白质、多酚、多糖等物质, 通过电泳图、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值可知, 浓度和纯度也较高, 符合转录组、基因克隆等高通量试验的要求。5S 条带缺失或不清晰是 CTAB 法提取 RNA 的不足之处, 此方法提取的 RNA 不能用于小 RNA 的分析。LiCl 本身沉淀大片 RNA 效果好的特点使得到的 RNA 大片损失很少, 更适于进行后续分子生物学试验; 而异丙醇沉淀获得的沉淀

体积大, 导致多糖和酚类物质的共沉淀作用, 因而 CTAB-LiCl 比 CTAB-异丙醇更适合青蒿 RNA 的提取。因此, 青蒿不同部位 RNA 用 TRIzol 法提取的比用 CTAB 法质量更好, 条带清晰、完整, 且 TRIzol 法比 CTAB 法用时更短, 效率更高。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [2] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. Meth Enzymol, 1974, 31(A): 528-545.
- [3] 张秋红, 朱子徽, 李 晋, 等. 中药青蒿化学成分与种植研究现状[J]. 中国医药导报, 2011, 8(19): 10-12.
- [4] Sambrook, J, Fritschi E F, et al. Molecular cloning: a laboratory manuals[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 343-361.
- [5] 赖 茜, 余迪求. 4 种榕树总 RNA 提取方法的比较[J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2008, 30(6): 636-640.
- [6] 印 华, 周兆德, 吴志祥. 2 种荔枝 RNA 提取方法的比较[J]. 热带农业工程, 2009, 33(2): 1-4.

行优化非常重要。本研究利用正交设计原理对影响野牛草 ISSR 反应的主要因素[包括引物(Primer)、*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTP 的用量]设计 4 因素 3 水平正交试验筛选最优反应体系;可为野牛草种质资源遗传多样性评价、种源鉴定及明确亲缘关系以及其他方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料来源

本试验材料为中坪 1 号野牛草种子剥去颖壳后经水培生长到约 10 cm 的幼嫩植株,采用改良 CTAB 法提取水培植株基因组 DNA,并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量及完整性,然后用紫外分光光度计法测定其浓度,根据检测浓度将其稀释为 20 ng/ $\mu$ L 后备用。

1.2 野牛草 ISSR - PCR 反应体系的正交优化

本试验正交设计针对影响野牛草 ISSR - PCR 反应的 4 个主要因素引物、*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$  及 dNTP 的用量,利用正交设计助手 3.1 绿色版设计  $L_9(3^4)$  正交试验进行 4 因素 3 水平筛选最优反应体系,具体正交设计见表 1、表 2。制备总体积为 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系,除各变化因素外,每反应管中还含有 Reaction Buffer( $\times 10$ )2.0  $\mu$ L 以及稀释浓度为 20 ng/ $\mu$ L 的野牛草模板 DNA 2.0  $\mu$ L,不足 20  $\mu$ L 部分用 ddH<sub>2</sub>O 补足,引物随机选用 UBC808(序列为 AGA、GAG、AGA、GAG、AGA、GC)。ISSR - PCR 反应在 Biometra Personal Thermal Cycler 上进行;扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,然后 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,40 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。反应完成后在扩增产物中加入 4  $\mu$ L 上样缓冲液,使用 1  $\times$  TBE 缓冲液,用含有 0.5 g/L 溴化乙锭(EB)的 1.8% 琼脂糖凝胶进行电泳(5 V/cm),电泳结束后用凝胶成像系统拍照。

表 1 野牛草 ISSR - PCR 正交试验水平 - 因素设计

水平	用量( $\mu$ L)			
	$MgCl_2$ (25 mmol/L)	dNTP (2 mmol/L)	引物 (2.0 $\mu$ mol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L)
1	1.4	1.0	2.0	1.0
2	1.6	1.5	4.0	0.2
3	1.8	2.0	6.0	0.3

表 2 野牛草 ISSR - PCR  $L_9(3^4)$  正交试验设计

处理 编号	用量( $\mu$ L)			
	$MgCl_2$ (25 mmol/L)	dNTP (2 mmol/L)	引物 (2.0 $\mu$ mol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L)
1	1.4	1.0	4.0	0.1
2	1.4	1.5	2.0	0.2
3	1.4	2.0	6.0	0.3
4	1.6	1.0	2.0	0.3
5	1.6	2.0	4.0	0.2
6	1.6	1.5	6.0	0.1
7	1.8	1.0	6.0	0.2
8	1.8	1.5	4.0	0.3
9	1.8	2.0	2.0	0.1

1.3 反应模板 DNA 用量筛选

根据上述试验结果确定 ISSR - PCR 的最佳反应体系,并应用上述体系中最佳的反应组合,同时为保证结果的重复性,

随机引物仍选用 UBC808 以及 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系,模板 DNA(20 ng/ $\mu$ L)设置用量为 1.0 ~ 4.5  $\mu$ L(每梯度增加 0.5  $\mu$ L)共 8 个处理来确定 ISSR - PCR 反应体系中野牛草模板 DNA 的最适用量。

1.4 数据处理

利用正交设计助手 3.1 绿色版和 Excel 2010 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 ISSR - PCR 反应体系的优化及建立

ISSR - PCR 的反应结果与  $Mg^{2+}$ 、dNTP、引物及 *Taq* DNA 聚合酶的用量 4 个因素密切联系。在本试验正交试验设计的 9 个扩增组合中,由于各组合成分用量的不同,扩增结果有比较明显的差异,但各组合都可扩增出较多的谱带(图 1)。具体来说,1、2、3 号处理组合除了明显的 3 条谱带较强外,其他谱带强度比较弱;4、7 号组合谱带比较清晰,但多态性相对较差;6 号组合条带扩增较多,但强度较弱;8、9 号组合除多态性较低外,也没有得到最佳的效果。综合来看,5 号组合条带多,背景干扰较小。经过综合对比,以谱带多态性高、背景影响低、主带清晰且副带明显为筛选原则,确定 5 号组合为野牛草 ISSR - PCR 的最适反应体系,即 20  $\mu$ L 的体系中含引物(2.0  $\mu$ mol/L)4.0  $\mu$ L、 $Mg^{2+}$ (25 mmol/L)1.6  $\mu$ L、dNTP(2 mmol/L)2.0  $\mu$ L 以及 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L。

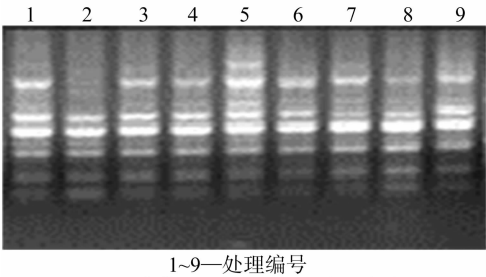


图 1 野牛草 ISSR-PCR 正交组合结果

2.2 模板 DNA 用量的确定

由图 2 可知,在 20  $\mu$ L 的 ISSR - PCR 反应体系中,野牛草 DNA 模板的用量在 1.0 ~ 4.5  $\mu$ L(20 ng/ $\mu$ L)之间时,8 个梯度的组合均能扩增出条带;但在模板用量较低(1.0 ~ 2.5  $\mu$ L)时,造成扩增条带的较少。在模板用量为 3.0  $\mu$ L 时,谱带多态性高;而当模板用量超过 3.0  $\mu$ L(3.5 ~ 4.5  $\mu$ L)时,扩增出的谱带减少。通过全面比较,仍以谱带多态性高、背景影响低、主带清晰且副带明显为筛选原则,最后确定反应体系中 DNA 模板最适用量为 3.0  $\mu$ L。

2.3 优化 ISSR - PCR 反应体系的建立

根据  $L_9(3^4)$  正交试验以及采用梯度法对 DNA 模板用量的筛选结果,建立野牛草 ISSR - PCR 最优化反应体系,总计 20  $\mu$ L,其组分及各自用量见表 3。

3 讨论与结论

ISSR 是基于 PCR 反应的一种分子标记,和其他分子标记技术类似,受到反应条件及所分析植物种类的影响,不同类型的植物对反应体系的要求存在较大的差异。为了得到可靠性高及具有可重复性的分析结果,对 ISSR - PCR 反应系统进行

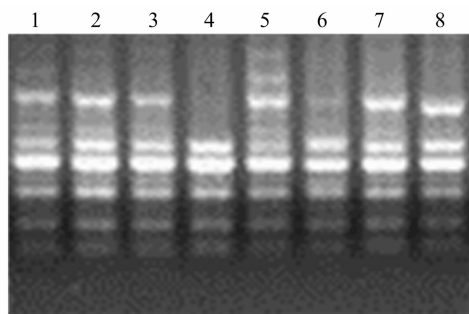
1~8—1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5  $\mu\text{L}$  DNA 模板

图2 野牛草不同 DNA 模板用量扩增结果

表3 野牛草 ISSR-PCR 反应的体系优化

体系组分	用量 ( $\mu\text{L}$ )
$\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L)	1.6
dNTP (2 mmol/L)	2.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2
引物 (2.0 $\mu\text{mol/L}$ )	4.0
Reaction buffer (10 $\times$ )	2.0
DNA 模板 (20 ng/ $\mu\text{L}$ )	3.0
ddH <sub>2</sub> O	7.2
合计	20

优化非常重要<sup>[13-14]</sup>。如果采用单因素设计对 ISSR-PCR 反应体系进行优化,则必须分别对每个影响因素进行多次的梯度试验,过程复杂繁琐且无法同时兼顾各影响因素间交互作用<sup>[15-18]</sup>;与单因素 PCR 设计比较,正交试验设计既具有均衡分散、综合可比及高效率等特性,又减少了试验的工作量,克服了单因素设计的缺点<sup>[19-22]</sup>,所以利用正交试验对 ISSR-PCR 的反应体系多因素组合进行筛选,可较快地找到最佳组合,从而迅速获得试验结果<sup>[23-28]</sup>。

为了建立 ISSR-PCR 最优化反应体系、提高反应的稳定性及特异性,本试验根据正交设计原理设计  $L_9(3^4)$  正交试验,对影响 ISSR 扩增结果的关键因素 ( $\text{MgCl}_2$ 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 模板的用量)进行筛选,最后获得适合野牛草 ISSR-PCR 优化反应体系,即 20  $\mu\text{L}$  的反应体系中含有引物 (2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 4.0  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 (20 ng/ $\mu\text{L}$ ) 3.0  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ 、Reaction buffer (10  $\times$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 1.6  $\mu\text{L}$ 、dNTP (2 mmol/L) 2.0  $\mu\text{L}$  及 ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu\text{L}$ 。

ISSR 分子标记具有步骤简单、迅速稳定和多态性高等优点,且试验进行前不须要获知植物的基因组背景,广泛应用于品种鉴定、分类、进化等方面的研究<sup>[13]</sup>。本研究中野牛草 ISSR-PCR 反应体系的建立,为 ISSR-PCR 技术进行野牛草种源鉴定、遗传多样性分析、亲缘关系、优良性状标记以及其他分子水平的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 孙吉雄. 草坪学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2008.
- [2] 胡晓艳,李敏,杨青川,等. 坪用野牛草种质资源搜集及品种筛选研究进展[J]. 中国草地,2005,27(6):54-60.
- [3] 王晓荣. 野牛草遗传力、配合力的估测及坪用性状的观测[D]. 北京:中国农业大学,2002.
- [4] 胡晓艳. 野牛草有性繁殖特性及其抗旱转录因子 DREB 的克隆

- [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [5] 李会彬,边秀举,赵炳祥. 坪用野牛草研究进展[J]. 草原与草坪,2005(3):9-12.
- [6] 李德颖. 野牛草雌雄单性植株对水分胁迫反应的差异[J]. 园艺学报,1996,23(1):62-66.
- [7] 康俊梅. 低温胁迫下野牛草生理生化响应及蛋白质组学研究[D]. 北京:中国农业科学院,2008.
- [8] 钱永强,孙振元,韩蕾,等. 野牛草叶片活性氧及其清除系统对水分胁迫的响应[J]. 生态学报,2010,30(7):1920-1926.
- [9] 沈静,杨青川,曹致中,等. 低温胁迫对野牛草细胞膜和保护酶活性的影响[J]. 中国草地学报,2010,32(2):98-102.
- [10] 谭玉霞,刘荣堂,王显国,等. 12 份野牛草材料蒸散量及抗旱性的研究[J]. 中国草地学报,2010,32(1):40-47.
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20:176-183.
- [12] 解新明,卢小良. SSR 和 ISSR 标记及其在牧草遗传与育种研究中的应用前景[J]. 草业科学,2005,22(2):30-37.
- [13] 孙洪,程静,詹克慧. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种,2005,3(1):123-127.
- [14] 魏臻武,符昕,耿小丽,等. 苜蓿遗传多样性和亲缘关系的 SSR 和 ISSR 分析[J]. 草地学报,2007,15(2):118-123.
- [15] 王瑜,袁庆华. 紫花苜蓿 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草地学报,2007,15(3):212-215.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 袁庆华,张君艳. 苜蓿假盘菌 ISSR 反应体系优化及指纹图谱构建[J]. 草地学报,2008,16(1):17-22.
- [20] 李旻,王四宝,樊美珍,等. 森林生态系中球孢白僵菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 遗传,2006,28(8):977-983.
- [21] Menzies J G, Bakkeren G, Matheson F. Use of inters simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of Ustilago[J]. Ecology and Population Biology, 2003, 23(2):167-175.
- [22] Hirst P, Richardson T E, Carson S D, et al. Dothistroma pini genetic diversity is low in New Zealand[J]. New Zealand Journal of Forestry Science,2000,29(3):459-472.
- [23] Burgess T, Wingfield M J, Wingfield B W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001,67(1):354-362.
- [24] 孙立夫,杨国亭,秦国夫,等. 用 ISSR 标记高卢蜜环菌系统发生学的尝试[J]. 植物研究,2003,23(3):317-322.
- [25] 于红梅,林英任,陈莉,等. 皮下盘菌属种内及种间遗传多样性的 ISSR 分子标记[J]. 微生物学杂志,2009,29(2):12-16.
- [26] 姜占发. 棉花黄萎病菌基因组 ISSR 分子指纹分析[D]. 保定:河北农业大学,2002.
- [27] 李海莲. 茄子黄萎病菌病原鉴定及其 ISSR 分子指纹分析[D]. 南京:南京农业大学,2005.
- [28] 杨水英,肖崇刚,韩海波,等. 重庆稻瘟病菌不同菌株 DNA 指纹图谱分析[J]. 西南农业大学学报,2002,24(3):235-237.