

蜡梅 ISSR 反应体系的优化

褚云霞^{1,2,3}, 汤庚国⁴, 张永春^{2,3,5}, 靖相密^{3,4}

(1. 上海市农业科学院园艺所, 上海 201106; 2. 上海市农业科学院花卉研究中心, 上海 201106; 3. 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106; 4. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 南京 210037; 5. 上海市农业科学院林木果树研究所, 上海 201106)

摘要: 通过不同浓度 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物的组合试验, 及不同浓度引物、Taq DNA 聚合酶的单因素试验, 筛选蜡梅最佳 ISSR 反应体系为: 每 20 μ L 中含 1 \times PCR buffer、2.5 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$ 、0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、0.3 μ mol \cdot L⁻¹ 引物、30 ng 模板 DNA、1U TaqDNA 聚合酶; 同时通过梯度 PCR 试验确定了不同引物的适宜退火温度。

关键词: 蜡梅; ISSR; 反应体系; 梯度 PCR

中图分类号: S 685.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)10-0161-03

蜡梅 (*Chimonanthus praecox* link) 又称腊梅、黄梅花, 原产我国中部地区, 以河南鄢陵、南京中山陵风景区、湖北武汉和重庆等地居多, 为我国特有的优良冬季香花树种, 同时也是珍贵的天然香料植物、药用植物、桩景和切花材料, 应用十分广泛。我国有悠久的栽培历史, 品种丰富, 但是至今还没有形成完善的分类体系, 且品种名称混乱, 同名异物、同物异名的现象很普遍, 争议颇多, 从而给科研、生产、园林应用、交流等方面带来诸多不便和困难^[1]。利用分子标记技术进行蜡梅的遗传多样性、分类、品种鉴定等研究显得尤为必要。

简单重复序列区间扩增多态 DNA (ISSR) 分析是建立在 PCR 反应基础上的一种新的分子标记技术^[2]。近年来已广泛用于品种鉴定、居群生物学以及物种的分类系统学研究等领域^[3,4]。

由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子标记技术, 其扩增结果易受 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 等因子的影响。因此, 在将该技术应用到一个新的植物材料之前, 都应先建立一个合适的 ISSR-PCR 反应体系, 以期获得可靠的结果。为此, 研究对上述各因子的最佳反应条件进行了优化, 建立了适合于蜡梅的 ISSR 反应体系, 为蜡梅品种分子鉴定和遗传关系的分析等研究奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为生长于上海市嘉定外冈的钱门蜡梅古

树, 春季取新鲜嫩叶片进行 DNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与定量 采用改进的 SDS 法, 按文献^[5]提取基因组 DNA。DNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 用 λ DNA/EcoRI + HindII 为定量标记, 同时检测波长 260nm 时的吸光值, DNA -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 ISSR 原初扩增条件及 PCR 扩增程序 原初的扩增反应条件为 20 μ L PCR 反应体积, 1 \times buffer (10 mmol \cdot L⁻¹ Tris \cdot HCl, pH 值 9.0, 50 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$, 1U Taq 酶, 30 ng 模板 DNA, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ 引物, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.4 mmol \cdot L⁻¹, 根据引物的 T_m 值及参考文献, 初步确定 ISSR-PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1.5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 38 个循环, 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 5 min^[7]。试验所用的 PCR 试剂 $MgCl_2$ 和 PCR Buffer 购自上海生工生物工程公司, 其它药品 (dNTP、Taq E、Primer 以及 SDS、Tris-HCl、EDTA、琼脂糖) 均购自北京鼎国生物技术责任有限公司。试验所用仪器为: Eppendorf 公司生产的 Mastercycler 5333 和 Mastercycler gradient 两种型号 PCR 仪, BIO-RAD Laboratories 公司生产的 PowerPac BasicTM EN61010-1 电泳仪和 Gel DocTM EQ 170-8060 凝胶成像仪, Varian 公司生产的 UV-100 紫外可见分光光度计等。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭) 中电泳, 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 用 100 bp DNA 梯度做分子量标记。

1.2.3 退火温度的确定 采用梯度 PCR 模式, 自动将温度设定为 45~59 $^{\circ}$ C, 生成的温度梯度为 45 $^{\circ}$ C、45.1 $^{\circ}$ C、45.9 $^{\circ}$ C、47.2 $^{\circ}$ C、48.8 $^{\circ}$ C、50.6 $^{\circ}$ C、52.5 $^{\circ}$ C、54.5 $^{\circ}$ C、56.2 $^{\circ}$ C、57.7 $^{\circ}$ C、58.9 $^{\circ}$ C、59.5 $^{\circ}$ C。其余 PCR 扩增程序同 1.2.2 以确定最合适的退火温度。

第一作者简介: 褚云霞 (1975-), 女, 硕士, 助理研究员, 长期从事花卉育种与栽培工作。E-mail: yy4@saas.sh.cn

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关资助项目 [沪农科攻字 (2005) 第 1-3 号]。

收稿日期: 2007-05-26

ISSR - PCR 扩增反应体系表

| 代号 | Mg ²⁺ 浓度 /mmol·L ⁻¹ | dNTP 浓度 /mmol·L ⁻¹ | DNA 量 /ng | 引物浓度 μmol·L ⁻¹ | Taq 量 /U |
|----|--|----------------------------------|--------------|------------------------------|-------------|
| 1 | 2.0 | 0.15 | 20 | 0.4 | 1 |
| 2 | 2.0 | 0.15 | 30 | 0.4 | 1 |
| 3 | 2.0 | 0.15 | 40 | 0.4 | 1 |
| 4 | 2.0 | 0.2 | 20 | 0.4 | 1 |
| 5 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1 |
| 6 | 2.0 | 0.2 | 40 | 0.4 | 1 |
| 7 | 2.0 | 0.25 | 20 | 0.4 | 1 |
| 8 | 2.0 | 0.25 | 30 | 0.4 | 1 |
| 9 | 2.0 | 0.25 | 40 | 0.4 | 1 |
| 10 | 2.5 | 0.15 | 20 | 0.4 | 1 |
| 11 | 2.5 | 0.15 | 30 | 0.4 | 1 |
| 12 | 2.5 | 0.15 | 40 | 0.4 | 1 |
| 13 | 2.5 | 0.2 | 20 | 0.4 | 1 |
| 14 | 2.5 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1 |
| 15 | 2.5 | 0.2 | 40 | 0.4 | 1 |
| 16 | 2.5 | 0.25 | 20 | 0.4 | 1 |
| 17 | 2.5 | 0.25 | 30 | 0.4 | 1 |
| 18 | 2.5 | 0.25 | 40 | 0.4 | 1 |
| 19 | 3.0 | 0.15 | 20 | 0.4 | 1 |
| 20 | 3.0 | 0.15 | 30 | 0.4 | 1 |
| 21 | 3.0 | 0.15 | 40 | 0.4 | 1 |
| 22 | 3.0 | 0.2 | 20 | 0.4 | 1 |
| 23 | 3.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1 |
| 24 | 3.0 | 0.2 | 40 | 0.4 | 1 |
| 25 | 3.0 | 0.25 | 20 | 0.4 | 1 |
| 26 | 3.0 | 0.25 | 30 | 0.4 | 1 |
| 27 | 3.0 | 0.25 | 40 | 0.4 | 1 |
| 28 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.2 | 1 |
| 29 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.3 | 1 |
| 30 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1 |
| 31 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.5 | 1 |
| 32 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 0.5 |
| 33 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1 |
| 34 | 2.0 | 0.2 | 30 | 0.4 | 1.5 |

1.2.4 ISSR - PCR 扩增反应体系的优化 ISSR - PCR

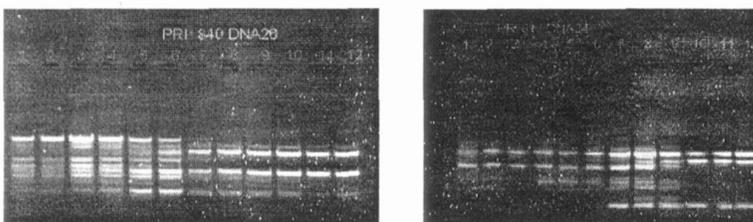


图1 梯度 PCR 结果(左图为引物 UBC840 右图为引物 UBC811)

2.2 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 扩增的影响

Mg²⁺ 浓度对 Taq DNA 聚合酶的活性、退火和产物的特异性都有影响⁹。在蜡梅的 ISSR - PCR 扩增中, Mg²⁺ 浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱影响较大(图 2)。Mg²⁺ 浓度在 2.5 mmol·L⁻¹ 时, 条带清晰可见; 当 Mg²⁺ 浓度增加至 3.0 mmol·L⁻¹ 时, 条带亮度反而下降, 因此, 确定 Mg²⁺ 浓度以 2.5 mmol·L⁻¹ 较为适宜。

2.3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

扩增反应体系的优化采用完全组合方式, 共 3 个因素各 3 个水平, 其中 Mg²⁺ 浓度为 2.0、2.5、3.0 mmol·L⁻¹, dNTP 浓度为 0.15、0.2、0.25 mmol·L⁻¹, 模板 DNA 量为每 20 μL 反应体系中含 20、30、40ng, 其余条件同 1.2.2。同时进行了引物浓度与 Taq DNA 聚合酶单因素试验, 引物浓度分别为: 0.2、0.3、0.4、0.5 μmol·L⁻¹; Taq 酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5 U(见表)。

2 结果与分析

2.1 退火温度的确定

退火温度不仅与引物序列有关, 还与物种 DNA 的序列有密切关系, 因此在进行 ISSR 扩增优化之前确定引物的退火温度非常重要⁸。先根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛, 选择能看到清晰条带的引物 UBC 840 进行退火温度的确定。从图 1 可看出, 退火温度对 ISSR - PCR 的影响非常明显。从 45~59℃ 共 14℃ 的温度间隔里, 对 PCR 结果的影响可以分为三类: 45 和 45.1℃ 为第一大类, 扩增条带不清晰, 亮度较小; 从 45.9℃~50.6℃ 为第二大类, 扩增条带数目明显较多, 亮度强; 从 52.5~59.5℃ 为第三大类, 有两条明显的带。引物 UBC 840 根据公式⁸ $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 计算的退火温度为 52.5℃, 而在研究中, 最适的退火温度为 48.8~50.6℃, 因此选择低于 T_m 的 50.6℃ 为蜡梅的最适温度。不同的引物有不同的退火温度, 而其它引物 UBC 810、UBC 811、UBC812、UBC813、UBC851 等均以 52.5℃ 的退火温度为最佳, 因此可用 52.5℃ 先进行筛选, 选择清晰、不弥散的引物进行下一步研究, 对于退火温度差距较大的, 则再次采用梯度 PCR 进行退火温度筛选。

dNTP 作为扩增的底物, 直接影响 PCR 扩增¹⁰。在试验中, dNTP 浓度的变化对 ISSR 带强弱影响较小(图 2)。在 0.15~0.2 mmol·L⁻¹ 时可扩增出清晰的条带。

2.4 模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响
模板 DNA 量是制约扩增产物及特异性的一个重要因子。模板量过低, 分子碰撞的概率低, 偶然性大, 扩增产物无或不稳定; 模板量过高, 会相应增加非特异性产物的扩增。试验在 20 μL 反应体积中, 当模板 DNA 的量为 20 ng 时, 条带较弱, 当增大到 30~40 ng 时, 条带较清晰(图 2), 因此在 20 μL 反应体积中最适模板 DNA 用量为 30 ng。

2.5 Taq 酶对 ISSR 扩增的影响

Taq 酶的用量也对试验结果影响较大, 酶用量过高

不仅增加成本,还会造成非特异性的扩增产物,过低则会使酶过早地消耗完,产物合成效率低^[1]。试验在 20 μ L 反应体积中,当 Taq 酶单位增加至 1.5 U 时,条带亮度明显增加,但同时背景也略有增加。因此认为在 20 μ L 反应体积中最适的 Taq 酶量为 1 U。

2.6 引物浓度对 ISSR 带的影响

引物浓度会对 ISSR-PCR 的带型产生明显的影

响,浓度过低不能扩增,浓度太高会产生新的位点^[2]。在试验中引物浓度为 0.2~0.3 μ mol \cdot L⁻¹ 时,条带清晰;随着引物浓度升高到 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ 时,条带数目增多,但大片段条带不清晰(图 2)。为了减少非特异性扩增,加强重复性,试验在确保产量的前提下,采用了较低的引物浓度,即 20 μ L 反应体积中加入引物 0.3 μ mol \cdot L⁻¹。

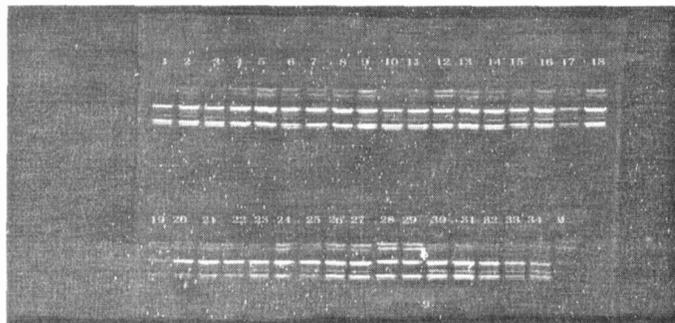


图 2 不同条件 ISSR 反应结果

参考文献

- [1] 涂非,陈龙清. 蜡梅科研进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 124-12
- [2] ZIETK IEW ICZ EKRA FAL SK IA KLABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [3] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map [J]. Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag Berlin, Germany; 2001, 102: 2/3, 206-214. 23 ref.
- [4] Balasaravanan T, Chezian P, Kamalakannan R et al. Identification of species-diagnostic ISSR markers for six Eucalyptus species [J]. Silvae Genetica. J. D. Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main, Germany; 2006, 55: 3, 119-122. 19 ref.
- [5] Wolfead Randlecp. Relationship s within and among species of the holoparasitic genus Hyobanche (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nudeotide sequences [J]. Syst. Bot., 2001, 26: 120-130.

- [6] 陈龙清,陈俊愉,郑用琏,等. 利用 RAPD 分析蜡梅自然居群的遗传变异[J]. 北京林业大学学报, 1992, 21(2): 86-90.
- [7] 金凤,陈崇顺,邹爱兰,等. 月季 ISSR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2006(1): 72-75.
- [8] Bomet, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting [J]. Plant Mol Bio Rep, 2001, 19: 209-215.
- [9] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 108-127.
- [10] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1050-1060.
- [11] 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.
- [12] 李伟,何桥,赵新成,等. 红千层 ISSR 反应体系的优化[J]. 西南园艺, 2006, 34(3): 1-4.

Study on Optimization for ISSR Reaction System in *Chimonanthus Praecox*

CHU Yun-xia^{1,2,3}, TANG Geng-guo⁴, ZHANG Yong-chun^{2,3,5}, JING Xiang-mi⁴

(1. Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai, 201106, China; 2. Flower Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai, 201106, China; 3. Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Shanghai, 201106, China; 4. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 5. Forestry and Fruit Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: To optimize ISSR amplification system on *Chimonanthus praecox*, the effect of three factors, Mg²⁺, dNTP and DNA were studied on three levels respectively, the suitable concentration of primer and Taq DNA Polymerase were studied also. The results showed that optimum ISSR reaction system of *Chimonanthus praecox* was every 20 μ L reaction system containing 1 \times PCR buffer, 2.5mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.2mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.3 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 30 ng DNA template and 1U Taq DNA polymerase. The optimal annealing temperature for ISSR-PCR reaction was proposed by gradient PCR.

Key words: *Chimonanthus praecox*; ISSR; Reaction system; Gradient PCR