

对长豇豆品种 ISSR 反应体系中 4 种关键成分的优化

彭 海, 张 静, 张路帆, 陈禅友

(江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

摘 要: 对长豇豆 ISSR 反应中模板、引物、dNTP 和酶的浓度进行了初步筛选, 通过正交设计实验确定了这 4 种关键成分的最终浓度, 即引物为 $0.2 \mu\text{M}$ 、模板为 $0.015 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、dNTP 各 $200 \mu\text{M}/\text{L}$ 和 Taq 聚合酶为 0.5 U 时, ISSR 扩增效果最好。研究为利用 ISSR 分子标记技术鉴定长豇豆种质资源奠定了基础。

关键词: 长豇豆; ISSR 分子标记; 遗传关系

中图分类号: S 643.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0186-03

ISSR 是由 Zietkiewicz 等^[1]提出的用于扩增 2 个距离较近的相邻 SSR 位点间序列的一种方法。其原理是同一 ISSR 引物序列同时与两个较近但方向相反的 SSR 重复序列互补结合^[2], 在模板、Taq 酶和 dNTP 等存在的情况下扩增这 2 个 SSR 位点间的序列。因此 ISSR 变异来源于 SSR 位点多态性本身与 SSR 位点间的序列变异。在牛筋草和高粱的遗传分析中, ISSR 技术被认为比 RFLP 更便宜, 比 RAPD 重复性更高^[2,3]。而利用 SSR 分析豇豆品种间遗传关系时都得用聚丙烯酰胺进行分辨, 费时且费用较高; 且目前具有多态性的 SSR 位点不多(<30 个)^[4,5], 难于对整个基因组进行全面分析。因此 ISSR 技术被认为更适合于遗传多样性较低的栽培品种内的遗传分析^[6,7]。

王佳等^[8]利用正交组合设计试验了 Taq 酶、dNTPs、引物和 Mg^{2+} 4 种因素对黄瓜中 ISSR 体系的影响, 结果表明 4 种成分对结果都有影响, 由于实验室所用的 PCR Buffer 已经含有固定浓度的 Mg^{2+} , 因此试验的组分包括前 3 种。由于模板的浓度对 PCR 也有影响, 因此, 研究还加上模板浓度共 4 种组份进行优化。在策略上也和王佳等^[8]的方法不一致, 研究先是在较宽的浓度范围内筛选引物与模板的浓度, 之后再行正交设计进行分析。研究旨在为分析长豇豆品种间的遗传关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

第一作者简介: 彭海(1975-), 男, 四川遂宁人, 博士, 研究方向: 植物遗传育种。E-mail: penghai138@163.com。

通讯作者: 陈禅友。E-mail: ccy@jhu.edu.cn。

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化资金资助项目(05EFN214420338)。

收稿日期: 2007-06-25

长豇豆品种为江汉大学培育的新品种柳翠^[9], 种子于室内发芽至 2 片真叶时收集叶片。

1.2 基因组 DNA 的提取、纯化、检测与稀释

按植物基因组 DNA 提取试剂盒(目录号: DP305-02, TIANGEN, 北京)的操作手册提取与纯化基因组 DNA。纯化后的 DNA 利用紫外可见分光光度计(SP-1910UVPC, 上海光谱仪器有限公司, 上海)测定波长为 260 nm 和 280 nm 处的光密度值, 计算 A_{260}/A_{280} 值以表示 DNA 的纯度, 并按 $A_{260} \times 2.500$ 计算母液的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。将母液稀释到 $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 作为使用液。

1.3 引物与模板浓度的预筛

预筛时引物(序列为: 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3')采用 4 种浓度梯度, 即 4.0, 0.4, 0.04 和 $0.004 \mu\text{M}$ 。模板采用 6 种浓度梯度, 即 15, 1.5, 0.15, 0.015, 0.0015 和 $0.00015 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。其余反应组分如下: $2 \mu\text{L}$ $10\times$ PCR buffer (组成: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 200 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 50% glycerol and 1% Triton X-100), 每种 dNTP 各 $100 \mu\text{M}/\text{L}$ 和 0.5 U Taq 聚合酶(目录号: ET101, TIANGEN, 北京)。反应混合物于 PCR 反应仪(5331, Eppendorf, 美国)按以下程序进行反应: 94°C 预变性 4 min; 94°C 1 min; 52°C 1 min; 72°C 2 min; 循环 44 次; 72°C 延伸 8 min。

反应结束后, $10 \mu\text{L}$ 扩增产物用 2% 的琼脂糖在 $0.5\times$ TBE buffer 中, 于 $5 \text{ V}/\text{cm}$ 的电压电泳 2.5 h 后于 UVP 凝胶成像系统中拍照。

1.4 PCR 反应体系中关键成分的正交设计

确定了引物与模板的大致浓度后, 再进行引物、模板、酶与 dNTP 的最佳浓度的最终确定, 试验按 L_9 正交表设计, 每一因素 3 个水平共 9 种处理见表 1, 每一处理重复 3 次。反应体系中采用引物 808, 反应体系中其它成分浓度以及凝胶成像同 1.3。

表 1 PCR 反应体系中关键因素的正交设计

处理	Taq 酶 / U	dNTP 混合物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 / $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1	0.25	50	0.20	0.007
2	0.25	100	0.40	0.015
3	0.25	200	0.80	0.030
4	0.50	50	0.40	0.030
5	0.50	100	0.80	0.007
6	0.50	200	0.20	0.015
7	1.00	50	0.80	0.015
8	1.00	100	0.20	0.030
9	1.00	200	0.40	0.007

注 除模板浓度外,每一因素的中间水平与 Ajibade 等^[10]使用的浓度一致

2 结果与分析

2.1 长豇豆 ISSR-PCR 引物与模板浓度的初步确定

图 1 所示为 6 种模板浓度与 4 种引物浓度组合下

的电泳图谱。从图 1 可以看出,不同的模板浓度对长豇豆 ISSR-PCR 扩增带的多少与清晰度有一定影响,但影响不大,以模板为 0.015 ng/ μL 时的扩增效果最好。而不同的引物浓度对不同分子量片段的扩增有强烈的选择性,即引物浓度低的时候更有利于大分子量片段的扩增,相反,引物浓度高时,则更有利于小分子量片段的扩增。当引物浓度为 4 $\mu\text{M}/\text{L}$ 时,扩增片段分子量大小在 0.1~1 K 之间;当浓度降低为 0.4 $\mu\text{M}/\text{L}$ 时,扩增片段长度增加到 0.3~1 K,而引物浓度进一步降低为 0.04 $\mu\text{M}/\text{L}$ 时,扩增片段长度增加为 0.5~2 K,以引物浓度为 0.4 μM 时,扩增带的数量多且清晰。综合来看,选择模板浓度为 0.015 ng/ μL ,引物浓度为 0.4 μM 时扩增效果最好(图上箭头所示的泳道即为该处理)。

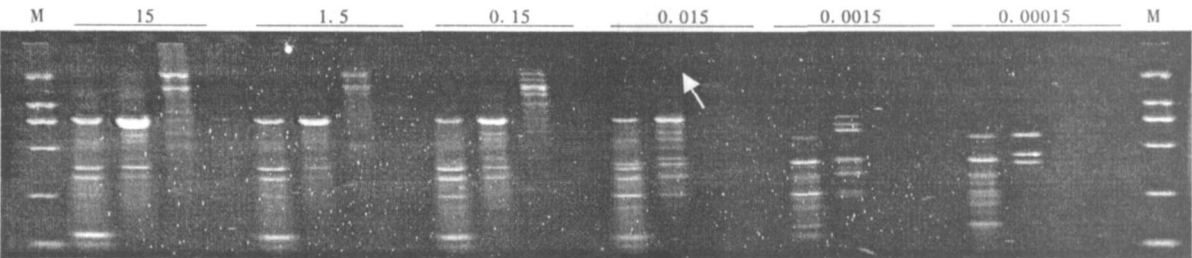


图 1 引物与模板浓度的初步筛选

注: M: Marker; 图上方的数字代表了模板的 6 种浓度,每一浓度下 4 种引物浓度 分别为 4.0, 0.4, 0.04 和 0.004 μM 。

2.2 长豇豆 ISSR-PCR 反应体系关键成分的最终优化

表 2 不同植物材料 ISSR 反应体系中关键成分的浓度

植物材料	dNTP 混合物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 / $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Taq 酶 / U	文献
水稻	25	1000.00	1.25	1.5	[11]
杨梅	250	0.30	2.40	1.0	[12]
乐昌含笑	250	0.13	2.40	1.0	[13]
五针松	200	0.50	2.00	1.0	[14]
豆腐	100	0.40	0.75	0.5	[10]
大豆	250	0.20	1.00	0.5	[15]

通过对引物与模板的浓度初筛后,对 4 种反应的关键成分按正交设计进行了优化,其结果如图 2 所示。从图 2 可以看出:各处理间的带型相差较大,表明这 4 种组合的浓度对长豇豆 ISSR-PCR 的扩增效果有显著影响。处理 1 对大分子量的片段扩增效率低下,而对小分子量的片段扩增效果较好;处理 2、4 和 8 的带数量偏少但较为清晰;处理 3、5、7 和 9 的带的数量偏少且扩增量也很少。综合来看,处理 6 不论是带的数量还是带的清晰度都较好,因此该处理为最优组合,即引物 0.2 μM 、模板 0.015 ng/ μL 、dNTP 各 200 $\mu\text{M}/\text{L}$ 和 Taq 聚合酶 0.5 U 时扩增效果最好。与 Ajibade 等^[10]在豇豆属 ISSR 反应中所采用的体系相比较,研究获得的最优体系中模板与 Taq 聚合酶浓度都降低了。

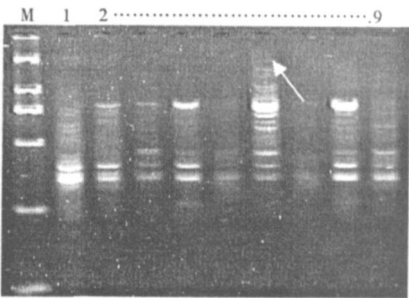


图 2 长豇豆 ISSR-PCR 关键成分的优化

注: M: DL 2000 Marker; 泳道 1~9 为处理 1~9(表 1)。

3 讨论

研究共优化了 4 种 ISSR 反应成分,表 2 所示为这 4 种成分在已有的不同植物材料 ISSR 反应中所采用的浓度。从表 2 可以看出,不同研究者在不同植物材料的 ISSR 反应中采用了不同的浓度,且它们之间相互差异较大,如 dNTP 混合物在杨梅中所使用的浓度达到了 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$,而在水稻中仅为 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$,二者差异达到 10 倍;引物浓度的差异更大,水稻中达到 1 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$,为五针松胚 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 2 000 倍,其它 2 种成分的浓度也存在差异。在不同植物材料中如此明显的差异表

明 当将 ISSR 反应应用于一种新的植物材料时, 应该对反应中这些关键成分进行优化以获得其最佳使用量。另外, 不同作者所用的 PCR 反应体系中的成分来源不一致, 特别是国外与国内的药品性能有可能存在较大差异, 有时甚至于对浓度的定义(如酶活力的定义)都不完全一致, 因此针对自己的反应体系, 也存在优化的必要。

参考文献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics* 1994 20(2): 176-83.
- [2] Yang W, De Oliveira A C, Godwin I, et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghum[J]. *Crop Science Society of America* 1996 36(6): 1669-1676.
- [3] Salimath S S, de Oliveira A C, Godwin I D, et al. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers[J]. *Genome* 1995 38(4): 757-63.
- [4] Li C D, Fatokun C A, Ubi B, et al. Determining Genetic Similarities and Relationships among Cowpea Breeding Lines and Cultivars by Microsatellite Markers[J]. 2001(41): 189-197.
- [5] Diaga D, Khidir W H. Microsatellites and RAPD Markers to Study Genetic Relationships Among Cowpea Breeding Lines and Local Varieties in Senegal[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2005 52(8): 1057-1067.

- [6] Gonzalez A, Wong A, Delgado-Salinas A, et al. Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean. This research was funded by the McKnight Foundation Collaborative Crop Research Program[J]. *Crop Sci* 2005 45(2): 606-615.
- [7] Ajilade S R, Weeden N F, Chite S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*[J]. *Euphytica* 2000 111(1): 47-55.
- [8] 王佳, 梁国华, 缪昱珉 等. 正交设计优化黄瓜 ISSR 体系[J]. *分子植物育种* 2006 4(3): 439-442.
- [9] 陈禅友. 豇豆新品种 柳翠[J]. *长江蔬菜* 2006(7): 7.
- [10] Ajilade S R, Weeden N F, Chite S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*[J]. *Euphytica* 2000 111(1): 47-55.
- [11] 周黎军, 李爱仙, 吴先军 等. 早世代稳定水稻的 ISSR 标记[J]. *遗传学报* 2005 32(10): 1074-1081.
- [12] 邱英雄, 傅承新, 孔航辉, 杨梅不同品种的 ISSR 分析[J]. *农业生物技术学报* 2002(04): 343-346.
- [13] 邱英雄, 傅承新, 何云芳. 乐昌含笑不同类型鉴定的 ISSR-PCR 分析[J]. *林业科学* 2002 38(6): 49-52.
- [14] 吕艳芳, 刘桂丰, 姜静, 等. 五针松胚乳 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. *植物研究* 2003(4): 429-432.
- [15] 金燕, 张文驹, 傅大煦 等. 利用 ISSR 标记研究野大豆居群内遗传变异及其取样策略[J]. *植物学报* 2003 45(8): 955-1002.

The Optimization for the Four Key Elements in Asparagus Bean ISSR Reaction

PENG Hai, ZHANG Jing, ZHANG Lufan, CHEN Chan-you

(College of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan Hubei 430056 China)

Abstract: After the initial screening for the proper concentrations of template, primer, dNTP and enzyme, their ultimate concentrations were determined by an orthogonal design experiment. The best electrophoreses profile was produced when the concentrations of primer, template, dNTP and Taq polymerase were 0.2 M, 0.015 ng/L, 200 M/L and 0.5U, respectively. This study set up a foundation for the identification of asparagus bean germplasm with ISSR technique.

Key words: Asparagus Bean; ISSR Reaction; Germplasm

棚不是建得越大越好

现在新建的大棚有个“特色”, 越建越大。50~60 m² 算小棚, 70~80 m² 还说过得去, 100 m² 左右的棚才算大的。可是, 大棚真的建得越大越好吗? 为此, 咨询了有关蔬菜专家, 他们给出了解答:

只有在特定的操作环境和种植特定植物的条件下, 才有必要建一个大型大棚, 菜农盲目扩大棚体面积是一种错误的潮流。考虑到大棚环境调控、作物生长特性和经济效益, 大棚建造的较佳规模为跨度 7~9 m, 长度 60~80 m。

当大棚跨度超过 9 m, 也就是过宽时, 棚面弧度减小会导致前部光线过强且通风条件差, 作物很容易发生病虫害。如

果已经建成, 可以在换膜时将大棚前部适当下压, 增加弧度, 以利通风。也可在大棚前部的第三根钢丝处挂上一层地膜, 顺棚顶部压到前部地上, 以避免大棚前部急剧升、降温。当气温比较高时可通过适当加大通风口的密度来加大通风量。

当大棚过长, 一样不利于通风换气。特别是刮大风时, 棚门一边的温度明显低于棚尾, 甚至在关掉通风口后也一样。同时, 大棚过长必然会造成农事操作的不便, 前后走动距离过大, 容易使人产生疲劳感。如果已经建成, 用新塑料薄膜在温室的中部做一个隔扇, 可以直接绑在柱子上, 但一定要直通到大棚顶部, 才能起到减少两边空气流通的作用。