

ISSR 反应中空气污染及其预防

彭海, 张静, 王博, 陈禅友

(江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

摘要: 对ISSR反应中污染的来源进行了分析与讨论, 提出了解决ISSR反应污染的方案, 为准确进行ISSR分析奠定了基础。

关键词: ISSR; 空气污染; 预防

中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0047-02

ISSR是由 Zietkiewicz 等提出的用于扩增两个距离较近的相邻 SSR 位点间序列的一种方法, 被认为比 RFLP 更便宜, 比 RAPD 重复性更高且 ISSR 多态性高, 较其它分子标记更适合遗传多样性较低的栽培品种内的遗传分析, 因此在遗传分析与基因定位等工作中得到了广泛的应用。由于微卫星的简单重复序列在所有生物中都存在, 因此 ISSR 引物可以在所有生物中通用, 由于空气中存在微生物, 给 ISSR 反应带来了污染的风险。然而国内外的研究者大多没有在方法中提及污染预防措施, 这可能给研究结果的准确性带来了一定的影响。研究证实空气确实能造成 ISSR 反应的污染, 并提出了解决措施, 为准确进行 ISSR 分析奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

长豇豆品种为江汉大学培育的长豇豆新品种柳翠, 种子于室内发芽至 2 片真叶时收集叶片提取 DNA。

1.2 基因组 DNA 的提取

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 的光密度值以检测其纯度并计算其浓度。

1.3 ISSR 分析

ISSR-PCR 反应体系为 50 μ L, 各成分浓度如下: 引物(序列为: 5' - AGAGAGAGAGAGAGC-3') 为 0.2 μ M, 模板为 0.75 ng/ μ L, dNTP 各 200 μ M/L 和 Taq 聚合酶(目录号: ET101, TIANGEN, 北京)为 0.5U, 2 μ L 10 \times PCR buffer (组成: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 200 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50% glycerol and 1% Triton X-100)。反应混合物于 PCR 反应仪(5331, Eppendorf, 美国)按以下程序进行反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 52 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 循环 44 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

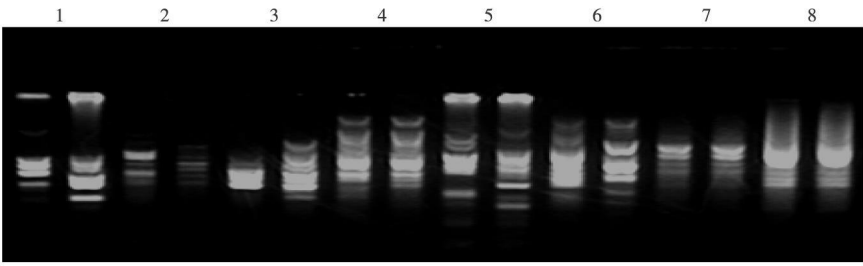


图 1 ISSR 反应阴性对照中各成分的替代实验

注: 图上的数字代表了 8 种处理, 处理 1 为阳性对照 2 为阴性对照 3~8 分别为其它来源的引物 Taq 聚合酶 dNTP, Buffer, 水以及 PCR 管逐一代替处理 2(原阴性对照)中各成分的扩增结果。

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。

通讯作者: 陈禅友, 教授 E-mail: ccy@jhun.edu.cn。

基金项目: 武汉市科技攻关资助项目(20062002097)。

收稿日期: 2007-04-26

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

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 污染的发现与分析

试验过程中发现阴性对照(无模板的 ISSR 反应)可以扩增出条带, 因此怀疑可能是在操作过程中将模板引入了其它反应成分, 或者是其它反应成分或 PCR 管在购买时就已经带入模板的污染。于是将其它来源的引物, Taq 聚合酶, dNTP, Buffer, 水以及 PCR 管逐一代替原阴性对照中的各成分, 与原阳性对照(有模板的反应)、阴性对照一起共形成 8 种处理, 每处理重复 2 次, 其结果如图 1。从图 1 可以看出, 处理 3~8 都有扩增产物出现, 表明污染不太可能是由引物, Taq 聚合酶, dNTP, Buffer, 水以及 PCR 管引入(当然也可能新成分中也有污染, 但两种不同来源的成分同时被污染的概率极低); 从 2~8 处理间与处理内 2 次重复来看, 其电泳的带型都互不相同, 表明污染是具有随机性的, 进一步说明不太可能来源于试剂; 阳性对照处理 1 的 2 次重复的带型也不完全一致, 其中重复 2 至少多扩增了一条带(图中白色箭头所示), 表明污染确实影响了正常的 ISSR 扩增的准确性。

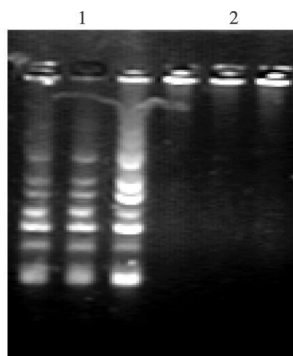


图 2 ISSR 反应污染的解决

注 图上的数字代表了 2 种处理, 每处理 3 次重复; 处理 1 为原阳性对照, 2 为阴性对照。

2.2 ISSR-PCR 污染的解决

从污染的随机性分析, 应该是在操作过程中随机引入的污染, 从而导致不同的阴性处理间与处理内不能重复(图 1), 结合 ISSR 引物的通用性分析, 很可能是空气中的微生物随机引入而带来的污染。由此将所有试剂与操作器材在 120℃ 20 min 灭菌, 并且整个操作在超净工作台上进行。试验设计共 2 个处理, 即阳性反应与阴性对照, 重复 3 次, 其结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 处理 2 即阴性对照没有扩增产物, 表明污染问题已

经得到解决, 而处理 1 阳性反应的 3 次重复间带型完全一致, 进一步表明阳性反应中没有污染, 因此结果能完全重复。

3 讨论

分子标记已成为遗传学研究的重要手段, 在众多的分子标记中, ISSR, RAPD, AFLP 和 SAMPL 标记的引物在各种生物中可以通用, 但 AFLP 与 SAMPL 是人工设计的引物, 不可能在微生物中扩增出产物。而 ISSR 与 RAPD 是根据生物 DNA 自身序列设计的通用引物, 因此存在微生物污染 PCR 反应的可能。从研究来看, ISSR 反应中即使没有模板, 也能在污染存在时扩增出大量的产物, 且导致处理间与处理内不能重复(图 1)。由于科学研究最基本的要求是现象能够重现, 而污染问题已经严重影响到了这一原则。因此, 在 ISSR 反应与 RAPD 反应中都应该注意微生物污染的问题, 整个反应体系所涉及的药品与器材应消毒, 且整个操作应严格在超净工作台上进行, 同时应在反应中设立阴性对照, 阳性也应设重复, 以监控污染是否产生。然而从已有的 ISSR 研究报道来看, 研究方法中很少有提及预防 PCR 污染的措施, 大多也没有设立阴性对照与阳性重复, 这给研究的结果准确性带来了风险, 应加以注意。

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): 176-183.
- [2] Yang W, De Oliveira A C, Godwin I, Schertz K, Bennetzen J L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghums [J]. *Crop Science Society of America* 1996, 36(6): 1669-1676.
- [3] Salimath S S, de Oliveira A C, Godwin I D, Bennetzen J L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Echinochloa* with DNA markers [J]. *Genome* 1995 38(4): 757-763.
- [4] Gonzalez A, Wong A, Delgado-Salinas A, Papa R, Gepts P. 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.
- [5] Ajilade S R, Weeden N F, Chite S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna* [J]. *Euphytica* 2000 V111 (1): 47-55.
- [6] 陈祥友. 豇豆新品种 - 柳翠 [J]. *长江蔬菜*, 2006(7): 7.

Air Contamination and Its Prevention in ISSR Reaction

PENG Hai, ZHANG Jing, WANG Bo, CHEN Chan-you

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

Abstract: In this paper, we discussed the sources of contamination in ISSR reaction and suggested a way to resolve it. This study laid a foundation for the accurate analysis by using ISSR technique.

Key words: ISSR; Air Contamination; Prevention