

茉莉花 ISSR-PCR 反应体系的建立

邱长玉^{1,2}, 高国庆¹, 陈伯伦¹, 周瑞阳², 牛英², 张加强²

(1. 广西农业科学院, 广西 南宁 530007; 2. 广西大学, 广西 南宁 530004)

摘要:以茉莉花为材料,研究了 PCR 反应体系的主要成分及退火温度对茉莉花 ISSR 扩增结果的影响。结果表明:在 20 μL 的反应体中, Mg²⁺ 的用量为 1.2~1.6 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L, 引物的浓度为 0.5 μmol/L, Taq DNA 聚合酶的用量为 1U, 模板 DNA 的用量为 40~70 ng, 在 48~50 °C 的退火温度下 40 个循环, 能得到清晰、多态性高的 ISSR 带谱。

关键词:茉莉花; ISSR; 反应体系; 优化

中图分类号: S 603.6; S 685.16 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)02-0214-04

茉莉(*Jasminum sambac* (Linn.) Aiton.)也称茉莉花,木樨科多年生灌木,素馨属(或茉莉属),属亚热带植物,原产波斯湾一带。我国是世界上茉莉花产量最多的国家^[1]。其鲜花香气清幽,花性味辛、甘、凉,具有理气、开郁、辟秽、和中的作用,广泛用于茶、烹调、保健食品中,食之有清热明目,治高血压的作用。广西横县是全国最大的茉莉花生产和花茶加工基地,至 2002 年全县种植茉莉超过 4 000 hm², 年产鲜花 5 万 t 以上,茉莉花产量占全国总产量的 50% 以上,茉莉花和花茶年销售产值达 10 亿元以上,全县农民来自茉莉花的收入达 2.5 亿元^[2]。茉莉种植业和加工业已成为该县的经济支柱之一。茉莉

花茶是广西出口的大宗产品之一。近年来随着花茶业的发展,茉莉种植面积有进一步上升的趋势。充分了解他们的性状特点,掌握其遗传关系是育种工作的关键。

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, 简单序列重复区间扩增)又叫随机扩增微卫星多态性标记(Random Amplified Microsatellites Polymorphisms, 简称 RAMP),是 Zietkiewicz 等于 1994 年在 SSR (Simple Sequence Repeat)基础上创建、基于 PCR 扩增的一种新型分子标记技术。其原理是根据基因组内广泛存在的微卫星基序设计单一引物。在 5' 或 3' 锚定几个随机碱基,对基因组 DNA 进行扩增,扩增的指纹图可以同时提供基因组内多个位点的序列信息。所用的引物是基于简单序列重复而设计的寡核苷酸引物,用来检测 2 个 SSR 之间的一段短 DNA 序列的差异^[3]。它操作简单,遗传多态性高,重复性好,而且为显性标记。并结合了 RAPD 标记简单、快速和 RFLP 和 SSR 标记可靠的优点,因而近年来得到了广泛的应用^[4],作为一种随机扩增的 PCR 技

第一作者简介:邱长玉(1976-),女,湖北钟祥人,在读硕士,从事作物遗传育种方向研究。E-mail: q6c6y6@163.com.

通讯作者:高国庆。E-mail: gqgao@gxaas.net.

基金项目:青年基金资助(桂科青 0640020)。

收稿日期:2007-10-08

Study on Bulb Scale Culture in Vitro of Lily

LI Min, WANG Jun

(Dalian Flowers Nursery Stock Co. Ltd, Dalian, Liaoning 116033, China)

Abstract: The bulb scales of three lily cultivars 'Brunello', 'Tiber' and 'Sorbonne' were used as explants in the experiment. The effect of different methods of sterilization, different cultivars, different parts and orientation of scales inoculated on culturing in vitro of bulb scales in lily were compared. The results showed that the best method of sterilization was 0.1% HgCl₂ with 8 minutes. The rate of contamination was lower and the rate of survival was up to 90.9%. The rate of contamination could be reduced using the sterilization method for the whole bulb. The differentiation capability of bulblets among lily cultivars was different obviously. The capability from strong to weak was 'Brunello', 'Sorbonne' and 'Tiber'. The capability of different parts of bulb scale to differentiate bulblets from strong to weak was underside, middle and upside. The bulblet regeneration was more when the bulb scales were inoculated upwards with the rate up to 100%.

Key words: Lily; Bulb Scales; Culture in vitro

术 ISSR-PCR 往往受到多种因素的影响,不同作物对反应条件的要求也存在一定的差异^[57]。因此,采用 ISSR 分子标记技术时应首先对其反应体系进行优化筛选。现以茉莉花为研究材料,对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物的浓度、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 的用量以及退火温度等因素的最佳反应条件进行筛选,获得了背景清晰、可重复的扩增条带图谱,建立了适合茉莉花的 ISSR 反应体系,为进一步进行茉莉花种质鉴定、遗传多样性检测、亲缘关系分析等研究奠定了重要的技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 选用品种为广西横县那阳镇东安村和横州镇周塘村提供的扦插苗。用改良后的 CTAB^[8] 法提取 DNA 作为此次 ISSR-PCR 的扩增模板。

1.1.2 试剂 用于 ISSR-PCR 反应的 Taq 酶、dNTP 以及标准分子量 MarkerDL2000 购自上海生工生物工程公司,引物由上海鼎安公司合成,经初步筛选,确定 887DVD(TC)7 为此次试验的引物。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 CTAB 法提取基因组 DNA,用 Eppendorf BioPhotometer 核酸测定仪测定所提 DNA 的浓度和纯度,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

1.2.2 PCR 设计与分析 采用 20 μ L 的反应体系,内含 10 \times buffer 2 μ L, DNA 模板 50 ng, 引物浓度 0.25 μ mol/L, dNTPs 0.15 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, Mg^{2+} 1.5 mmol/L。逐一改变 ISSR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、TaqDNA 聚合酶、DNA 模板的浓度进行 PCR 扩增。各因素设置 5 个水平(见表 1)。在 Biometra Thermocycler 扩增仪上进行扩增,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增反应结束后,每管加入 5 μ L 溴酚蓝,离心混匀后在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳缓冲液为 1 \times TBE,电压不超过 5V/cm,电泳结束后在紫外透射仪上观测并照相。经分析得到茉莉花 ISSR-PCR 的最佳反应水平。

表 1 PCR 反应的因素水平

因素	水平(体系终浓度)				
	1	2	3	4	5
$Mg^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	0.8	1.2	1.6	2.0	2.5
dNTPs/ $mmol \cdot L^{-1}$	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35
引物/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
Taq 酶/ $U(20\mu L)^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

1.2.3 退火温度的筛选 在确定试验最佳反应体系的基础上,对退火温度进行优化筛选,所用引物为 ISSR 887,退火温度为 44~52 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 PCR 体系单因素试验

试验结果表明,ISSR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、DNA 模板、Taq DNA 聚合酶的浓度分别对反应体系有很大的影响。

2.1.1 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, Mg^{2+} 不足,则 Taq 酶的作用效率低。同样,引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响,特别是其中的 Mg^{2+} 浓度能影响反应的特异性和扩增片断的产率^[9]。试验设了 5 个浓度梯度,结果表明(图 1): Mg^{2+} 浓度为 0.8 mmol/L 时,使产生的片断量较少, Mg^{2+} 浓度过低会导致 ISSR 扩增无法正常进行;而浓度为 1.2~1.6 mmol/L 时,能产生清晰的扩增带,背景相对清晰。当 Mg^{2+} 浓度在 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L 时,几乎扩不出清晰的带,在重复性试验中 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的也能扩出带,但条带稳定性不及 1.2~1.6 mmol/L 的体系,且高浓度的 Mg^{2+} 会使引物的错配频率增加,影响扩增的特异性。因此, Mg^{2+} 的适宜用量为 1.2~1.6 mmol/L。

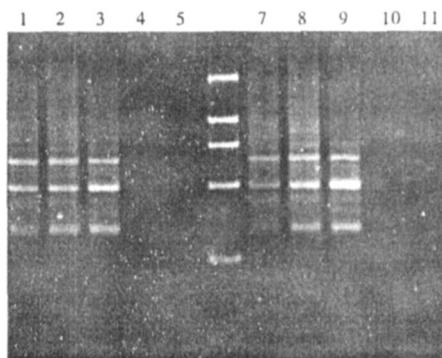


图 1 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

注: 1~5; Mg^{2+} 浓度分别为 0.8、1.2、1.6、2.0、2.5 mmol/L, 7~11 是 1~5 的重复引物; 887, M: marker DL 2000。由上至下依次为 2 000、1 500、1 000、700、400、200 bp。

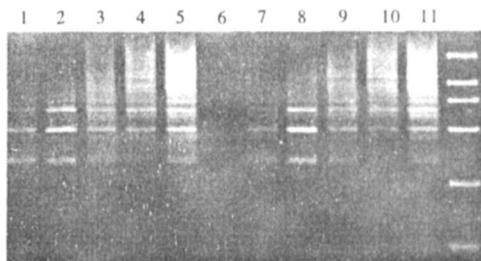


图 2 dNTPs 对 ISSR 扩增的影响

注: 1~5 dNTPs 0.10、0.15、0.20、0.30、0.35 mmol/L, 7~11 是 1~5 的重复。

2.1.2 dNTPs 浓度 dNTPs 是 PCR 反应的原料之一, dNTP 的量对反应的特异性、扩增产物的量有较大的影

响。dNTPs 浓度过低, 分子碰撞的几率降低, 导致扩增带产率低, 因而条带模糊。而过高导致 Taq 酶在非靶位置启动与核苷酸的错配, 产生错误掺入^[10], 从而降低了准确率。从图 2 可以看出, 在各 dNTPs 浓度下都能扩增出一致的条带, 但浓度为 0.35 mmol/L 时, 有的带不能进行有效的扩增, 或者变弱, 说明高浓度的 dNTPs 会抑制相对分子质量较大的条带扩增。考虑到反应的稳定性与可重复性, 0.15 mmol/L 的 dNTPs 浓度较合适。

2.1.3 引物浓度 随机引物浓度的高低也是 PCR 反应中影响因素。浓度太低不能进行有效扩增, 浓度太高又会增加引物二聚体的形成^[11], 导致条带不稳定及清晰度下降。根据 Weising 和 Nybom 等确认的引物浓度 (0.1~2.0 $\mu\text{mol/L}$)^[12], 试验设置了 5 个浓度梯度, 比较对 ISSR 扩增结果的影响。结果表明(图 3): 浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 主带明显, 杂带较少。当达到 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 条带的清晰度下降, 引物浓度越高, 条带越弥散, 扩增结果不理想。模板与引物浓度的比例还关系到可重复性问题。在重复试验中, 引物浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 反应稳定, 条带清晰, 故确定 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 为 ISSR 反应适宜的引物浓度。

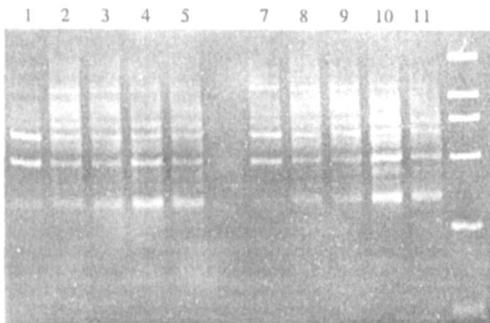


图 3 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

注: 1~5 引物 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 $\mu\text{mol/L}$, 7~11 是 1~5 的重复, 引物: 887。

2.1.4 Taq 酶浓度 Taq 酶的活性与用量直接关系到扩增能否正常进行, 是 PCR 反应中最重要的因子。Taq DNA 聚合酶的浓度太高不仅增加试验成本, 而且极易产生非特异性扩增产物造成假阳性。浓度太低会导致扩增产物不足。在确定酶用量时应考虑到以下两方面的问题: ①Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, 对 Mg^{2+} 浓度非常敏感, 故应选择最适合酶活性的 Mg^{2+} 浓度; ②不同厂家, 甚至同一厂家不同批次的酶在酶活力上也会存在差异, 对 Mg^{2+} 浓度的要求也不同。试验采用的 Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 每个反应体系中从 0.5~2.5 U 分别进行了扩增试验, 结果如图 4。试验结果表明, Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 和 1 U 时扩增谱

带结果稳定, 重复性好, 1.5 U 和 2 U 时扩增谱带出现模糊, 2.5 U 时带型发生变化。所以在确保试验结果稳定的前提下, 每个反应体系应采用的 Taq DNA 聚合酶浓度为 1 U。

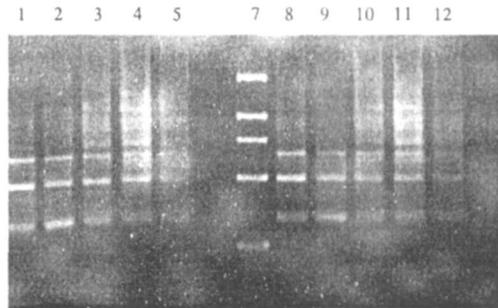


图 4 Taq DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响

注: 1~5 Taq DNA 聚合酶: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U, 7~11 是 1~5 的重复, 引物: 887。

2.1.5 模板浓度 PCR 反应中对模板 DNA 浓度要求的范围通常较宽, 但最佳的 DNA 模板浓度范围取决于研究的物种、类群以及 DNA 模板纯度。尽管理论上一个细胞中的 DNA 量就足够作扩增反应的模板, 但在实际应用中, 一定范围内模板分子数越多则错误扩增越少; 模板含量过高则可能使引物或 dNTP 过早被耗尽, 出现扩增结果不稳定的假象^[13-14]。此外, 扩增效果还与模板 DNA 的纯度有关。研究对不同量的 DNA 模板分别进行了 PCR 扩增, 发现 40~70 ng 的模板 DNA 浓度用于茉莉花 ISSR-PCR 扩增为最佳选择。

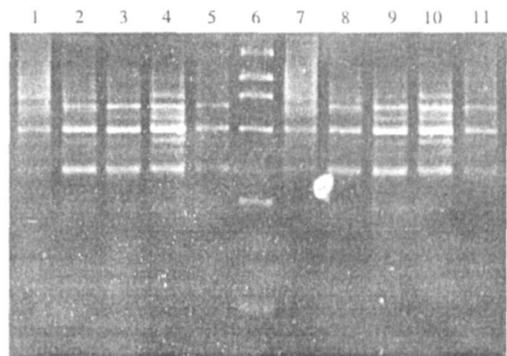


图 5 退火温度对 ISSR 扩增的影响

注: 1~5 退火温度依次是 44、46、48、50、52 $^{\circ}\text{C}$; 7~11 是 1~5 的重复。

2.2 退火温度的确定

引物长度不同, 退火温度就不同, 而且同一引物对于不同材料的退火温度也不同。较低的退火温度能保证引物与模板结合的稳定性, 但也会引起引物与模板产生错配, 产生非特异性条带; 退火温度过高则会抑制引

物与模板的结合^[15]。对于 ISSR 引物的退火温度, 一般根据引物的 T_m 值浮动 $1\sim 3\text{ }^\circ\text{C}$ 。有的研究者采用逐步筛选的方法^[16], 即所有引物先用一个较适宜的温度进行筛选, 总会得到一些扩增谱带清晰的引物, 然后在此温度上下进行下一步的引物筛选, 直到筛完为止。为了得到重复性好、分辨率高的扩增谱带, 最适的退火温度还是通过温度梯度来确定更为准确。从图 5 可以看出, 退火温度较低时($44\sim 46\text{ }^\circ\text{C}$), 产生的杂带多, 背景较深; 当退火温度逐渐升高时($48\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$), 扩增的特异性升高, 杂带减少, 扩增的主带也减少, 弥散背景减少。 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 处理条带清晰, 主带明显, 因此, 确定茉莉花 ISSR-PCR 扩增适宜的退火温度为 $48\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ 。由于 ISSR 的引物长度不同, 可适当调节退火温度, 以提高反应稳定性和重复性。试验其它 PCR 反应采用的退火温度为 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 。

3 讨论

影响 ISSR 结果的因素很多^[17], 为了获得重复性和可靠性较高的 ISSR 谱带, 提高分析的准确性, 需要对不同试验条件下的 PCR 反应体系进行优化。试验筛选出较稳定的茉莉花 ISSR-PCR 的反应体系, 即在 $20\ \mu\text{L}$ 体系中, Mg^{2+} 的浓度为 $1.2\sim 1.6\text{ mmol/L}$, dNTPs 的浓度为 0.15 mmol/L , 引物的浓度为 $0.5\ \mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶的用量为 1 U , 模板 DNA 的用量为 $40\sim 70\text{ ng}$, 按照此体系, 在 $48\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ 的退火温度下循环 40 次。利用此优化系统, 对茉莉花进行 ISSR-PCR 扩增, 能得到清晰、多态性高的 ISSR 带谱, 并具有较好的重复性, 多态位点丰富。

参考文献

- [1] 董利娟, 张曙光. 茉莉花的生产现状与科研方向[J]. 茶叶通讯, 2001(2): 11-13.
[2] 临沧行署科技局. 赴广西横县学习考察茉莉花种植和花茶窰制技术情况报告[J]. 临沧科技, 2002(2): 19-23.

- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger printing by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994 (20): 176-183.
[4] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 36-41, 68.
[5] 冯富娟, 王凤友, 刘彤, 红松. ISSR-PCR 试验系统影响因子[J]. 植物学通报, 2004, 21(3): 326-331.
[6] 宣继平, 章镇. 适合于苹果 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 549-550.
[7] 乔玉山, 章镇, 房经贵, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2002, 20(4): 270-274.
[8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
[9] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 7-14.
[10] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19.
[11] 李忠超. 特有濒危植物八角莲遗传多样性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2002: 57-58.
[12] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 36-41, 68.
[13] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究[J]. 遗传, 2005, 27(5): 753-758.
[14] 佟汉文, 孙群, 吴波, 等. 乌拉尔甘草 ISSR-PCR 反应体系优化研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 156-159.
[15] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
[16] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91-93.
[17] Jonsson B O, Jonsdot tir I S, Cronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic *Carex bigelowii* [J]. Ecol, 1996(84): 449-459.

(致谢: 分子生物学试验在广西农科院重点实验室完成, 特致谢忱!)

Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Jasminum Sambac* (Linn) Aiton.

QIU Chang-yu^{1,2}, GAO Guo-qing¹, CHEN Bo-lun¹, ZHOU Rui-yang², NIU Ying², ZHANG Jia-qiang²

(1. Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: The factors that affecting the ISSR (inter-simple sequence repeat) result of *Jasminum sambac* (Linn) Aiton were studied. By adjusting Mg^{2+} , dNTPs, primer, Taq DNA polymerase and annealing temperature were optimized. The results showed that the optimized content consists of Mg^{2+} was $1.2\sim 1.6\text{ mmol/L}$, dNTPs was 0.15 mmol/L , primer was $0.5\ \mu\text{mol/L}$, Taq DNA polymerase was 1 U , annealing temperature was $48\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$, in zoul reaction system.

Key words: *Jasminum sambac* (Linn) Aiton; ISSR (inter-simple sequence repeat); Analysis system; Optimization