

正交设计对‘红阳’猕猴桃 ISSR 反应体系的优化研究

邱利娜¹, 廖明安¹, 李明章², 王丽华², 郑晓琴²

(1. 四川农业大学 园艺学院 四川 雅安 625014; 2. 四川省自然资源科学研究院 四川 成都 610015)

摘要:以‘红阳’猕猴桃及其杂交 F₁ 代作为试材, 通过正交设计对 ISSR-PCR 扩增反应的影响因子进行优化, 初步确立了适合‘红阳’猕猴桃 ISSR-PCR 反应体系: 总体积 20 μL, 10× PCR buffer 2.0 μL, Mg²⁺ 0.75 mmol/L, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 60 ng, 引物 1.25 μmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L。扩增程序: 94℃预变性 7 min, 94℃变性 30 s, 50~58℃退火 45 s, 72℃延伸 2 min, 45 个循环, 72℃延伸 7 min。引物 UBC841 的最佳退火温度为 58.5℃。应用该优化反应体系, 用 UBC835 对 35 份杂交 F₁ 代 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增, 结果显示优化后的反应体系具有较高的稳定性。

关键词:‘红阳’猕猴桃; 正交设计; ISSR; 反应体系
中图分类号: S 663.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)16—0125—04

猕猴桃为猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 浆果类藤本果树, 全世界共有 66 个种, 栽培品种主要为中华猕猴桃和美味猕猴桃^[1]。大多数栽培品种是绿肉和黄肉品种, 四川省自然资源科学研究院育成的新品种‘红阳’猕猴桃及时的填补了红心猕猴桃的空白, 性状表现稳定, 深受消费者的喜爱^[2]。猕猴桃为多年生、雌雄异株果树, 自然界种间杂交现象普遍, 使得某些种间以及变种间混淆不清, 用常规方法很难准确的研究其遗传背景。DNA 分子技术的发展和应用于猕猴桃研究提供了一条有效的途径。目前 RAPD 技术^[3-5] 较常用, ISSR 技术仅有邹游等^[6] 做了相关研究, 还未见猕猴桃 ISSR 反应体系系统优化的研究报道。该研究旨在通过优化猕猴桃的 ISSR 反应体系, 为今后利用该技术对‘红阳’猕猴桃杂交 F₁ 代的遗传多样性研究和重要经济性状分子标记提供理论依据, 为培育新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料‘红阳’猕猴桃 (1 份) 及其杂交 F₁ 代 (34 份) 由四川省自然资源科学研究院提供。取新梢上刚展

开的嫩叶, 液氮速冻后放入 -70℃ 冰箱备用。ISSR 引物、Taq 酶、dNTPs 等试剂均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[7]。核酸蛋白仪测定 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 ISSR-PCR 反应因子水平的确定 采用正交 L₂₅ (5⁶) 确定 PCR 反应 5 个反应因子 (Taq 酶、Mg²⁺、模板 DNA、dNTPs、引物) 最佳水平 (表 1)。以‘红阳’猕猴桃 DNA 为模板, 引物 UBC817 进行优化。每处理 2 次重复, 按表 1 编号加样, 10× buffer 2.0 μL 加 ddH₂O 补足 20 μL, 在 PTC-200 上进行扩增, 初步反应程序为: 94℃预变性 7 min, 94℃变性 30 s, 53℃退火 45 s, 72℃延伸 2 min, 40 个循环, 72℃延伸 7 min, 4℃保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-RAD 成像仪成像。

1.2.3 引物退火温度和筛选 根据 T_m 值上下浮动 5℃ 设定退火温度范围, PCR 仪自动生成 12 个温度梯度进行筛选。对反应程序的循环次数进行优化。

2 结果与分析

2.1 直观分析法评分

正交 PCR 产物电泳结果由图 1 可知, 对 25 个处理从高到低依次打分, 条带数量丰富、清晰度高、背景低的最佳产物记为 25, 与此相反, 最差的记为 1^[8]。依次计分为: 15、14、4、7、8、22、10、11、19、17、6、1、5、23、12、13、3、9、21、2、25、20、18; 重复电泳的结果与第 1 个结果有较大的一致性, 评分结果: 10、15、7、8、10、18、16、22、11、15、20、17、8、1、5、19、10、12、3、16、20、1、25、24、15。

第一作者简介: 邱利娜 (1984), 女, 在读硕士, 研究方向为果树优质高产高效理论与技术。E-mail: qulina0807@yahoo.com.cn

通讯作者: 廖明安 (1957), 男, 博士, 教授, 现从事果树栽培研究工作。

基金项目: 国际科技合作资助项目 (2009DFA30870); 四川省“十一五”攻关资助项目 (04FB013-016)。

收稿日期: 2010-05-04

表 1 PCR 反应的因素水平 L₂₅ (5⁶) 正交实验设计

编号	Mg ²⁺ /mmol · L ⁻¹	Taq/U	引物/μmol · L ⁻¹	DNA/ng	dNTPs/mmol · L ⁻¹
1	0.50	0.5	0.50	20	0.075
2	0.50	1.0	0.75	40	0.100
3	0.50	1.5	1.00	60	0.125
4	0.50	2.0	1.25	80	0.150
5	0.50	2.5	1.50	100	0.175
6	0.75	0.5	0.75	80	0.175
7	0.75	1.0	1.00	100	0.075
8	0.75	1.5	1.25	20	0.100
9	0.75	2.0	1.50	40	0.125
10	0.75	2.5	0.50	60	0.150
11	1.00	0.5	1.00	40	0.150
12	1.00	1.0	1.25	60	0.175
13	1.00	1.5	1.50	80	0.075
14	1.00	2.0	0.50	100	0.100
15	1.00	2.5	0.75	20	0.125
16	1.25	0.5	1.25	100	0.125
17	1.25	1.0	1.50	20	0.150
18	1.25	1.5	0.50	40	0.175
19	1.25	2.0	0.75	60	0.075
20	1.25	2.5	1.00	80	0.100
21	1.50	0.5	1.50	60	0.100
22	1.50	1.0	0.50	80	0.125
23	1.50	1.5	0.75	100	0.150
24	1.50	2.0	1.00	20	0.175
25	1.50	2.5	1.25	40	0.075

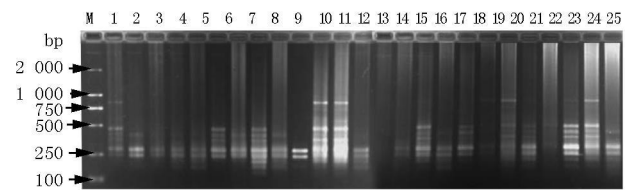


图 1 猕猴桃 ISSR 反应体系正交实验结果

2.2 各因素对 PCR 反应影响的差异分析

DPS 软件对结果进行方差分析结果见表 2 由 *F* 值可知, Mg²⁺ 对 PCR 反应影响最大, 引物最小。各因子水平变化对 PCR 反应影响从大到小依次为: Mg²⁺、dNTPs、*Taq* 酶、模板 DNA、引物。由于各因子水平间的差异均达到显著水平, 需进一步做因素内多重比较。

表 2 PCR 各反应因素的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i>
Mg ²⁺	2 443.0	4	610.75	91.157	0.0001
<i>Taq</i> 酶	2 790.4	4	697.60	22.947	0.0020
引物	2 518.6	4	629.65	12.062	0.0048
DNA	890.4	4	222.60	18.550	0.0033
dNTPs	1 847.4	4	461.85	74.492	0.0001

2.2.1 Mg²⁺ 对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 对 Mg²⁺ 各水平间进行比较分析结果表明, 0.75 和 1.5 mmol/L、0.5 和 1.0 mmol/L、1.0 和 1.25 mmol/L 间差异未达显著水平, 0.75、1.25、1.5 mmol/L 均与 0.5 mmol/L 达到极显

著差异水平, 综合考虑成本和扩增效果, 0.75 mmol/L 为 Mg²⁺ 最佳反应水平。

2.2.2 *Taq* 酶对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 从方差分析可知, *Taq* 酶对 PCR 扩增影响较大, 酶量过低, 扩增产物较少, 过高产生弥散带, 电泳背景加深。对酶各水平比较分析表明, 0.5 U 和 1.5 U 扩增效果较好(图 3), 且两水平间的差异未达到极显著水平, 综合考虑以 1.5 U 水平为最佳反应水平。

2.2.3 dNTPs 对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 dNTPs 水平间比较的结果表明, 0.1、0.15、0.175 μmol/L 的扩增效果较好, 且三者间未达到极显著水平(图 4)。浓度低于 0.15 μmol/L, 扩增的产物较少, 背景比较模糊, 不利于遗传多样性分析, 从结果的准确性角度选择 0.15 μmol/L 为最佳水平。

2.2.4 模板 DNA 对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 由图 5 可知, DNA 模板 20~100 ng 均扩增出条带, 这表明猕猴桃 ISSR 反应体系对模板 DNA 浓度的变化不敏感, 80 ng 与其它水平的差异达到极显著水平, 扩增出的谱带略模糊, 考虑到结果的稳定性及样品的使用量, 选择 60 ng 为最佳水平。

2.2.5 引物对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 由方差分析可知, 引物对扩增结果的影响最小, 在 0.5~1.5 μmol/L 内随着浓度的增加扩增效果呈先上升后下降的趋势, 在 1.25 μmol/L 时达到峰值(图 6), 说明引物浓度对扩增产物电泳信号的强弱有影响, 浓度增加信号增强, 同时浓度过大引起电泳颜色的加深, 影响遗传多样特异条带的分析, 因此选择峰值 1.25 μmol/L 为最佳水平。

2.3 退火温度对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 PCR 反应中, 退火温度对扩增产物的影响较大, 较低的退火温度允许适当错配, 扩大了引物在基因组中配对的随机性, 而较高的退火温度虽可提高配对专一性, 却影响引物与模板的结合程度。以引物 UBC841 为例, 退火温度低于 56℃时, 扩增特异性差, 背景颜色深; 温度较高电泳条带较模糊, 不利于统计, 综合考虑扩增产物的特异性和清晰度, 以 58.5℃为引物 UBC841 的最佳退火温度。

2.4 循环次数对猕猴桃 ISSR-PCR 体系的影响 循环次数对扩增产物的量具有重要的影响, 循环次数不足, 扩增产物量不足, 部分谱带不能检测; 达到反应平台后, 循环次数增多不会使产物明显增加, 反而引起非特异性扩增, 发生错配的比例比较高, 引起弥散现象。该试验通过对 3 个(35、40、45)循环数的筛

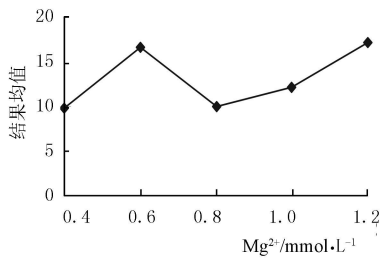


图2 Mg²⁺ 浓度与扩增结果关系

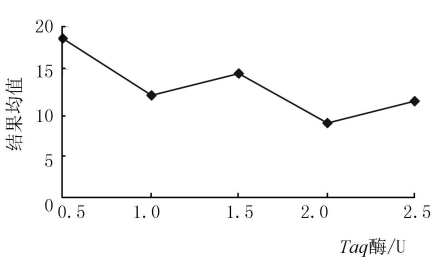


图3 Taq 酶与扩增结果关系

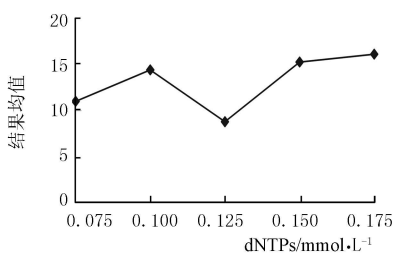


图4 dNTPs 与扩增结果关系

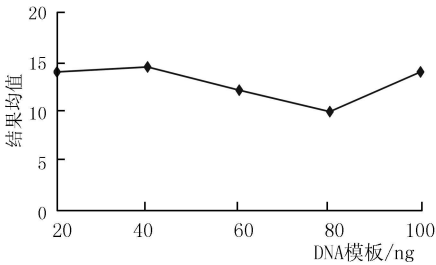


图5 DNA 模板与扩增结果关系

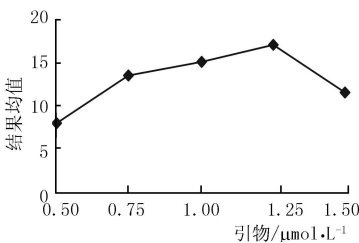


图6 引物浓度与扩增结果关系

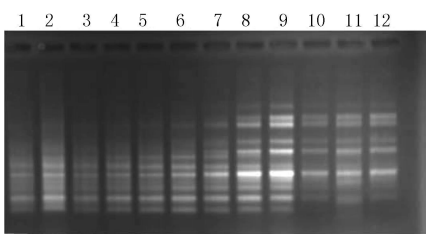


图7 PCR 退火温度梯度电泳结果
注 1~12 依次为 50、50.3、50.9、51.7、52.8、54.3、56.7、4.58、5.59、3.59、8.60℃。

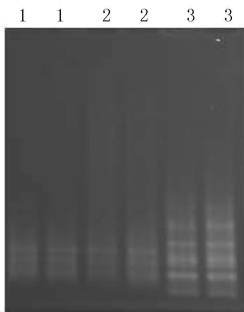


图8 循环次数对扩增结果的影响
注: 1、2、3 表示 35、40、45 个循环数。

选以 45 个循环数的扩增产物丰富、亮度高, 清晰度高(图 8)。

通过优化 PCR 反应体系的各因子, 建立了适合猕猴桃 ISSR-PCR 反应体系: 总体积为 20 μL, 其中 10×buffer 2.0 μL, Mg²⁺ 0.75 mmol/L, Taq 酶 1.5 U, 模板 60 ng, 引物 1.25 μmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L; 扩增程序: 94℃预变性 7 min, 94℃变性 30 s, 退火 45 s, 72℃延伸 2 min, 45 个循环, 72℃延伸 7 min, 最后 4℃保存。采用上述优化体系, 引物 UBC835 对 35 份猕猴桃杂交 F₁ 代进行扩增(图 9), 由图 9 可见, 扩增的条带数量丰富清晰度高, 说明该反应体系和程序稳定, 重复性强, 适合‘红阳’猕猴桃 ISSR 反应。

3 结论与讨论

ISSR 反应体系受多因素影响, 不同物种具有不同的特性, 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, 有必要对各影响因子进行优化以筛选

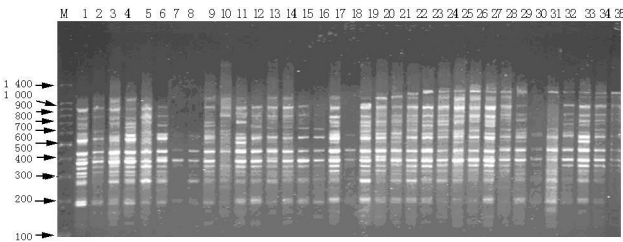


图9 引物 UBC835 在 35 份‘红阳’猕猴桃杂交 F₁ 代中的 ISSR 扩增结果

注 15 号是‘红阳’猕猴桃 其余为‘红阳’猕猴桃杂交 F₁ 代。

出适合‘红阳’猕猴桃的 ISSR 反应体系。

试验结果可知, Mg²⁺ 对 PCR 反应影响最大, 这与王彦华^[9] 的研究一致。dNTPs 次之, dNTPs 是 ISSR 反应的原料, 浓度过高导致 PCR 错配, 容易出现非特异性扩增, 浓度过低影响合成效率, 甚至会因过早的消耗而使产物单链化, 背景模糊, 影响扩增效果^[10]。ISSR 引物的碱基序列较长, 因此对引物退火温度的筛选是必要的, 退火温度较高, 扩增的特异性增强, 条带逐渐减少, 退火温度偏低, 背景模糊, 弱带较多, 不利于结果统计, 通过筛选后的最佳退火温度与引物的 T_m 值之间没有直接联系, 这与郭凌飞等^[11] 的结果一致。付燕等^[12] 在枇杷属的 ISSR 反应体系上 UBC841 退火温度为 58.0℃, 而该试验通过筛选 UBC841 的最佳退火温度为 58.5℃, 结果不一致, 可能是物种不同造成 DNA 模板特性差异, 也可能是实验设备造成的差异。合适的引物浓度不仅可以保证 PCR 反应成功扩增, 而且在提高产物的特异性、

消除背景、消除杂带方面也有重要作用,引物浓度太低不能进行有效扩增,太高易产生新的位点^[13]。

该研究采用正交设计对影响 PCR 反应的各因子进行筛选和优化,优化后的体系和程序在 35 份猕猴桃材料中扩增的条带数量丰富,清晰稳定,重复性好。因此,该研究建立的‘红阳’猕猴桃 ISSR 反应体系可靠稳定,为‘红阳’猕猴桃杂交后代遗传多样性分析等提供了有效依据。

参考文献

- [1] 黄宏文,龚俊杰,王圣梅,等.猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J].生物多样性,2008(1):1-12.
- [2] 王明忠,李明章.红肉猕猴桃新品种“‘红阳’猕猴桃”的选育研究[J].园艺学报,2003(6):610.
- [3] 陈延惠,李洪涛,朱道垠,等. RAPD 分子标记在猕猴桃种质资源鉴定上的应用[J].河南农业大学学报,2003,37(4):360-364.
- [4] Palombi M A, Damiano C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) [J]. Plant Cell Rep., 2002 20: 1061-1066.

- [5] Gill C P, Hrvey C F, Gardner R G et al. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 439-445.
- [6] 邹游,黄敏,侯若彤,等. ISSR 标记技术在猕猴桃遗传研究中的运用[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(1):112-115.
- [7] 魏艳霞, 豁泽春, 王飞, 等. 野生猕猴桃 DNA 的提取及 RAPD 分析体系的建立[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 169-173.
- [8] 何正文, 刘云生, 陈立华, 等. 正交实验直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报 1998 23(4): 403-404.
- [9] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5):899-902.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999:458-463.
- [11] 郭凌飞, 邹明宏, 曾辉, 等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2008 44(5):160-164.
- [12] 付燕, 罗楠, 杨芬, 等. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2009 26(2): 180-185.
- [13] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001:36-97.

Establishment and Optimization of the ISSR Reaction System for ‘Hongyang’ Kiwifruit

QIU Li-na¹, LIAO Ming-an¹, LI Ming-zhang², WANG Li-hua², ZHENG Xiao-qin²

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014; 2. Sichuan Institute of Natural Resources, Chengdu, Sichuan 610015)

Abstract: The orthogonal design was used to optimize ISSR-PCR amplification system on ‘hongyang’ kiwifruit, in five level of five factors which were Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, primer, dNTPs, DNA template respectively. The results showed that the 20 μ L reaction system consisted of 10 \times PCR buffer 2.0 μ L, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 60 ng DNA template, 1.25 μ mol/L primer, 0.15 mmol/L dNTPs and 0.75 mmol/L Mg^{2+} . The optimal PCR amplification process was as following: 1 cycle initial denaturalization at 94 $^{\circ}$ C for 7 min, followed by 45 cycles, which included denaturalization at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing for 45 s, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 2 min, and then extension at 72 $^{\circ}$ C for 7 min, and finally holding the samples at 4 $^{\circ}$ C for ever. The reaction condition of ISSR experiment of kiwifruit was discussed, which was a basis for study on genetic diversity among kiwifruit populations. 58.5 $^{\circ}$ C was the most suitable annealing temperature of UBC841 primer 35 F₁ individuals of ‘RedSun’ kiwifruit were used to tested the stabilization of the optimized reaction system. The results showed that the optimized reaction system was stable.

Key words: ‘Hongyang’ kiwifruit; establishment; ISSR; optimization