

# 国兰 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

刘 菲<sup>1</sup>, 李 萍<sup>1</sup>, 何俊荣<sup>2</sup>, 蒋 彧<sup>2</sup>, 卓碧萍<sup>2</sup>, 孙淑霞<sup>2</sup>

(1. 西南交通大学, 四川 成都 610031; 2. 四川省农业科学院 园艺研究所, 四川 成都 610066)

**摘 要:**采用正交设计与单因素结合法,对国兰 ISSR-PCR 反应体系中的 4 个因素(dNTPs、引物浓度、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶)进行优化试验,结果用 DPS 软件进行分析。结果表明:各因素对 PCR 结果均有显著影响,其中 *Taq* DNA 聚合酶对反应的影响最大;筛选出了各反应因素的最佳水平,建立国兰 ISSR-PCR 的最佳反应体系(25  $\mu$ L)为:dNTPs 0.2 mmol/L、引物 1.0  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U。

**关键词:**国兰;分子标记;ISSR-PCR;反应体系;正交设计

中图分类号:S 682.31 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)17-0136-04

中国兰花习称国兰,兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)植物,包括春兰(*Cymbidium goeringii*)、蕙兰(*C. faberi*)、建兰(*C. ensifolium*)、墨兰(*C. sinense*)、寒兰(*C. kanran*)、莲瓣兰(*C. tortisepalum*)和春剑(*C. tongibracteatum*)7 个种<sup>[1]</sup>。具有极高的经济价值和观赏价值。近年来对于国兰的育种进行了大量研究,选育出了很多优质品种,但是仅凭传统的判断标准来识别并对新品种进行分类以及注册登记等,存在很大的困难。

分子标记技术可以在很大程度上弥补传统判断标准的缺陷,因此广泛应用于植物品种的鉴定。ISSR(Inter

Simple Sequence Repeat)即简单序列重复区间,又称 Inter ISSR,是 1944 年 Zietkiewicz 等发明的一种新分子标记技术<sup>[2]</sup>。其基本原理是在 SSR 的 5' 或 3' 加上 2~4 个随机核苷酸,在 PCR 反应中与特定的引物结合,对结合引物互补区两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增。ISSR 引物设计比较简单,无需知道 SSR 两端的单拷贝序列。和 SSR 标记相比种特异性不强;与 RAPD 相比其多态性更高;可以与 RFLP 的精确度相媲美,而且检测十分方便。目前,ISSR 标记已广泛应用于植物品种鉴定<sup>[3]</sup>、遗传作图<sup>[4]</sup>、基因定位<sup>[5]</sup>、遗传多样性<sup>[6]</sup>、进化及分子生态学研究中<sup>[7]</sup>。但是由于其反应是基于 PCR,其反应条件容易受到  $Mg^{2+}$ 、模板、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 以及引物浓度各种因素的影响,所以需要针对不同物种进行反应体系优化。该研究采用正交设计和单因素试验相结合的方法对 dNTPs、引物浓度、 $Mg^{2+}$  以及 *Taq* DNA 聚合酶 4 个因素进行筛选,对国兰 ISSR 反应体系进行优化,以期获得适合于国兰 ISSR 反应的最佳体系,为国兰的 ISSR 分子标记提供一定的参考。

第一作者简介:刘菲(1986-),女,硕士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yblf1987@163.com。

责任作者:李萍(1962-),女,博士,教授,研究方向为生物化学与分子生物学。

基金项目:四川省科技支撑计划资助项目(09ZC1745);四川省育种工程花卉资助项目;四川省财政厅“草本花卉”资助项目。

收稿日期:2011-06-09

## Study on Tissue Culture of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward

CHEN Ping-fen<sup>1</sup>, LIU Jia-xun<sup>2</sup>, LI Xing-gui<sup>3</sup>, GAO Fei<sup>2</sup>, LIANG Ming-tai<sup>2</sup>

(1. Kunming King-Keys Flower Limited Company, Kunming, Yunnan 650213; 2. Institute of Horticulture, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming, Yunnan 650205; 3. Kunming Institute of Horticulture, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204)

**Abstract:** Taking the semi-lignification stems segments of annual *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward as explants and WPM as the basic medium to study on the effect of different hormone concentrations and combinations on bud induction and rooting of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward. The results showed that the best medium for explants induction was WPM+ZT 2.0+IAA 0.5 add sucrose 30 g/L, agar 4 g/L, pH 5.0. The stem segments of *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward on inductivity had highly reached 83%. The best multiplication medium was WPM+ZT 0.8 mg/L+NAA 0.05 mg/L add sucrose 30 g/L, agar 4 g/L, pH 5.0. The optimal rooting medium was WPM+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, add sucrose 30 g/L, agar 7 g/L+activated carbon 3 g/L, pH 5.0, rooting rate was 93%.

**Key words:** *Rhododendron facetum* Balf. f. et Ward; tissue culture; propagation

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

四川省农业科学院园研究艺所提供的国兰 16 个不同品种,取新鲜幼嫩叶片 1~3 g,立即用液氮研磨,于-80℃下保存。引物序列由上海生工合成;10 × *Taq* Buffer(不含  $Mg^{2+}$ )、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、Trans<sup>2K</sup> Plus DNA Marker 均购于 TransGen 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测 运用 Dellaporta<sup>[8]</sup> 的 CTAB 法提取基因组 DNA,1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,Totalab 软件检测 DNA 含量,稀释到 50 ng/ $\mu$ L 备用。

1.2.2 正交因素及水平设计 对 ISSR-PCR 扩增的体系中的 dNTPs、引物、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶的用量,在 4 个水平上进行试验。PCR 反应中各因素的水平见表 1,正交设计  $L_{16}(4^5)$  见表 2。ISSR 反应对模板含量不太敏感,各浓度都有比较清晰的扩增结果<sup>[9-14]</sup>,所以正交设计中没有考虑模板浓度的影响,该试验模板浓度均选择 50 ng。反应体系总体积为 25  $\mu$ L,10 × buffer 2.5  $\mu$ L,其它成分按照正交设计表 2 加样,不足 25  $\mu$ L 用超纯水补足。单因素试验是根据正交实验的初步结果,在其它因子保持不变的情况下,对某一因按梯度进行变化。从而筛选出各因素的最佳组合。4 个因子处理浓度梯度和正交设计见表 1。

1.2.3 PCR 反应条件 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,44~56℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,40 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存,并与 24 h 内检测。

1.2.4 PCR 产物检测 反应结束后,取 10  $\mu$ L 产物在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳(含 1%核酸染料),TBE(1×)缓冲液,以 Trans<sup>2K</sup> Plus DNA 为 Maker,120 V 电泳 90 min,用紫外凝胶成像系统观测并拍照。

表 1 ISSR-PCR 正交设计因素水平

水平	因素			
	dNTPs/mmol · L <sup>-1</sup>	引物/ $\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	$Mg^{2+}$ /mmol · L <sup>-1</sup>	<i>Taq</i> 酶/U
1	0.1	0.5	1.0	0.5
2	0.2	1.0	1.5	1.0
3	0.3	1.5	2.0	1.5
4	0.4	2.0	2.5	2.0

表 3

16 个处理评分

组合	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	3	12	11	13	5	6	13	12	6	16	1	1	8	13	1	2
2	2	10	10	10	4	5	11	14	2	14	1	2	5	12	1	1
3	2	10	10	11	4	4	12	10	9	13	1	1	7	12	1	1

### 2.3 因素内各水平对 ISSR-PCR 结果的影响

2.3.1 dNTPs 浓度对 PCR 结果的影响 dNTPs 是 PCR 反应的底物,其浓度与扩增产物的生成直接相关。dNTPs 浓度对 PCR 反应影响结果如图 2。由图 2 可以看出,dNTPs 浓度对 PCR 结果影响具有明显的规

表 2 PCR 反应的因素水平  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计

编号	dNTPs/mmol · L <sup>-1</sup>	引物/ $\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	$Mg^{2+}$ /mmol · L <sup>-1</sup>	<i>Taq</i> 酶/U
1	0.1	0.5	1.0	0.5
2	0.1	1.0	1.5	1.0
3	0.1	1.5	2.0	1.5
4	0.1	2.0	2.5	2.0
5	0.2	0.5	1.5	1.5
6	0.2	1.0	1.0	2.0
7	0.2	1.5	2.5	0.5
8	0.2	2.0	2.0	1.0
9	0.3	0.5	2.0	2.0
10	0.3	1.0	2.5	1.5
11	0.3	1.5	1.0	1.0
12	0.3	2.0	1.5	0.5
13	0.4	0.5	2.5	1.0
14	0.4	1.0	2.0	0.5
15	0.4	1.5	1.5	2.0
16	0.4	2.0	1.0	1.5

## 2 结果与分析

### 2.1 电泳结果评分

正交设计 PCR 结果如图 1 所示,根据何正文等<sup>[15]</sup>的方法,根据条带的多少以及亮度进行打分。无条带视为最差记为 1 分,条带最多且最亮视为最好记为 16 分。分数越多表明多态性越好,灵敏度越高。该试验 ISSR-PCR 正交设计设 3 次重复,统一计分,各处理打分情况见表 3。

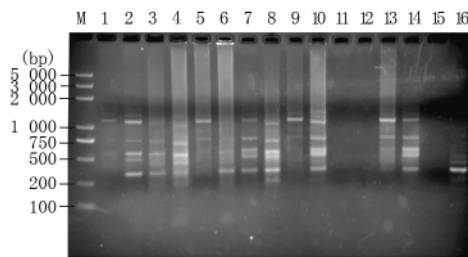


图 1 正交实验 PCR 扩增结果(1~16 处理编号见表 2)

注:M;Trans2K Plus DNA Marker,图 4、图 7、图 8 同。

### 2.2 各因素对 ISSR-PCR 反应体系影响

将上述打分结果运用 DPS 软件进行方差分析<sup>[16]</sup>,结果如表 3 所示,方差大小反映了各因素对体系的影响情况。结果分析可见,*Taq* DNA 聚合酶对反应结果的影响最大,而 dNTPs 对反应的影响则最小。由表 4 可知,4 个因素对反应结果影响的顺序是 *Taq* 酶> $Mg^{2+}$ >引物>dNTPs。可以看出各因素水平间的差异达到了显著水平,因此进行各因素内的多重分析比较。

律,即在 0.1~0.2 mmol/L 的浓度区间内整体效果较好,并且具有缓慢的上升趋势;在 0.2~0.3 mmol/L 的浓度区间内 PCR 结果呈明显的下降趋势;且在 0.3~0.4 mmol/L 的浓度区间差异不显著。结合单因素试验,结果如图 4(1~4)所示,浓度过高(0.4 mmol/L)错

配率增加,可能是与  $Mg^{2+}$  竞争从而使 *Taq* DNA 聚合酶的作用效率降低,反而使扩增效果变差。2 号浓度即 0.2 mmol/L 所得结果最清晰。因此该试验选择 dNTPs 的最佳水平为 0.2 mmol/L。

表 4 PCR 反应各因素间方差分析

误差来源	方差	自由度	S	F 值	P
dNTPs	40.33333	3	13.44444	22	<0.05
引物	81.16667	3	27.05556	44.27273	<0.05
$Mg^{2+}$	208.8333	3	69.61111	113.9091	<0.01
<i>Taq</i> 酶	365.1875	3	121.7292	199.1932	<0.01
误差	1.833333	3	0.611111		

2.3.2 引物浓度对 PCR 结果的影响 引物浓度在很大程度上决定 PCR 的带型,浓度过低不能扩增,浓度过高又会产生新的位点<sup>[17]</sup>。引物浓度对 PCR 反应影响结果如图 3。引物浓度在 0.5~1.0  $\mu$ mol/L 的 PCR 的结果有明显差异,且呈明显的上升趋势;1.0~1.5  $\mu$ mol/L 差异显著,并呈明显的下降趋势;1.5~2.0  $\mu$ mol/L 差异不显著。结合单因素试验,结果如图 4 (5~8)6 号浓度即 1.0  $\mu$ mol/L 所得结果最清晰。因此该试验选择 1.0  $\mu$ mol/L 为最佳引物浓度。

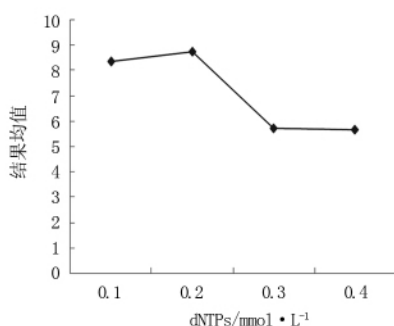


图 2 dNTPs 浓度与结果均值关系

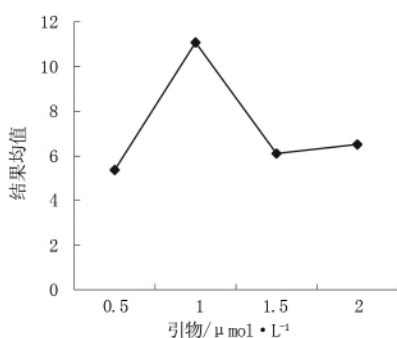


图 3 引物浓度与结果均值关系

2.3.3  $Mg^{2+}$  对 PCR 结果的影响  $Mg^{2+}$  在 PCR 中是通过改变聚合酶的活性来产生影响, $Mg^{2+}$  浓度过低时 *Taq* 酶活性较低,扩增产物较少; $Mg^{2+}$  浓度过大时由于酶活性过高,可能产生大量非特异性的弥散带,甚至扩增产物消失。 $Mg^{2+}$  各浓度对结果的影响见图 5,表现为 1.0~2.5 mmol/L 范围内,反应结果均值随  $Mg^{2+}$  浓度的增加呈正比例递增。同时结合单因素试验,结果如图 7(1~4),浓度过低时(1~1.5 mmol/L)扩增产物带型弱,在 2.5 mmol/L 获得稳定清晰地条带。因此

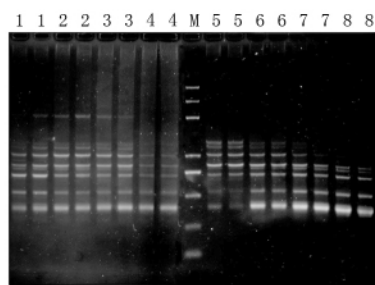


图 4 dNTPs、引物浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

该试验选择 2.5 mmol/L 为最佳反应浓度。

2.3.4 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 结果的影响 由方差结果可知 *Taq* DNA 聚合酶是 PCR 反应的主要影响因素。由此可知酶量在 PCR 反应中起着举足轻重的作用。*Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 反应影响结果如图 6。在 0.5~1.0 U 浓度区间里结果差异显著,并且呈明显的上升趋势;在 1.0~1.5 U 浓度区间里呈明显的下降趋势;而在 1.5~2.0 U 浓度区间无明显差异。结合单因素试验,结果如图 7(5~8),在 0.5~2.0 U 区间均有清晰稳定的条带,1 U 即 6 号所获结果最为清晰稳定。因此该试验的酶浓度选为 1 U。

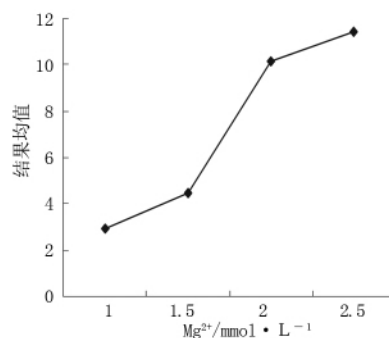


图 5  $Mg^{2+}$  浓度与结果均值关系

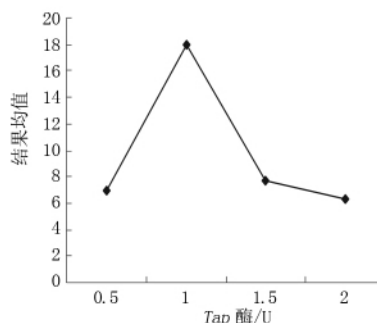


图 6 *Taq* 酶浓度与结果均值关系

综上所述,该试验的反应条件为 25  $\mu$ L:10×buffer 2.5  $\mu$ L,dNTPs 0.2 mmol/L、引物 1.0  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L、*Taq* 酶 1U。

#### 2.4 ISSR-PCR 体系稳定性的检测

选择 ISSR 引物 U827 对优化确立的国兰 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测。由图 8 可知,选用的引物 U827 对所检测的国兰 16 个品种都能扩增出清晰、重复性好的谱带,表明优化确立的国兰 ISSR-PCR

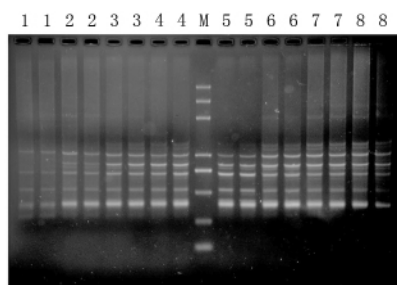


图7  $Mg^{2+}$ 、 $Taq$  酶浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

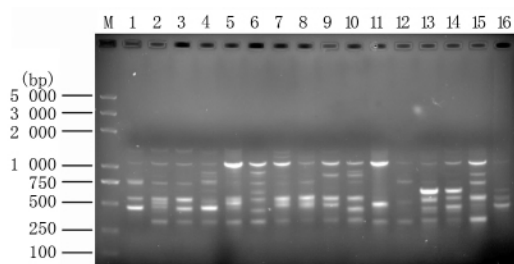


图8 引物 U827 对 16 种不同国兰的 ISSR 扩增结果

注:1. 龙泉局;2. 张荷素;3. 翠盖;4. 宋梅;5. 墨兰;6. 三星蝶(夏兰);7. 隆昌素;8. 天香蝶;9. 皇冠蝶;10. 秋素;11. 送春;12. 绿花蕙兰;13. 红蝉;14. 醉妃;15. 副瓣蝶(夏兰);16. 笑春。

体系是稳定可靠的。

### 3 结论与讨论

$Mg^{2+}$ 、 $Taq$  DNA 聚合酶、dNTPs、引物、模板 DNA 浓度都会对 ISSR 的扩增结果产生影响。对于不同物种在不同的试验条件下,需要对这几个因素进行最佳组合的优化。该试验不同处理间确实存在显著的差异, $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L、 $Taq$  酶 1 U、dNTPs 0.4 mmol/L、引物 1.0  $\mu$ mol/L 为该试验的最佳反应条件,此外大量的研究表明,DNA 模板浓度对 ISSR-PCR 反应的影响不大,因此该试验未对模板 DNA 浓度进行考察,选择 DNA 模板浓度为 50 ng。

该研究利用正交设计与单因素水平相结合的方法,克服了正交设计的主观性,很好地弥补了单因素水平间各因子缺少的互作效应。结合分析软件,迅速得到

ISSR-PCR 反应的最佳试验条件,使结果的分析更加客观、科学和简便。最后采用最佳因素水平组合对反应体系进行验证,所得结果条带清晰,多态性好,证明此优化体系结果可靠,可以用于国兰的 ISSR 分子标记中。

### 参考文献

- [1] 陈心启,吉占和. 国兰、洋兰三百问[M]. 北京:中国林业出版社,1996:108-109.
- [2] Ziefkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple Sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Gnomics, 1994, 20: 176-183.
- [3] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. ISSR amplification for analysis of micro satellite motif frequency and fingerprinting in rice [J]. Theor. Appl. Genet, 1999, 98: 780-792.
- [4] Kojima T, Nagaoka T, Noda K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. Theor. Appl. Genet, 1998, 96: 37-45.
- [5] Ratna Parkhem B, Santra D K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. Theor. Appl. Genet, 1998, 96: 348-353.
- [6] Joshi S P, Aggarwal R K, Ranjekar P K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor. Appl. Genet, 2000, 100: 1311-1320.
- [7] 祁建民,王涛,陈顺辉,等. 部分烟草种质遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 标记分析[J]. 作物学报, 2006, 32(3): 373-378.
- [8] Dellaport S L, Wood J, Hicks J B. A rapid method for DNA extraction from plant tissue [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983(1): 19-21.
- [9] 肖海峻,孟利前,李玉冰. ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. 内蒙古农业科技, 2006(4): 31-33.
- [10] 潘坤,王文泉,吴翼,等. 椰子 ISSR 体系优化[J]. 中国农学通报, 2009, 25(4): 24-29.
- [11] 曾黎辉,洪自同,许家辉,等. 龙眼 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 111-113.
- [12] 杨传平,潘华,魏志刚,等. 白桦 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(6): 1-3.
- [13] 张立荣,刘大群,徐大庆,等. 小麦 ISSR 分析初探[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(1): 10-13.
- [14] 原勤勤,文亚峰,何刚,等. 用正交设计法优化枣树 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中南林业科技大学学报, 2010(2): 70-74.
- [15] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [16] 曾艳玲,谭晓风,曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系[J]. 湖北农业科学, 2008(11): 1235-1237.
- [17] 邹喻萍,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: 36-97.

## Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System of Chinese Cymbidium

LIU Fei<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, HE Jun-rong<sup>2</sup>, JIANG Yu<sup>2</sup>, ZHUO Bi-ping<sup>2</sup>, SUN Shu-xia<sup>2</sup>

(1. Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031; 2. Institute of Horticulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066)

**Abstract:** Using the orthogonal design and single factor experiment to optimize ISSR-PCR amplification system of four factors (dNTPs, primer,  $Mg^{2+}$  and  $Taq$  DNA polymerase,) respectively. PCR results showed that each factor in different levels has significant effect on the result of PCR, the most remarkable factor was the quantity of  $Taq$  DNA polymerase. The optimum level of ISSR-PCR system for jujube was established. The total reaction system was 25  $\mu$ L and contained 0.2 mmol/L dNTPs, 1.0  $\mu$ mol/L Primer, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 1 U  $Taq$  DNA polymerase.

**Key words:** Chinese cymbidium; molecular marker; ISSR-PCR; reaction system; orthogonal design