

# 云南松 ISSR-PCR 反应体系建立及优化

赵 雷<sup>1</sup>, 张继兰<sup>2</sup>

(1. 昆明兴海绿化有限公司, 云南 昆明 650228; 2. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

**摘 要:** 为建立和优化云南松 ISSR-PCR 反应体系, 运用正交实验分析了模板 DNA、Tag DNA 聚合酶、引物、Mg<sup>2+</sup> 和 dNTPs 5 个因子对云南松 ISSR-PCR 反应的影响。结果表明: 云南松 ISSR-PCR 25  $\mu$ L 反应体系中 5 个因子最佳水平为: DNA 模板为 3.6 ng、Tag DNA 聚合酶为 2.0 U、引物浓度为 0.8 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L、Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.0 mmol/L。

**关键词:** 云南松; ISSR-PCR 反应; 体系优化

**中图分类号:** S 791.257 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2012)12-0130-04

云南松(*Pinus yunnanensis*) 为松科常绿针叶乔木, 广泛分布于北纬 23°~29°, 东经 98°~106°的西藏东南部、四川西南部、贵州西部、广西西部及云南的大部分地

区<sup>[1]</sup>。云南松以云南高原为其起源和分布中心, 在形态水平上分化强烈, 生态地理变异突出, 形成了生态小种地盘松(*P. yunnanensis* var. *pygmaea* (Hsueh) Hsueh) 和地理小种细叶云南松(*P. yunnanensis* var. *tenuifolia* Chenget Law)。云南松具有生长较快、材质较好、耐干旱瘠薄、天然更新能力强等优良品性, 是西南地区荒山造林先锋树种和主要的用材树种<sup>[2-3]</sup>。目前云南松在遗传多样性<sup>[4-5]</sup>、种源选优<sup>[6-8]</sup> 和非木质资源开发<sup>[9-10]</sup> 等方面研究进展显著, 但在分子标记种源鉴定和辅助育种等生化研究方面报道甚少。

**第一作者简介:** 赵雷(1962-), 男, 云南昆明人, 本科, 工程师, 现主要从事园林苗木繁育和园林设计与施工。

**基金项目:** 云南省应用基础研究资助项目(2010ZC089); 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室开放基金资助项目(BC2010F04); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(09C0185); 西南林学院基金资助项目(200611); 云南省园林植物与观赏园艺重点学科建设资助项目。

**收稿日期:** 2012-03-27

## 参考文献

- [1] 周以良. 黑龙江省植物志[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1985: 300.
- [2] 王丽红, 刘娟, 贝雷, 等. 黑龙江省光果葶苈的资源调查及开发利用[J]. 北方园艺, 2009(9): 43-45.
- [3] 王丽红, 刘娟, 高歌. 光果葶苈的化学成分分析[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(4): 46.
- [4] 吴谋成, 况成生, 黄伟. 用液相制备色谱从菜籽中分离、纯化制备硫代葡萄糖苷[J]. 色谱, 1995, 13(1): 4-7.
- [5] 彭爱娟, 唐桂芬, 兰尊海. 油菜籽粕中提取硫苷的实验[J]. 郑州牧业

工程高等专科学校学报, 2000, 20(2): 92-93.

- [6] Ishida M, Takahata Y, Kaizuma N. Simple and rapid method for the selection of individual plants low in Glucosinolates[J]. Breeding Science, 2003, 53: 291-296.

- [7] Yuan L F, Guo W Q, Wang Z G, et al. Determination of glucosinolates by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Zhejiang University(Sciences Edition), 2004, 31(2): 180-183.

- [8] 褚庆华, 倪昕路. 油菜籽及其饼粕中硫代葡萄糖苷总量快速测定方法的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 79-83.

(该文作者还有缪月英, 工作单位同第一作者。)

## Determination Glucosinolates Content in *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. by HPLC

WANG Li-hong<sup>1</sup>, WU Li-li<sup>1</sup>, WU Dong-mei<sup>1</sup>, LUAN Fang<sup>1</sup>, WANG Feng-zhi<sup>2</sup>, SUN Wei-jia<sup>1</sup>, MIAO Yue-ying<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002)

**Abstract:** Taking Allyl glucosinolate as internal standard substance, The content of glucosinolates on the herbs of *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. in different harvesting were determined by HPLC internal standard method. The results showed that the content of glucosinolates of its seedling stage and flowering were 275.696  $\mu$ mol/g and 85.1246  $\mu$ mol/g.

**Key words:** *Draba nemorosa* L. var. *Leiocarpa* Lindl.; glucosinolates; HPLC internal standard method

ISSR(Inter-simple Sequence Repeat)由 Zietkiewicz E 等<sup>[11]</sup>于 1994 年创建,因其具有分布广、多态性高、DNA 用量少且质量要求低、无辐射、技术难度低、操作简单、重复性高、耗时少、成本低等优点,广泛用于遗传和物理图谱建立、基因定位与克隆、数量性状位点遗传分析、遗传多样性评估、物种起源和分子标记辅助育种等<sup>[12-13]</sup>。因不同植物对 ISSR-PCR 反应体系要求不同,因此在利用 ISSR 标记之前,必须建立该种植物最适 ISSR-PCR 反应体系。该研究旨在通过正交实验分析模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、引物、 $Mg^{2+}$  和 dNTPs 5 个因子对云南松 ISSR-PCR 反应影响,并据此建立云南松最适 ISSR-PCR 反应体系,为利用 ISSR 标记对其进行后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为云南松,由西南林业大学林木遗传育种重点实验室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 云南松基因组 DNA 提取 采用改良 CTAB 法提取云南松基因组 DNA<sup>[14]</sup>。

1.2.2 云南松 ISSR-PCR 反应引物筛选 从加拿大哥伦比亚大学公布的 60 个 ISSR 引物中随机选择 8 个引物:801(AT)<sub>8</sub>T、804(AT)<sub>8</sub>A、812(GA)<sub>8</sub>A、818(CA)<sub>8</sub>G、831(AC)<sub>8</sub>YA、836(AT)<sub>8</sub>YA、838(TA)<sub>8</sub>RC、848(CA)<sub>8</sub>RG 进行目标引物筛选。初反应体系中 *Taq* 酶浓度 1 U/(25 $\mu$ L)、 $Mg^{2+}$  浓度 2 mmol/L、DNA 浓度 6 ng/(25 $\mu$ L)、dNTP 浓度 0.4 mmol/L、引物浓度 2 mmol/L,共计 25  $\mu$ L。扩增程序为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,52.5℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,共 40 个循环,72℃ 延伸 5 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行扩增产物检测。

1.2.3 云南松 ISSR-PCR 反应体系建立 对云南松 ISSR 反应 5 因子(*Taq* 酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、DNA 浓度、dNTPs 浓度、目标引物浓度)进行 4 浓度梯度试验,共 16 个处理  $L_{16}(4^5)$ ,3 次重复,建立云南松 ISSR-PCR 反应体系。

## 2 结果与分析

### 2.1 目标引物确定和正交实验设计

由图 1 可知,8 个引物中 3 个引物(引物 812、817 和 818)有扩增条带,进一步比较扩增条带清晰度和多态性,发现引物 812 效果最好,确定引物 812 为目标引物进行云南松 ISSR-PCR 反应体系建立。据该引物 ISSR-PCR 反应所采用的反应体系进行云南松 ISSR-PCR 反应体系 5 因素 4 梯度正交实验设计(表 1)。

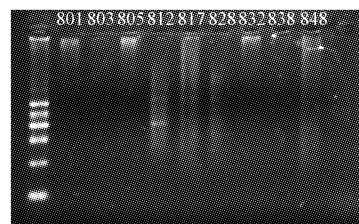


图 1 云南松 8 个引物 ISSR-PCR 反应结果

Fig. 1 ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis* with eight primers

表 1 云南松 ISSR-PCR 反应体系正交实验设计

Table 1 Orthogonal design for ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis* Franch

水平 Level	因素 Factor				
	模板 DNA 浓度 Concentration of template DNA	<i>Taq</i> 酶浓度 Concentration of <i>Taq</i> enzyme	引物浓度 Primer concentration	dNTPs 浓度 Concentration of dNTPs	$Mg^{2+}$ 浓度 Concentration of $Mg^{2+}$
	/ng · (25 $\mu$ L) <sup>-1</sup>	/U · (25 $\mu$ L) <sup>-1</sup>	/nmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>
1	3.00	0.40	0.20	0.08	1.20
2	3.00	1.20	0.40	0.20	1.60
3	3.00	2.00	0.60	0.32	2.00
4	3.00	2.80	0.80	0.44	2.40
5	3.60	0.40	0.40	0.32	2.40
6	3.60	1.20	0.20	0.44	2.00
7	3.60	2.00	0.80	0.08	1.60
8	3.60	2.80	0.60	0.32	1.20
9	4.20	0.40	0.60	0.44	1.60
10	4.20	1.20	0.80	0.32	1.20
11	4.20	2.00	0.20	0.32	2.40
12	4.20	2.80	0.40	0.08	2.00
13	4.80	0.40	0.80	0.08	2.00
14	4.80	1.20	0.60	0.32	2.40
15	4.80	2.00	0.40	0.44	0.12
16	4.80	2.80	0.20	0.32	1.60

### 2.2 云南松 ISSR-PCR 正交实验综合分析

基于引物 812 云南松 ISSR-PCR 反应体系 5 因素 4 梯度正交实验结果,由图 2 可知,16 个处理除 1、5 和 9 之外,其余 13 个处理都能够扩增出清晰条带,且每个处理 3 个重复效果一致。进一步从带的清晰度和多态性比较 7 个处理的扩增效果,处理 16 带多态性最好(每个重复有 9 条带)、条带最清晰。由表 1 可知,该体系 DNA 浓度为 3.6 ng/25 $\mu$ L、*Taq* 酶浓度为 2.0 U/25 $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  浓度为 1.6 mmol/L、引物浓度为 0.8 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.08 mmol/L。为便于对其进行准确分析,以 Marker 电泳带数量和亮度为参照,参考何正文等<sup>[15]</sup>确定的正交设计直观分析方法打分,为 16 个处理进行打分。具体打分标准为:带数为 4 以上=10 分,3=8 分,2=6 分,1=4 分,0=2 分;亮度最亮=10 分,很亮=8 分,较亮=6 分,微亮=4,不亮=2 分;3 个重复分数总和为每个处理

最后得分。由表 2 可知,第 7 处理的得分为最高,第 12 处理次之,第 14 处理第 3,第 3、4、6、8、10、11、13、15、16 基本可见带数,但是带数和亮度没有达到一个很好水平,其它的处理基本不见带数,效果不佳。

表 2 云南松 ISSR-PCR 反应 16 个处理评分

Table 2 Mark on 16 disposal for ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis*

序号 Serial number	带数 Band number	亮度 Luminance	带数 Band number	亮度 Luminance	带数 Band number	亮度 Luminance	合计 Summation
1	2	2	2	2	2	2	12
2	2	4	2	4	2	4	18
3	10	6	10	4	4	4	36
4	8	8	10	6	8	4	44
5	4	4	4	4	4	4	24
6	10	6	10	6	10	6	48
7	10	8	10	10	10	10	58
8	8	4	6	4	6	4	32
9	2	2	2	2	2	2	12
10	4	4	6	4	8	6	32
11	2	2	8	6	8	6	32
12	10	10	10	8	8	10	56
13	6	4	6	4	6	4	30
14	10	8	10	8	10	8	54
15	6	4	4	6	6	4	30
16	8	8	6	4	6	4	36

表 3

云南松 ISSR-PCR 正交实验 5 个因子评分

Table 3 Mark on 5 factor for orthogonal design for ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis*

Mg <sup>2+</sup> 浓度 Concentration of Mg <sup>2+</sup> /mmol · L <sup>-1</sup>	平均评分 Average score	dNTPs 浓度 Concentration of dNTPs /mmol · L <sup>-1</sup>	平均评分 Average score	引物浓度 Primer concentration /mmol · L <sup>-1</sup>	平均评分 Average score	Taq 酶浓度 Concentration of Taq enzyme /U · (25μL) <sup>-1</sup>	平均评分 Average score	模板 DNA Concentration of template DNA /ng · (25μL) <sup>-1</sup>	平均评分 Average score
1.2	26.5	0.08	39.0	0.2	32.0	0.4	19.5	3.0	27.5
1.6	31.0	0.20	29.5	0.4	32.0	1.2	38.0	3.6	40.5
2.0	42.5	0.32	36.5	0.6	33.5	2.0	39.0	4.2	33.0
2.4	38.5	0.44	33.5	0.8	41.0	2.8	42.0	4.8	37.5

2.3.2 Mg<sup>2+</sup> 浓度影响 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 扩增特异性和产物有显著影响, Mg<sup>2+</sup> 浓度过低, Taq 酶作用效率低, PCR 产物多样性不高; 浓度过高后, 容易产生非特异性弥散带。该试验结果与上述原理一致。Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1.2~2.4 mmol/L 范围变化时, 反应结果出现先升高后降低的趋势, 在浓度为 2 mmol/L 时效果最好(平均评分为 42.5 分), 故选取 2 mmol/L 为云南松 ISSR 反应体系中 Mg<sup>2+</sup> 的最佳浓度。

2.3.3 dNTP 浓度影响 dNTP 作为 PCR 反应的原料, 浓度太低会使扩增不完全, 从而降低 PCR 产物产量; 浓度过高会对 Mg<sup>2+</sup> 产生抑制作用, 降低 Mg<sup>2+</sup> 的有效浓度, 影响 Taq 酶的活力, 造成浪费。在该试验设置的 4 个(0.08~0.44 mmol/L) 浓度梯度范围内, 扩增效果一直在下降, 在浓度为 0.08 mmol/L 时效果最好, 平均评分为 39.0 分。至于浓度下降之后效果是否增强还有待

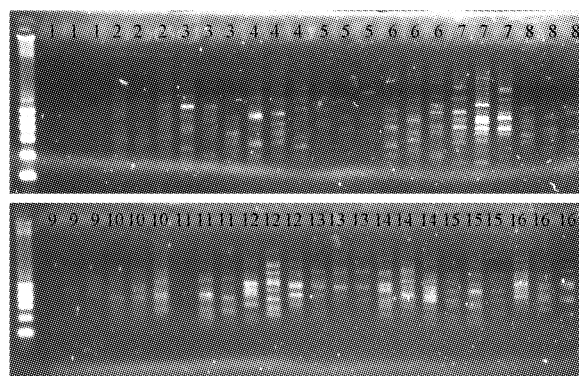


图 2 云南松 ISSR-PCR 5 因素 4 浓度正交实验结果

Fig. 2 Experimental result of L16(4<sup>5</sup>) orthogonal design for ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis*

### 2.3 云南松 ISSR-PCR 正交实验单因子分析

2.3.1 Taq 酶浓度影响 Taq 酶用量直接影响扩增反应成功与否, 使用高浓度 Taq 酶不仅成本高, 而且易产生非特异扩增产物, 但如 Taq 酶浓度过低, 则会导致产物合成效率下降。由图 2 可知, Taq 酶浓度在 0.4~2.8 U/25μL 范围变化时, 扩增效果(主要指扩增条带亮度和多态性, 下同)呈直线增强趋势, 在浓度为 2.8 U/25μL 条带平均评分 42.0 分, 扩增条带亮度和多态性均最好, 故选取 2.8 U/25μL 作为云南松 ISSR-PCR 反应体系中 Taq 酶的最佳浓度。

进一步验证。

2.3.4 引物浓度的影响 当引物浓度为 0.2~0.6 μmol/L 时, 扩增效果随浓度增加差异不明显, 平均评分分别为 32.0 分、32.0 分和 33.5 分。当引物浓度增至 0.8 μmol/L 时, 扩增效果明显增强, 平均评分为 41.0 分, 说明浓度过低会使扩增不完全, 故选取 0.8 μmol/L 为云南松 ISSR 反应体系中引物的最佳浓度。

2.3.5 模板 DNA 浓度的影响 同 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 扩增效果一样, 当模板 DNA 浓度为 3.0~4.8 ng/25μL 范围变化时, 扩增效果出现先升高后降低的趋势, 在浓度为 3.6 ng/25μL 时效果最好, 平均评分为 40.5 分, 所以选取 3.6 ng/25μL 为云南松 ISSR 反应体系中模板 DNA 的最适浓度。

### 3 结论与讨论

正交实验结果表明, 云南松 ISSR-PCR 25 μL 反应体



系中 5 个因子的最佳水平: *Tag* 酶浓度为 2.0 U/25 $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  浓度为 2 mmol/L、dNTP 浓度 0.2 mmol/L、引物浓度为 0.8  $\mu$ mol/L、DNA 浓度 3.6 ng/25 $\mu$ L。

ISSR-PCR 因其引物的非特异性,在研究基础相对薄弱的植物上应用较多,如在灯盏花<sup>[16]</sup>、半夏<sup>[17]</sup>和山荆子<sup>[18]</sup>等中药材以及勃氏甜龙竹<sup>[19]</sup>、龙牙百合<sup>[20]</sup>、马尾松<sup>[21]</sup>、枇杷<sup>[22]</sup>等园林植物。ISSR-PCR 反应体系是一个多因子协同控制的综合反应,单独各因子对反应有影响,各因子之间也对反应结果也存在影响。因此只能采用多因素多梯度的正交实验才能准确定位反应体系及各因子对反应结果的影响。该试验结果为进一步利用 ISSR 分子标记技术对云南松进行种质资源鉴定、遗传多样性分析及遗传图谱构建等研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 郑万均,傅立国.中国植物志[M].第7卷.北京:科学出版社,1978:203-281.
- [2] 吴征镒,朱彦承,姜汉桥.云南植被[M].北京:科学出版社,1987:417-419.
- [3] 黄瑞富.云南松的种群遗传与进化[J].云南大学学报(自然科学版),1993,11(1):50-63.
- [4] 王昌命,王锦,姜汉桥.云南松针叶的比较解剖学研究[J].西南林学院学报,2003,23(4):4-7.
- [5] 王昌命,王锦,姜汉桥.云南松针叶比较形态学研究[J].西南林学院学报,2004,24(1):1-5.
- [6] 虞泓,杨彩云,徐正尧.云南松居群花粉形态多样性[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21(2):86-89.
- [7] 曾郁珉,谢红春.云南松母树林遗传增益的研究[J].广西林业科学,2004,33(3):130-133.
- [8] 周蛟,张兆国,伍聚奎.云南松天然优良林分早期遗传增益研究[J].西南林学院学报,1994,14(4):215-221.
- [9] 邱坚.云南松花粉饮料的研制[J].西南林学院学报,2002,22(3):57-59.
- [10] 殷彩霞,朱光辉,周楠.云南松枝梢营养成分分析[J].广东微量元素科学,2004,11(5):58-60.
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [12] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物 DNA 标记辅助育种[J].北京:北京科学出版社,2001:15-16.
- [13] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005:143-150.
- [14] 孙正海,萧凤回,曾亚文,等.粳稻近等基因系糙米钙含量 SSR 标记筛选及 QTL 分析[J].西北植物学报,2010,30(3):481-486.
- [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] 杨生超,文国松,刘雪玲,等.灯盏花种质资源遗传关系的 ISSR 分析[J].中草药,2010,41(9):1523-1527.
- [17] 张瑾,谈献和,王康才,等.江苏不同产地半夏遗传多样性的 ISSR 分析[J].南京农业大学学报,2010,26(2):130-132.
- [18] 王雷宏,郑玉红,汤庚国.8个山荆子居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].西北植物学报,2010,30(7):1337-1343.
- [19] 阮桢媛,杨汉奇,田波,等.勃氏甜龙竹 6 个云南地理种群的 ISSR 多样性分析[J].北京林业大学学报,2010,32(2):46-51.
- [20] 李恩香,黄玉琴,蒋满英,等.江西省龙牙百合种质资源遗传多样性研究[J].园艺学报,2010,37(5):811-816.
- [21] 张一,储德裕,金国庆,等.马尾松亲本遗传距离与子代生长性状相关性分析[J].林业科学研究,2010,23(2):215-220.
- [22] 王永清,付燕,杨琴,等.枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J].林业科学,2010,46(4):49-57.

## Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Pinus yunnanensis* Franch

ZHAO Lei<sup>1</sup>, ZHANG Ji-lan<sup>2</sup>

(1. Xinghai Greening Limited Company in Kunming, Kunming, Yunnan 650228; 2. College of Horticulture and Gardening, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** Effect for ISSR-PCR reaction of *Pinus yunnanensis* on five factors (DNA template, *Tag* DNA, primer,  $Mg^{2+}$  and dNTPs) were analysed by orthogonal design for establishing and optimizing ISSR-PCR reaction system of *Pinus yunnanensis* Franch. The results showed that the optimal ISSR-PCR reaction system (25  $\mu$ L) mixture contained 3.6 ng DNA template, 2.0 U *Tag* DNA, 0.8 mmol/L primer, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$  and 0.20 mmol/L dNTPs.

**Key words:** *Pinus yunnanensis* Franch; ISSR-PCR reaction; optimization of system