

长白山区杓兰属植物 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立

孙叶迎, 陈丽飞, 刘树英, 刘昕, 曹岩, 刘洪章

(吉林农业大学 生命科学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以长白山区的 5 种杓兰属植物大花杓兰、杓兰、东北杓兰、山西杓兰、斑花杓兰为试材,对影响 PCR 扩增效果的模板浓度、引物浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶量以及退火温度进行了优化,以期建立杓兰属植物 ISSR-PCR 的反应体系。结果表明:25 μL 反应体系中 DNA 模板的量为 30.00 ng、引物 0.60 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTP 0.20 mmol/L、*Taq* 酶 0.75 U;该体系以 5 种杓兰属植物,4 个引物进行扩增验证,能够得到清晰的条带,且具有多态性,而且有可重复性;表明建立的杓兰属 ISSR-PCR 体系适用遗传多样性的研究。

关键词:长白山区;杓兰属;ISSR;反应体系

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0092-04

杓兰属(*Cypripedium* Linn.)为兰科多年生草本植物^[1]。由于花唇瓣特化呈兜状,被称为“大口袋花”,西方人称其拖鞋兰。杓兰属植物花形奇特、颜色艳丽,具有极高的观赏价值。杓兰属共有 50 余种,主要产于东亚、北美、欧洲等温带地区和亚热带山地,向南可达喜马拉雅地区和中美洲的危地马拉^[1]。我国杓兰属植物种类繁多,资源丰富,有 30 余种,广布于东北至西南山地和台湾地区高山^[2]。在长白山区分布的杓兰属植物有大花杓兰、斑花杓兰、杓兰、东北杓兰和山西杓兰。针对杓兰属遗传学和分子生物学方面的研究较少,目前在遗传标记方面的研究以 AFLP、RAPD 法为主,对其遗传结构以及多样性进行分析^[3-4]。ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)简单重复区间序列标记,是由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等^[5]于 1994 年提出的一种建立在 PCR 技术上的分子标记技术。该技术具有操作简单、成本低、条件稳定、快速、灵敏、检测多态能力强、所需 DNA 模板量少等优点,目前已被广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学等研究^[6-10]。

该研究对杓兰属植物 ISSR 反应体系进行优化,并对 PCR 反应程序中的退火温度进行优化,以期建立适合杓兰属植物的 ISSR-PCR 反应体系,为利用 ISSR 标记技

术研究杓兰属植物的遗传多样性、种质资源研究、分子育种等提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试大花杓兰、杓兰、东北杓兰、山西杓兰、斑花杓兰 5 种杓兰属植物材料均采自吉林省长白山区。取材料的嫩叶用锡箔纸包好放入到液氮中,置于-80℃超低温冰箱中备用。

Taq 酶(5 U/ μL)、dNTPs(25 mmol/L)、2 000 bp DNA Marker 均购于大连宝生物工程有限公司,引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。CTAB、PVP、 β -巯基乙醇、琼脂糖等为北京鼎国生物技术有限公司生产的分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取以及检测 采用改良的 CTAB 法提取 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶(含核酸染料)电泳检测 DNA 质量,同时取 1 μL 样品用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度以及纯度。将样品稀释为 20 ng/ μL 并存放于-20℃冰箱中备用,以便用于 ISSR 反应条件的优化。

1.2.2 杓兰属 ISSR 反应体系的优化 试验以 UBC847 引物对影响杓兰属植物的 ISSR 反应的主要因素 *Taq* 酶浓度、dNTPs 浓度、DNA 模板量、引物浓度优化。每组试验中除了试验的成分以外,其它成分与其它组试验成分相同。参考文献[11-14],采用 25 μL 体系,在基本反应体系中所含的成分有:2.5 μL 10 \times buffer, 0.15 mmol/L dNTP, 0.40 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 30.00 ng DNA 模板,最后加双蒸水补足。

1.2.3 退火温度的选择 在单因素筛选出最佳反应体系后,设置退火温度为 47℃、50℃、53℃、56℃、59℃进行

第一作者简介:孙叶迎(1989-),女,硕士研究生,研究方向为分子标记。E-mail:sunyeying3928@163.com.

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物资源。E-mail:lhzy99@126.com.

基金项目:农业部野生植物资源调查资助项目;吉林省科技厅资助项目(20100254)。

收稿日期:2013-09-13

温度梯度退火,选择引物的最佳退火温度。

1.2.4 反应产物的电泳和检测 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶,1×TBE 电泳缓冲液,500 V 电压 60 min,2 000 bp Marker 进行分子量标记,银染,显影观察并照相、记录每次试验至少重复 2 遍,记录和分析重复出现的条带。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的条件

Table 1 Conditions of ISSR-PCR reaction system

影响因素	浓度梯度				
	1	2	3	4	5
DNA 模板量/ng	20.00	30.00	40.00	50.00	60.00
dNTPs 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
引物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
Taq 酶浓度/U	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

2 结果与分析

2.1 CTAB 法提取的杓兰属植物 DNA 的质量

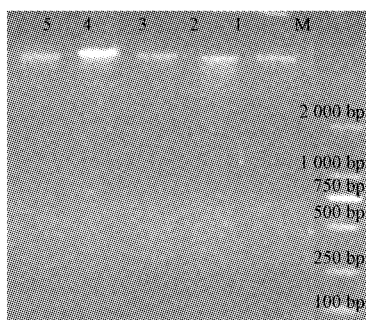


图 1 5 种杓兰的 DNA 电泳结果

注:M 为 2 000 bp marker,下同。1~5 分别为大花杓兰、杓兰、东北杓兰、山西杓兰、斑花杓兰。

Fig. 1 The electrophoretogram of 5 *Cypripedium*

Note:The size of Marker is 2 000 bp. The same below. The numbers 1 to 5 are *Chypripedium acranthum* Sw., *Cypripedium calceolus* L., *Cypripedium × ventricosum* Sw., *Cypripedium shanxiense* C. Chen. and *Cypripedium guttatum* Sw..

表 2 DNA 的质量

Table 2 The qualities of DNA

编号	DNA 样品	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	DNA 浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1	大花杓兰	1.90	1.90	1 029
2	杓兰	1.91	2.06	2 424
3	东北杓兰	1.96	1.91	995
4	山西杓兰	2.11	2.16	368
5	斑花杓兰	1.95	1.87	1 605

2.2 DNA 模板量对 PCR 反应的影响

DNA 模板的质量是影响 PCR 成败的重要因素之一。由图 2 可知,20.00、30.00、40.00、50.00 ng DNA 均能扩增出的产物条带,60.00 ng DNA 没有扩增出产物条带。在扩增出的产物条带中可以看出,30.00 ng DNA 扩增出的产物条带比较清晰,容易判读,随着 DNA 浓度的升高,个别模板出现没有扩增条带的现

象。由此可见,并不是模板浓度越高越好。因此,杓兰属植物的 ISSR-PCR 反应的最佳模板量为 30.00 ng。

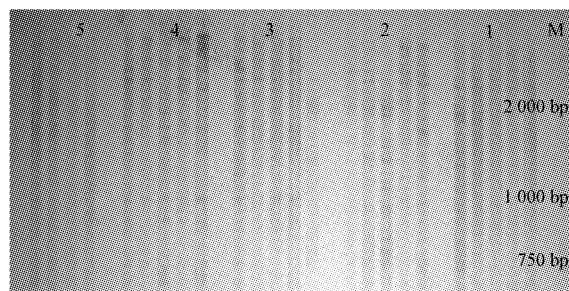


图 2 不同 DNA 模板的量的扩增效果

注:1~5 分别为 20.00、30.00、40.00、50.00、60.00 ng DNA 模板的量。5 个重复为 5 个不同的杓兰品种,下同。

Fig. 2 Banding pattern amplified by different concentrations of template DNA

Note:The numbers of 1 to 5 are the quantitie of DNA template, respectively are 20.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00 ng.

2.3 引物浓度对 PCR 反应的影响

在 PCR 反应中,引物的浓度是反应的关键,PCR 反应的特异性是由引物与模板的结合程度来决定的。当引物的浓度过高时会引起错配、非特异性扩增,甚至形成引物二聚体。引物浓度过低时,引物与模板结合的机会减少,结合量减少,得到的产物少,扩增出来的条带就比较弱。由图 3 可知,当引物浓度为 0.40 mmol/L 时,条带较弱;引物浓度为 0.60 mmol/L 时,扩增条带较全面、稳定、清晰,无特异性条带。因此,杓兰属植物的 ISSR-PCR 反应的最佳模板浓度是 0.60 mmol/L。

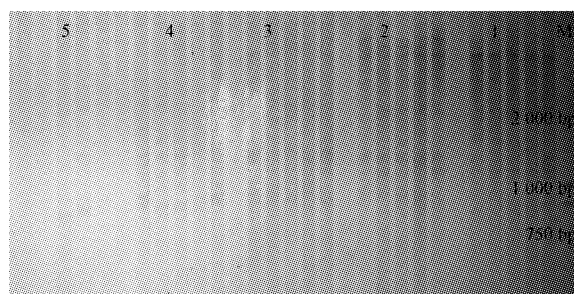


图 3 不同引物浓度的扩增效果

注:1~5 分别为 0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 $\mu\text{mol/L}$ 引物的浓度。

Fig. 3 Banding pattern amplified by different concentrations of primer

Note:The numbers of 1 to 5 are the concentration of primer, respectively are 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20 $\mu\text{mol/L}$.

2.4 dNTP 浓度对 PCR 反应的影响

从图 4 可以看出,dNTP 浓度过高时,无扩增条带;浓度过低时,条带较少,不清晰。在 0.20 mmol/L 时,条带较清晰。因此,dNTP 的最佳试验浓度为 0.20 mmol/L。

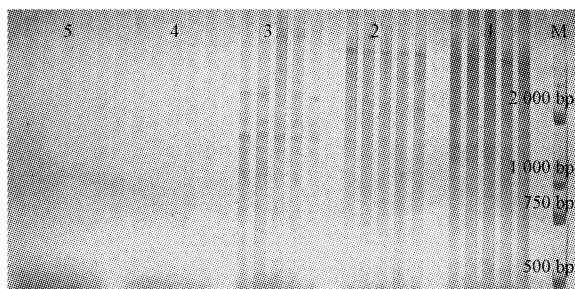


图4 不同 dNTP 浓度的扩增效果

注:1~5 分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L dNTP 的浓度。

Fig. 4 Banding pattern amplified by different concentrations of dNTP

Note: The numbers of 1 to 5 are the concentration of dNTP, respectively are 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mmol/L.

2.5 Taq 酶浓度对 PCR 反应的影响

Taq DNA 聚合酶的浓度对 PCR 反应影响也很大,是影响 PCR 反应的重要因素之一。从图 5 可以看出, Taq DNA 酶的浓度过高则会引起非特异性扩增,产生弥散带,背景颜色重;浓度过低,扩增出来的条带较少,因此,PCR 时要选择适当的酶浓度。该试验中 5 个不同浓度梯度的酶浓度中 0.75 U 的酶含量扩增出来的条带最清晰,无特异性扩增条带,最适合该 PCR 体系。

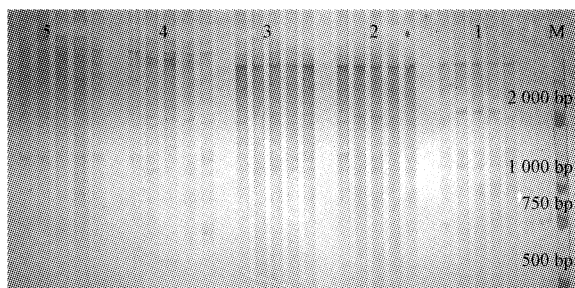


图5 不同 Taq 酶浓度的扩增效果

注:1~5 分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 U Taq 酶的量。

Fig. 5 Banding pattern amplified by different concentrations of Taq DNA polymerase

Note: The numbers of 1 to 5 are the quantity of Taq DNA Polymerase, respectively are 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 U.

2.6 退火温度对 PCR 的影响

退火温度影响引物与模板结合,由 5 个退火温度梯度可以看出,56℃时,扩增产物特异性强,条带清晰;温度低于或高于 56℃时,特异性较差,有些条带不明显,甚至扩增不出来。因此,确定了引物 UBC847 的最佳退火温度为 56℃,其它引物由此方法得到最佳退火温度。

2.7 体系稳定性的检测

随机选取其余 4 个引物(UBC807、UBC855、UBC841、UB873)对优化好的 PCR 体系的稳定性进行检测(图 7)。

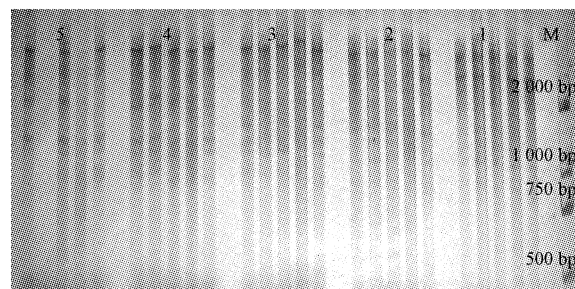


图6 不同退火温度的扩增效果

注:1~5 分别为 47℃、50℃、53℃、56℃、59℃的退火温度。

Fig. 6 Banding pattern amplified by different annealing temperatures

Note: The numbers of 1 to 5 are the annealing temperatures, respectively are 47℃, 50℃, 53℃, 56℃, 59℃.

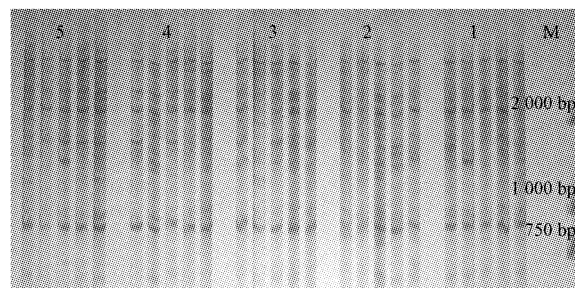


图7 扩增结果稳定性检测

注:1~5 分别为引物 UBC847、UBC807、UBC855、UBC841、UBC873。

Fig. 7 The detection of the stable of amplified results

Note: The numbers of 1 to 5 are the 5 primers, respectively are UBC847, UBC807, UBC855, UBC841, UBC873.

所选的引物都能扩增出比较理想的结果,说明优化的体系比较稳定可靠。

2.8 ISSR-PCR 反应体系的确立

该试验建立了构兰属植物的 ISSR-PCR 反应体系,在 25 μL 的体系中含有 2.5 μL 10× buffer, 30.00 ng DNA 模板, 0.60 μmol/L 引物 0.20 mmol/L dNTP, Taq 酶的量 0.75 U。扩增条件:94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min; 56℃退火 1 min; 72℃延伸 1.5 min, 35 个循环, 72℃完全延伸 10 min。

3 讨论与结论

在遗传多样性的研究中,体系稳定性是十分重要的。ISSR 体系的稳定性受很多因素的影响,如模板的量、Taq 聚合酶、引物、dNTP 以及退火温度等。其中一般模板 DNA 的量对扩增结果影响不大,浓度在 5~500 ng 都能扩增出较好的结果,但该试验中 DNA 的用量达到 40.00~50.00 ng,扩增条带减少,60.00 ng 无扩增条带,这可能是由试验材料不同引起的。在 PCR 反应中,各个底物之间是相互作用,相互影响的。反应体

系中 dNTP 能与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度降低。因此,dNTP 的浓度直接影响到反应中 Mg^{2+} 浓度。同时,高浓度 dNTP 引起非特异性扩增,低浓度降低反应产物的量。因此控制好 dNTP 的浓度对于 PCR 反应很重要。Lu^[15] 认为 dNTP 的浓度范围在 0.02~0.20 mmol/L 之间。高丽等^[16] 认为 dNTP 的浓度为 0.20 mmol/L 时,反应扩增出来的产物的量、特异性、忠实性较好,与该试验结果相符。

Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶活性所必需的元素,对 PCR 扩增的效率、特异性、退火温度都有影响^[17]。*Taq* 酶的量对反应体系的影响较大,酶浓度过高不仅增加成本,而且容易产生非特异性产物;酶浓度过低,扩增产物减少。在 PCR 反应中,退火温度的高低直接影响到引物与模板 DNA 的特异性结合^[18]。退火温度和退火时间取决于引物的长度、碱基组成以及其浓度,通过温度梯度 PCR 仪对温度进行筛选可以保证得到清晰稳定的扩增条带,客观地反映杓兰属植物的遗传多态性。

该试验建立的体系采用单因素梯度试验来进行最佳组合的摸索,通过试验得到了清晰稳定的条带。因此,该体系可以用于杓兰属遗传多样性的分析。

参考文献

- [1] Cribb P. The Genus *Cypripedium* [M]. Portland: Time Press, 1997: 126.
- [2] 李纪红. 杓兰属和杓兰亚科生物地理学研究简况[J]. 郑州师范教育, 2012, 1(4): 42-45.
- [3] 李全建, 王彩霞, 田敏, 等. 扇脉杓兰 AFLP 反应体系的建立[J]. 湖南农业科学, 2012(1): 107-110.
- [4] 蔡凝枫, 严宁, 刘涛, 等. 黄花杓兰云南中部居群遗传结构及克隆多样性的分析[J]. 云南植物研究, 2008, 30(1): 69-75.
- [5] Zietkiewicz E, Rahh A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [6] 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.
- [7] 周凌瑜. 小苍兰 ISSR 分子标记[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [8] Bornet B, Branchard M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassicataxa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. Hereditas, 2004, 140: 245-247.
- [9] Xia T, Chen S L, Chen S Y, et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae) [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, 35: 209-214.
- [10] Hao G, Lee D H, Lee J S, et al. A study of taxonomic relationships among species of Korean *Alliumsect Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2002, 43: 63-68.
- [11] 李敏, 王尧峰, 明凤. 用 ISSR 分子标记技术分析 16 个蝴蝶兰品种的亲缘关系研究[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(1): 60-65.
- [12] 曹冬梅, 康黎芳, 王云山, 等. 大花萱草 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立[J]. 山西农业科学, 2011, 39(12): 1239-1242.
- [13] 刘小溪, 荔枝林, 崔光芬, 等. 百合 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 30-33.
- [14] Li H S. ISSR markers and their application in plant genetic variation analysis[J]. Bulletin of Biology, 2004, 39(2): 19-21.
- [15] Lu S D. Current Protocols for Molecular Biology. Second edition [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 458-463.
- [16] 高丽, 杨波. 春兰 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(3): 305-309.
- [17] 吴小丽, 王树彬, 曹磊生, 等. 辣椒 ISSR-PCR 体系优化[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 288-291.
- [18] 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.

Establishment of the Optimum ISSR-PCR Reaction System of *Cypripedium* in the Region of Changbai Mountain of China

SUN Ye-ying, CHEN Li-fei, LIU Shu-ying, LIU Xin, CAO Yan, LIU Hong-zhang
(College of Life Science, Jinlin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking *Cypripedium macranthum*, *Cypripedium calceolus*, *Cypripedium ventricosum*, *Cypripedium shanxiense* and *Cypripedium guttatum* of 5 *Cypripedium* species which distributed in Changbai mountains as test materials, the 4 factors and annealing temperatures which affect the amplification of PCR were optimized. The optimal ISSR-PCR conditions for *Cypripedium* were established. The results showed that containing of 30.00 ng template DNA, 0.60 μ mol/L primer, 0.20 mmol/L dNTP, and 0.75 U *Taq* DNA polymerase in a volume of 25 μ L was optimal. The clear, pleomorphic and repetitive amplified bands might be obtained with the above ISSR-PCR reaction conditions by 5 *Cypripedium* and 4 primers. It was revealed that the ISSR-PCR reaction system was suitable for researching of genetic diversity.

Key words: Changbai mountain; *Cypripedium*; ISSR; reaction system