

# 光核桃 ISSR 扩增体系的优化

孟凡娟<sup>1</sup>, 邢春<sup>1</sup>, 徐福玲<sup>1</sup>, 王中奎<sup>2</sup>, 李荣钦<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000)

**摘 要:**为确保光核桃 ISSR 反应条件的稳定性,以改良的 CTAB 法提取光核桃基因组 DNA,对模板 DNA 浓度、MgCl<sub>2</sub> 浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶用量、引物浓度等因素进行了优化,确立了光核桃 ISSR 反应体系。结果表明:最佳反应体系为模板浓度 40 ng/μL、引物浓度 0.4 μmol/L、Mg<sup>2+</sup> 的浓度 2.5 mmol/L、酶浓度 0.5 U、dNTPs 浓度 0.5 mmol/L,为光核桃这一优质的种质资源的遗传多样性研究奠定了理论基础。

**关键词:**光核桃;ISSR;体系优化

**中图分类号:**S 664.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0095-04

ISSR(inter-simple sequence repeat)技术是 1994 年 ZIETKEIWITCZ 等人继 SSR 技术开发以后发展起来的一种显性分子标记方法,是在 SSR 序列的 3'或 5'末端加上 2-4 个核苷酸(通常是随机选择且是简并的),对 SSR 之间的序列(非 SSR 本身)进行扩增<sup>[1-3]</sup>。与 SSR 分子标记技术相比,它不需要预先获知基因组序列,可以在不同物种间通用,是一种非特异性的标记方法,同时它操作简单方便、多态性丰富、费用低<sup>[4]</sup>。特别适用于大批量的材料研究<sup>[5]</sup>,所以已被广泛应用于植物进化、品种鉴定、基因定位、遗传作图、分子生态学以及遗传多样性研究中<sup>[6-9]</sup>。

光核桃(*Prunus mira koehne* Kov et. Kpst)属蔷薇科桃属植物,又名西藏桃,是极其珍贵的野生桃种质资源,具有适应性强、耐旱、抗病、长寿、结果力强、更新容易等优良特性,具有较高的生态价值,同时其果实中富含糖、维生素 C 和其它营养成分,具有较高的经济价值,因此光核桃是集生态价值和经济价值为一体的优良树种。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采集幼嫩的光核桃叶片,经液氮冷冻处理 20 min,迅速放入-80℃冰箱里冻藏。利用改良的 CTAB 法提取样品基因组总 DNA。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 DNA 纯度测定 采用紫外分光光度计测定 DNA

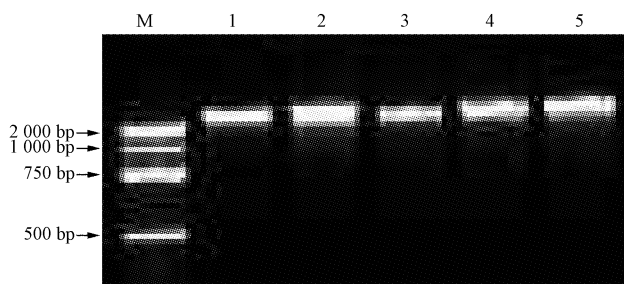
在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,并通过计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,测定 DNA 纯度。

**1.2.2 ISSR 体系优化** 为了确保 ISSR 反应体系的扩增效果,优化反应体系,通过设置单因素梯度确定模板、引物、dNTPs、酶、Mg<sup>2+</sup> 的浓度。试验中,反应体系为 25 μL,固定其它因素,仅设置 1 个变量。模板浓度梯度分别设置为 20、30、40、50、60 ng/μL,引物浓度梯度分别设置为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 浓度梯度分别设置为 1.0、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L,酶浓度梯度分别设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U, dNTPs 浓度梯度分别设置为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取的 DNA 产物 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.8~2.0 之间,证明所提 DNA 杂质蛋白及酚类少,纯度较好;经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 条带较为整齐且明亮清晰(图 1)。所以确定改良 CTAB 法为提取材料基因组 DNA 的方法。



注:M 为 Marker 2 000;1~5 为所提取的植物 DNA。

Note:M is Marker 2 000;1-5 is the extracted plant DNA.

图 1 改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of DNA by improved CTAB method

**第一作者简介:**孟凡娟(1975-),女,黑龙江兰西人,博士,副教授,现主要从事植物资源等研究工作。E-mail:mjf19751@163.com.

**责任作者:**李荣钦(1968-),女,四川成都人,硕士,副教授,现主要从事植物资源等研究工作。E-mail:mjf19751@126.com.

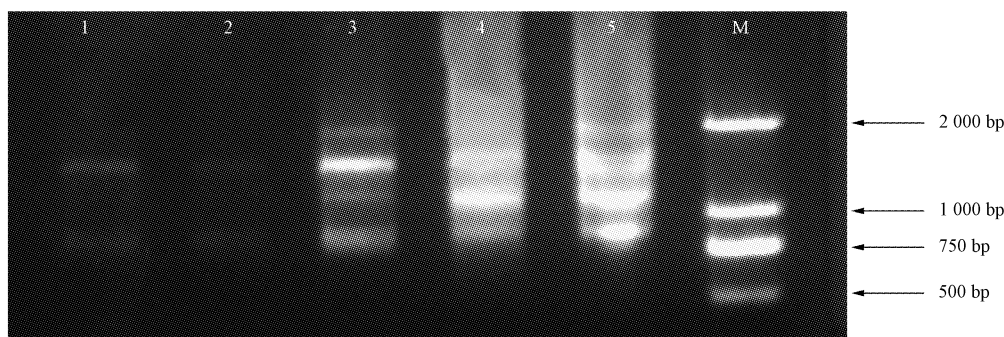
**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31160386)。

**收稿日期:**2015-07-22

## 2.2 最佳模板浓度的确定

扩增结果受模板浓度的直接影响,模板浓度过低则扩增条带不完全,过高则条带出现弥散现象。由图 2

可以看出,第 3 泳道条带的扩增效果最好。因此选用 40 ng/ $\mu$ L 作为扩增模板的浓度。



注:M;DL2 000 Marker;泳道 1:模板浓度 20 ng/ $\mu$ L;泳道 2:模板浓度 30 ng/ $\mu$ L;泳道 3:模板浓度 40 ng/ $\mu$ L;泳道 4:模板浓度 50 ng/ $\mu$ L;泳道 5:模板浓度 60 ng/ $\mu$ L。

Note:M,DL2 000 Marker;Lane 1,20 ng/ $\mu$ L template concentration;Lane 2,30 ng/ $\mu$ L template concentration;Lane 3,40 ng/ $\mu$ L template concentration;Lane 4,50 ng/ $\mu$ L template concentration;Lane 5,60 ng/ $\mu$ L template concentration.

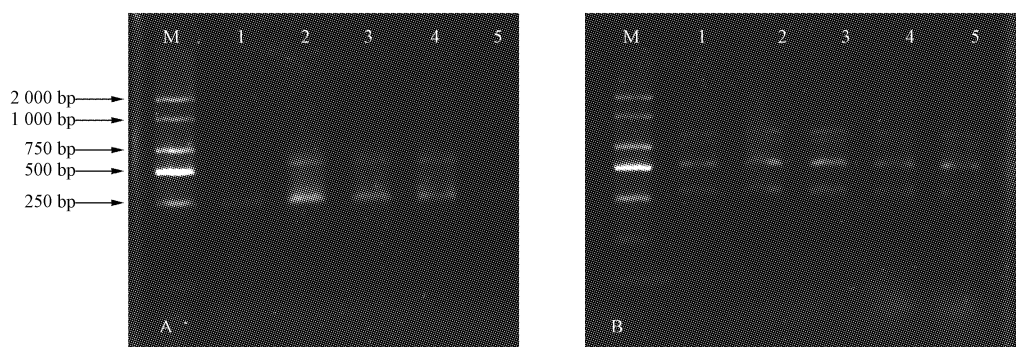
图 2 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 2 Effect of different DNA concentration on ISSR-PCR

## 2.3 最佳引物浓度的确定

不同浓度的引物会直接影响扩增条带的清晰程度,

由图 3(A)可以看出,第 2 泳道条带最清晰,即引物浓度为 0.4  $\mu$ mol/L 时扩增效果最好。



注:A,M;DL 2 000 Marker;泳道 1:引物浓度 0.5  $\mu$ mol/L;泳道 2:引物浓度 0.4  $\mu$ mol/L;泳道 3:引物浓度 0.3  $\mu$ mol/L;泳道 4:引物浓度 0.2  $\mu$ mol/L;泳道 5:引物浓度 0.1  $\mu$ mol/L。B,M;DL 2 000 Marker;泳道 1: $Mg^{2+}$  浓度 3.5 mmol/L;泳道 2: $Mg^{2+}$  浓度 3.0 mmol/L;泳道 3: $Mg^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L;泳道 4: $Mg^{2+}$  浓度 2.0 mmol/L;泳道 5: $Mg^{2+}$  浓度 1.0 mmol/L。

Note:In A,M,DL 2 000 Marker;Lane 1,0.5  $\mu$ mol/L primer concentration;Lane 2,0.4  $\mu$ mol/L primer concentration;Lane 3,0.3  $\mu$ mol/L primer concentration;Lane 4,0.2  $\mu$ mol/L primer concentration;Lane 5,0.1  $\mu$ mol/L primer concentration. In B,M,DL 2 000 Marker;Lane 1,3.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  concentration;Lane 2,3.0 mmol/L  $Mg^{2+}$  concentration;Lane 3,2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  concentration;Lane 4,2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$  concentration;Lane 5,1.0 mmol/L  $Mg^{2+}$  concentration.

图 3 不同引物浓度(A)和不同  $Mg^{2+}$  (B)浓度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 3 Effect of different primer concentrations (A) and  $Mg^{2+}$  concentrations (B) on ISSR-PCR

## 2.4 最佳 $Mg^{2+}$ 浓度的确定

由图 3(B)可以看出,当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时,扩增条带不清晰,当  $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 和 3.5 mmol/L 时,条带较亮,但随着浓度的增加出现弥散现象,所以确定  $Mg^{2+}$  最适浓度为 2.5 mmol/L。

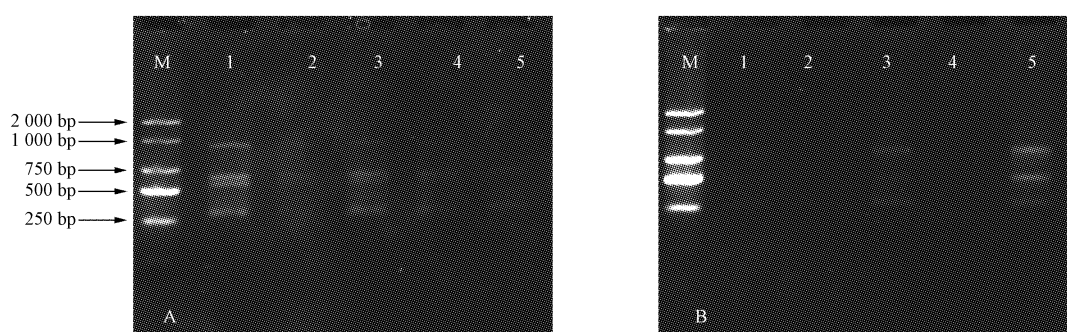
## 2.5 最佳酶浓度的确定

酶浓度是影响扩增结果的关键因素之一,浓度过低

则无法扩增出清晰完整条带,过高则条带出现弥散。由图 4(A)可以看出,第 1 泳道即酶浓度为 0.5 U 时,扩增效果最好。

## 2.6 dNTPs 浓度的确定

不同的扩增需要不同浓度,因为扩增片段的大小决定 dNTPs 的最适浓度,由图 4(B)可以看出,当 dNTPs 浓度为 0.5 mmol/L 时,能扩增出较为清晰的条带。



注:A,M,DL 2 000 Marker;泳道 1,酶浓度 0.5 U;泳道 2,酶浓度 1.0 U;泳道 3,酶浓度 1.5 U;泳道 4,酶浓度 2.0 U;泳道 5,酶浓度 2.5 U。B,M,DL 2 000 Marker;泳道 1,dNTPs 浓度 0.1 mmol/L;泳道 2,dNTPs 浓度 0.2 mmol/L;泳道 3,dNTPs 浓度 0.3 mmol/L;泳道 4,dNTPs 浓度 0.4 mmol/L;泳道 5,dNTPs 浓度 0.5 mmol/L。

Note:In A,M,DL 2 000 Marker;Lane1,0.5 U enzyme concentration;Lane 2,1.0 U enzyme concentration;Lane3,1.5 U enzyme concentration;Lane 4,2.0 U enzyme concentration;Lane 5,2.5 U enzyme concentration. In B,M,DL 2 000 Marker;Lane 1,0.1 mmol/L dNTPs concentration;Lane 2,0.2 mmol/L dNTPs concentration;Lane 3,0.3 mmol/L dNTPs concentration;Lane 4,0.4 mmol/L dNTPs concentration;Lane 5,0.5 mmol/L dNTPs concentration.

图 4 不同酶浓度(A)和不同浓度 dNTPs(B)对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 4 Effect of different *Taq* DNA polymerase (A) and dNTPs concentration (B) on ISSR-PCR

### 3 讨论

不同模板材料所要求的 ISSR 反应体系不同,该研究对 5 个反应参数加以优化,确定最佳反应体系。模板浓度低于一定范围会导致分子碰撞几率降低,使得扩增产物不稳定;若模板浓度高于一定范围又会使得非特异性增强,从而使扩增条带弥散<sup>[10]</sup>。试验结果也证明了这一点,当模板浓度为 20 ng/ $\mu$ L 和 30 ng/ $\mu$ L 时,扩增条带微弱,几乎看不清,当模板浓度为 50 ng/ $\mu$ L 和 60 ng/ $\mu$ L 时,扩增条带出现弥散。

引物浓度过低则与模板接触不完全,不能有效地扩增条带;而浓度过高会产生引物二聚体,出现非特异性扩增条带,此外,还会影响靶序列的产量<sup>[11]</sup>。同时  $Mg^{2+}$  是反应体系中的重要因素,影响产物的特异性、引物与模板的结合效率等,从而影响试验结果。此外,酶是价格比较高的试剂,浓度过高不仅导致试验结果不理想还会造成经济浪费;用量过低则会使反应不完全,导致产物量减少<sup>[12]</sup>。所以在该试验反应体系中,选用 0.5 U 最为合适。

dNTPs 是扩增反应中的原料,浓度过高会整合大量的  $Mg^{2+}$ ,导致整个反应失败,而且也不经济<sup>[13]</sup>;浓度过低又会影响扩增效率,试验中设置 5 个梯度,当浓度为 0.5 mmol/L 时,条带较为清晰,且更为经济,确定为最适反应浓度。

### 参考文献

- [1] 陈巍,王力荣,张绍铃,等. 利用 SSR 研究不同国家桃育成品种的遗传多样性[J]. 果树学报,2007,24(5):580-584.
- [2] 罗冉,吴委林,张旻,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):137-143.
- [3] 罗海燕,陈业渊. ISSR 分子标记及其应用[J]. 安徽农学通报,2008(19):45-46,27.
- [4] 朱岩芳,祝水金,李永平,等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子,2010(2):55-59.
- [5] 韩宏. 分子标记在果树种质资源研究中的应用[J]. 陕西农业科学,2010(4):74-76.
- [6] 余贤美,艾呈祥. 杠果野生居群遗传多样性 ISSR 分析[J]. 果树学报,2007(3):329-333.
- [7] 叶春海,王耀辉,李映志,等. 菠萝蜜遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 果树学报,2009(5):659-665.
- [8] 刘威生,冯晨静,杨建民,等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建[J]. 果树学报,2005(6):626-629.
- [9] 陈少瑜,杨恩,习学良,等. 云南主要核桃品种的 ISSR 分子鉴别[J]. 经济林研究,2006(4):41-45.
- [10] 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(3):91-93.
- [11] 谢运海,夏德安,姜静,等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2005(3):445-450.
- [12] 邹枚伶,夏志强,王文泉. 白木香基因组 DNA 提取与 ISSR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2009(2):250-254.
- [13] 刘威生,冯晨静,杨建民,等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建[J]. 果树学报,2005(6):626-629.

## Optimization of ISSR on *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst

MENG Fanjuan<sup>1</sup>, XING Chun<sup>1</sup>, XU Fuling<sup>1</sup>, WANG Zhongkui<sup>2</sup>, LI Rongqin<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. College of Agriculture and Animal Husbandry Tibet University, Linzhi, Tibet 860000)

# 蓝莓休克病毒的 RT-PCR 快速检测方法建立

谢丽雪<sup>1</sup>, 蔡伟<sup>2</sup>, 郑姍<sup>1</sup>, 张立杰<sup>1</sup>, 张小艳<sup>1</sup>, 李韬<sup>1</sup>

(1. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013; 2. 福清出入境检验检疫局, 福建 福清 350001)

**摘要:**以蓝莓叶片为试材,提取病毒 RNA,根据已报道的蓝莓休克病毒(Blueberry shock virus, BlShV)外壳蛋白基因序列设计特异性引物,建立 RT-PCR 快速检测方法,并对采集的 20 份疑似病例进行检测。结果表明:建立的 RT-PCR 方法具有良好的特异性和较高的灵敏度。仅从感染 BlShV 的样品中扩增出与预期大小相符的特异性目的片段,而从其它蓝莓病毒及健康样品中未扩增到目的片段;该方法能检测到 RNA 原液的  $10^{-4}$  倍稀释液,灵敏度较高。疑似病例检测结果与 ELISA 验证结果完全相符。试验表明,建立的 RT-PCR 方法能够用于 BlShV 的现地检测。

**关键词:**蓝莓休克病毒;RT-PCR;快速检测

**中图分类号:**S 432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0098-04

病毒病是蓝莓生产上的主要病害之一,目前已报道的病毒主要包括蓝莓休克病毒(Blueberry shock virus, BlShV)、蓝莓焦枯病毒(Blueberry scorch virus, BLSv)、蓝莓带化病毒(Blueberry shoestring virus, BSSV)、蓝莓叶斑驳病毒(Blueberry leaf mottle virus, BLMoV)、蓝莓红环斑病毒(Blueberry red ringspot virus, BRRV)、烟草环斑病毒(Tobacco ringspot virus, TRSV)、番茄环斑病毒(Tomato ringspot virus, ToRSV)等<sup>[1-7]</sup>。其中,蓝莓休克病毒(BlShV)属雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)成员,最早于 1987 年在美国的 Highbush blueberry(*Vaccinium corymbosum* L.)上被发

现<sup>[1]</sup>。BlShV 现主要分布于美国的加利福尼亚、宾夕法尼亚州、纽约州、密歇根州和加拿大的新斯科舍省<sup>[8-9]</sup>,该病毒基因组为+ssRNA,全长 9 650 bp,病毒粒子呈等轴对称球状,直径约 27 nm。已报道的 BlShV 的自然寄主为蓝莓,人工侵染寄主有本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、克利夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*)、林烟草(*Nicotiana sylvestris*)和普通烟草(*Nicotiana tabacum*)。BlShV 侵染蓝莓后引起的主要症状是开花期时花和叶片的突然完全坏死,但之后除引起不结果外叶片仍会长出。受 BlShV 侵染的蓝莓通常在 1~4 年内表现症状,随之逐渐恢复并隐症。BlShV 几乎侵染所有的蓝莓品种,并表现相似的症状。据统计,BlShV 侵染蓝莓造成的损失达 34%~90%,损失大小与症状严重程度直接相关,且不同年份之间存在差异<sup>[9-10]</sup>。BlShV 可通过蜜蜂携带感染的花粉传播,因此在田间扩散速度相对较快<sup>[11]</sup>。

我国从 1983 年由吉林农业大学引种蓝莓栽培,至 2000 年建立基地开始蓝莓产业化种植<sup>[12-13]</sup>。由于我国蓝莓产业处于起步阶段,蓝莓病虫害的相关报道较少,仅辽宁、山东、上海等地已对蓝莓的病虫害做了相关的调查<sup>[14-17]</sup>,但未见休克病的相关研究报道。课题组在

**第一作者简介:**谢丽雪(1981-),女,福建厦门人,硕士,助理研究员,研究方向为果树遗传育种及病害。E-mail:sarah614510@126.com

**责任作者:**李韬(1969-),男,本科,副研究员,研究方向为果树遗传育种及病害。E-mail:leetao06@163.com

**基金项目:**福建省公益类科研院所专项资助项目(2015R1101018-13);福建省种业创新与产业化工程资助项目(2014SI477-22);福州市科技计划资助项目(2013-N-54);福建省农业科学院导师制基金资助项目(2013DQB-9)。

**收稿日期:**2015-06-04

**Abstract:** To ensure the stability of ISSR for *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst, total genomic DNA was extracted by improved CTAB method, the factors including template DNA concentration,  $MgCl_2$  concentration, dNTPs concentration, *Taq* polymorphism dose and primer concentration were studied to establish optimized ISSR reaction system. The result showed that template concentration 40 ng/ $\mu$ L, primer concentration 0.4  $\mu$ mol/L,  $Mg^{2+}$  concentration 2.5 mmol/L, enzyme concentration 0.5 U, dNTPs concentration 0.5 mmol/L were the optimized reaction system. The study would provide the foundation for the genetic diversity on germplasm resources of *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst.

**Keywords:** *Prunus mira koehne* Kov et. Kpst; ISSR; system optimization