

铁线莲园艺品种 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选

王楠, 王锦, 李宗艳, 杨坤梅, 何辉, 肖振东

(西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘要:以铁线莲的园艺品种 *Clematis* ‘Gravetye Beauty’ 为试材, 采用改良 CTAB 法提取其基因组 DNA 为模板, 采用单因子试验设计, 研究模板 DNA 含量、引物浓度、Master Mix 对 ISSR-PCR 反应的影响, 以期构建基于 ISSR 分子标记技术的铁线莲园艺品种遗传图谱。结果表明: 25 μ L C. ‘Gravetye Beauty’ ISSR-PCR 最佳反应体系的模板 DNA 用量 5 ng、引物浓度 0.8 μ mol/L、Master Mix 12 μ L; 利用该体系从 38 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性好的 11 条引物。

关键词:铁线莲园艺品种; ISSR-PCR 反应体系; 引物筛选

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0080-04

铁线莲属毛茛科铁线莲属 (*Clematis* L.) 植物, 多为藤本, 少数宿根草本, 分布于热带、亚热带、温带和寒带地区^[1]。全世界共有 355 个种, 我国 155 个种, 全国各地都有分布, 尤以西南地区种类较多^[2-5]。铁线莲园艺品种花色丰富, 花型多变, 花期长, 观赏价值很高, 被誉为“攀援植物皇后”, 在世界园林中占有十分重要的地位^[6]。目前对铁线莲属植物的研究多集中在分类学、细胞学、系统分类、引种栽培、病虫害防治和繁殖技术等方面^[7]。现采用 ISSR 分子标记技术, 建立铁线莲园艺品种 ISSR-PCR 最佳反应体系, 以期构建铁线莲园艺品种遗传图谱奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 2010 年 2 月从欧洲引进的铁线莲园艺品种 C. ‘Gravetye Beauty’ 2 年生种苗, 栽植在西南林业大学铁线莲种质资源圃。该试验所用 Master Mix 包含反

应缓冲液、dNTPs、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶、PCR 反应优化剂、增强剂和稳定剂, 购于昆明硕阳科技有限公司。

1.2 试验方法

采集 C. ‘Gravetye Beauty’ 新鲜叶片, 用 70% 酒精擦洗叶片表面, 放于 -70℃ 冰箱保存。

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[8]提取 C. ‘Gravetye Beauty’ 基因组 DNA。

1.2.2 ISSR-PCR 反应引物 试验所用的 38 个 ISSR 引物参考加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布引物。38 条引物碱基序列见表 1。

1.2.3 试验设计 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA 含量、目标引物浓度、Master Mix 因素采用单因子试验设计。扩增反应程序为 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 45 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保存。采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 最后在凝胶成像系统中进行拍照分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取结果

从图 1 电泳结果可以看出, 1 条整齐亮带, DNA 主带清晰, 无明显的 RNA 带, 无弥散现象。DNA 样品中的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.80~1.90, 提取的 DNA 纯度较高。把提取的 DNA 样品统一稀释到一定浓度后, -20℃ 保存。

第一作者简介:王楠(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: 371622073@qq.com.

责任作者:王锦(1966-), 女, 博士, 教授, 现主要从事观赏园艺等教学与科研工作。E-mail: 908505685@qq.com.

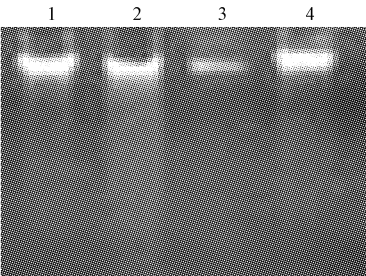
基金项目:云南省高校林下生物资源保护及利用科技创新团队资助项目(51400605); 西南林业大学科学研究基金面上资助项目(111105)。

收稿日期:2015-09-24

表 1 38 条引物碱基序列

Table 1 Base sequences of 38 primers

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence(5'-3')	引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence(5'-3')	引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence(5'-3')
ISSR-833	AGAGAGAGAGAGAGAGAT	UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC-867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC
ISSR-827	ACACACACACACACACG	UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
UBC-801	ATATATATATATATATT	UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	UBC-872	GATAGATAGATAGATA
UBC-804	ATATATATATATATATA	UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	UBC-873	GACAGACAGACAGACA
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	UBC-876	GATAGATAGACAGACA
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC-846	CACACACACACACACART	UBC-884	HBHAGAGAGAGAGAGAG
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC-847	CACACACACACACARC	UBC-889	DBDACACACACACACAC
UBC-815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	UBC-848	CACACACACACACACARG	UBC-895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC
UBC-817	CACACACACACACACAA	UBC-855	ACACACACACACACACYT	UBC-898	GATCAAGCTTNNNNNATGTGG
UBC-818	CACACACACACACACAG	UBC-860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	UBC-899	CATGGTGTGTGGTCATTGTCCA
UBC-820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	UBC-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	UBC-900	ACTTCC CCACAGGTTAACACA
UBC-825	ACACACACACACACT	UBC-864	ATGATGATGATGATGATG		



注:1~4 C. ‘Gravetye Beauty’ DNA。C₁ = 568. 50, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 86; C₂ = 297. 80, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 84; C₃ = 235. 38, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 80; C₄ = 692. 26, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 87。
Note: 1~4 C. ‘Gravetye Beauty’ DNA。C₁ = 568. 50, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 86; C₂ = 297. 80, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 84; C₃ = 235. 38, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 80; C₄ = 692. 26, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1. 87。

图 1 C. ‘Gravetye Beauty’基因组 DNA 电泳

Fig. 1 Electrophoresis pattern of genomic DNA from C. ‘Gravetye Beauty’

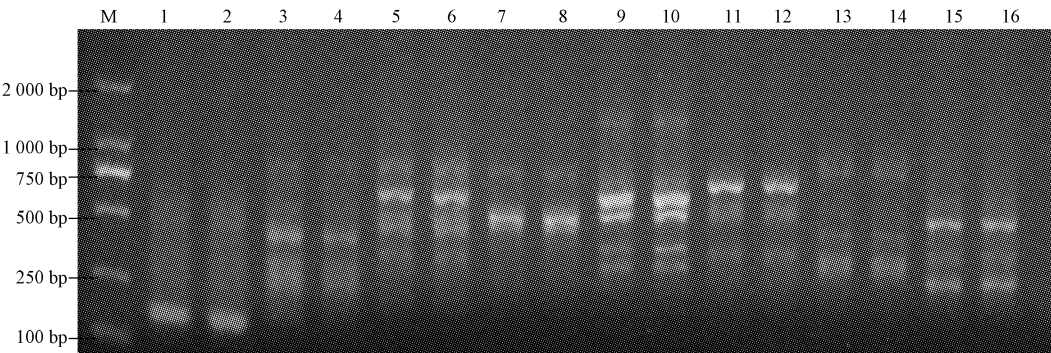
2.2 目标引物的确定

从 38 个 ISSR 引物中随机选择 8 个引物 808、811、817、840、847、860、873、889 进行目标引物初筛,ISSR 引

物由上海生物工程技术有限公司合成。ISSR-PCR 反应体系确定为 25 μL,模板 DNA 10 ng,Mix 12. 5 μL,引物 1 μmol/L,双蒸水找平。扩增反应程序为 95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 45 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,40 个循环;72℃ 延伸 5 min;4℃ 保存。采用 1. 0%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,最后在凝胶成像系统中进行拍照分析。8 个引物的扩增结果见图 2。比较扩增条带的清晰度和多态性,引物 UBC-847 效果最好,所以选择引物 UBC-847 为目标引物进行后续 ISSR-PCR 反应体系建立。

2.3 ISSR-PCR 最佳反应体系建立

ISSR 扩增反应中,模板 DNA 的用量对扩增结果有较大影响,DNA 浓度过低会造成分子碰撞的几率降低,导致偶然性增加,扩增产物具不稳定性;DNA 浓度过高会加大非特异产物的扩增,且不同物种所需要的最佳模板 DNA 浓度范围不同。因此确定适合的模板 DNA 用量非常重要。不同模板 DNA 的用量都能扩出清晰的条带,当模板 DNA 浓度在 5. 0 ng/25μL 时扩增条带最亮;当浓度超过 10. 0 ng/25μL 时,扩增条带的亮度逐渐降低。模板 DNA 浓度在 5. 0~15. 0 ng/25μL 范围变化时,

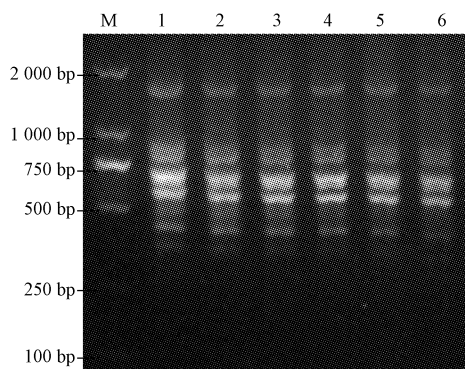


注:1~2 引物 808,3~4 引物 811,5~6 引物 817,7~8 引物 840,9~10 引物 847,11~12 引物 860,13~14 引物 873,15~16 引物 889。
Note:1~2 primer 808,3~4 primer 811,5~6 primer 817,7~8 primer 840,9~10 primer 847,11~12 primer 860,13~14 primer 873,15~16 primer 889。

图 2 8 条引物的 ISSR-PCR 扩增

Fig. 2 Eight ISSR-PCR amplification of primers

扩增出来的条带数基本一致,当浓度超过 15.0 ng/25 μ L 时,扩增条带数减少。由此可知,在 25 μ L 的反应体系中,5 ng 为最佳模板用量(图 3)。



注:M1-5 ng,M2-10 ng,M3-15 ng,M4-30 ng,M5-50 ng,M6-70 ng。

Note:M1-5 ng,M2-10 ng,M3-15 ng,M4-30 ng,M5-50 ng,M6-70 ng。

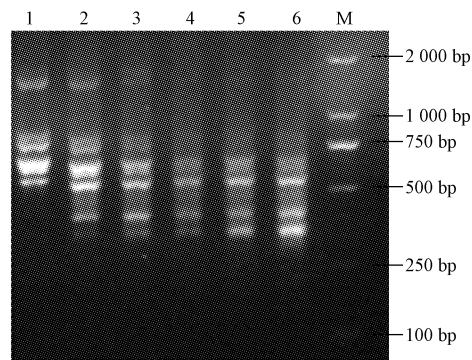
图 3 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 3 Effect of template DNA on ISSR-PCR amplification system

从图 4 可以看出,在 6 个不同引物浓度梯度中,浓度为 0.4 μ mol/L 时,扩增出来的条带较少,当增至 0.8~1.2 μ mol/L 时扩增出来的条带数量多、清晰且较亮。浓度升高到 1.6~3.2 μ mol/L 时,扩增条带逐渐变少且模糊。考虑节约成本,ISSR-PCR 反应的适宜引物浓度为 0.8 μ mol/L。

Master Mix 具有稳定性好、灵敏度高、快速简便、特异性强等优点。由图 5 可知,随 Master Mix 加入量增加,扩增条带变亮。当 Master Mix 加入量小于 11 μ L 时,扩增条带模糊且数量较少。当加入量在 12~15 μ L 时扩增条带稳定清晰。考虑节约成本,12 μ L 为 Master Mix 最佳用量。

单因子试验结果得出 25 μ L C. 'Gravetye Beauty' ISSR-PCR 最佳反应扩增体系 DNA 用量为 5 ng,引物浓度为 0.8 μ mol/L,Master Mix 用量为 12 μ L。

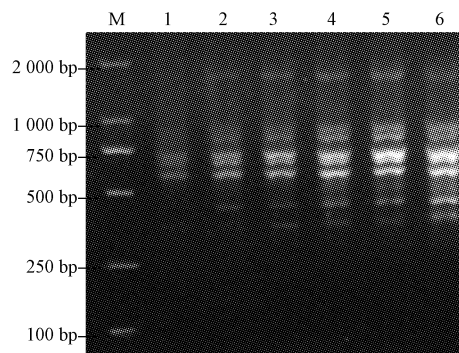


注:M1-0.4 μ mol/L,M2-0.8 μ mol/L,M3-1.2 μ mol/L,M4-1.6 μ mol/L,M5-2.4 μ mol/L,M6-3.2 μ mol/L。

Note: M1-0.4 μ mol/L, M2-0.8 μ mol/L, M3-1.2 μ mol/L, M4-1.6 μ mol/L, M5-2.4 μ mol/L, M6-3.2 μ mol/L。

图 4 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 4 Effect of ISSR primer on ISSR-PCR amplification system



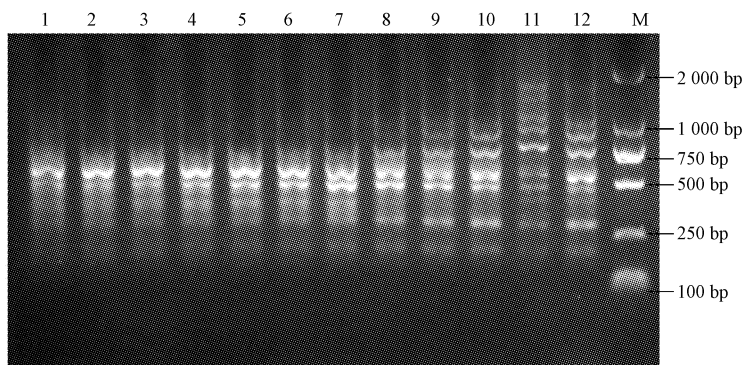
注:M1-9 μ L,M2-10 μ L,M3-11 μ L,M4-12 μ L,M5-13 μ L,M6-15 μ L。

Note:M1-9 μ L,M2-10 μ L,M3-11 μ L,M4-12 μ L,M5-13 μ L,M6-15 μ L。

图 5 Master Mix 用量对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 5 Effect of Master Mix on ISSR-PCR amplification system

严格来说,退火温度并不一定等于其 T_m 值,而在 T_m 值附近波动,参考不同引物的 T_m 值,利用梯度 PCR 确定该引物的最佳退火温度。以引物 825($T_m=52.2^\circ\text{C}$)为例,设定退火温度梯度分别为 46.7、46.9、47.7、48.9、



注:M1-46.7 $^\circ\text{C}$,M2-46.9 $^\circ\text{C}$,M3-47.7 $^\circ\text{C}$,M4-48.9 $^\circ\text{C}$,M5-50.2 $^\circ\text{C}$,M6-51.5 $^\circ\text{C}$,M7-52.8 $^\circ\text{C}$,M8-54.2 $^\circ\text{C}$,M9-55.5 $^\circ\text{C}$,M10-56.7 $^\circ\text{C}$,M11-57.4 $^\circ\text{C}$,M12-57.7 $^\circ\text{C}$ 。

Note:M1-46.7 $^\circ\text{C}$,M2-46.9 $^\circ\text{C}$,M3-47.7 $^\circ\text{C}$,M4-48.9 $^\circ\text{C}$,M5-50.2 $^\circ\text{C}$,M6-51.5 $^\circ\text{C}$,M7-52.8 $^\circ\text{C}$,M8-54.2 $^\circ\text{C}$,M9-55.5 $^\circ\text{C}$,M10-56.7 $^\circ\text{C}$,M11-57.4 $^\circ\text{C}$,M12-57.7 $^\circ\text{C}$ 。

图 6 退火温度对引物 825 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 6 Effect of annealing temperature on 825 ISSR-PCR amplification system

50.2、51.5、52.8、54.2、55.5、56.7、57.4、57.7℃。从图 6 可以看出,退火温度小于 56.7℃时扩增的条带较少、大片段带较多且背景模糊。退火温度在 57.4℃时扩增的条带数最多,效果最好。当退火温度高于 57.4℃时,扩增条带开始减少。

表 2

引物筛选及最佳退火温度

Table 2

Primer screening and its optimum annealing temperature

℃

引物 Primer	<i>T_m</i> 值 <i>T_m</i> value	退火温度 Annealing temperature	引物 Primer	<i>T_m</i> 值 <i>T_m</i> value	退火温度 Annealing temperature	引物 Primer	<i>T_m</i> 值 <i>T_m</i> value	退火温度 Annealing temperature
UBC-812	52.2	52.8	UBC-834	53.9	53.2	UBC-848	56.2	54.2
UBC-817	52.2	52.8	UBC-836	53.9	50.6	UBC-873	51.6	53.6
UBC-818	54.6	53.9	UBC-841	56.2	58.2	UBC-880	53.6	51.9
UBC-825	52.2	57.4	UBC-847	56.2	56.8			

3 结论与讨论

该试验结果表明,25 μL C. ‘Gravetye Beauty’ ISSR-PCR 最佳反应扩增体系的模板 DNA 用量为 5 ng,引物浓度为 0.8 μmol/L, Master Mix 用量为 12 μL。利用该体系从 38 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性好的 11 条引物。

ISSR-PCR 是基于 PCR 的分子标记技术,与其它基于 PCR 的反应技术一样,其扩增会受到诸多因素的影响。因此为获得可靠性和重复性较高的 ISSR 带谱,十分有必要对它的反应体系进行优化。引物浓度是影响 ISSR-PCR 扩增的一个重要因素。引物浓度过低,会使扩增产量下降,可能会出现 Smear 现象,而引物浓度过高,易引起碱基错配和产生非特异性扩增。在 ISSR-PCR 反应中使用 Master Mix 能够很好的解决反应体系中 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度的配比问题。不仅缩短了试验时间还可有效地避免人为操作污染。关于引物的退火温度,从理论上讲,退火温度

通过退火温度梯度设置,采用所得 ISSR-PCR 最佳反应扩增体系对 38 个引物进行初筛和复筛,选择出条带比较清晰且多态性好的 11 条引物及其最佳退火温度(表 2)。

高,特异性强,但温度过高,不利于引物和模板结合。温度太低,会造成引物与模板配错,从而使特异性大大降低。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 28 卷. 北京:科学出版社,2000.
- [2] 王文采,李良千. 铁线莲属一新分类系统[J]. 植物分类学报,2005,43(5):431-488.
- [3] 张燕,黎斌,李思锋. 铁线莲属植物分类学及园艺学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,29(5):6-10.
- [4] 江南,管开云,王仲朗. 云南铁线莲属植物地理分布及区系特征[J]. 云南植物研究,2007,29(2):145-154.
- [5] 王文采. 云南植物志[M]. 昆明:云南科学技术出版社,2000:208-209.
- [6] 章银柯,江燕. 我国铁线莲属植物研究现状及其园林应用[J]. 北方园艺,2007(3):122-124.
- [7] 刘立波,杨慧,王锦. 铁线莲属植物研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(15):6959-6961.
- [8] 胡晨,孙正海,王锦,等. 4 种滑叶铁线莲基因组 DNA 提取方法比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(36):2225-22216,22363.

Optimization of ISSR-PCR System and Selection of Primers for Horticultural Varieties of *Clematis*

WANG Nan, WANG Jin, LI Zongyan, YANG Kunmei, HE Hui, XIAO Zhendong

(College of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: A *Clematis* garden species (*Clematis* ‘Gravetye Beauty’) was chosen as the experiment material to built the genetic map based on the ISSR molecule marker technology. The ‘Gravetye Beauty’ genomic DNA was used as the DNA model, and simple factor design of experiment was used to study the impacts of model DNA concentration, primer concentration, and Master Mix on ISSR-PCR reaction. The results showed that the optimum system was DNA model 5 ng, primer concentration 0.8 μmol/L, Master Mix 12 μL and the whole reaction system was 25 μL. Using this system, 11 primers with clear stripe and good polymorphism were selected from 38 ISSR primers.

Keywords: *Clematis* cultivation; ISSR-PCR reaction system; primer screening