

基于 PAGE 检测技术的平菇 ISSR-PCR 体系的建立和优化

张运峰, 屈安姜, 付薪蒙

(唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000)

摘 要:以平菇“唐平 26”基因组 DNA 为模板,以 U836 为引物,比较了琼脂糖凝胶电泳和不同浓度聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳对 ISSR-PCR 产物的分离效果,并且采用 PAGE 电泳技术对影响 ISSR 反应体系的主要因素进行优化。结果表明:以 PAGE 电泳技术检测平菇 ISSR-PCR 产物的效果最好,最佳 ISSR-PCR 反应体系为,在 20 μL 反应体系中,模板 20 ng, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$,引物 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 1.0 U, 30 个扩增循环。

关键词:平菇;ISSR-PCR 体系;PAGE

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0091-05

平菇(*Pleurotus ostreatus*)属菌物界真菌门担子菌纲伞菌目侧耳科侧耳属食用菌,是我国产量最高的食用菌品种。平菇营养丰富、风味独特,高蛋白、低脂肪,具有较高的营养价值和保健功能,是人们喜食的食用菌之一^[1-2],其种质资源非常丰富^[3-4]。由于我国食用菌产业的快速发展,面临越来越严重的同名异物、同物异名现象等问题,造成侵权问题普遍存在^[5],严重影响了食用菌产业的正常发展。

ISSR 技术是在 SSR 基础上发展起来的一项扩增条带多态性的技术,以其操作简单、灵敏、快速,检测多态性能力强,所需 DNA 量少等优点而倍受青睐^[6]。虽然 ISSR-PCR 具有很多优点,但其扩增结果一般会受到模板含量、引物浓度、检测技术手段等诸多因素的相互影响^[7]。由于不同物种间 ISSR-PCR 体系差异较大,ISSR 技术的结果依赖于扩增条带的数量,因此,寻找和采用分辨率高、精度好的 PCR 产物检测技术是 ISSR 技术发展的关键制约因素。国内利用琼脂糖凝胶电泳检测 ISSR 分子标记的研究较多,而利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel

electrophoresis, PAGE)检测还较少^[8],尤其是对平菇分子标记遗传多样性的研究还鲜有报道。该试验探讨了影响 ISSR-PCR 反应的多个因素,并建立了基于 PAGE 检测技术的 ISSR-PCR 体系,以期平菇菌株间遗传分化的研究及菌种库的建立奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株平菇“唐平 26”由唐山师范学院食用菌育种试验室保存。

供试试剂:PDA 培养基为马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000 mL,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 25 min。真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(B518229)、40%聚丙烯酰胺凝胶和 ISSR-PCR 引物由上海生工购买(合成),*Taq*TM、dNTP 等试剂购买于 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 “唐平 26”菌丝的培养和 DNA 的提取 “唐平 26”菌丝 DNA 的提取参照真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒的方法进行。

1.2.2 ISSR-PCR 试验条件的设置 为了探索出适于平菇 DNA 的 ISSR-PCR 最优体系,对各影响因素设置了一系列梯度参数进行试验(表 1)。ISSR-PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 ISSR-PCR 产物的琼脂糖凝胶检测 ISSR-

第一作者简介:张运峰(1982-),男,硕士,实验师,现主要从事微生物分子遗传学等研究工作。E-mail:zyfkkx@126.com.

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2014105067);唐山师范学院科学研究基金资助项目(2016C05);河北省大学生创新创业计划资助项目(201510099032)。

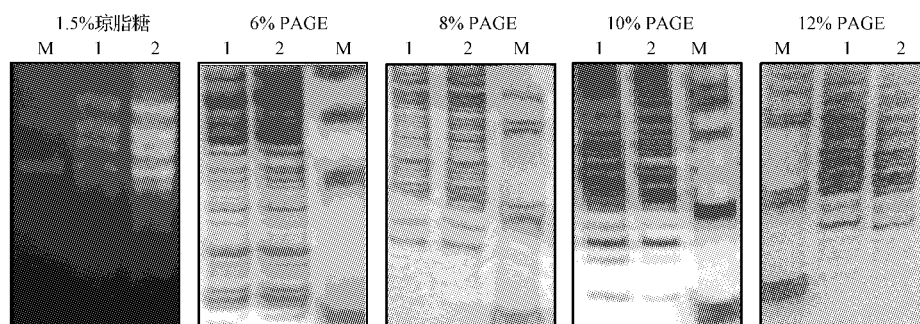
收稿日期:2016-10-11

PCR 反应结束后,取扩增产物 5 μL 用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,电压为 $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 2 μL GelGreen 溶液染色后,于紫外凝胶成像系统上观察电泳结果并成像。

表 1 ISSR-PCR 反应体系设计

项目 Substance	反应参数设计 The design of reaction parameter				
退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$	45	47	49	52	54
模板 DNA Template DNA/ ng	5	10	20	30	40
Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
引物 Primer/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase/U	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
循环次数 Number of cycles	25	30	35	40	45

1.2.4 ISSR-PCR 产物的 PAGE 凝胶检测 取 5 μL ISSR-PCR 扩增产物分别在 6%、8%、10%、12% PAGE 凝胶中电泳,电压为 120 V, 2 h 电泳后,进行银染^[9],最后置于凝胶成像系统中观察、成像。



注: M, DL 2000, 下同; 1 和 2 表示加入的样本为同一参数和体积的 ISSR-PCR 产物。

Note: M, DL 2000, the same below; 1 and 2 indicate the same parameter and volume of ISSR-PCR product.

图 1 ISSR-PCR 产物在不同凝胶中电泳的结果

Fig. 1 ISSR-PCR results of electrophoresis in different gels

2.2 U836 引物的最适 T_m 值

虽然所有 ISSR 的引物不具有物种特异性,但是并非每个引物都适合于所有物种,因此需要对引物进行预试^[10],该试验对 ISSR 通用引物进行了筛选,筛选出多对扩增多态性水平高而且重复性好的引物。随机选择了引物 U836 和“唐平 26”的基因组 DNA 进行试验,通过温度梯度的设定对 U836 引物的最适温度进行了摸索,如图 2 所示,随着温度的升高扩增条带的数目逐渐增加。当退火温度达到 51 $^\circ\text{C}$ 时,条带数目最多且清晰,53 $^\circ\text{C}$ 时,条带数目有所减少。因此,确定 U836 引物的最适温度为 51 $^\circ\text{C}$ 。

2.3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

Mg^{2+} 是 *Taq* 酶活性的重要因子,其浓度对 PCR 的扩增效果具有重要影响, Mg^{2+} 浓度过低或过高,均

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 产物检测方法的比较

通过比较 ISSR-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 6%、8%、10%、12% 不同浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离效果。由图 1 可知,琼脂糖凝胶可以检测到 6 条带,而 PAGE 电泳图谱的条带数量远高于琼脂糖凝胶的结果,其中在 6% PAGE 上的条带数目达到了 21 条,显著高于琼脂糖检测效果;同时,6%、8% 的聚丙烯酰胺凝胶的检测条带清晰,条带数量显著高于 10%、12% PAGE 电泳结果;同时,6%、8% 聚丙烯酰胺凝胶的结果差异不显著,但是在相同电泳电压下,6% PAGE 电泳形成的带间距优于 8% PAGE,表现为减少条带重叠,便于条带区分。因此,该试验后续检测均使用 6% PAGE 胶电泳。

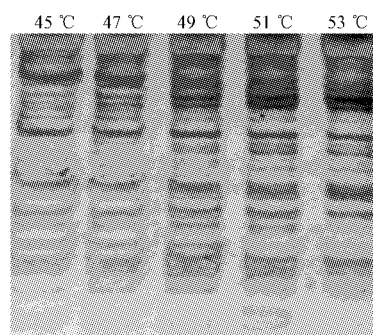
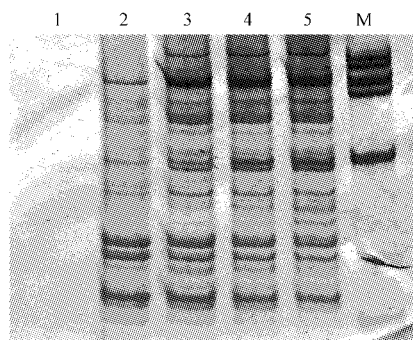


图 2 U836 引物在不同退火温度下的 PCR 结果

Fig. 2 PCR result of primer U836 in different T_m

会对 ISSR-PCR 的特异性和扩增效率产生影响。从图 3 可以看出, Mg^{2+} 浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,没有出现明显的扩增条带,当浓度达到 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带

清晰,但条带数量较少; Mg^{2+} 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时条带数量多且清晰,与高于 $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的试验结果没有差异,考虑到 Mg^{2+} 浓度过高会增加非特异性扩增可能,因此确定 ISSR-PCR 的最适 Mg^{2+} 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。



注:1~5 分别表示 Mg^{2+} 浓度为 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。

Note:1-5 indicate $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1} Mg^{2+}$ respectively.

图 3 不同 Mg^{2+} 浓度条件下 ISSR-PCR 结果

Fig. 3 Results of ISSR-PCR under different Mg^{2+} concentration

2.4 模板 DNA 含量对 ISSR-PCR 结果的影响

模板浓度太低,引物与之结合的机率降低;模板浓度过高,模板分子之间结合的机率增大,也减少了引物与之结合的机率。因此模板浓度过高过低都使得扩增产物减少且不稳定^[11]。该试验设置了 5 个模板 DNA 浓度进行扩增。由图 4 可以看出,在 $20 \mu L$ 反应体系中,当模板 DNA 含量为 5 ng 时,条带少且比较模糊,随着模板 DNA 含量的增加,扩增条带的数量逐渐增加,当模板含量达到 20 ng 时,条带完整清晰,模板含量超过 30 ng 时,大片的 DNA 条带开始减少、模糊,且一些条带出现了重叠。因此,适宜的模板含量为 20 ng 。

2.5 不同引物浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

引物浓度过低,条带少且比较弱;浓度过高,小片段产物增多且易产生非特异性条带^[12]。图 5 结果表明,当引物浓度低于 $0.8 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 时,条带数量较少,部分条带较弱;当引物浓度高于 $0.8 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 时,条带开始变弱消失,部分条带不能区分。因此,引物浓度为 $0.8 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 时,扩增条带丰富且清晰。

2.6 PCR 循环次数对 ISSR-PCR 结果的影响

PCR 产物随着循环次数的增加而增加,但是循环次数过多时,非特异产物的扩增也会相应增加,还会在后续扩增过程中引起错配,最终影响 ISSR-PCR

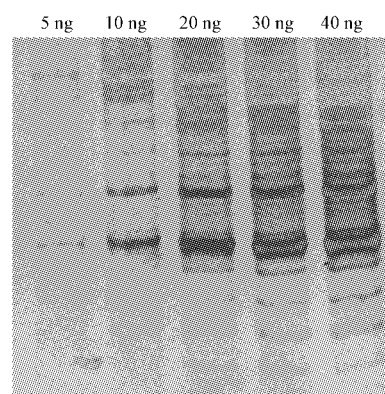
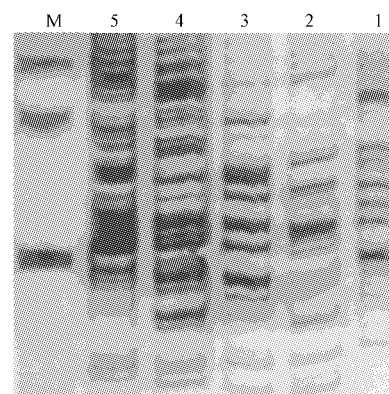


图 4 不同浓度模板条件下 ISSR-PCR 结果

Fig. 4 Results of ISSR-PCR under different DNA concentration



注:1~5 分别表示引物浓度为 $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 。

Note:1-5 indicate $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ primer respectively.

图 5 在不同引物浓度条件下的 PCR 结果

Fig. 5 PCR result of under different primer concentration

结果的准确性,由于 PAGE 检测精度的提高,严格控制好 PCR 的循环次数尤为重要。通过试验发现 25 个循环时,条带数量和亮度很少,30 个循环时,条带丰富且清晰明亮,35 个循环及以上时,大量条带出现重叠(图 6)。

2.7 Taq 聚合酶用量对 ISSR-PCR 结果的影响

Taq 酶浓度是影响 ISSR-PCR 结果的重要因素之一,酶浓度低则扩增效率低,条带少且弱;酶量高不仅产生非特异性条带,且增加成本。

由图 7 可知,在 $20 \mu L$ 体系中酶量为 0.2 U 时没有形成明显的条带, 0.6 U 时,条带较少且模糊;酶活 1.0 U 条带清晰明亮, $1.4 \sim 1.8 \text{ U}$ 时,没有出现明显的条带增加,且泳道内背景影响逐渐增强。因此,最适的 Taq 酶用量为 1.0 U 。

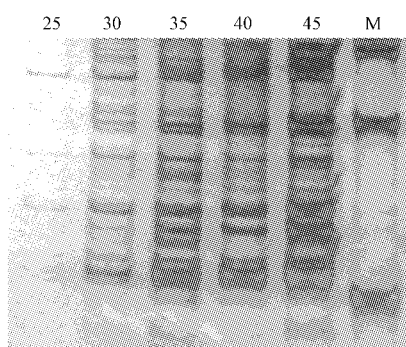


图6 不同循环次数条件下 PCR 结果

Fig. 6 PCR results under different cycles

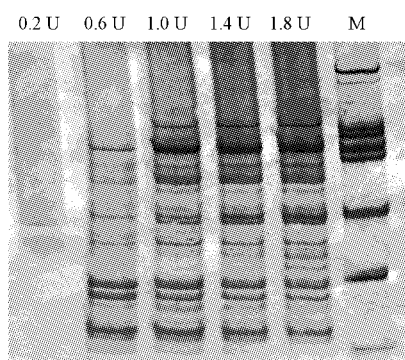


图7 不同 Taq 酶用量条件下 PCR 结果

Fig. 7 PCR results under different cycles Taq concentration

3 讨论与结论

ISSR 是一种基于 PCR 的分子标记技术,物种、反应条件的差异会导致 PCR 体系的显著变化^[13]。由于聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分辨率很高,对 ISSR 的试验体系显著不同于琼脂糖检测技术。因此,需要摸索建立对应的 ISSR 体系。

退火温度明显影响扩增谱带式样^[13-14],试验利用逐步筛选法^[15]首先确定了引物 U836 的最适退火温度。通过比较 ISSR 产物在琼脂糖凝胶和不同浓度 PAGE 中电泳结果,确定了 PAGE 检测技术在平菇 ISSR 分子标记技术中无法比拟的巨大优势。模板、 Mg^{2+} 、引物和 Taq 酶的浓度及循环次数会在扩增产物的数量、引物二聚体的形成、非特异性扩增条带产生等方面产生影响。该试验的模板浓度为 $20\text{ ng} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$,显著低于任海霞等^[16]用琼脂糖凝胶检测 ISSR 产物的 $40\text{ ng} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$,明显节约了模板的用量,更加适合样本较少且珍贵样品的检测; Mg^{2+} 浓度最适为 $1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,较低浓度扩增效果差异明显,较高的 2 个浓度没有出现明显差异;Taq 酶用量为 $1.0\text{ U} \cdot (20\mu\text{L})^{-1}$,与董娜等^[17]利用

PAGE 技术检测毛叶山桐子 ISSR 体系的用量相同;循环次数也是重要的影响因子,在平菇^[16]、马蔺^[18]、毛花猕猴桃^[19]的研究多采用 35~45 个循环,该试验循环数降低至 30 次,显著减少了非特异条带形成的几率,缩短了试验时间。

该研究结果表明,影响 ISSR-PCR 特异性和稳定性的因素很多,该研究通过反复试验确定了以 PAGE 检测技术为基础的 ISSR-PCR 反应条件和体系,最终确定了平菇菌株 ISSR-PCR 扩增的最优反应体系: $20\mu\text{L}$ 反应体系含有 Mg^{2+} 浓度为 $1.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,模板 DNA 含量为 20 ng ,引物浓度 $0.6\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,Taq 酶用量为 1.0 U ,30 个扩增循环。

参考文献

- [1] 张运峰,张淑红,武秋颖,等.平菇原生质体再生菌株的 ISSR-PCR 遗传多样性分析[J].河北农业大学学报,2016,39(2):100-104.
- [2] 李慧,陈强,黄晨阳,等.基于 SSR 标记构建平菇栽培品种核心样本方法的探讨[J].园艺学报,2012,39(10):2023-2032.
- [3] 张金霞,黄晨阳,胡清秀.食用菌品种鉴定及品种保护技术[J].中国食用菌,2005,24(4):14-16.
- [4] 张金霞,谢宝贵.食用菌菌种生产与管理手册[M].北京:中国农业出版社,2006:4.
- [5] 张金霞,黄晨阳.植物新品种保护与食用菌品种权[Z].武汉:首届全国食用菌中青年专家学术交流会,2006.
- [6] 余艳,陈海山,葛学军.简单重复序列区间(SSR)引物反应条件优化与筛选[J].热带亚热带植物学报,2003,11(1):15-19.
- [7] 钱伟,葛颂,洪德元.采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J].植物学报,2000,42(7):741-750.
- [8] 张俊,潘兆娥,张亚楠,等.棉花 SSR-PCR 过程中聚丙烯酰胺凝胶电泳操作常见问题的解决与优化[J].中国棉花,2016,43(2):10-13.
- [9] 梁宏伟,王长忠,李忠,等.聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J].遗传,2008(10):1379-1382.
- [10] 刘祖同,罗信昌.食用菌菌种生物技术及应用[M].北京:清华大学出版社,2002.
- [11] 佟汉文,孙群,吴波,等.乌拉尔甘草 ISSR-PCR 反应体系优化研究[J].中国农学通报,2005,21(4):70-74.
- [12] 冯富娟,王凤友,刘彤.红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J].植物学通报,2004,21(3):326-331.
- [13] 陈大霞,李隆云,鲁成,等.黄连 ISSR 反应条件优化的研究[J].植物研究,2007,27(1):77-81.
- [14] 李硕,李敏,卢道会,等.当归 ISSR-PCR 反应体系的建立优化及引物筛选[J].时珍国医国药,2015,26(2):373-376.
- [15] 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,2003,22(3):91-93.
- [16] 任海霞,宫志远,曲玲,等.平菇 ISSR-PCR 反应体系影响因素研究[J].中国食用菌,2009,28(4):35-37.
- [17] 董娜,唐晓娜,唐琳.毛叶山桐子性别相关 ISSR 分子标记的筛选与分析[J].四川大学学报(自然科学版),2016,53(2):465-469.
- [18] 王育青,王晓晶,王建光.马蔺 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].中国草地学报,2010,32(2):80-85.
- [19] 郎彬彬,黄春辉,陶俊杰,等.毛花猕猴桃种质资源 ISSR 反应体系的建立和优化[J].分子植物育种,2016,14(2):511-516.

枸杞种质遗传多样性 SCoT 分析

杨 辉¹, 周 旋², 王学琴¹, 康 磊¹, 梅 杰¹, 杨 剑¹

(1. 宁夏科技发展战略和信息研究所, 宁夏 银川 750001; 2. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以 17 份枸杞种质为试材, 采用 SCoT 标记法, 分析了 17 份枸杞种质资源的遗传多样性, 以期枸杞种质资源的深度开发与利用提供参考。结果表明: 从 42 条引物中筛选出 7 条重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增, 共扩增出 32 条条带, 其中 30 条条带具有多态性, 多态性比率为 93.47%; UPGMA 聚类分析显示, 17 份枸杞种质间遗传相似系数在 0.30~1.00, 平均相似系数为 0.80, 在遗传相似系数为 0.72 时, 可将 17 份枸杞资源分成四大类。表明采用 SCoT 标记法能够揭示枸杞种质间的遗传多样性。

关键词:枸杞; SCoT; 遗传多样性

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0095-04

枸杞(*Lycium bararum* L.)是我国重要传统名贵植物, 该属在全球有 80 余种, 并离散分布于南美洲、北美洲、澳洲、欧亚大陆、太平洋岛屿和南非等地域。其中, 欧亚大陆约有 10 种, 主要分布在中亚; 非洲南部分布约 20 种; 北美洲南部约 20 种; 南美洲南部分布最多, 达 30 余种, 热带地区未发现分布^[1]。我

国有枸杞属的 7 个种 3 个变种, 其中宁夏枸杞和中国枸杞分布最广泛, 宁夏枸杞主要分布在我国西北地区, 中国枸杞主要分布在华东地区^[2]。近年来, 分子标记技术快速发展为研究枸杞种质资源基因型鉴定的有力工具。目前先后采用 RAPD^[3]、AFLP^[4-6]、ISSR^[6]、SSR^[7-9]和 SRAP^[10-12]等分子标记技术对部分枸杞种质的遗传多样性进行了评价, 而应用目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)标记技术对枸杞种质遗传多样性评价尚鲜见报道。

SCoT 标记技术是 COLLARD 等^[13]于 2009 年在水稻上开发一种类似 RAPD(随机引物扩增多态性)的基因型分子标记。与 RAPD 技术一样利用单

第一作者简介:杨辉(1983-), 男, 本科, 研究实习员, 现主要从事科技信息分析服务等工作。E-mail: yh_nxinfo@163.com.

责任作者:周旋(1984-), 女, 回族, 硕士, 助理研究员, 现主要从事枸杞栽培育种等研究工作。E-mail: 18695145633@163.com.

基金项目:国家科技基础条件建设资助项目(2015DT01)。

收稿日期:2016-09-26

Establishment and Optimization of ISSR-PCR System of *Pleurotus ostreatus* by PAGE Detection Technology

ZHANG Yunfeng, QU Anjiang, FU Xinmeng

(Department of Life Sciences, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: The separation efficiency of ISSR-PCR product was detected by agarose gel electrophoresis and different concentrations of polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis, with *Pleurotus ostreatus* 'Tangping 26' genomic DNA as template and with primers U836 as primer. The results showed that the separation of PAGE was significantly better compared to agarose gel. Main factors which had an influence on ISSR reaction system were optimized based on the PAGE detection technology, that the optimum ISSR-PCR reaction system was 20 μ L total volume including 20 ng template, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.8 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTPs, 1.0 U *Taq* enzyme, 30 cycles of amplification.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; ISSR-PCR; PAGE