

大葱 ISSR 反应体系的建立及优化

贾俊香, 崔连伟, 李娜, 姜滨滨

(辽宁省农业科学院 蔬菜研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以大葱嫩叶为试材,采用单因素试验和正交实验探讨了 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、模板 DNA 以及 Buffer 用量对大葱 ISSR-PCR 扩增的影响,建立了大葱 ISSR 反应体系。结果表明:优化后的最佳反应体系为 10 μ L 反应体系中,10 \times Buffer 缓冲液 1.0 μ L, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol \cdot L $^{-1}$, dNTPs 浓度为 0.3 mmol \cdot L $^{-1}$, 引物浓度为 0.65 μ mol \cdot L $^{-1}$, *Taq* 酶 1.0 U, 模板 DNA 为 60 ng, 用灭菌的超纯水补齐体积至 10 μ L。对大葱 71 份样品材料进行 ISSR-PCR 扩增体系的检测结果显示,该优化体系扩增的产物条带清晰,稳定性高,为大葱种质 ISSR 分子标记遗传结构分析提供参考依据。

关键词:大葱;ISSR;反应体系;单因素试验;正交设计

中图分类号:S 633.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0092-05

大葱 (*Allium fistulosum* L. var. *giganteum* Makino.) 属百合科 (Liliaceae) 葱属 (*Allium*) 二三年生草本植物,以叶鞘组成的肥大假茎和嫩叶为产品的栽培种,是我国重要的香辛、保健蔬菜,含有糖类、蛋白质、矿物质和维生素。中国是栽培大葱的主要国家,淮河秦岭以北和黄河中下游为主产区。简单重复序列区间扩增多态 (Inter-simple sequence repeat) 分子标记简称 ISSR,是 ZIETKIEWICZ 等^[1]于 1994 年发展起来的一种微卫星基础上的分子标记,具有稳定性好、多态性丰富、成本低、操作简单等特点,目前在遗传多样性分析和品种鉴定中得到广泛应用^[2]。ISSR 标记已广泛用于韭菜^[3]、洋葱^[4-5]、钩栗^[6]、桃^[7]、蓝莓^[8]、石榴^[9]、火龙果^[10]、李^[11]和砂梨^[12-14]等亲缘关系及 DNA 指纹图谱的研究,是一种有效检测物种内遗传变异的方法。

大葱品种的选育工作严重滞后,缺乏科学的品种选育与种源管理,长期存在互引互种的习俗,使现有栽培群体类型多样,种源混杂,病害加剧。因此对大葱种质资源进行鉴定和品种改良的研究势在必行。目前国内外尚鲜见有关应用 ISSR 技术对大葱

进行研究的报道,该研究主要对影响大葱 ISSR-PCR 反应体系各因素进行试验,旨在建立大葱 ISSR-PCR 最佳的扩增反应体系和扩增程序,从而为 ISSR 标记技术在大葱上的应用提供技术参考,同时构建大葱种质资源 DNA 指纹图谱。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试大葱来自辽宁省农业科学院蔬菜研究所。供试试剂:ISSR 引物参照哥伦比亚大学 UBC 的 ISSR 引物序列,由宝生物(大连)生物有限公司合成, dNTP、*Taq* 酶、 $MgCl_2$ 、10 \times Buffer、CTAB、琼脂糖和 Gold View 核酸染料购自天根生物工程有限公司。其它药品均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 采用改进的 CTAB 法^[9]提取大葱嫩叶总 DNA,用 1% 琼脂糖、Gold View 染色凝胶电泳检测质量,紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度,用灭菌的超纯水稀释成 30 ng \cdot μ L $^{-1}$, -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.2.2 单因素筛选试验 研究 DNA 模板用量、*Taq* 酶用量、引物(UBC886)浓度、dNTPs 浓度、 $MgCl_2$ 用量 5 个因素对 ISSR-PCR 体系的影响。在其它因子保持不变的情况下,按一定梯度变化单一因子,筛选出最优条件。扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min;57 $^{\circ}$ C 退火 40 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循

第一作者简介:贾俊香(1979-),女,硕士,助理研究员,现主要从事大葱新品种选育等研究工作。E-mail:xiangji1129@163.com.

基金项目:辽宁省科技厅自然科学基金资助项目(2014027019)。

收稿日期:2017-02-28

环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。反应在 PCR 仪(T-Gradient Thermoblock,德国产)上进行扩增,反应产物经溴酚蓝染色后取 7 μL 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外凝胶成像仪成像。反应体系和扩增程序见表 1。

表 1 影响 ISSR-PCR 扩增的因素与水平

Table 1 Factors and levels on influencing amplification of ISSR-PCR							
因素 Factors	浓度 Concentration	水平 Levels					
模板 DNA Template DNA/ng	30 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
引物 Primer/ μL	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80
Taq 聚合酶 Taq polymerase/ μL	2.5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
dNTPs/ μL	10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Mg^{2+} / μL	25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系的正交实验设计 在单因素试验的基础上,对筛选出的 dNTPs 浓度和 Mg^{2+} 浓度等较优浓度进一步细化,DNA 模板用量和引物浓度则直接使用单因素筛选出的 3 个较适水平。采用 $\text{L}_9(3^4)$ 进行正交设计(表 2),对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板 DNA 四因素在三水平上进行探讨。

表 2 ISSR-PCR 反应体系的 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验设计

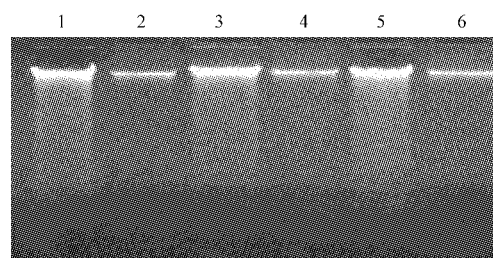
Table 2 The ISSR-PCR reaction system orthogonal experimental design $\text{L}_9(3^4)$				
处理 Treatment	引物浓度 Concentration of primer / $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTPs 浓度 Concentration of dNTPs / $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Mg^{2+} 浓度 Concentration of Mg^{2+} / $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	模板 DNA Template DNA /ng
1	0.65	0.20	1.5	30
2	0.65	0.30	2.0	60
3	0.65	0.40	2.5	90
4	0.70	0.20	2.0	90
5	0.70	0.30	2.5	30
6	0.70	0.40	1.5	60
7	0.75	0.20	2.5	60
8	0.75	0.30	1.5	90
9	0.75	0.40	2.0	30

2 结果与分析

2.1 大葱嫩叶基因组 DNA 纯度的检测结果

从图 1 可以看出,基因组 DNA 电泳条带整齐,经 RNase 酶纯化的 DNA 的泳道 2、4、6 无拖尾、弥散现象,与未经 RNase 酶纯化的 1、3、5 泳道相比 RNA 含量减少了,说明经 RNase 酶纯化提取的大葱 DNA 质量较高,多糖、蛋白质和酚类等杂质基本去除,能

够满足 ISSR 分子标记分析的质量需求,检测后将 DNA 浓度稀释到 30 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。



注:1,3,5 未经 RNase 酶处理;2,4,6 经 RNase 酶处理。

Note:1,3,5 haven't been disposed by RNase. 2,4,6 have been disposed by RNase.

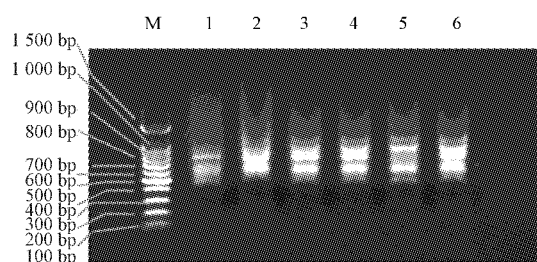
图 1 大葱嫩叶基因组 DNA 电泳质量检测

Fig. 1 Electrophoresis quality testing of genomic DNA of welsh onion leaves

2.2 大葱 ISSR-PCR 反应体系单因素试验结果分析

2.2.1 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 扩增的影响

图 2 表明,反应体系中适量的 DNA 模板浓度对 ISSR-PCR 体系的建立很重要,其中以 2.0 μL 左右的模板用量为大葱 ISSR-PCR 反应体系的最佳 DNA 用量。当模板 DNA 用量为 1.0 μL 时扩增强度较弱;1.5~2.5 μL 时扩增出的条带清晰度变高,以 2.0 μL 时清晰度最高;超过 2.5 μL 时,条带的清晰度减弱,非特异性条带数目增多。因此,选择 2.0 μL 时即反应体系中 60 ng 的 DNA 用量比较适宜。



注:M, Marker 100 bp ladder;1~6 DNA 加入量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 μL 。

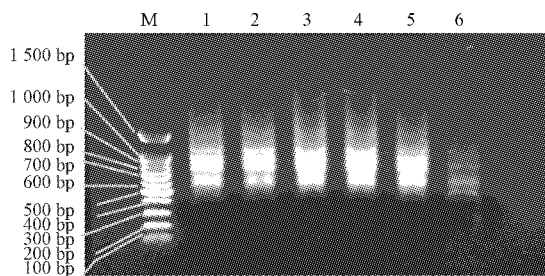
Note:M, Marker 100 bp ladder;1~6 the amount of DNA 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 μL .

图 2 不同水平 DNA 模板用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 2 Effects of different DNA template levels on ISSR amplification

2.2.2 不同引物用量对 ISSR-PCR 扩增的影响 引物浓度与扩增产物的特异性有关,其浓度变化实质上是改变引物与模板配对机率,从而影响扩增效率。引物浓度偏高或偏低,都不利于引物与模板的配对。从图 3 可以看出,引物用量为 0.65 μL 时条带反应稳

定而且清晰。当引物用量为 0.55~0.60 μL 时条带清晰度由弱变强;当引物用量为 0.65~0.80 μL 时,条带清晰度由强变弱;当引物用量为 0.80 μL 时条带极弱。因此,引物量在 0.65 μL 时为大葱 ISSR-PCR 扩增反应的最佳用量。



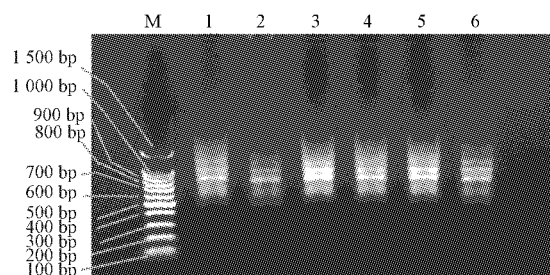
注:M, Marker 100 bp ladder;1~6 引物加入量分别为 0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80 μL 。

Note: M, Marker 100 bp ladder; 1~6 the amount of primer 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80 μL 。

图3 不同水平引物用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Effects of different primer levels on ISSR amplification

2.2.3 不同 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 扩增的影响 在 ISSR-PCR 反应中, *Taq* DNA 聚合酶的使用量直接影响到 PCR 扩增反应的成败^[15]。 *Taq* 酶浓度过高会产生弥散现象, 浓度过低则合成产物量减少。如果反应混合物中含未完全纯化的模板 DNA, 为获得高产的扩增产物, 可适当增加 *Taq* 浓度。由图 4 可知, 当加入 0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶时, 扩增条带最清晰且主次分明。当 *Taq* DNA 聚合酶加入 0.2~0.3 μL 时条带模糊, 且条带少; 随着 *Taq* DNA 聚合酶用量逐渐增多时, 扩增出的条带由



注:M, Marker 100 bp ladder;1~6 *Taq* 酶加入量分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 μL 。

Note: M, Marker 100 bp ladder; 1~6 the amount of *Taq* 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 μL 。

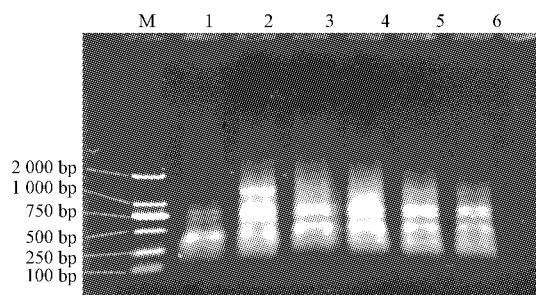
图4 不同水平 *Taq* 酶用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effects of different *Taq* DNA polymerase levels on ISSR

清晰变得模糊。因此, 选择加入 0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶时扩增出的条带效果最佳。

2.2.4 不同 dNTPs 用量对 ISSR-PCR 扩增的影响

dNTPs 浓度直接影响 ISSR-PCR 扩增产物的合成, 当 dNTPs 浓度过高时, 错误率大大增加, 同 *Taq* 酶竞争 Mg^{2+} , 从而使得反应体系中 Mg^{2+} 总量下降, *Taq* 酶活性受到影响。dNTPs 浓度不足时, 扩增产物减少。图 5 表明, 在大葱 ISSR-PCR 反应体系中, 以 0.30 μL 的 dNTPs 用量的反应体系扩增效果最佳。当 dNTPs 用量为 0.25 μL 时, 条带数量少; 当 dNTPs 用量为 0.30 μL 时, 扩增条带的清晰度最高; dNTPs 用量超过 0.30 μL 时, 条带明显减少且清晰程度减弱。因此, 选择 0.30 μL 的 dNTPs 用量为大葱 ISSR-PCR 反应体系的最佳用量。



注:M, Marker DS 2 000;1~6 dNTPs 加入量分别为 0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 μL 。

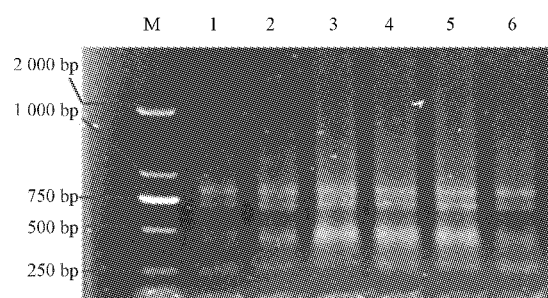
Note: M, Marker DS 2 000; 1~6 the amount of dNTPs 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50 μL 。

图5 不同水平 dNTPs 用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effects of different dNTPs levels on ISSR amplification

2.2.5 不同 Mg^{2+} 用量对 ISSR-PCR 扩增的影响

反应混合物中 Mg^{2+} 的浓度影响模板双链与引物的解链, 同时也影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性。当浓度过高时, 使非特异扩增产物增加, 浓度过低时会使扩增产物减少。 Mg^{2+} 是 *Taq* 酶的激活剂, Mg^{2+} 不足时, *Taq* 酶的作用效率低; dNTPs 也同样竞争 Mg^{2+} , Mg^{2+} 总量受 dNTPs 总量的影响, 因此反应体系中, Mg^{2+} 的浓度非常重要。 Mg^{2+} 主要是通过影响 *Taq* 酶的活性从而间接影响 PCR 扩增反应。从图 6 可以看出, 在大葱 ISSR-PCR 反应体系中, 0.75~0.85 μL 时 PCR 扩增效果较好。当 Mg^{2+} 用量为 0.65~0.70 μL 时条带较弱, 超过 0.85 μL 时条带数变少。因此, 用量为 0.80 μL 时最清晰稳定, 即 Mg^{2+} 浓度为 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



注: M, Marker DS 2 000; 1~6 Mg^{2+} 加入量分别为 0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90 μL 。

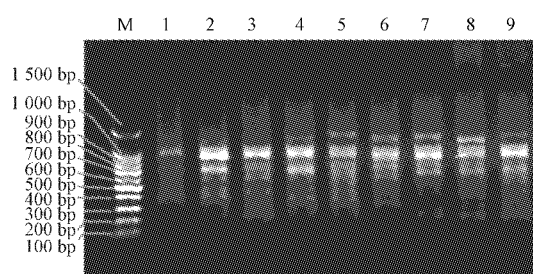
Note: M, Marker DS 2 000; 1~6 the amount of Mg^{2+} 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90 μL 。

图 6 不同水平 Mg^{2+} 用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 6 Effects of different Mg^{2+} levels on ISSR amplification

2.3 正交设计结果

由图 7 可知, 1、3、4、5、6、7、8、9 号组合都能扩增出条带, 但结果较模糊, 只有 2 号组合条带亮度均匀且稳定。综合考虑条带亮度及丰富度, 最终确定 2 号组合为最佳的 ISSR-PCR 反应体系组合, 即 10 μL 的反应体系中 10×Buffer 缓冲液 1 μL , Mg^{2+} 浓度为 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$, dNTPs 浓度为 0.3 $mmol \cdot L^{-1}$, 引



注: M, Marker DS 2 000; 1~9 对应表 2 的处理组合编号。

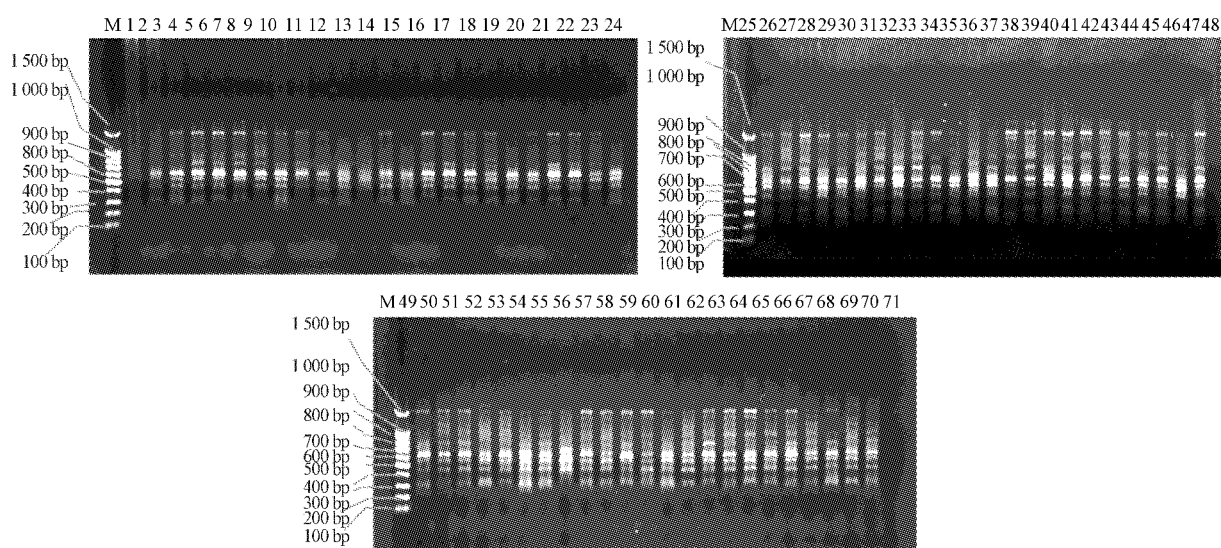
Note: M, Marker DS 2 000; 1~9 treatment number of orthogonal experiment.

图 7 正交实验设计 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

Fig. 7 Results of orthogonal design on ISSR amplification
物浓度为 0.65 $\mu mol \cdot L^{-1}$, Taq 酶 1.0 U, 模板 DNA 为 60 ng。

2.4 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测

通过试验筛选出 14 条有效引物并确立各引物的退火温度, 对优化确定的大葱 ISSR-PCR 反应体系稳定性进行检测。在 14 条引物中, 绝大多数引物在 71 份大葱种质资源中能扩增出清晰、稳定的条带, 条带大小在 100~2 000 bp。且表现出丰富的多态性。图 8 为 UBC811 的扩增情况。



注: M, Marker DS 2 000; 1~71. 71 份大葱 ISSR-PCR 扩增结果。

Note: M, Marker DS 2 000; 1~71. Amplification result in 71 cultivars of welsh onions.

图 8 引物 UBC811 对 71 份大葱品种的 ISSR 扩增结果

Fig. 8 ISSR-PCR amplification result by primers UBC811 in 71 cultivars of welsh onions

3 讨论

ISSR 分子标记技术已广泛应用于种质资源分类与鉴定、遗传多样性分析等, 比传统的形态学、细

胞学更加准确可靠, 同时操作起来比基因测序等技术方便。但 ISSR 扩增结果易受到模板 DNA、引物、 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 及 Mg^{2+} 等因素的影响。