

云南三台核桃 ISSR 体系优化

陈霞^{1,2}, 张雨², 陆斌², 陈少瑜², 李文祥¹

(1. 云南农业大学, 云南 昆明 650201; 2. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650204)

摘要: 试验以云南三台核桃幼叶为试材提取基因组 DNA, 并用正交设计方法, 比较了 Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs 和 DNA 模板等 5 因素 5 水平共 25 个反应体系的 ISSR-PCR 扩增结果。确定三台核桃 ISSR-PCR 的反应体系为: 20 μ L 反应体系中 Taq 酶 0.25 U、 Mg^{2+} 为 2.0 mM/L、引物 0.8 μ M/L、dNTPs 0.4 mM/L、10 \times PCR Buffer 2 μ L 和 10 ng 模板 DNA。该体系的建立为今后利用 ISSR 技术进行三台核桃遗传图谱的构建、基因定位、种质资源鉴定与分类和遗传多样性分析奠定了技术基础。

关键词: 三台核桃; ISSR; 正交设计

中图分类号: S 664.103.6(274) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0020-03

核桃(*Juglans*)是我国传统的经济树种, 也是云南栽培历史悠久、栽培面积最大、经济效益最好的经济林木。云南三台核桃(*Juglans sigillata* cv. Santai)是经过长期天然和人工选育的优良核桃品种, 具有丰产、果大、壳薄、仁色浅黄、食味香纯等特点, 是云南省目前核桃主要推广品种之一^[1]。随着分子生物学的发展, 分子标记技术已逐步应用于核桃研究当中, 其中运用较多的方法是 RAPD、AFLP 和 SSR, 而有关 ISSR 分子标记报道的很少^[2]。

ISSR 即简单序列重复区间扩增多态性技术是于 1994 年由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等^[3]提出。它用加锚微卫星 DNA 作引物, 即在微卫星的 5' 端或 3' 端加上 2~4 个随机选择的核苷酸, 这可引起特定位点退火, 从而导致锚定微卫星引物间的基因片段进行 PCR 扩增。ISSR 结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 具有成本较低、稳定可靠、操作简单、重复性强等优点。目前已广泛应用于构建遗传连锁图谱^[4,5]、基因定位^[6]、种质资源鉴定^[7-10]、植物分类、进化和遗传多样性分析等方面^[11-14]。试验利用正交设计来探索三台核桃 ISSR-PCR 反应的最适体系, 旨在为三台核桃 ISSR 分子标记的进一步研究奠定基础。

第一作者简介: 陈霞(1983-), 女, 四川眉山人, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术的学习与研究工作。E-mail: chenxia0835@163.com。

通讯作者: 张雨(1967-), 女, 云南昆明人, 副研究员, 现主要从事经济林良种选育及丰产栽培技术的研究工作。E-mail: zhangyu_67@126.com。

基金项目: 国家“十一·五”栽培攻关资助项目(2006BAD18B0203-20)。

收稿日期: 2009-11-20

1 材料与方法

1.1 试验材料

云南三台核桃幼叶, 于 2009 年 4 月采集于云南省楚雄州大姚县三台核桃优良种质收集圃, 采后立即置于装有硅胶的自封袋中, 带回实验室放 -30 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

Taq 酶、dNTPs 等试剂均为上海申能博彩公司产品。试验所用 ISSR 引物标号 807 的序列为 (Ag)₈T, 是由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 三台核桃基因组 DNA 的提取及检测

参照陈大明^[15]的 SDS 法, 稍有改动, 即用氯仿: 异戊醇: 乙醇进行了 2 次抽提, 在用异丙醇沉淀出的 DNA 经过乙醇洗涤后直接风干溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

提取的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 同时用 751 可见紫外分光光度计进行检测, 测出样品在波长为 230、260 以及 280 nm 处的 OD 值, 用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 分析其纯度; 用 OD₂₆₀ 计算, 1 OD 约为 50 μ g/mL 双链 DNA, 利用公式 (DNA 浓度 = 50 \times OD₂₆₀ \times 稀释倍数) 计算出样品 DNA 浓度。

1.3 PCR 体系的正交设计

采用 5 因素 5 水平 L₂₅(5⁵) 正交试验设计^[16], Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs 和 DNA 模板等 5 因子及各因子水平见表 1。正交设计共 25 种反应体系 (表 2), 各反应体系总体积为 20 μ L, 包括 2 μ L 10 \times PCR buffer, 其他各成分按照表 2 加样, 最后用 ddH₂O 补足 20 μ L。每种体系重复试验 2 次。

PCR 扩增反应在 Bio-Rad 基因扩增仪上。PCR 热反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 52.5 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖胶进行电泳检测。取

9 μ L 扩增产物与 1 μ L 溴酚蓝指示剂混匀后加入点样孔中, 150 V 恒压电泳约 2.5 h, 所用电泳缓冲液为 0.5 \times TBE。电泳结束后用 Gene Genius Bio 图像成像系统拍照分析。

表 1 正交设计中各因素及水平

因素 Factors	TaqE	Mg ²⁺	M Primer	dNTPs	Template
水平 Levels	/ U	/ mM	/ μ M	/ mM	/ ng
1	0.25	0.5	0.2	0.05	10
2	0.5	1.0	0.4	0.1	20
3	0.75	2.0	0.6	0.2	50
4	1.0	3.0	0.8	0.3	60
5	1.5	4.0	1.0	0.4	80

注: 表中 M 均为浓度单位 mol/L 的缩写 各浓度是因素在体系中的终浓度。以下同。
Note: The M was abbreviate of concentration(mol/L) in the table, the finis concentration of factors in the system, the following table the same.

表 2 25 个处理中各因素及其水平组合

因素 Factors	TaqE	Mg ²⁺	Primer	dNTPs	Template
水平 Levels	/ U	/ mM	/ μ M	/ mM	/ ng
1	0.25	0.5	0.2	0.05	10
2	0.25	1.0	0.4	0.1	20
3	0.25	2.0	0.6	0.2	50
4	0.25	3.0	0.8	0.3	60
5	0.25	4.0	1.0	0.4	80
6	0.5	0.5	0.4	0.2	60
7	0.5	1.0	0.6	0.3	80
8	0.5	2.0	0.8	0.4	10
9	0.5	3.0	1.0	0.05	20
10	0.5	4.0	0.2	0.1	50
11	0.75	0.5	0.8	0.4	20
12	0.75	1.0	1.0	0.05	50
13	0.75	2.0	0.2	0.1	60
14	0.75	3.0	0.2	0.2	80
15	0.75	4.0	0.4	0.3	10
16	1.0	0.5	0.8	0.1	80
17	1.0	1.0	1.0	0.2	10
18	1.0	2.0	0.2	0.3	20
19	1.0	3.0	0.4	0.4	50
20	1.0	4.0	0.6	0.05	60
21	1.5	0.5	1.0	0.3	50
22	1.5	1.0	0.2	0.4	60
23	1.5	2.0	0.4	0.05	80
24	1.5	3.0	0.6	0.1	10
25	1.5	4.0	0.8	0.2	20

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测

用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测所提的 DNA (图 1), 电泳结果显示, 试验提取的 DNA 片段比较完整, 以 λ DNA 作为对照, 并用 751 可见紫外分光光度计进行检测, DNA 的平均浓度为 134 μ g/mL, OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.973 说明有少量 RNA 存在, 但对 ISSR 扩增结果并无影响, OD₂₆₀/OD₂₃₀=2.273, 说明很少或无盐和小分子杂质^[17]。

2.2 ISSR 反应体系确定

从图 2 可以看出, 由于参试因素浓度不同, 各处理之间的扩增结果存在明显的差异。而在各因素中 Taq 酶为反应的主要影响因素^[18], 结合表 2 分析, Taq 酶用量按处理 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 U, 5 个递增浓度梯度, 前 4 个浓度处理的结果均有一定程度的条带, 而第 5 个浓度仅有亮区, 说明在其他因素浓度不变的情况下, 使用 Taq 酶浓度为 1.5 U 已经不适宜, 即处理中的 Taq 酶浓度为 1.0 U 已接近使用上限; 1~5 号处理中, Taq 酶为 0.25 U, 在此条件下其他 4 个因子组合的情况可以看出它们的前 4 个浓度组合均能出现条带, 即其余 4 个因子的浓度可用范围是 Mg²⁺ 0.5~2.0 mM/L、引物 0.2~0.8 μ M/L、dNTPs 0.05~0.4 mM/L、DNA 模板 10~60 ng。

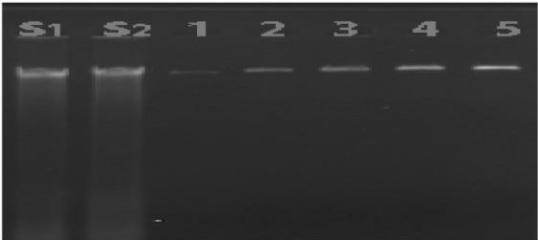


图 1 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis result of DNA abstracted

注: S1、S2 为提取的 DNA, 1~5 号为 λ DNA, 浓度分别是 10、30、50、70、90 ng。

Note: The S1、S2 was extracted DNA, the No 1 to 5 was λ DNA, the concentration ws 10 na 30 na, 50 ng 70 ng 90 ng.

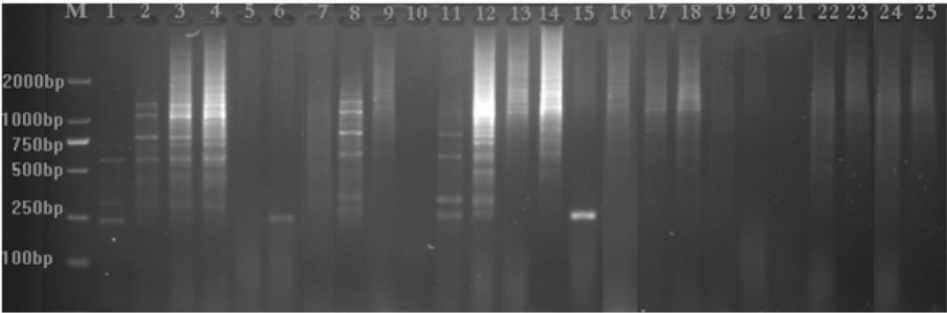


图 2 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis result of PCR products

注: M 为 DNA marker, 1~25 是各处理代号。

Note: The M was DNA marker, the No 1 to 25 was codename of treatment.

综合扩增结果, 有条带出现的各处理中, 处理 8 的条带数量较多, bp 值从 250 bp 到 1 000 bp 以上都有分配而且条带清楚, 无弱带, 较之其它处理更为理想, 因此是该正交试验设计中最适合的扩增体系。从试验效果和节约成本综合考虑, 将体系中 Taq 使用浓度确定为 0.25 U, 即确定最终的 20 μ L 体系中 Taq 酶 0.25 U、 Mg^{2+} 为 2.0 mM/L、引物 0.8 μ M/L、dNTPs 0.4 μ M/L、10 \times PCR Buffer 2 μ L 和 10 ng 模板 DNA。

3 结论与讨论

关于 ISSR 优化体系的建立, 在很多植物上均有研究, 但不同的植物间存在很大的差异, 但绝大多数都认为影响反应的各因子中, Taq 酶浓度最主要。酶浓度的大小直接影响 PCR 产物, 浓度过高可引起非特异扩增, 过低则合成产物量少。试验确定 Taq 酶用量为 0.25 U, 在后期试验中检验得到较好的结果。

Mg^{2+} 浓度影响 Taq 酶活性, 还影响引物的退火, 产物的特异性, 引物二聚体的生成等, 由于体系中的 DNA 模板、引物和 dNTPs 均可与 Mg^{2+} 结合而造成损失, 故 Mg^{2+} 总量一般比 dNTPs 高出 0.2~2.5 mM/L。引物浓度的影响也很重要, 过高会引起引物二聚体的形成和非特异性扩增, 竞争 Taq 酶和 dNTPs; 过低则造成产物量低。DNA 模板的适宜范围较广, 从 10~60 ng 均可。

试验使用正交设计, 按各因子影响主次进行排列, 组成了具有代表性的 25 个处理方案, 最后得出处理 8 为最优的水平组合。从节约成本和试验效果综合考虑, 优化并确定了云南三台核桃 ISSR-PCR 反应体系, 为进一步以分子标记技术为基础的相关研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 方文亮. 加快云南核桃产业化发展的探讨[J]. 干果研究进展, 2001(5): 14-17.
- [2] 陈霞, 陈少瑜, 陆斌, 等. 分子标记及其在核桃种植资源研究中的应

用[J]. 现代农业科技, 2009(14): 247-350.

- [3] Zietkiewicz E, Rafalskia A, Lubuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat-anchored polymerase chain reaction amplified[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [4] 宣继萍, 章镇, 房经贵, 等. 苹果 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 421-423.
- [5] 易克, 徐向利, 卢向阳, 等. 利用 SSR 和 ISSR 技术构建西瓜分子遗传连锁图谱[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29(4): 333-337.
- [6] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. Genetic linkagemap of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat relation to that of RFLP markers[J]. Theor Appl Gene, 1998(1): 37-45.
- [7] Culley T M, Wolfe A D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers[J]. Heredity, 2001, 86(5): 545-556.
- [8] 丘英雄, 傅承新, 何云芳. 乐昌含笑不同类型鉴定的 ISSR-PCR 分析[J]. 林业科学, 2002, 38(6): 49-52.
- [9] 孙岳, 李景鹏, 金昌元, 等. 南、北五味子 ISSR 鉴定研究[J]. 中医药学报, 2003, 31(1): 29-30.
- [10] 李进波, 江良荣, 李春海, 等. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 42-47.
- [11] 钱韦, 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.
- [12] 何予卿, 张宇, 孙梅. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 261-263.
- [13] 马朝芝, 傅延栋, Stine T, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
- [14] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21.
- [15] 陈大明, 张上龙, 金永丰, 等. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624.
- [16] 赵选民. 试验设计方法[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 254.
- [17] 张瑞, 唐铭露, 翁周, 等. 重楼属植物 AFLP 实验体系的建立[J]. 四川大学学报, 2006, 43(5): 1104-1107.
- [18] 吴小丽, 王述彬, 曹培生, 等. 辣椒 ISSR-PCR 体系优化[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 289-291.

Optimization on ISSR Reaction System of *Juglans sigillata* cv. Santai

CHEN Xia^{1,2}, ZHANG Yu², LU Bin², CHEN Shao-yu², LI Wen-xiang¹

(Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; 2. Yunnan Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650204)

Abstract: Based on cell DNA extracted from *Juglans sigillata* cv. Santai and orthogonal design, this experiment conducted 5 important elements Taq Polymerase, Mg^{2+} , primer, dNTPs, DNA template of ISSR system by 5 different concentration. The result of Polymerase Chain Reaction showed that during the 25 treatments, No.8 was the best one. That is the optimal reaction system of ISSR for *Juglans sigillata* cv. Santai was 20 μ L total reaction volume containing 0.25 units of Taq DNA polymerase, 2.0 mM/L of Mg^{2+} , 0.8 μ M/L of primer, 0.4 mM/L of dNTPs, 2 μ L of 10 \times PCR Buffer and 10ng of DNA template. This research established a foundation of further interrelated study in *Juglans sigillata* cv. Santai.

Key words: *Juglans sigillata* cv. Santai; ISSR; orthogonal design