

# 正交设计优化莲藕 ISSR-PCR 反应体系研究

李长春, 阳天泉, 戴余军, 李建华, 田春元

(孝感学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

**摘要:** 利用正交实验设计的方法, 对莲藕 ISSR-PCR 反应的四因素 (*Taq* DNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度) 三水平进行优化分析, 并在此基础上对模板 DNA 浓度、PCR 反应过程中的退火温度进行梯度检测。结果表明: 20  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度为:  $10 \times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L、dNTP 150  $\mu$ mol/L、引物 1.2  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L 和 *Taq* DNA 聚合酶 4 U, 最佳模板 DNA 浓度为 40~60 ng, 引物 U826 的最佳退火温度为 48.7  $^{\circ}$ C。

**关键词:** 莲藕; ISSR-PCR; 反应体系; 正交设计

**中图分类号:** S 682.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0121-03

莲藕(*Nelumbo nucifera*) 属睡莲科, 是一种古老的子遗植物, 在我国栽培历史悠久, 分布广泛, 几乎遍布全国, 种质资源丰富, 品种繁多, 在长期的进化过程中出现了各种变异类型, 经过长期的人工选择, 按培育的目的可分为花莲、籽莲和藕莲三大类<sup>[1-2]</sup>。莲藕富含糖、蛋白质、淀粉和维生素, 不仅营养丰富, 而且有很强的保健功能, 荷叶、荷梗、莲心、藕节等均可入药, 在食用、药用、美容健美、园林绿化以及外贸出口等方面有极大的应用价值和开发潜力。

ISSR 即简单重复序列区间 (Inter-Simple Sequence Repeat) 是由 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种分子标记技术, 它结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 以其多态性高, 操作简单, 可重复性强而在不同物种中被广泛应用于品种鉴定、遗传多样性或指纹图谱构建等研究领域<sup>[3-5]</sup>。由于 ISSR 分子标记技术以 PCR 反应为基础, 影响 PCR 扩增的一些因素都能影响 ISSR-PCR 扩增的结果。考虑到 PCR 体系中各因素间的互作效应, 该试验采用正交实验设计的方法, 从引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度 4 种因素 3 个水平对莲藕 ISSR 反应体系进行优化, 并在此基础上对模板 DNA 的浓度和 PCR 反应程序中的退火温度进行比较分析, 旨在建立适合于莲藕的 ISSR 反应体系, 为莲藕遗传多样性、种质资源筛选和分子标记辅助育种等方面的研究奠定基础。

**第一作者简介:** 李长春(1976-), 男, 湖北广水人, 硕士, 助教, 研究方向为植物遗传与生物技术。E-mail: lcc386@163.com。  
**基金项目:** 湖北省教育厅优秀中青年人才资助项目 (Q20102701); 湖北省农业资源利用重点(培育)学科资助项目 (鄂学位[2010]1 号)。  
**收稿日期:** 2010-10-15

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

莲藕样品采自武汉植物园莲藕种质资源库。试验所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 所用引物序列为 U826 : (AG)<sub>8</sub>YT; U840 : (GA)<sub>8</sub>YT; U807 : (AG)<sub>8</sub>T; U844 : (CT)<sub>8</sub>RC; U811 : (GA)<sub>8</sub>C; U842 : (GA)<sub>8</sub>YG; U841 : (GA)<sub>8</sub>YC, 注: Y=(C, T), R=(A, G)。其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 莲藕基因组 DNA 的提取 采取改良的 CTAB 法提取莲藕幼嫩叶片的 DNA<sup>[6]</sup>。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交设计与 PCR 扩增 采用  $L_9(3^4)$  正交实验设计, 对 dNTP 浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度进行四因素三水平筛选, 方案见表 1。根据表 1 配制总体积为 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系, 除表中因素外, 每管中还含有  $1 \times$  PCR buffer 和 40 ng 模板 DNA, 引物选用 U826, 每个处理设 2 次重复。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个热循环, 每个热循环包括 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的正交实验设计

处理 编号	dNTP / $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	Primers / $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	$Mg^{2+}$ / mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	<i>Taq</i> DNA polymerase / U $\cdot$ (20 $\mu$ L) <sup>-1</sup>
1	150	0.3	1.0	1.0
2	150	0.6	1.5	2.0
3	150	1.2	2.0	4.0
4	200	0.3	1.5	4.0
5	200	0.6	2.0	1.0
6	200	1.2	1.0	2.0
7	250	0.3	2.0	2.0
8	250	0.6	1.0	4.0
9	250	1.2	1.5	1.0

结束循环后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。PCR 产物检测: PCR 扩增完成后, 用 1% 的琼脂糖(含有 0.1% 的 EB)凝胶电泳, 电泳缓冲液为  $0.5 \times$  TBE, 在 120 V 稳定电压的条件下, 电泳 1.5 h, 用凝胶成像系统照相保存。

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA 浓度的优化 根据正交实验结果选出最佳反应体系组合后, 再对模板 DNA 浓度进行梯度优化试验。20  $\mu$ L 反应体系中模板 DNA 浓度设 5、10、20、30、40、60、80、100 ng 8 个处理, 其它反应物浓度和反应程序同正交实验确定的最佳反应体系, 2 次重复。

1.2.4 ISSR-PCR 反应体系中退火温度的优化 在上述试验确定的最佳反应体系基础之上, 对不同引物的退火温度进行梯度试验。在 PCR 仪上设置 8 个温度梯度, 即 48、48.7、49.9、51.7、54.1、56.57.2、58℃ 反应体系组合和其它反应程序同正交实验确定的最佳反应体系。2 次重复。

1.2.5 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测 选择另外 6 个 ISSR 引物 U840、U807、U844、U811、U842、U841 对优化确定的莲藕 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测。2 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR-PCR 反应体系的正交优化

参照何正文等的方法对 PCR 扩增结果进行直观分析<sup>[7]</sup>。由图 1 可以看出, 由于处理中各因素的梯度大, 导致不同处理组合的扩增结果存在明显差异。组合 1、6、9 效果很差, 其中组合 1 可能是引物、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶浓度过低, 导致扩增产物少; 组合 6、9 可能是反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶浓度较低, 而高浓度的 dNTP 结合了较多的  $Mg^{2+}$ , 影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性。引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度同样受二价阳离子的影响, 从而导致扩增效率降低所致<sup>[8]</sup>。组合 8 可能是 dNTP 浓度较高, 引物浓度较低导致其与模板结合位点少, 产物减少。组合 2、4、5、7 基本能扩增出主谱带, 但清晰度低。组合 2、5 是由于反应体系中引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶浓度较低, 扩增产物减少; 组合 4、7 可能因为反应体系中引物浓度过低, 与模板结合位点减少, 导致 PCR 产物下降。组合 3 主谱带亮度好, 且多态性高、清晰度好。该试验选择第 3 组为最佳组合, 即 20  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度为:  $10 \times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L、dNTP 150  $\mu$ mol/L、引物 1.2  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L 和 *Taq* DNA 聚合酶 4 U。

### 2.2 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

根据正交实验结果选择组合 3 对模板 DNA 浓度进行梯度筛选。从图 2 可以看出, 由于模板 DNA 浓度不同, 其扩增结果也存在一定的差异。在 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中, 模板 DNA 浓度为 5 到 100 ng 虽然能扩增出谱带, 但模板 DNA 浓度为 5~30 ng 时, 扩增出的条带

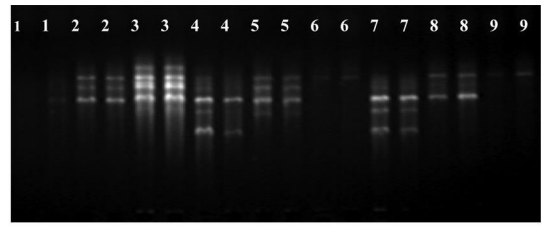


图 1 正交实验设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增

注: 1~9 为表 2 的处理组合编号。

数较少。模板 DNA 浓度为 80 和 100 ng 时扩增出的条带模糊。因此, 该试验确定 20  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中, 模板 DNA 浓度以 40~60 ng 为最佳。

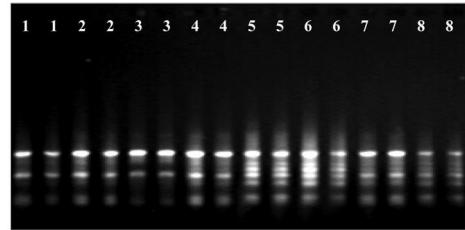


图 2 ISSR-PCR 反应体系中不同模板 DNA 浓度的扩增结果

注: 1~8 的反应体系中模板 DNA 分别为 5、10、20、30、40、60、80、100 ng。

### 2.3 不同退火温度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

根据正交实验和模板 DNA 浓度的筛选结果, 选择组合 3(模板浓度为 40 ng)对引物 U826 的最佳退火温度进行梯度摸索。由图 3 可以看出, 退火温度不同, 其扩增结果也存在明显的差异。在 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中, 退火温度由 48℃ 升到 58℃ 虽然均能扩增出谱带, 但退火温度为 48℃ 时, 由于退火温度较低, 特异性较差, 背景模糊, 主带不是很明显。当退火温度高于 54.1℃ 时引物与模板的特异性增强, 到 57.2℃、58℃ 时谱带模糊, 多态性偏低。退火温度为 48.7、49.9℃ 时, 谱带清晰, 亮度高, 但 48.7℃ 时多态性较高, 因此确定引物 U826 的最佳退火温度为 48.7℃。

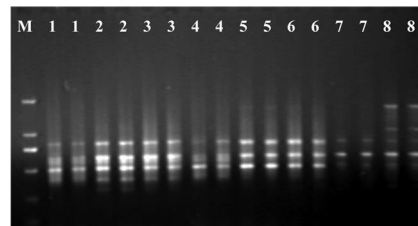


图 3 ISSR-PCR 反应体系中不同退火温度的扩增结果

注: 1~8 对应的退火温度依次为 48、48.7、49.9、51.7、54.1、56.57.2、58℃。

### 2.4 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测

根据正交实验和模板 DNA 浓度的筛选结果, 选择不同引物对优化确定的莲藕 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测。由图 4 可以看出, 所选 6 个 ISSR 引物均

能扩增出清晰度和多态性高、重复性好的谱带,表明优化确定的莲藕 ISSR-PCR 反应体系是稳定可靠的。

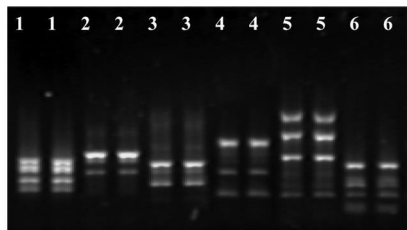


图4 ISSR-PCR 反应体系中不同引物的扩增结果

注:1~6 对应的引物依次 U840、U807、U844、U811、U842、U841。

### 3 结论与讨论

由于 ISSR 分子标记技术建立在 PCR 反应基础上,其扩增结果会随反应条件和扩增程序变化以及物种不同的影响<sup>[9-10]</sup>,因此,要保证 ISSR-PCR 试验结果的稳定性和可靠性,必须针对供试样品,不同来源的试剂和反应程序对影响 PCR 扩增的主要因子进行适当的调整、筛选和优化。

$Mg^{2+}$  是 *Taq* 酶的激活剂,同时还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合,影响 PCR 扩增的效率以及扩增的特异性<sup>[8]</sup>。*Taq* DNA 聚合酶的用量直接影响扩增的条带,其浓度过高易产生非特异性扩增,浓度过低则会导致产物的合成效率下降,甚至无扩增产物。dNTP 作为 PCR 反应的原料,浓度过低会影响到产物的多样性和特异性,dNTP 中的磷酸基还可以与游离的  $Mg^{2+}$  结合,反应中  $Mg^{2+}$  浓度应与 dNTP 浓度保持在一定的比例<sup>[11-12]</sup>。引物浓度会对 PCR 的带型产生明显的影响,浓度太高易产生非特异性扩增,浓度过低则不能进行有效的扩增<sup>[13]</sup>。此外,DNA 的浓度和引物的退火温度均对扩增结果有明显的影响<sup>[14-15]</sup>。

考虑到参与反应的不同因子间的互动,该研究采用正交实验的方法,得到了莲藕 ISSR-PCR 最佳反应体系,即 20  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度为:10  $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L、dNTP 150  $\mu$ mol/L、引物

1.2  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L 和 *Taq* DNA 聚合酶 4 U,最佳模板 DNA 浓度为 40~60 ng。引物 U826 的最佳退火温度为 48.7 $^{\circ}$ C。利用该优化系统进行的莲藕 ISSR-PCR 反应,可获得稳定性高、重复性好、背景清晰的电泳图谱,对进一步利用 ISSR 分子标记进行莲藕种质资源的筛选及多样性评价、优良种质基因的克隆和分子标记辅助育种具有一定的参考意义。

### 参考文献

- [1] 中国科学院武汉植物研究所.中国莲[M].北京:科学出版社,1987.
- [2] 韩延闯,刁英,周立,等.莲藕品种 DNA 指纹图谱的绘制[J].武汉植物学研究,2004,22(3):193-196.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [4] 邱英雄,胡绍庆,陈跃磊,等. ISSR-PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用[J].园艺学报,2004,31(4):529-532.
- [5] 缪恒彬,陈发棣,赵宏波,等.应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].中国农业科学,2008,41(11):3735-3740.
- [6] 王经源,郭明亮,林文雄,等.高多糖含量植物—莲 DNA 的提取方法[J].福建稻麦科技,2004(3):8-9.
- [7] 何正文,刘运生,陈立华,等.正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J].湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.
- [8] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M].北京:人民军医出版社,1993:7-14.
- [9] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J].遗传,2002,24(5):613-616.
- [10] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M].北京:人民军医出版社,1993:7-14.
- [11] 邱长玉,高国庆,陈伯伦,等.茉莉花 ISSR-PCR 反应体系的建立[J].北方园艺,2008(2):214-217.
- [12] Bomet B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. Plant Mol Bio Rep, 2001, 19: 209-215.
- [13] 李麟,王喆之.丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化[J].广西植物,2008,28(5):599-603.
- [14] 贺佳,丁小余,褚必海,等.泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化[J].南京师大学报:自然科学版,2006,29(3):86-90.
- [15] 王彦华,侯喜林,徐明宇.正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J].西北植物学报,2004,24(5):899-902.

## Optimization for ISSR-PCR Reaction System in Lotus Root Using Orthogonal Design

LI Chang-chun, YANG Tian-quan, DAI Yu-jun, LI Jian-hua, TIAN Chun-yuan

(College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000)

**Abstract:** The orthogonal design was used to optimize the ISSR-PCR amplification system of Lotus root in four factors (the concentration of) *Taq* DNA polymerase, dNTP, Primers and  $Mg^{2+}$  at three levels. Then, based on the optimal ISSR-PCR amplification system, the concentration of template DNA and annealing temperature were proposed by gradient PCR. The results showed that 10  $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L, dNTP 150  $\mu$ mol/L, primers 1.2  $\mu$ mol/L,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 4 U and 40~60 ng template DNA in a total volume of 20  $\mu$ L were suitable for ISSR-PCR amplification system of lotus root. The optimal annealing temperature for primers U826 was 48.7 $^{\circ}$ C.

**Key words:** lotus root; ISSR-PCR; reaction system; orthogonal design