

# 正交设计优化大白菜 ISSR-PCR 反应体系

吴春燕, 高 义, 宋廷宇, 张晓明, 韩玉珠

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**以大白菜为试材,采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取大白菜基因组 DNA,采用正交实验设计方法,对 dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、及模板 DNA 五因素四水平进行优化,筛选并建立了适合大白菜的 ISSR-PCR 反应体系。结果表明:25  $\mu$ L 的反应体系中含有 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、200  $\mu$ mol/L dNTP、0.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.7  $\mu$ mol/L 引物、30 ng 模板 DNA。在此基础上探讨了最佳循环次数,应用该优化反应体系,用 3 个不同循环数对资源 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,结果显示优化的反应体系适宜的循环次数是 30。

**关键词:**大白菜;ISSR;正交设计;PCR 反应体系

**中图分类号:**S 634.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0127-03

大白菜,又称白菜、结球白菜、芽白、黄芽菜等,起源于我国,栽培历史悠久,在我国蔬菜市场供应中占有重要地位。据农业部统计,2006 年全国蔬菜播种面积为 18 216.9 km<sup>2</sup>,大白菜播种面积为 2 623.7 km<sup>2</sup>,占全国蔬菜播种面积的 14.4%,产量占全国蔬菜总产量的 18%。其面积和产量在各种蔬菜中均居首位。由此可见,大白菜在蔬菜中占有举足轻重的地位<sup>[1]</sup>。虽然对大白菜分子标记研究报道较多<sup>[2-4]</sup>,但应用 ISSR 标记进行研究的报道甚少。

ISSR 分子标记是在 1994 年创建的一种类似于 RAPD 的 PCR 技术<sup>[5]</sup>,它是在简单重复序列(SSR)的 3' 或 5' 端加锚 1~4 个随机碱基作为扩增引物,用此锚定引物对两侧具有反向排列的 SSR 间的基因组 DNA 片段进行扩增。ISSR 标记结合了 RAPD 和 SSR 标记的优点,操作简单、多态性高、稳定性好。目前已广泛用于植

物的品种鉴定<sup>[6]</sup>、亲缘关系<sup>[7]</sup>、遗传多样性<sup>[8]</sup>、遗传作图<sup>[9]</sup>、基因定位<sup>[10]</sup>等方面。

ISSR 标记技术是基于 PCR 的一种标记,所以  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、引物、模板 DNA 等反应条件都会影响反应的效果,因此其适宜的 PCR 反应体系需要一定时间的摸索。如果进行单因素试验,就会忽视交互作用,短期内难以得到最佳反应组合;而采用正交实验设计则可以弥补单因素试验的不足,应用较少的水平组合研究多因素之间的互作效应,尽快找到最佳处理。该试验应用正交设计方法,采用  $L_{16}(4^5)$  正交表,对 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、引物 5 个因素进行了研究,并对 PCR 反应中的循环次数进行了优化,以期建立适于大白菜 ISSR 反应的体系,为今后利用 ISSR 标记技术对大白菜进行品种鉴定、遗传作图、QTL 定位分析等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试大白菜品种为‘丰抗 78’。dNTP、*Taq* DNA 聚合酶由 TAKARA 公司生产,引物 836 由上海生工合成。新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂、糖购自天根公司。Marker 为索莱宝公司产品。

**第一作者简介:**吴春燕(1978-),女,吉林永吉人,博士,讲师,研究方向为蔬菜种质资源创新与利用。E-mail:cuwu315@163.com。

**责任作者:**张晓明(1962-),男,硕士,教授,研究方向为蔬菜栽培生理。E-mail:xiaomingzh@126.com。

**基金项目:**吉林农业大学科研启动基金资助项目(201013)。

**收稿日期:**2011-12-14

results showed that the suitable medium for different culture periods was the suitable medium for differentiation medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L;During the proliferating period of clustered shoots,the medium with MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L showed the best effects;MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L was suitable for rooting and getting strong plants;and the best medium for rooting was a modified 1/2MS+IBA 0.1 mg/L,rooting trte for 100%. The rooted plantlets are transferred into the substrate pearlite : vermiculite =1 : 1,and the survival rate of transplants reached above 95% with the best treatment.

**Key words:** strawberry;heat treatment;stem apex detoxification;fast propagation

## 1.2 试验方法

试验于 2009 年 8 月在吉林农业大学园艺学院进行。将供试大白菜种子浸种后,播种在营养钵中,选取幼嫩叶片,采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取大白菜基因组 DNA,并用紫外分光光度计检测 DNA 的纯度及浓度。针对  $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 等因素,选用  $L_{16}(4^5)$  正交表进行试验(表 1)。反应体系中总体积为 25  $\mu$ L,不足用水补足。以上 16 个处理在 PCR 仪上进行扩增。反应程序为:94℃ 4 min;94℃ 30 s,53.5℃ 1 min,72℃ 1 min 30 s,35 次循环;最后 72℃ 延伸 10 min,扩增完后 4℃ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像仪进行拍照。根据正交实验结果找出最佳处理,采用最佳处理再对循环次数进行梯度试验,分别循环 30、35、40 次。

表 1 ISSR-PCR 正交设计

Table 1 ISSR-PCR orthogonal design

处理 Treatment	因素 Factors				
	$Mg^{2+}$ /mmol · L <sup>-1</sup>	dNTP /μmol · L <sup>-1</sup>	<i>Taq</i> 酶 /U	引物 /μmol · L <sup>-1</sup>	模板 DNA /ng
1	1.0	150	0.5	0.1	10
2	1.0	200	1.0	0.3	20
3	1.0	250	1.5	0.5	30
4	1.0	300	2.0	0.7	40
5	1.5	150	1.0	0.5	40
6	1.5	200	0.5	0.7	30
7	1.5	250	2.0	0.1	20
8	1.5	300	1.5	0.3	10
9	2.0	150	1.5	0.7	20
10	2.0	200	2.0	0.5	10
11	2.0	250	0.5	0.3	40
12	2.0	300	1.0	0.1	30
13	2.5	150	2.0	0.3	30
14	2.5	200	1.5	0.1	40
15	2.5	250	1.0	0.7	10
16	2.5	300	0.5	0.5	20

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 浓度检测结果

采用新型基因组提取试剂盒提取的大白菜基因组 DNA,经紫外分光光度计检测,浓度为 125 ng/ $\mu$ L,  $OD_{260}/OD_{280}$  为 2.0,说明 DNA 纯度较高,适合做 ISSR 分析。

### 2.2 正交设计的直观分析

由图 1 可知,在 16 个组合中,除 8 以外,均有谱带产生。根据条带的强弱和杂带的数量,依据何正文等<sup>[11]</sup>的方法进行直观分析。电泳条带背景低、数量丰富的记为 16 分,依此类推,扩增效果最差的记为 1 分。16 个处理依次记分为:2、7、6、3、15、16、4、1、10、9、12、8、13、5、11、14 分。

ISSR-PCR 的扩增结果是反应因素,即 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、引物、 $Mg^{2+}$  和模板 DNA 等综合作用的结果。在正交设计的 16 个处理中,由于每个因素的浓度、用量及组合的不同,扩增结果差异明显。而最佳的水平组合应该为 6 号。因为在此反应体系下进行的 PCR 反

应,产物谱带清晰、稳定、多态性丰富。因此,优化后的反应体系为:在 25  $\mu$ L 的反应体系中包括:1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 200  $\mu$ mol/L dNTP, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.7  $\mu$ mol/L 引物, 30 ng 模板 DNA。

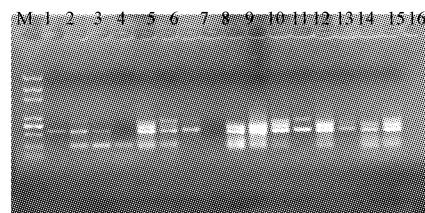


图 1 正交设计 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

注: M. DNA Marker DL 2000 Plus; 1~16. 处理编号, 见表 1。

Fig. 1 The amplification result of ISSR-PCR by orthogonal design

Note: M. DNA Marker DL 2000 Plus; 1~16 was the treatments as showed in table 1.

### 2.3 循环次数对白菜 ISSR 反应的影响

由图 2 可看出,循环次数与产量密切相关,次数太少,PCR 产物条带弱,次数太多,易引起非特异性扩增。试验用 6 号组合进行了 30、35、40 次循环试验。结果表明,30 次循环电泳谱带较强,条带清晰背景浅;35 次循环时,扩增条带出现弥散状;40 次循环时,扩增不稳定,条带弱。可见 30 次循环已经达到要求。

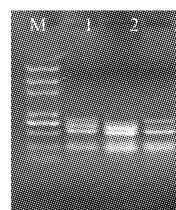


图 2 循环次数对扩增结果的影响

注: M. DNA Marker DL 2000 Plus; 1~3. 循环次数分别为: 30、35、40 次。

Fig. 2 Influence of cycle number on amplification

Note: M. DNA Marker DL 2000 Plus; 1~3 was 30, 35 and 40 cycles respectively.

## 3 讨论与结论

试验利用正交设计方法,优化了大白菜 ISSR-PCR 反应体系。反应体系中的 *Taq* 酶、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、DNA 模板和引物等都影响 PCR 扩增的效果。谢运海等<sup>[12]</sup>认为 PCR 反应体系中各因素的影响从大到小依次为:模板 DNA、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、引物和 *Taq* 酶。而王彦华等<sup>[13]</sup>认为在 PCR 反应体系中影响最大的为  $Mg^{2+}$  浓度。无论哪种因素影响最大,由于因素间存在相互作用,任何一种因素变化都会影响 PCR 扩增的效果。

*Taq* 酶是 PCR 反应体系中的主要因素,引物与模板结合后,必须在 *Taq* 酶的作用下才会发生延伸反应。而 *Taq* 酶在反应时必须要有  $Mg^{2+}$  的参与,因此在反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度也十分重要, $Mg^{2+}$  主要通过改变 *Taq* 酶

的活性而对 PCR 反应结果产生影响,  $Mg^{2+}$  浓度过高, 会出现非特异性扩增, 浓度过低, 产物减少。该试验结果表明, 大白菜 ISSR-PCR 反应体系中适宜的 *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.5 U,  $Mg^{2+}$  浓度在 1.5 mmol/L 时适宜反应进行。

dNTP 作为 PCR 反应的原料, 直接影响扩增的效果。dNTP 浓度过低 PCR 产物量少, 浓度太高时易发生错配, 也不会对  $Mg^{2+}$  产生拮抗作用, 使  $Mg^{2+}$  实际参加反应的浓度下降, 影响 *Taq* 酶的反应效果。在该试验中, 经综合比较后, 适于 ISSR-PCR 反应的 dNTP 浓度为 200  $\mu$ mol/L。引物浓度影响 PCR 扩增效果。浓度过高, 易发生碱基错配, 产生非特异性扩增, 而且易导致引物二聚体形成; 引物浓度过低, 扩增产物少, 产量低<sup>[14]</sup>。试验结果表明, 引物浓度为 0.7  $\mu$ mol/L 较适合大白菜 ISSR-PCR 反应扩增。

模板 DNA 也影响扩增效果, ISSR-PCR 反应中适宜模板 DNA 浓度范围较大, 浓度太低, 无扩增产物或产物不稳定; 浓度太高, 使非特异性扩增产物增加, 电泳谱带弥散。在该试验中, 模板浓度对扩增影响不明显, 试验结果与姜静等<sup>[15]</sup>、刘威生等<sup>[16]</sup> 结论基本相同。该试验的反应体系中, 模板 DNA 用量为 30 ng 时较适宜。另外, 循环次数也对 PCR 扩增有影响。循环次数太少, 电泳条带弱, 次数太多, 易引起非特异性扩增。故需要对不同的引物进行循环次数的摸索, 该试验体系 30 次循环为宜。

该试验结果表明, 稳定的 ISSR 反应体系最佳的组合为: 25  $\mu$ L 的反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度为 1.5 mmol/L, dNTP 适宜浓度为 200  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶为 0.5 U, 引物浓度为 0.7  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 为 30 ng; 最佳循环次数为 30 次。

#### 参考文献

[1] 柯桂兰. 中国大白菜育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.

- [2] 朴钟云, 吴迪, 王森, 等. 大白菜抗根肿病近等基因系的分子标记辅助选育[J]. 园艺学报, 2010, 37(8): 1264-1272.
- [3] 袁鹤, 张成合, 刘海河, 等. 大白菜雄性核不育基因的染色体定位及 AFLP 分子标记筛选[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2061-2067.
- [4] 沈向群, 杨文骏. 大白菜核基因显性雄性不育性育性恢复基因的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 731.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [6] Blair M W, McCouch S R, Panaud O. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 780-792.
- [7] 苏小俊, 徐海, 陈龙正, 等. 丝瓜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(3): 42-46.
- [8] Joshi S P, Aggarwal R K, Ranjekar P K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 1311-1320.
- [9] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 37-45.
- [10] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 348-353.
- [11] 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.
- [12] 谢运海, 夏德安, 姜静. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 分子植物育种, 2005(3): 445-450.
- [13] 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.
- [14] Bruno W S. High output genetic mapping of polyploids using PCR-Generated junkers [J]. Theor. Appl. Genet., 1993, 86: 105-112.
- [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] 刘威生, 冯晨静, 杨建民, 等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建 [J]. 果树学报, 2005, 22(6): 626-629.

## Optimization of an ISSR-PCR Reaction System of Chinese Cabbage by Orthogonal Design

WU Chun-yan, GAO Yi, SONG Ting-yu, ZHANG Xiao-ming, HAN Yu-zhu

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** Chinese cabbage genomic DNA, extracted from its fresh young leaves by DNA extraction kit was applied to optimize ISSR-PCR amplification system based on orthogonal design. Five factors were considered such as dNTP,  $Mg^{2+}$ , *Taq* DNA polymerase, primer and template DNA at four levels. A suitable ISSR-PCR reaction system was established. The results showed that 25  $\mu$ L reaction system containing 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 200  $\mu$ mol/L dNTP, 0.5 U *Taq* DNA polymerase, 0.7  $\mu$ mol/L primer and 30 ng DNA template. The number of cycles was also investigated. Three different cycle numbers of were used to test the optimized reaction system. The results indicated that the appropriate cycle numbers of the optimized reaction was 30.

**Key words:** Chinese cabbage; ISSR; orthogonal design; PCR reaction system