

豇豆 ISSR-PCR 反应体系的建立

尹光晶^{1,2}, 宋廷宇², 吴春燕², 李静², 宋述尧²

(1. 松原职业技术学院, 吉林 松原 138005; 2. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118)

摘要:以豇豆为试材,用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取豇豆 DNA,选取 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物及模板 DNA 为主因素进行正交优化试验,从 3 个不同循环次数中筛选出最佳效果循环次数。结果表明:优化的反应体系为 25 μ L 的反应体系中 Mg^{2+} 1.0 mmol/L、dNTP 0.2 μ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U、引物 0.3 μ mol/L、模板 DNA 45 ng,循环次数为 40 次。

关键词:豇豆;ISSR 标记;反应体系

中图分类号:S 643. 403. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2012)12—0141—03

豇豆(*Vigna unguiculata* L. Walp)俗称角豆、姜豆、带豆,在我国公元 3 世纪初张揖所撰的《广雅》^[1]中已有相关记载。由于中国豇豆变异性很大,种质资源丰富,栽培也很广泛。因此,不少学者认为中国是豇豆的次生起源中心。所以,针对豇豆开展分子标记研究来探讨其起源中心以及种质资源鉴定是十分必要的。

而 ISSR 标记方法是近年来以微卫星为引物的 PCR 基础上发展起来的一种成型的分子标记技术。它结合了 RAPD 和 SSR 标记的优点,具有稳定性较高、重复性好、多态性高等特点,已在种质资源鉴定^[2]、遗传作图^[3]、基因定位^[4]、遗传多样性^[5]、进化^[6]、系统发育^[7]、分子标记育种^[8]等方面得到广泛应用。该试验选用 5 因素 4 水平的正交实验设计来建立 ISSR-PCR 反应体系,主要因素设置为 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA,通过筛选来建立最优的豇豆反应体系,为豇豆的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为豇豆幼叶,采自吉林农业大学园艺学院蔬菜基地。植株生长健壮,叶片正常。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒,按照提取说明书提取豇豆 DNA。

1.2.2 DNA 浓度检测 用紫外分光光度计检测 DNA

的浓度和纯度。并将 DNA 稀释到浓度为 5 ng/ μ L,备用。

1.2.3 试验设计 采用 5 因素 4 水平 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计(表 1),对 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板 DNA 和 *Taq* 酶用量进行优化。反应体系的总体积为 25 μ L,包括 1 \times PCR Buffer,其它各成分按照表 1 加样,最后用水补足。

1.2.4 PCR 反应条件及电泳、成像 以上 16 个处理在 PCR 仪 9700 上进行扩增,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,40 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。用琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统进行拍照分析。

1.2.5 循环次数的确定 根据以上试验找出最佳组合后,用最佳组合对循环次数进行梯度试验,设循环次数分别 35、40、45 次。

表 1 ISSR-PCR 正交实验设计($L_{16}(4^5)$)

处理组合	因素				
	Mg^{2+} /nmol \cdot L ⁻¹	dNTP / μ mol \cdot L ⁻¹	<i>Taq</i> 酶 /U	引物 / μ mol \cdot L ⁻¹	模板 DNA /ng
1	1.0	0.1	0.5	0.1	15
2	1.0	0.15	1.0	0.2	30
3	1.0	0.2	1.5	0.3	45
4	1.0	0.25	2.0	0.4	60
5	1.5	0.1	2.0	0.2	45
6	1.5	0.15	1.5	0.1	60
7	1.5	0.2	1.0	0.4	15
8	1.5	0.25	0.5	0.3	30
9	2.0	0.1	1.0	0.3	60
10	2.0	0.15	0.5	0.4	45
11	2.0	0.2	2.0	0.1	30
12	2.0	0.25	1.5	0.2	15
13	2.5	0.1	1.5	0.4	30
14	2.5	0.15	2.0	0.3	15
15	2.5	0.2	0.5	0.2	60
16	2.5	0.25	1.0	0.1	45

第一作者简介:尹光晶(1987-),女,吉林松原人,现主要从事果树生理研究工作。E-mail:yinguangying@yahoo.com.cn。

责任作者:宋廷宇(1977-),男,吉林德惠人,博士,现主要从事蔬菜种质资源创新与利用方面的研究工作。E-mail:tyson422@163.com。

收稿日期:2012-04-17

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度检测结果

用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, $OD_{260}/OD_{280}=2.0$, 说明 DNA 纯度高, 适合做 ISSR 分析。将 DNA 样品用超纯水稀释成 $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 备用。

2.2 PCR 正交设计直观分析

PCR 的扩增结果受多个因素综合影响, 而最佳的组合应该是谱带清晰、特异性谱带多态性高、且谱带较稳定的组合。因此, 该试验确定 3 号组合为最佳组合, 即 $25 \mu\text{L}$ 的 PCR 反应体系中含: $1.0 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$ 、 $0.2 \mu\text{mol/L dNTP}$ 、 $1.5 \text{ U Taq DNA 聚合酶}$ 、 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 引物, 45 ng 模板 DNA。

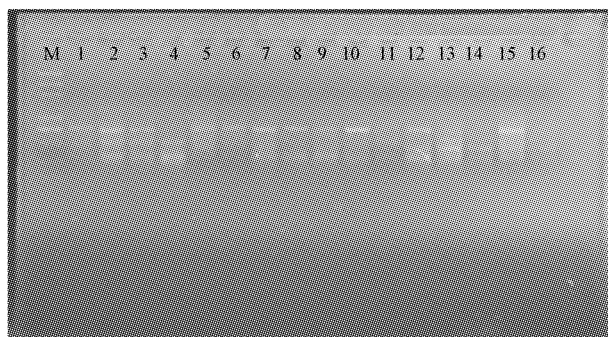


图1 正交设计 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

注: M 为 Marker; 1~16 为表 1 中正交设计处理。

2.3 循环次数对豇豆 ISSR 反应的影响

引物在最佳反应体系下进行了 35、40 和 45 次循环的尝试。40 次循环时, 条带清晰背景浅, 扩增带型较强; 35 次循环时, 扩增条带出现弥散状; 45 次循环时, 扩增不稳定, 条带弱。可见 40 次循环已经达到要求。

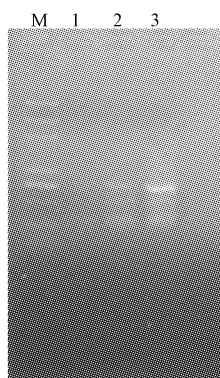


图2 循环次数对扩增结果的影响

注: M 为 Marker; 1~3 依次为循环 35、40、45 次。

3 讨论与结论

Taq 酶是 Mg^{2+} 的依赖性酶, 受 Mg^{2+} 浓度的影响,

Mg^{2+} 主要通过改变 Taq 酶的活性对 PCR 反应结果产生影响, 在该试验中, 经综合比较, Taq DNA 聚合酶为 1.5 U , Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 。

dNTP 作为 PCR 反应的原料, 浓度过低则产率下降, 浓度过高不仅会导致 PCR 错配, 而且 dNTP 会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用, 在该试验中, 经综合比较后, dNTP 适宜浓度为 0.2 mol/L 。

引物浓度也是影响 PCR 扩增的一个重要因素。引物浓度过高, 易引起碱基错配以及产生非特异性扩增; 引物浓度过低, 其与 DNA 模板结合位点少, 扩增产量下降。该试验综合比较认为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 比较适合此反应体系。

模板 DNA 亦是影响 PCR 扩增的重要因素, ISSR-PCR 反应对模板 DNA 适宜浓度范围较大, 浓度太高, 会相应增加非特异性扩增产物, 使电泳图谱背景呈弥散状; 浓度太低, 则无扩增产物或产物不稳定。

循环次数也是影响 PCR 扩增的一个重要因素。次数太少, 产物量极低、条带较弱, 次数太多, 反而引起非特异性扩增。可见, 一个优良的反应体系是多方面因素共同在起作用。

该试验稳定的 ISSR 反应体系最佳的组合为: $25 \mu\text{L}$ 的反应体系中 dNTP 适宜浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L , 引物浓度为 $0.3 \mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 为 45 ng , Taq DNA 聚合酶为 1.5 U ; 最佳循环次数为 40 次。

参考文献

- [1] 朱德蔚, 王德斌, 李锡香. 中国作物及其野生近缘植物(蔬菜作物卷下)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [3] Blair W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat(ISSR) amplification for analysis of micro satellite motif frequency and fingerprinting in rice(*Oryza sativa* L.) [J]. Theor. Appl. Genet, 1999, 98:780-792.
- [4] Kojima T, Nagaoka T, Noda K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. Theor. Appl. Genet, 1998, 96:37-45.
- [5] Ratnaparkhem B, San Trad K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. Theor. Appl. Genet, 1998, 96:348-353.
- [6] Joshi P, Gupta S, Aggarwal K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat(ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor. Appl. Genet, 2000, 100:1311-1320.
- [7] 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.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem. Bull, 1987, 19:11-15.

培养基种类、BA 浓度和蔗糖浓度对春石斛组培苗增殖的影响

修景润¹, 朴炫春², 姚睿², 高日², 廉美兰²

(1. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林 龙井 133400; 2. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要:以春石斛(*Dendrobium casciflake*)的组培苗为试材,研究培养基的种类、BA 浓度、蔗糖浓度等因素对不定芽增殖生长的影响,为春石斛种苗的规模化生产提供理论依据。结果表明:在 MS 培养基中不定芽分化及生长能力明显好于 White、VW、SH、B₅ 及 KC 培养基,培养 30 d 后每个外植体平均分化出 3.7 个健壮的苗;在 MS 培养基中加入 BA 3.0 mg/L 以及蔗糖 30 g/L 时,春石斛不定芽增殖数多,且生长良好。

关键词:春石斛;增殖生长;培养基种类;BA 浓度;蔗糖浓度

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0143-03

石斛(*Dendrobium casciflake*)为兰科石斛属多年生草本植物,在我国主要分布于西南和华南地区^[1]。春石斛兰属,有优美的花姿、芳香的气味,具有很高的观赏价值,受到全球消费者喜爱^[2]。春石斛主要采用分株及组织培养的方式进行繁殖,但其分株繁殖的繁殖系数低^[3-5],不能满足生产需要,且其对生长条件的要求较为苛刻,所以早在 20 世纪 60 年代初国外有人开始进行石斛组织培养^[6-8]的研究,但是春石斛在生产实践过程中还存在很多问题急需被研究和解决。有人采用组织培

养的技术方法进行墨兰根状茎的快速繁殖,克服了种子繁殖与分株繁殖技术上的缺点^[9]。利用组织培养技术快速繁殖春石斛,能够克服普通繁殖技术上的缺点,缩短了人工栽培春石斛周期,在短期内取得经济效益,具有较大的实用价值。因此,该试验用春石斛无菌试管苗作为试验材料,对影响春石斛增殖的几个外部因素分别进行了探讨,以缩短人工栽培周期为种苗的规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取春石斛的侧芽,去掉根和老叶,使用流水冲洗 30 min 以上,再用浓度为 70% 的酒精浸泡 30 s,然后使用无菌水冲洗 1 次后用浓度为 0.1% 的升汞溶液浸泡,浸泡时间为 8 min,最后用无菌水冲洗 6 次,得到无菌外植体。

第一作者简介:修景润(1981-),男,硕士,现主要从事长白山经济植物栽培育种研究工作。E-mail: huijuanli2006@163.com。

责任作者:廉美兰(1963-),女,博士,教授,现主要从事植物组织培养和生物反应器的研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160179)。

收稿日期:2012-03-26

Establishment of Inter Simple Sequence Repeat PCR Reaction System in Asparagus Bean

YIN Guang-jing^{1,2}, SONG Ting-yu², WU Chun-yan², LI Jing², SONG Shu-yao²

(1. Songyuan Technical College, Songyuan, Jilin 138005; 2. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Genomic DNA of asparagus bean was extracted by the method of DNA secure Plant kit. Five factors such as concentration of Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA, primer, and template DNA which were primary factor for the orthogonal design was selected, while the best cycles of PCR reaction was also screened from three different treatments. The results showed that the optimization for ISSR-PCR reaction system on asparagus bean was as follows: 25 μ L reaction system containing 1.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 μ mol/L dNTP, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 0.3 μ mol/L primer and 45 ng DNA template, the whole PCR reaction ran for 40 cycles.

Key words: asparagus bean; ISSR; reaction system