

云锦杜鹃 ISSR 扩增条件的优化

顾奇萍^{1,2}, 金则新^{2*}, 李钧敏²

(1. 西南大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

摘要: 以云锦杜鹃基因组 DNA 为研究对象, 对影响 ISSR-PCR 扩增效果的一些因素, 包括镁离子浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 含量、Taq DNA 聚合酶量、BSA 浓度、引物用量以及退火温度等进行筛选和优化, 建立了稳定、可重复的最佳反应体系: 10 μ L PCR 反应体积中, 1 $\times$ Taq 酶配套缓冲液 (10 mmol/L Tris $\cdot$ HCl pH9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.15 mmol/L dNTP, 0.45 U Taq DNA 聚合酶, 2 mg/mL BSA, 12 pmol 引物, 16 ng 模板 DNA。利用所建立的优化反应体系从 100 个 ISSR 引物中共筛选出 12 个稳定性好、重复性高的引物, 对 5 个居群共 100 个云锦杜鹃个体的 DNA 进行扩增, 检测到 170 个位点, 其中多态位点 150 个, 多态位点百分率 88.24%, 5 个居群的多态位点百分率平均为 48.23%。云锦杜鹃 ISSR 反应体系的建立为利用 ISSR 分子标记技术研究云锦杜鹃的遗传多样性奠定了良好的基础。

关键词: 云锦杜鹃; ISSR; 优化; 遗传多样性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0560-04

Optimization of ISSR amplification conditions for *Rhododendron fortunei*

GU Qi-Ping^{1,2}, JIN Ze-Xin^{2*}, LI Jun-Min²

(1. Key Laboratory of the Three Gorge Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Ecology, Taizhou University, Linhai 317000, China)

Abstract: Factors which affect the ISSR-PCR amplification, such as Mg²⁺ concentration, dNTP concentration, template DNA dosage, Taq DNA polymerase units, BSA concentration and primer dosage, and annealing temperature were optimized and selected by using the genomic DNA of *Rhododendron fortunei* as material. The suitable ISSR-PCR conditions BSA, 12 pmol primer, 16 ng template DNA. The suitable annealing temperature was 56.9 °C. Based on these suitable conditions, 12 primers were selected and 170 DNA bands were produced in 5 populations with 100 individuals among which 150 loci were polymorphic. The total percentage of polymorphic loci was 88.24%, while the mean percentage of polymorphic loci of 5 *Rh. fortunei* population was 48.23%. The establishment of the PCR reaction conditions could settle favorable basis for the further study on the genetic diversity of *Rh. fortunei* by using ISSR molecular marker techniques.

Key words: *Rhododendron fortunei*; ISSR; optimization; genetic diversity

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), 又称 Inter-SSR, 称为简单重复序列区间, 是建立在 PCR 反应基础上的一种新的分子生物学技术, 由 Zietkiewicz 等于 1994 年建立的, 它结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 具

RAPD 操作简单, 所需 DNA 量少, 不需预知研究对象的基因组序列等优点, 并具 SSR 的稳定性。因此, ISSR 技术近年来已迅速应用于品种鉴定、种质资源和遗传多样性的研究 (Gilbert 等, 1999; Borne

收稿日期: 2005-09-28 修回日期: 2006-05-09

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y504220); 台州市科技局项目 (044205) [Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y504220); Bureau of Science and Technology of Taizhou City (044205)].

作者简介: 顾奇萍 (1982-), 女, 浙江诸暨人, 在读硕士, 从事植物生态学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: jzx@tzc.edu.cn)

等,2002)。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子技术,所以同其它标记一样,其最终结果易受多种因素的干扰,如模板 DNA、Taq 酶、dNTP、引物以及 Mg^{2+} 等都能影响扩增的结果,甚至其中一个因子的改变都会导致扩增条带弥散、消失及位置的改变,从而严重影响整个实验结果,因此,在研究时都应先建立起合适的反应体系并对其进行优化(何桥等,2005)。

云锦杜鹃(*Rhododendron fortunei*)属杜鹃花科常绿灌木或小乔木,生于海拔 400~1 900 m 山间林中,花大艳丽,极具观赏价值(方云亿,1989)。本研究以云锦杜鹃基因组 DNA 为研究对象,对 ISSR-PCR 扩增条件进行筛选和优化,建立重复性好、结果清晰而稳定的云锦杜鹃 ISSR-PCR 反应体系,为进一步研究云锦杜鹃种群的遗传多样性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验材料均采自浙江省境内,5 个样地分别位于括苍山、天台山、凤阳山、百山祖、干坑等地。各居群均随机选取 20 株成年植株的幼嫩叶片,根据居群的大小,相邻植株间的距离在 30 m 以上。取植株的幼嫩叶片置于保鲜袋中,封口,于样品贮藏箱(由超低温冰袋保持冷藏条件)带回实验室,-70 °C 低温冰箱保存,供 DNA 提取。本优化实验材料取自丽水市凤阳山居群。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用改进的 SDS 法,按李钧敏等(2002)进行云锦杜鹃基因组 DNA 的提取,DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照定量。将 DNA 稀释成 20 ng/ μ L,贮存于-20 °C 冰箱中备用。

1.3 试验处理

ISSR-PCR 扩增反应体系的优化按常规采用单因素试验,共试验了 6 个因素,每个因素各设置了四个梯度。 Mg^{2+} 浓度设置了 1.5、1.8、2.1、2.4 mmol/L 四个梯度;4×dNTP 设置了 0.1、0.15、0.2、0.25 mmol/L 四个梯度;Taq DNA 聚合酶设置了 0.45、0.6、0.75、0.9U 四个梯度;牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)设置了 1、2、3、4 mg/mL 四个梯度;引物设置了 6、12、18、24 pmol 四个梯度,模板 DNA 用量设置了 4、10、16、22 ng 四个梯度。

退火温度设置 50、50.3、50.9、51.8、52.9、54.2、55.5、56.9、58.4、59.3、59.8、60.1 °C 等 12 个梯度。

1.4 ISSR 反应程序

ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia,Set No. 9,No. 801-900)提供的序列,由上海生工生物工程公司合成。

原初扩增反应条件为 10 μ L PCR 反应体积中,1×Taq 酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0,50 mmol/L KCl,0.1% Triton X-100),1.5 mmol/L $MgCl_2$,0.5 U Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司),6 pmol 引物,0.15 mmol/L 4×dNTPs,10 ng 模板 DNA,2 mg/mL BSA。本实验所用的 PCR 仪为美国 Thermol 公司的 p×2 梯度 PCR 仪。PCR 反应程序为:94 °C 5 min 1 个循环;再 94 °C 30 s,55 °C 45 s,72 °C 1.5 min,共 35 个循环;最后一个循环 72 °C 延伸 5 min,使 DNA 片段完全延伸。

1.5 PCR 产物的鉴定

扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶(0.5×TBE,含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)上进行电泳分析,于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照保存。

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,对 Mg^{2+} 浓度比较敏感。 Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 结果的重要变量之一,在一般的 PCR 反应中,1.5~2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 比较合适(卢盛栋,1999)。在云锦杜鹃 ISSR 扩增中,当 Mg^{2+} 分别在 1.5 mmol/L,1.8 mmol/L 时,扩增条带清晰,但在 1.8 mmol/L 时,条带变少,稳定性下降,而当 Mg^{2+} 浓度达到 2.1 mmol/L 以上时条带明显变得不清晰(图 1)。所以我们选择 1.5 mmol/L 为该实验 Mg^{2+} 的最适浓度。

2.2 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

dNTP 浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱影响较大(图 1)。当浓度为 0.1 mmol/L 时,条带虽清晰,但缺少分子量最小的一条带,而 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L 时,条带最清晰、稳定;随着 dNTP 浓度逐渐增加,条带减少且变得模糊不清,可能由于 dNTP 过多,与游离的 Mg^{2+} 结合,导致 Mg^{2+} 浓度的降低,从而使 ISSR 条带变模糊。因此,本实验的最佳 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L。

2.3 Taq 酶单位对 ISSR 扩增的影响

Taq 酶单位的变化对扩增结果影响较大,量多不仅增加实验成本,而且容易产生非特异性扩增产物,量少则会导致产物的合成效率下降。由图 1 可知,在 Taq DNA 聚合酶的量 0.45U 时,条带最清晰。随着酶浓度的增加,条带亮度也随之增加,但同时背景也略有增加,当酶提高到 0.9 U 时,背景亮度非常高,可能是酶量的提高导致非特异性扩增的增加。因此本研究认为在 10 μ L 反应体积中最适的 Taq 酶量为 0.45 U。

2.4 BSA 浓度对 ISSR 带的影响

BSA 浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱有一定的影响(图 1)。当 BSA 浓度为 1 mg/mL 时,条

带较弱,当浓度增至 2 mg/mL 时,条带变亮,清晰度增强,而随着浓度进一步增加,条带亮度又开始减弱,到达 4 mg/mL 时,不仅亮度减弱,而且有些条带开始丢失。所以我们最终选择 2 mg/mL 为本实验 BSA 的最佳浓度。

2.5 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

在本研究中,引物浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱影响较小,引物浓度从 6~24 pmol 均有明显并清晰的扩增产物,带型变化较小(图 1)。当引物浓度为 12 pmol 时,带型最清晰,条带的亮度最大;当引物增加至 18 pmol 以上时,带型无变化但条带的亮度却明显下降。所以我们选择 12 pmol 为该实验的最佳引物浓度。

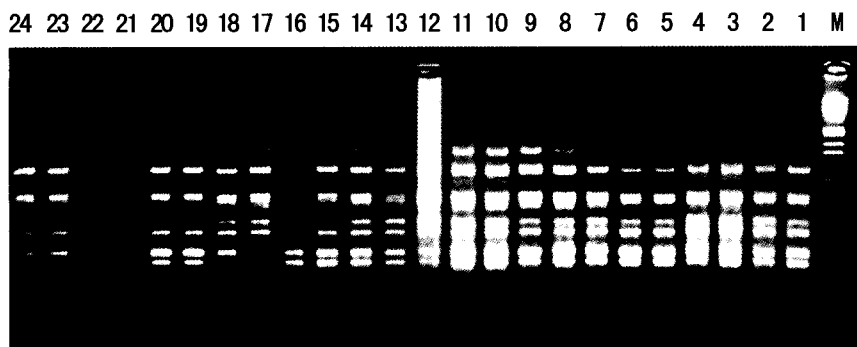


图 1 不同因素对云锦杜鹃 ISSR 扩增的影响(引物 UBC 856)

Fig. 1 Effect of different conditions on *Rhododendron fortunei* ISSR amplification (primer UBC 856)

M. 200 bp 标准分子量参照物。1-4. Mg^{2+} 浓度分别为 1.5、1.8、2.1、2.4 mmol/L; 5-8: dNTP 浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25 mmol/L; 9-12: Taq 酶浓度分别为 0.45、0.6、0.75、0.9 U; 13-16: BSA 浓度分别为 1、2、3、4 mg/mL; 17-20: 引物浓度分别为 6、12、18、24 pmol; 21-24: 模板 DNA 浓度分别为 4、10、16、22 ng。



图 2 退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Fig. 2 Effect of annealing temperatures on the ISSR-PCR amplification results

M. 200 bp 标准分子量参照物。1-12(引物 UBC855)和 13-24(引物 UBC856): 温度依次为 50、50.3、50.9、51.8、52.9、54.2、55.5、56.9、58.4、59.3、59.8、60.1 $^{\circ}$ C。

2.6 模板 DNA 浓度对 ISSR 扩增的影响

适宜的模板 DNA 浓度是保证特异性扩增的前提,不同的扩增材料对模板 DNA 浓度的需要也各

不相同。而本实验,在 10 μ L PCR 反应体积中,当模板 DNA 浓度为 4 ng 和 10 ng 时,扩增条带颜色较浅;而在 16 ng 和 22 ng 时,模板 DNA 量对扩增结

果影响不大,均能获得清晰的条带。因此,我们选择 16 ng 为该实验最适 DNA 模板量。

2.7 退火温度对 ISSR 带的影响

退火温度对不同物种 ISSR-PCR 的影响非常明显。根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛,选择能看到清晰条带的两个引物 UBC 855 和 UBC 856 进行退火温度的测定,结果如图 2 所示。从中可看出,当退火温度为 56.9 °C,两个引物扩增出的条带稳定、清晰,而它们的理论退火温度却均为 54 °C,席嘉宾等(2004)在地毯草的 PCR 扩增反应中使用的引物 UBC 890 和引物 UBC 887 的理论温度分别为 52 °C 和 42 °C,而实际退火温度分别为 60 °C 和 48 °C,均比理论温度要高。本研究使用的其它引物的理论温度和实际温度见表 1,可见实际退火温度与理论退火温度之间存在一定的差异,实际退火温度可能高于、低于或等于理论退火温度。

表 1 退火温度对 PCR 结果的影响

Table 1 Annealing temperature of different primers

引物 Primer	理论温度(T_m /°C) Melting temperature	实际退火温度(°C) Annealing temperature
UBC855	54	56.9
UBC856	54	56.9
UBC841	58	59.2
UBC895	58	55.0
UBC900	62	55.0

2.8 云锦杜鹃的引物筛选和扩增

利用该反应体系对 100 个 ISSR 引物进行了筛选,筛选出 UBC817、UBC826、UBC827、UBC835、UBC836、UBC840、UBC841、UBC855、UBC856、UBC888、UBC895、UBC900 共 12 个扩增条带清晰,重复性好,稳定性高的引物作为正式扩增的 ISSR 引物。上述 12 个引物对 5 个居群共 100 个云锦杜鹃个体的 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 170 条带,平均每个引物 14.2 个条带,其中有 150 个条带为多态条带,占 88.24%。5 个居群的多态位点百分率(P%)的变化范围在 42.94%~55.88%之间,平均为 48.23%。

3 结论

扩增条件的变化会对 ISSR 图谱产生较大的影响,从而影响 ISSR 分析的准确性和稳定性,因此,

为了获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱,对云锦杜鹃进行引物的筛选、ISSR-PCR 扩增条件的优化及不同引物的退火温度的确定显得十分必要。通过对影响 ISSR 反应体系中各个主要影响因子的筛选和优化,建立了重复性好、清晰度高的 ISSR-PCR 反应体系。本研究结果显示,适合云锦杜鹃 ISSR 分析的扩增条件如下:10 μ L PCR 反应体积中,1 $\times$ Taq 酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris $\cdot$ HCl pH9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.15 mmol/L dNTP, 0.45U Taq DNA 聚合酶, 2 mg/mL BSA, 12 pmol 引物, 16 ng 模板 DNA。最适退火温度 56.9 °C。以此条件对同一云锦杜鹃植株 DNA 进行了 3 次 ISSR 分析,结果可靠,带型稳定。采用 12 个引物检测云锦杜鹃的遗传多样性研究中,所产生的 ISSR 标记位点清晰,反应稳定,检测多态性能力较强。有关云锦杜鹃居群的遗传多样性和遗传分化将另文发表。

参考文献:

- 卢盛栋. 1999. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版, 458—463
- 方云亿. 1989. 浙江植物志(第 5 卷)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社: 9—10
- Bornet B, Goraguer F, Joly G, et al. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs)[J]. *Genome*, **45**: 481—484
- Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, et al. 1998. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. *Theoretical Appl Gen*, **98**: 1 125—1 131
- He Q(何桥), Liang GL(梁国鲁), Xin JH(谢江辉). 2005. Optimization of the inter-simple sequence repeat reaction system and its preliminary application in wax apple (*Syzygium samarangense*) (莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), **22**(2): 186—189
- Li JM(李钧敏), Ke SS(柯世省), Jin ZX(金则新). 2002. Extraction and determination of DNA from *Heptacodium miconioides* (濒危植物七子 DNA 的提取及分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(6): 499—502
- Xi JB(席嘉宾), Zheng YZ(郑玉忠), Yang ZY(杨中艺). 2004. Establishment and optimization of ISSR reaction system for Carpet grass(地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报(自然科学版)), **43**(3): 79—84
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, **20**: 176—183