

银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化

曹福亮, 王国霞, 李广平, 花喆斌

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 为了对影响银杏 *Ginkgo biloba* 简单序列重复区间扩增-聚合酶链式反应 (ISSR-PCR) 扩增反应体系的因素进行优化, 采用 ISSR-PCR 扩增技术和 UVP 凝胶电泳成像技术对模板 DNA 浓度、*Taq* 酶用量、引物用量、dNTP 的用量以及退火温度等因素进行筛选和优化。筛选优化后的反应条件: *Taq* 酶 0.3 μg , 2 μL 10 \times Buffer (含 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2), 模板 DNA 40 ng, dNTP 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后进行 38 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 48~53 $^{\circ}\text{C}$ (根据引物而定) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。上述反应条件可广泛应用于银杏的遗传多样性分析、遗传育种和转基因等方面的研究。图 6 表 1 参 19

关键词: 林木育种学; 银杏; ISSR-PCR; 反应体系

中图分类号: S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)02-0186-05

Optimizing the inter simple sequence repeat (ISSR) reaction system with *Ginkgo biloba*

CAO Fu-liang, WANG Guo-xia, LI Guang-ping, HUA Zhe-bin

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: To optimize the inter simple sequence repeat (ISSR) reaction conditions with *Ginkgo biloba*, the concentrations of template DNA, *Taq* DNA polymerase, primers, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), along with annealing temperature and their influence on polymerase chain reaction (PCR) amplification were studied. The sample leaves were collected in 97 old ginkgo trees from more than 20 provinces in April and May, 2006. Results showed that the optimum reaction conditions for ISSR-PCR of ginkgo were: 0.3 μg *Taq* DNA, 2 μL 10 \times *Taq* buffer (including 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2), 40 ng template DNA, 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer, and 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} with a total volume of 20 μL . Amplification consisted of one cycle with initial denaturation at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 38 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s annealing at 48-53 $^{\circ}\text{C}$ (depending on the primer used), 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, and a final 10 min extension at 72 $^{\circ}\text{C}$. Afterward, the samples were maintained at 4 $^{\circ}\text{C}$. [Ch, 6 fig. 1 tab. 19 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Ginkgo biloba*; ISSR-PCR; reaction system

ISSR (inter simple sequence repeat, 简单序列重复区间扩增) 是 Zietkiewicz 等于 1994 年在 SSR (simple sequence repeat) 基础上创建, 基于 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 扩增的一种新型分子标记技术^[1]。该标记具有操作简单, 多态性好, 重复性较高, 引物设计简单, 成本低, 不需预先知道 DNA 序列即可用引物对它们进行扩增等优点^[2], 目前已被广泛应用于植物品种鉴定、遗传图谱构建、基因定位和遗传多样性分析等研究^[3-8]。银杏 *Ginkgo biloba* 是我国特有的珍贵的多用途经济树种。本试验针对可能引起银杏 ISSR-PCR 反应体系变化的 6 个主要影响因素进行了相关条件的优化研究, 以确保建立一个适合银杏的 ISSR-PCR 反应体系, 使 ISSR 分析结果的可靠性和重复性能

收稿日期: 2007-02-01; 修回日期: 2007-11-09

基金项目: “十一五” 国家科技支撑项目 (2006BAD18B0301)

作者简介: 曹福亮, 教授, 博士生导师, 从事经济林等研究。E-mail: samcao@njfu.edu.cn

满足银杏遗传多样性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

2006 年 4 ~ 5 月从全国 20 多个省(市)的 97 株百年以上的古银杏雄树, 采集刚展开的银杏嫩叶装入封口袋用硅胶干燥保存带回备用。采用改进的 CTAB 法提取 DNA^[9]; 利用紫外分光光度计 (Lambda Bio10 型, 美国 PE 公司)检测提取 DNA 的光密度值, 并计算其浓度和纯度, 采用琼脂糖凝胶电泳法 (DYY-III 型恒压恒流电泳仪, 北京六一仪器公司)检测 DNA 的完整性。

1.2 PCR 反应及电泳

利用 PCR 扩增仪 (PTC-200, 美国)进行扩增, 采用如下的反应程序: 94 °C 变性 5 min, 然后进行 38 个循环: 94 °C 变性 30 s, 48 ~ 53 °C (根据引物而定)退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止反应。各影响因素的优化均采用上述反应程序。利用 DYY-III 型恒压恒流电泳仪 (北京六一仪器公司)对 PCR 产物在 10 g · kg⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳分离, 溴化乙锭染色显带。紫外灯下 UVP 凝胶成像系统观察并成像。主要试剂: 由上海生工生物技术公司合成 60 条引物; *Taq* polymerase, dNTP, 100 bp ladder, Mg²⁺ 和琼脂糖均购自北京天为时代科技有限公司, 其他试剂为国产分析纯。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

模板 DNA 浓度是影响 ISSR-PCR 扩增效果的一个重要因子。在 10 ~ 100 ng 设置了 10 个梯度进行试验。由图 1 可以看出, 银杏 ISSR 反应对模板 DNA 浓度不甚敏感, 模板浓度许可范围较大。在 20 μ L 反应体系中, 含有 10 ng 模板 DNA 时几乎无扩增产物, 20 ~ 50 ng 均能获得比较清晰的谱带, 但在 40 ng 时扩增出的条带最多且清晰, 到 50 ~ 100 ng 时虽仍有谱带出现, 但清晰度却逐渐下降。考虑到结果的稳定性和可重复性, 笔者选用 40 ng 作为适宜的模板浓度。

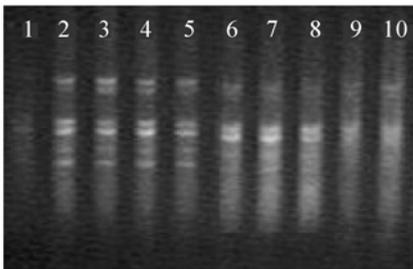


图 1 模板 DNA 浓度对 ISSR 反应的影响

1 ~ 10 分别表示 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ng (20 μ L) 的 DNA 浓度

Figure 1 Effects of template DNA concentrations on ISSR reaction
1 - 10 indicating DNA concentrations 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 ng (20 μ L) respectively

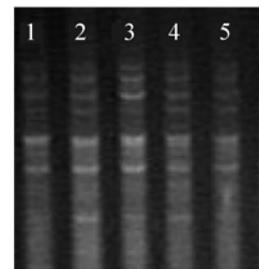


图 2 引物浓度对 ISSR 反应的影响

1 ~ 5 分别表示 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 μ mol · L⁻¹ 的 ISSR 引物浓度

Figure 2 Effects of primer concentrations on ISSR reaction
1 - 5 indicating primer Concentrations: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 μ mol · L⁻¹ respectively

2.2 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

为了减少非特异性扩增, 加强重复性, 笔者的试验在 0.1 ~ 1.0 μ mol · L⁻¹ 设置了 5 个引物浓度梯度, 分析它们对 ISSR 扩增结果的影响。由图 2 可以看出: 当浓度在 0.1 μ mol · L⁻¹ 时, 扩增不完全, 谱带较少; 在 0.5 μ mol · L⁻¹ 时, 扩增效率最高, 谱带清晰、稳定且无非特异性谱带; 在 0.7 ~ 0.9 μ mol · L⁻¹ 时, 扩增谱带较弱, 难以辨认且不稳定。故试验选用 0.5 μ mol · L⁻¹ 作为最佳的引物浓度。

2.3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

设置了6个dNTPs浓度梯度。结果表明(图3):6个浓度都有扩增产物,但当浓度为0.05~0.10 mmol·L⁻¹时,虽有扩增产物,但谱带较弱,不易辨认;在0.15~0.20 mmol·L⁻¹时,均能扩增出清晰的谱带,但在0.25~0.30 mmol·L⁻¹,扩增产物不稳定且有非特异性扩增。考虑到结果的稳定性,文章选用0.20 mmol·L⁻¹的dNTPs浓度。在此浓度下,扩增产物稳定,重复性强。

2.4 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

在PCR反应中,TaqDNA聚合酶的用量是影响PCR扩增的一个重要因子。笔者在0.1~0.5 μg设置了5个Taq酶浓度梯度,比较表明(图4):0.1~0.5 μg时,均有扩增产物;但在0.1,0.4和0.5 μg时,扩增谱带较弱且背景模糊;在0.3 μg时,扩增谱带最清晰且条带稳定,因而确定0.3 μg为试验中适宜的Taq DNA聚合酶用量。

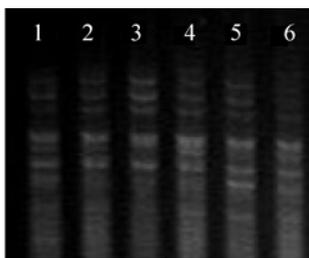


图3 dNTPs 浓度对 ISSR 反应的影响

1~6 分别表示 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs 浓度

Figure 3 Effects of dNTPs Concentrations on ISSR reaction 1~6 indicating dNTPs Concentrations: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30 mmol·L⁻¹ respectively

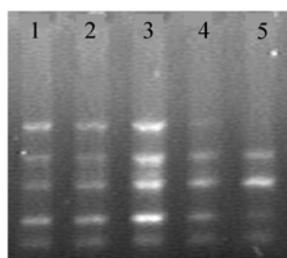


图4 TaqDNA 聚合酶质量分数对 ISSR 反应的影响

1~5 分别表示 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 μg (20 μL) 的 TaqDNA 聚合酶含量

Figure 4 Effects of Taq DNA polymerase concentrations on ISSR reaction 1~5 indicating TaqDNA polymerase concentrations: 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 and 0.50 μg (20 μL) respectively

2.5 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Mg²⁺浓度是影响PCR扩增特异性的主要因子之一,确定扩增反应的最佳Mg²⁺浓度非常重要。在0.5~3.5 mmol·L⁻¹设置了7个Mg²⁺浓度梯度。比较表明(图5):在Mg²⁺浓度过低或过高时,扩增产物条带模糊或没有产物,但当Mg²⁺浓度在1.5 mmol·L⁻¹和2.0 mmol·L⁻¹时,扩增谱带最清晰且条带稳定,且1.5 mmol·L⁻¹要比2.0 mmol·L⁻¹的扩增效果还要好,因而笔者确定1.5 mmol·L⁻¹为试验中适宜的Mg²⁺浓度。

2.6 退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响

引物的退火温度也极大地影响ISSR反应的进行。为了确定所选引物各自最佳的退火温度,在上述优化条件的基础上,对45~55℃的温度区间进行筛选,PCR仪自动生成了12个温度梯度(45.0,45.3,45.3,46.7,47.8,49.3,51.0,52.4,53.5,54.3,54.8,55.0℃),结果发现不同引物具有不同的最佳退火温度。筛选出的13个引物及其各自最适退火温度见表1。

据此,确定银杏ISSR-PCR反应的适宜条件,其20 μL的反应体系主要成分为:2 μL 10× Buffer,模板DNA 40 ng, dNTP 0.2 mmol·L⁻¹, Taq酶0.3 μg,引物0.5 μmol·L⁻¹, Mg²⁺1.5 mmol·L⁻¹。反应程序为:94℃充分变性5 min。然后进行38个循环:94℃变性30 s,48~53(根据引物而定)退火

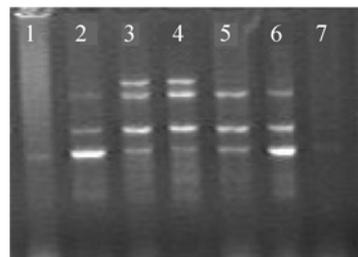


图5 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 反应的影响

1~7 分别表示 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺ 浓度

Figure 5 Effects of Mg²⁺ Concentrations on ISSR reaction 1~7 indicating Mg²⁺ Concentrations: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mmol·L⁻¹ respectively

30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止反应。银杏雄株遗传多样性的 ISSR 扩增即据此完成(另著文发表), 且试验结果稳定, 重复性高。图 5 是引物 ISSR-857 的部分扩增图谱。

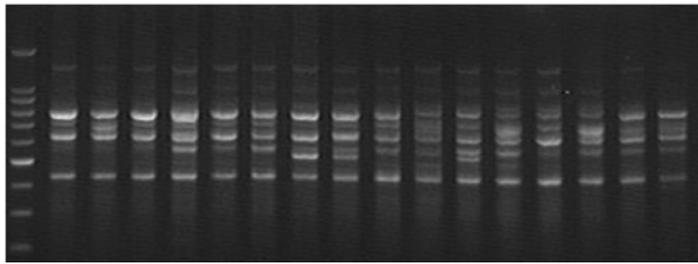


图 6 引物 ISSR-857 扩增的部分银杏雄株 ISSR 谱带

Figure 6 ISSR profiles of some male ginkgo sample amplified by using primer ISSR-857

3 讨论和结论

由于 ISSR 技术是基于 PCR 的一种标记, 所以其扩增的结果易受其他因素干扰, 如模板 DNA, 引物, dNTP, *Taq* 酶和 Mg^{2+} 等浓度。为了提高试验的重复性和可靠性, 试验前应该根据实验材料的不同, 对各种影响因子进行优化, 以筛选出最适宜的 ISSR 反应条件^[10-13]。

模板 DNA 浓度是影响 ISSR-PCR 扩增效果的一个重要因子。在一定范围内, PCR 扩增产物会随模板浓度的升高而显著升高, 但如果模板浓度过高, 则又可能导致非特异性条带的出现; 引物浓度会对 PCR 的带型产生明显的影响, 浓度过低不能产生扩增产物, 浓度过高会增加引物二聚体的形成, 引起模板与引物的错配, 导致条带不清晰或者产生新的特异性位点, 使 PCR 反应特异性下降^[14]; dNTPs 是 ISSR-PCR 反应的原料, 其浓度取决于扩增片段的长度, 常用的浓度范围为 0.05 ~ 0.30 mmol · L⁻¹。dNTPs 浓度过高, 可能导致 PCR

错配甚至产生非特异性扩增^[15], 浓度过低则产率太低, 影响扩增效果^[16]。笔者通过优化所得适合于银杏 ISSR-PCR 扩增的 dNTPs 浓度为 0.20 mmol · L⁻¹, 这与高丽等^[13]对春兰 *Cymbidium goeringii* 的 ISSR 反应条件的报道相同, 略低于张文标等^[17]报道的甜槠 *Castanopsis eyrei* ISSR-PCR 反应体系的 0.25 mmol · L⁻¹; 在 PCR 反应中, 不同厂家和不同批次的 *Taq* 酶的用量都会不同, 它是影响 PCR 扩增的一个重要因子。*Taq* 酶浓度过高不仅不增加扩增产量, 还会产生非特异性扩增; 用量过少则条带不够明亮清晰。因此, 为减少实验误差, 应尽量使用同一厂家同一批次生产的产品。笔者的试验 *Taq* 酶在 0.3 μg 即可获得较佳的扩增效果, 这比金凤等^[18]、赵杨等^[19]在月季 *Rosa chinensis*, 胡枝子属 *Lespedeza* 的 PCR 反应体系用量要少, 节约了试验成本。 Mg^{2+} 可以提高 DNA 双链结构的稳定性, 不仅影响 *Taq* 酶的活性, 还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[14]。引物的退火温度也极大地影响着 ISSR 反应的进行, 由于引物碱基序列长短不同使得引物的退火温度也不尽相同, 即使同一引物, 在不同的植物样品中的退火温度也不一样。

表 1 ISSR 引物、序列及其退火温度

Table 1 Sequences and annealing temperatures of different primers

引物	序列(5'~3')	退火温度/°C
ISSR-1	ACACACACACACACT	48
ISSR-5	ACACACACACACACTG	52
ISSR-17	GACAGACAGACAGACA	49
ISSR-25	ACACACACACACACCA	50
ISSR-28	TGTGTGTGTGTGTGCC	50
ISSR-50	TGTGTGTGTGTGTGAG	53
ISSR-52	TGTGTGTGTGTGTGGA	51
ISSR-65	AGAGAGAGAGAGAGCC	50
ISSR-815	CTCTCTCTCTCTCTG	49
ISSR-835	ACACACACACACACCG	50
ISSR-844	CTCTCTCTCTCTCTGC	52
ISSR-848	CACACACACACACAAG	48
ISSR-857	ACACACACACACACYG	53

文章通过多个梯度试验确定了银杏 ISSR-PCR 反应的适宜条件,其 20 μL 的反应体系为: 2 μL 10 \times Buffer, 模板 DNA 40 ng, dNTP 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 0.3 μg , 引物 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 浓度 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 充分变性 5 min, 然后进行 38 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 48 ~ 53 $^{\circ}\text{C}$ (根据引物而定) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

参考文献:

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**: 176 - 183.
- [2] 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.
- [3] 邹喻苹. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 36 - 68.
- [4] NAGAOKA T, OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 597 - 602.
- [5] 沈永宝, 施季森, 赵洪亮. 利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种[J]. *林业科学*, 2005, **41** (1): 202 - 204.
- [6] PREVOST A, WWILKINSON M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **98**: 107 - 112.
- [7] KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K. Genetic linkage of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 37 - 45.
- [8] AMMIRAJU J S S, DHOLAKIA B B, SANTRA D K, *et al.* Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**: 726 - 732.
- [9] DOYLE J J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M] // HEWITT G M, JOHNSTON A. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer Ver-lag, 1991: 283 - 293.
- [10] 胡绍庆, 邱英雄, 吴光洪, 等. 桂花品种的 ISSR-PCR 分析[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2004, **28** (增刊): 71 - 75.
- [11] 乔玉山, 章镇, 房经贵, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. *果树学报*, 2003, **20** (4): 270 - 274.
- [12] 刘海河, 侯喜林, 张彦萍. 西瓜 ISSR-PCR 体系的正交优化研究[J]. *果树学报*, 2004, **21** (6): 615 - 617.
- [13] 高丽, 杨波. 春兰 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. *华中农业大学学报*, 2006, **25** (3): 305 - 309.
- [14] 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.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458 - 463.
- [16] 尹佟明, 韩正敏, 黄敏仁, 等. 林木 RAPD 分析及实验条件的优化[J]. *南京林业大学学报*, 1999, **23** (4): 7 - 12.
- [17] 张文标, 金则新, 李钧敏, 等. 甜槠 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. *浙江林学院学报*, 2006, **23** (5): 516 - 520.
- [18] 金凤, 陈崇顺, 邹爱兰, 等. 月季 ISSR 反应体系的优化[J]. *江苏农业科学*, 2006 (1): 72 - 75.
- [19] 赵杨, 陈晓阳, 李桐森, 等. 胡枝子属 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *西南林学院学报*, 2006, **26** (2): 6 - 10.