

文章编号: 1000-5692(2006)05-0516-05

# 甜槠 ISSR-PCR 反应体系的正交优化

张文标<sup>1,2</sup>, 金则新<sup>2</sup>, 李钧敏<sup>2</sup>, 潘冠琼<sup>2</sup>

(1. 西南师范大学 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:** 对甜槠 *Castanopsis eyrei* 进行遗传多样性研究的过程中, 为了获得清晰可靠、重复性强的 ISSR 扩增结果, 利用正交设计对  $Mg^{2+}$ , dNTP, 引物, *Taq* 酶, 牛血清蛋白 (BSA) 和模板 DNA 等 6 种因素 5 个水平进行筛选和优化。确定甜槠 ISSR-PCR 最适宜反应体系为: 10  $\mu$ L 反应体积中,  $1 \times Taq$  酶配套缓冲液 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 9.0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TritonX-100),  $1.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Mg^{2+}$ ,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,  $8.34 \text{ nkat } Taq$  DNA 聚合酶,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清蛋白, 6 pmol 引物, 12 ng 模板 DNA。甜槠扩增时引物 UBC846 的最适退火温度为  $56.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。图 2 表 1 参 23

**关键词:** 植物学; ISSR-PCR; 正交设计; 优化; 甜槠

**中图分类号:** Q946; S792.17 **文献标识码:** A

甜槠 *Castanopsis eyrei* 是中亚热带常绿阔叶林主要建群种和优势种之一, 在我国亚热带森林生态系统中占重要地位<sup>[1]</sup>。在过去的十几年中, 国内学者就天台山、武夷山和古田山等地甜槠林的种群学、群落学、水文学和生物量等<sup>[2-5]</sup>做了大量的研究工作, 但分子生态学方面的研究还未见报道。ISSR (inter simple sequence repeat) 是一种用微卫星引物 PCR (polymerase chain reaction) 扩增产生多态位点标记的技术, 它既简单又快捷, 并具备 SSR (simple sequence repeat), AFLP (amplified fragment length polymorphism) 标记的优点和 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记的普遍性, 相对于 RAPD 技术 (引物碱基数为 10), 因其使用了更长的引物 (16~25 个碱基) 提高了退火温度而具有更高的重复性<sup>[6]</sup>。由于不需预知基因组的序列, ISSR 技术要比其他标记系统简单<sup>[7]</sup>, 已被广泛地应用于濒危物种遗传多样性<sup>[8]</sup>、作物遗传育种<sup>[9]</sup> 和生殖生态学<sup>[10]</sup> 等领域的研究。此实验以甜槠 DNA 为材料, 采用正交设计方法, 旨在综合考虑各种因素及因素间的相互关系对扩增结果的影响, 筛选出最适宜的反应体系, 为甜槠遗传多样性研究奠定良好的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

甜槠叶采自浙江省丽水市松阳县箬寮岷自然保护区。选取植株上当年萌发的幼嫩叶片, 置于保鲜袋中, 封口, 用样品储藏箱 (由超低温冰袋保持冷藏条件) 带回实验室洗净,  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存。

收稿日期: 2005-10-31; 修回日期: 2006-05-15

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y504220)

作者简介: 张文标, 硕士研究生, 从事植物生态学研究。E-mail: zhargwb0918@hotmail.com。通讯作者: 金则新, 教授, 硕士, 从事植物生态学研究。E-mail: jzx@tzc.edu.cn

ISSR 引物序列由加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, Set No. 9, No. 801—900)提供, 由上海生物技术工程公司合成, UBC846: (CA)<sub>8</sub>RT。

## 1.2 DNA 的提取与定量

按李钧敏等<sup>[11]</sup>描述的方法, 采用改进的 SDS 法进行甜橘 DNA 的提取, DNA 经  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳后, 用上海天能 GIS 凝胶成像分析系统(上海天以科技服务公司)拍照, 利用 TANON Gel version 3.71 软件, 以  $250 \text{ ng} \lambda\text{DNA}$  为标准量, 按荧光密度对 DNA 条带进行定量。将 DNA 稀释成  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 贮存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

## 1.3 ISSR 扩增

这项实验初始聚合酶链式反应(PCR)扩增体系设定为:  $10 \mu\text{L}$  PCR 反应体积中含  $1 \times \text{Taq}$  酶配套缓冲液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 9.0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TritonX-100),  $8.34 \text{ nkat}$  TaqDNA 聚合酶(华美生物工程公司),  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ ,  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,  $10 \text{ ng}$  模板 DNA,  $10 \mu\text{mol}$  引物;  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清白蛋白(BSA)。初始的 ISSR 扩增反应程序:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1.5 min, 共 35 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 5 min。PCR 反应在美国 Thermo 公司生产的 P×2 梯度热循环仪中进行。扩增产物在  $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶(含  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溴化乙锭)上进行电泳, 电泳缓冲液为  $0.5 \times \text{TBE}$  (Tris-硼酸和 EDTA), 电泳结果于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统拍照保存。

## 1.4 退火温度优化

采用梯度 PCR 模式, 生成的温度梯度为 48.1, 48.5, 49.3, 50.7, 52.4, 54.4, 56.3, 58.3, 60.6, 62.0, 62.7, 63.2  $^\circ\text{C}$ 。其余 PCR 扩增条件同 1.3, 以确定最合适的退火温度。

## 1.5 实验正交设计处理

针对  $\text{Mg}^{2+}$ , dNTP, Taq 酶, BSA, 引物和模板 DNA 等 6 种因素, 各设 5 个水平, 选用  $L_{25}(5^6)$  正交表。ISSR-PCR 正交实验设计表如表 1 所示。

# 2 结果与分析

## 2.1 退火温度的确定

退火温度取决于所选引物中 GC 碱基对的含量, 通常温度范围为  $45 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[6]</sup>。在 PCR 反应中, 退火温度的高低直接影响到引物与模板 DNA 的特异性结合和扩增谱带的样式<sup>[12,13]</sup>。该实验先根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛, 选择能看到清晰条带的引物 UBC 846 进行退火温度的确定(图 1)。结果表明退火温度对 ISSR 扩增谱带有明显的影响。总的变化趋势为: 在较低温度下( $48.1 \sim 50.7 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 条带数较少, 长度为 759 和 636 bp 的条带亮度较弱或缺失。随退火温度的升高( $52.4 \sim 58.3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 条带数增多, 亮度增加。随温度再升高( $60.6 \sim 63.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 引物和模板的特异性结合增强, 但扩增条带明显减少, 亮度减弱。根据公式  $T=4(G+C)+2(A+T)$ <sup>[14]</sup> 计算, 理论上退火温度为  $52.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。从图 1 可看出, 退火温度在  $52.4 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $54.4 \text{ }^\circ\text{C}$  时, 扩增出的带型清晰, 但长度为 1 163 bp 的条带缺失, 长度为 923 bp 的条带较弱。而退火温度为  $56.3 \text{ }^\circ\text{C}$  时可扩增获得清晰、完全的条带, 虽然背景略有增高, 但可以在进一步的条件优化中消除, 因此,  $56.3 \text{ }^\circ\text{C}$  为该引物的最适退火温度。但不同引物有不同的退火温度, 我们先根据公式<sup>[14]</sup> 计算引物的退火温度, 对于理论温度为  $52.0 \text{ }^\circ\text{C}$  左右的引物, 采用  $56.3 \text{ }^\circ\text{C}$  进行筛选, 选择清晰、不弥散的引物进行下一步研究, 而对于理论退火温度差距较大的, 则再度采用梯度 PCR 去进行退火温度的筛选。

## 2.2 PCR 正交实验设计的直观分析

PCR 扩增结果, 依据其谱带的强弱及杂带的多少, 并结合这项试验目的, 作直观分析(图 2)。从图 2 中可看出, 具有较好条带的处理有 2 个, 为处理 15 和处理 24。Taq 酶是  $\text{Mg}^{2+}$  依赖性酶,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度是影响 PCR 结果的重要因素之一<sup>[15,16]</sup>。在 2 个处理中,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度大于  $1.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显示甜橘的 ISSR 扩增需较高浓度的  $\text{Mg}^{2+}$ 。

表1 ISSR-PCR 正交试验设计表

Table 1 Orthogonal design for ISSR-PCR optimization

编号	Mg <sup>2+</sup> / (mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTP/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶/ (mkat·L <sup>-1</sup> )	BSA/ (g·L <sup>-1</sup> )	引物/ (μmol·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/ (mg·L <sup>-1</sup> )
1	1.5	0.05	0.417	0	0.6	0.4
2	1.5	0.10	0.834	0.5	0.9	0.8
3	1.5	0.15	1.250	1.0	1.2	1.2
4	1.5	0.20	1.667	1.5	1.5	1.6
5	1.5	0.25	2.084	2.0	1.8	2.0
6	1.6	0.05	0.834	1.0	1.5	2.0
7	1.6	0.10	1.250	1.5	1.8	0.4
8	1.6	0.15	1.667	2.0	0.6	0.8
9	1.6	0.20	2.084	0	0.9	1.2
10	1.6	0.25	0.417	0.5	1.2	1.6
11	1.7	0.05	1.250	2.0	0.9	1.6
12	1.7	0.10	1.667	0	1.2	2.0
13	1.7	0.15	2.084	0.5	1.5	0.4
14	1.7	0.20	0.417	1.0	1.8	0.8
15	1.7	0.25	0.834	1.5	0.6	1.2
16	1.8	0.05	1.667	0.5	1.8	1.2
17	1.8	0.50	2.084	1.0	0.6	1.6
18	1.8	0.15	0.417	1.5	0.9	2.0
19	1.8	0.20	0.834	2.0	1.2	0.4
20	1.8	0.25	1.250	0	1.5	0.8
21	1.9	0.05	2.084	1.5	1.2	0.8
22	1.9	0.10	0.417	2.0	1.5	1.2
23	1.9	0.15	0.834	0	1.8	1.6
24	1.9	0.20	1.250	0.5	0.6	2.0
25	1.9	0.25	1.667	1.0	0.9	0.4

dNTP 是 PCR 的原料, 过低导致 PCR 产率下降<sup>[7]</sup>。2 个处理中 dNTP 浓度分别为 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> 和 0.20 mmol·L<sup>-1</sup>, 因此, 较高浓度的 dNTP 对获得清晰稳定主带是必需的。

Taq 酶用量是影响 PCR 的一个重要因素, 浓度过低不能扩增, 浓度太高导致背景增加<sup>[18]</sup>。由图 2 可知, 10 μL 反应体系中, 处理 15 和处理 24 的 Taq 酶用量分别为 8.34 nkat 和 12.42 nkat, 均可获得清晰条带。适宜的 Taq 酶用量(8.34 nkat 或 12.42 nkat)是甜橘 ISSR 扩增的关键。

BSA 可以通过其分子中富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物的阴离子相互作用, 或是通过疏水相互作用力消除内源的多酚类化合物, 起到阻止它们与 Taq 酶结合, 从而提高酶的活性, 最终起到改善 PCR 反应的作用<sup>[19]</sup>。另外, BSA 还有助于封闭体系中的杂质对 Taq 酶的活性影响, 在 PCR 反应体系中添加一定量的 BSA, 可以提高实验的效果, 增加条带, 减少弱带<sup>[21, 22]</sup>。从结果可知

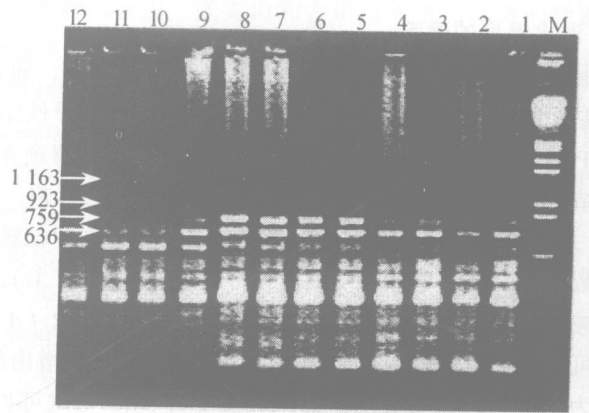


图1 不同退火温度 ISSR-PCR 扩增(引物为 UBC 846)  
M. λ DNA EcoRI + HindIII 标准分子量参照物; 1~12 温度依次为 48.1, 48.5, 49.3, 50.7, 52.4, 54.4, 56.3, 58.3, 60.6, 62.0, 62.7 和 63.2 °C

Figure 1 ISSR-PCR amplification patterns under different annealing temperatures (using primer UBC846)

M. λ DNA EcoRI + HindIII molecular weight standard; 1~12 The annealing temperatures were 48.1, 48.5, 49.3, 50.7, 52.4, 54.4, 56.3, 58.3, 60.6, 62.0, 62.7 and 63.2 °C, respectively

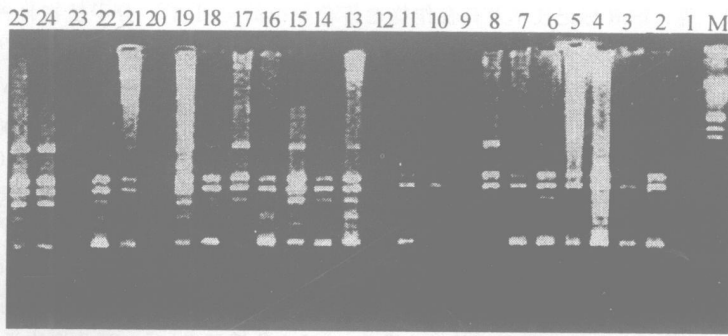


图 2 ISSR-PCR 正交设计处理结果(引物为 UBC846)

M:  $\lambda$  DNA *Eco*RI + *Hind*III 标准分子量参照物; 1~25: 处理代号参见表

Figure 2 The electrophoresis results of ISSR-PCR orthogonal design (using primer UBC 846)

M.  $\lambda$  DNA *Eco*RI + *Hind*III molecular weight standard; 1~25. Treatment No. as showed in Table 1

BSA 的浓度对扩增结果影响不大, 当 BSA 质量浓度为  $0.5 \sim 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时均可达到优化 PCR 的目的。

可获得清晰条带处理的模版 DNA 的用量为  $12 \sim 20 \text{ ng}$ , 显示模板 DNA 用量对甜槠 ISSR 扩增影响不大。Reddy<sup>[9]</sup> 的研究表明在  $20 \mu\text{L}$  的 PCR 反应体系中,  $10 \text{ ng}$  的 DNA 模板用量得到了与  $25 \text{ ng}$  和  $50 \text{ ng}$  相同的扩增结果。谢运海等<sup>[12]</sup>, 余艳等<sup>[16]</sup> 的研究也得到相似的结论。

引物用量对扩增结果有明显的影响, 较高的引物用量会增加引物与模板之间的非特异性结合, 导致条带弥散, 背景增高。2 个处理中适宜的引物用量均为  $6 \text{ pmol}$ , 显示甜槠 ISSR 扩增在较低的引物用量时就可获得清晰的条带。

综合以上的分析, 在 25 个处理中, 处理 15 最佳, 其主带明显, 背景较低, 清晰度较高。

### 3 结论

ISSR 技术是基于 PCR 扩增反应, 易受模板浓度、引物浓度、*Taq* 酶用量、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度和扩增程序与循环次数等诸多因素的影响<sup>[2]</sup>。正交试验设计的特点是在实验的全部处理组合中, 仅挑选部分有代表性的水平组合(处理组合)进行实验, 通过部分事实了解全面试验情况, 从中找出较优的处理组合<sup>[23]</sup>。这项研究结果显示甜槠 ISSR 扩增时引物 UBC 846 的最适退火温度为  $56.3 \text{ }^\circ\text{C}$ , 扩增的最适条件为:  $10 \mu\text{L}$  反应体积中,  $1 \times \text{Taq}$  酶配套缓冲液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 9.0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TritonX-100),  $1.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,  $8.34 \text{ nkat}$  *Taq* DNA 聚合酶,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清白蛋白,  $6 \text{ pmol}$  引物,  $12 \text{ ng}$  模板 DNA。

### 参考文献:

- [1] 徐学红, 于明坚, 胡正华, 等. 浙江古田山自然保护区甜槠种群结构与动态[J]. 生态学报, 2005, 25 (3): 645-653.
- [2] 金则新. 浙江天台山甜槠群落物种多样性[J]. 生态学杂志, 2002, 21 (3): 1-4.
- [3] 李凌浩, 林鹏, 王其兵, 等. 武夷山不同林龄甜槠林水文效应的比较研究[J]. 应用生态学报, 1998, 9 (1): 18-22.
- [4] 李凌浩, 林鹏, 邢雪荣. 武夷山甜槠林细根生物量和生长量研究[J]. 应用生态学报, 1998, 9 (4): 337-340.
- [5] 金则新, 蔡辉华. 浙江天台山常绿阔叶林不同演替阶段优势种群动态[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (3): 272-276.
- [6] REDDY M P, SARIL N, SIDDIQ E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128 (1): 9-17.
- [7] LIU B, WENDEL J F. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic maker system in cotton [J]. *Mol Ecol Notes*, 2001, 1 (3): 205.
- [8] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11 (4): 276-287.

- [ 9 ] 孙洪, 程静, 詹克慧, 等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[ J ]. 分子植物育种, 2005, 3 (1): 123—127.
- [ 10 ] GE X J, SUN M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Mysinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis[ J ]. *Mol Ecol*, 1999, 8 (12): 2 061—2 069.
- [ 11 ] 李钧敏, 柯世省, 金则新. 濒危植物七子花 DNA 的提取及分析[ J ]. 广西植物, 2002, 22 (6): 499—502.
- [ 12 ] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 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 (4): 45—50.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 卢圣栋. 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社, 1999: 458—463.
- [ 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.
- [ 16 ] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[ J ]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11 (1): 15—19.
- [ 17 ] 王正加, 黄坚钦, 郭传友. 山核桃 RAPD 反应体系的优化[ J ]. 浙江林学院学报, 2003, 20 (4): 429—433.
- [ 18 ] 冯富娟, 王凤友, 刘彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[ J ]. 植物学通报, 2004, 21 (3): 326—331.
- [ 19 ] KREADER C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein[ J ]. *Appl Environ Microbio*, 1996, 62 (3): 1 102—1 106.
- [ 20 ] 边才苗, 李钧敏, 金则新, 等. 牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用[ J ]. 遗传, 2002, 24 (3): 279—282.
- [ 21 ] 包晓东, 宋铁英, 郑伟文. 苏铁共生蓝细菌 PCR 条件的优化[ J ]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2002, 24 (6): 824—828.
- [ 22 ] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001: 36—95.
- [ 23 ] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[ M ]. 北京: 科学出版社, 2002: 147—148.

## Optimization of ISSR-PCR reaction system of *Castanopsis eyrei* by orthogonal design

ZHANG Wen-biao<sup>1,2</sup>, JIN Ze-xin<sup>2</sup>, LI Jun-min<sup>2</sup>, PAN Guan-qiong<sup>2</sup>

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

**Abstract:** Obtaining the stable and repeatable ISSR-PCR amplification result is the basic work to study genetic diversity of *Castanopsis eyrei*. The ISSR-PCR amplification system was optimized by using orthogonal design in six factors and five levels ( $Mg^{2+}$ , dNTP, primer, *Taq* DNA polymerase, bovine serum albumin and template DNA). The suitable reaction conditions of ISSR-PCR were shown as follows:  $1 \times Taq$  buffer ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 9.0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TritonX-100,  $1.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $Mg^{2+}$ ,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP, 8.34 nkat *Taq* DNA polymerase,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  bovine serum albumin, 6 pmol primer, 12 ng template DNA in  $10 \mu\text{L}$  reaction volume. The optimal annealing temperature for primer UBC 846 was  $56.3 \text{ }^\circ\text{C}$ . [Ch, 2 fig, 1 tab, 23 ref.]

**Key words:** botany; ISSR-PCR; orthogonal design; optimization; *Castanopsis eyrei*