

文章编号: 1000-5692(2007)02-0156-06

石蒜属植物种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立

张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 刘志高, 童再康, 黄华宏

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 为进一步开展石蒜属 *Lycoris* 植物种质资源遗传多样性研究, 利用正交试验设计的方法, 从 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTP 和引物等 5 因素 4 水平, 对石蒜属植物 ISSR (inter simple sequence repeats) 反应体系进行优化, 确立了石蒜属植物 ISSR 的最佳反应体系: 在 20 μ L 反应体系中, 含 1 \times Buffer, 模板 DNA 50 ng, 2.5 mmol \cdot L $^{-1}$ 氯化镁(MgCl $_2$), 0.15 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTP, 25.05 nkat *Taq* 聚合酶, 0.5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 引物。进一步进行梯度退火试验, 确定最适宜退火温度为 57 $^{\circ}$ C。图 7 表 2 参 23

关键词: 植物学; 石蒜属; 简单序列重复区间 (ISSR); 正交设计; PCR 聚合酶链反应体系

中图分类号: S682.2; Q943 **文献标志码:** A

简单序列重复区间 (inter simple sequence repeats, ISSR) DNA 标记技术是由 Zietkiewicz 等^[1] 于 1994 年创建的, 是在简单重复序列 (SSR) 标记基础上发展起来的一种新技术。ISSR 标记技术具有操作简单, 成本低, 快速, 灵敏, 检测多态能力强, 所需 DNA 模板量少等优点, 其产物的多态性比随机扩增多态 DNA (RAPD) 丰富, 而且比 RAPD 技术更为稳定可靠, 重复性更好^[2]。目前 ISSR 技术已用于植物品种鉴定^[3,4]、遗传作图^[5,6]、遗传多样性^[7-9] 和居群遗传学^[10] 等研究中。石蒜属 *Lycoris* 植物是我国特产的球根花卉, 也是中国传统园林地被植物, 有“中国的郁金香”之称, 同时又是重要的药用植物, 在日本、美国及欧洲已成为商品花卉, 主要用于盆花、切花和园林造景。研究与开发石蒜属植物野生种质资源具有十分重要的现实意义, 其中关于石蒜属植物的栽培繁殖技术已有相关报道^[11]。此研究旨在建立石蒜属植物种质资源的 ISSR-PCR 反应体系, 为开展石蒜属植物种质资源多样性评价、新品种鉴定和亲缘关系分析等提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为石蒜属的石蒜 *Lycoris radiata*, 乳白石蒜 *L. albiflora*, 中国石蒜 *L. chinensis*, 换锦花 *L. sprengeri* 共 4 种。材料均取自浙江林学院苗圃。采取幼嫩叶片, 液氮速冻后置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

收稿日期: 2006-06-20; 修回日期: 2006-10-10

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目 (2005C32029)

作者简介: 张雷凡, 硕士研究生, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: leifan0922@163.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: zktong@zjfc.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 石蒜属植物基因组 DNA 提取采用硅珠悬浮法^[12], 用 U-0080D 核酸测定仪测定其 DNA 的浓度和纯度, 用 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增反应 以乳白石蒜 DNA 为试材, 根据预备试验的结果, 以 W53157 (上海生工) 为引物。针对 *Taq* 酶量、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTP 和引物 5 个因素各设计 4 个水平, 用 $L_{16}(4^5)$ 正交表, 设计聚合酶链式反应 (PCR) 扩增体系各成分的因素-水平正交设计试验表^[13] (表 1)。共有 16 个处理, 每个处理做 2 个重复, 共 32 个试验, 按表 1 中的数据加样。在 Gene Amp PCR System 9700 扩增仪上进行扩增, 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 除表 1 中所列因素外, 每管还有 $1 \times$ Buffer。反应程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s, 循环 38 次; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。设计所得出的最佳体系。

扩增的反应产物用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶 [含溴化乙啶 (EB) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 电泳约 100 min, Gene Genius Bio Imaging System 拍照分析。

1.2.3 退火温度 用以上所得最佳反应体系进行温度梯度退火实验, 在 PCR Express 扩增仪上自动生成 12 个温度 (最小设置为 $50.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 最大设置为 $62.0 \text{ }^\circ\text{C}$)。

2 结果与分析

2.1 数据处理与表观分析

参照何正文等^[14]的方法, 依扩增条带的敏感性与特异性, 即条带的强弱和杂带的多少, 将各处理的结果做 1~16 分记分, 条带数量丰富、清晰度高和背景

低的最佳产物记为 16 分, 与此相反, 最差的记为 1 分。如图 1, 2 次重复分别独立统计, 依处理次序得到的 2 次记分结果分别为: 1, 4, 6, 2, 5, 3, 12, 8, 13, 15, 10, 11, 16, 9, 14, 7; 2, 3, 5, 1, 4, 6, 11, 9, 13, 15, 12, 10, 16, 7, 14, 8。

表 1 PCR 扩增体系各成分因素-水平正交设计表 $L_{16}(4^5)$

Table 1 Orthogonal design for PCR

序号	<i>Taq</i> 酶/ nkat	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ng	dNTP/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	8.35	1.5	20	0.10	0.25
2	8.35	2.0	30	0.15	0.50
3	8.35	2.5	40	0.20	0.75
4	8.35	3.0	50	0.25	1.00
5	16.70	1.5	30	0.20	1.00
6	16.70	2.0	20	0.25	0.75
7	16.70	2.5	50	0.10	0.50
8	16.70	3.0	40	0.15	0.25
9	25.05	1.5	40	0.25	0.50
10	25.05	2.0	50	0.20	0.25
11	25.05	2.5	20	0.15	1.00
12	25.05	3.0	30	0.10	0.75
13	33.40	1.5	50	0.15	0.75
14	33.40	2.0	40	0.10	1.00
15	33.40	2.5	30	0.25	0.25
16	33.40	3.0	20	0.20	0.50

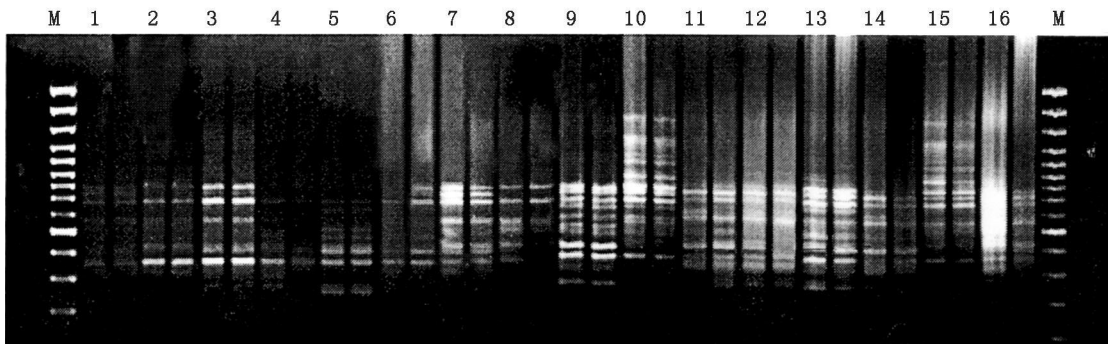


图 1 ISSR-PCR 正交试验结果

1~16. 处理代号, 参见表 1; M. 为 DL 3000

Figure 1 Electrophoresis of ISSR-PCR orthogonal design

1~16. Treatment number, treatment as showed in Table 1; M. DL 3000 marker

2.2 影响 ISSR-PCR 反应因素的差异显著性

将上述处理和评分结果用统计软件 MINITAB 进行分析, 结果见表 2。由 F 值可知, Taq 酶的量对反应结果影响最大, dNTP 浓度对反应结果影响相对较小些。但各因素水平间的差异均达到极显著水平, 进一步对各因素的不同水平进行多重比较。

2.2.1 Taq 酶活性对 PCR 扩增结果的影响

Taq 酶的 25.05 nkat 和 33.40 nkat 水平间差异不显著, 其余梯度相互之间差异均达到了极显著水平。反应结果均值与酶活性关系见图 2。由曲线波动幅度可知, Taq 酶活性对结果影响最大。 Taq 酶活性过低, PCR 反应的敏感性差, 扩增的条带少(1~4 号处理), 所能提供的信息少, 随着 Taq 酶活性的增加, PCR 结果也越好。由图 2 可知

25.05 nkat 与 33.40 nkat 都比较适合, 二者对反应结果的影响差异不大。从经济的角度考虑, 可选择 25.05 nkat 作为石蒜属植物 ISSR-PCR 反应体系中最佳的酶活性。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 PCR 结果的影响 Mg^{2+} 主要是通过改变聚合酶的活性对 PCR 反应结果产生影响。经过进一步多重比较试验可知, Mg^{2+} 各浓度水平对 PCR 结果的影响有差异, 表现在为 1.5, 2.0, 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 水平间无显著差异, 这三者与 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 水平间均有显著差异。但当 Mg^{2+} 浓度超过 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 由于酶活性过高, 产生大量非特异性的弥散带, 从而产生很亮的背景。由图 3 可知 Mg^{2+} 浓度在 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 反应结果均值是最高的。所以选 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 作为本试验的 Mg^{2+} 最佳反应水平。

表 2 PCR 反应各因素正交设计方差分析表

Table 2 Variance analysis for the factors of PCR reaction

变异来源	自由度	均方	F 值	显著水平
Taq 酶	3	158.068	182.39	0.000 0
Mg^{2+}	3	19.584	22.97	0.000 0
模板 DNA	3	34.201	40.77	0.000 0
dNTP	3	6.035	6.78	0.004 0
引物	3	19.839	22.89	0.000 0
误差	15	0.933		

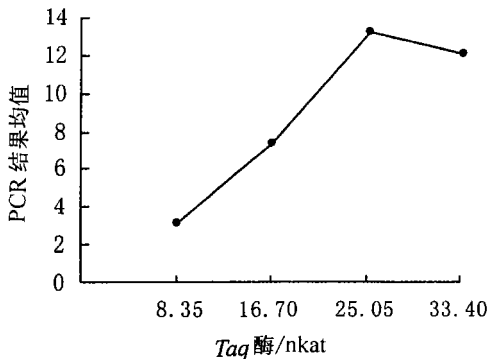


图 2 PCR 结果均值与 Taq 酶活性的关系

Figure 2 The relationship of Taq polymerase concentration and the result of ISSR-PCR

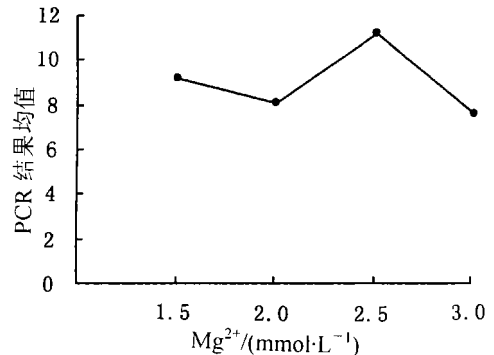


图 3 PCR 结果均值与 Mg^{2+} 浓度的关系

Figure 3 The relationship of Mg^{2+} concentration and the result of ISSR-PCR

2.2.3 模板 DNA 量对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 图 4 显示, DNA 量在 20~50 ng 范围内, 反应结果均值是呈正比例递增, 以模板 DNA 用量 50 ng 为最佳。已有的研究认为模板 DNA 浓度对 PCR 结果影响不大^[5]。这可能与试验材料不同以及不同试验所选的梯度范围不同有关。

2.2.4 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 dNTP 作为 PCR 反应的原料, 量太少会使扩增反应进行不完全, 而过多用量会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用。dNTP 分子中的磷酸基团能定量地与 Mg^{2+} 结合, 使实际反应中 Mg^{2+} 的浓度下降而影响聚合酶的活力, 且 dNTP 过多也是不必要的浪费。由多重比较及图 5 可见, dNTP 在 0.1 $mmol \cdot L^{-1}$ 与 0.15 $mmol \cdot L^{-1}$ 水平上整体效果较好, 且反应结果值呈缓慢上升趋势; 至 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 与 0.25 $mmol \cdot L^{-1}$ 水平时, 其 PCR 反应效果较差。因此, 选择 dNTP 最佳水平为 0.15 $mmol \cdot L^{-1}$ 。

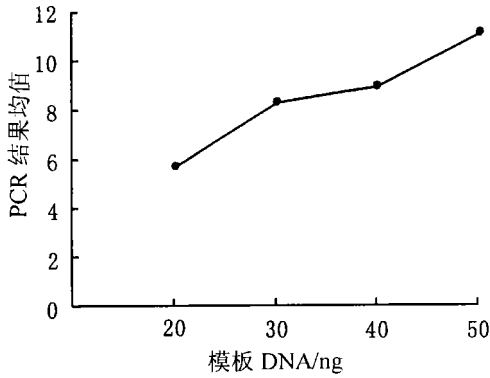


图 4 PCR 结果均值与 DNA 量关系

Figure 4 The relationship of DNA concentration and the result of ISSR-PCR

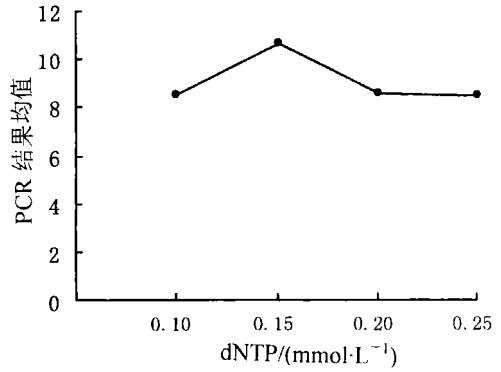


图 5 PCR 结果均值与 dNTP 浓度的关系

Figure 5 The relationship of dNTP concentration and the result of ISSR-PCR

2.2.5 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 引物在 PCR 反应中一般用的浓度在 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 引物浓度过少会引起扩增量不足, 过多则引产生非特异性扩增。图 6 可见, 随着引物浓度的增加, 反应结果均值呈递减趋势。多重比较分析表明, 在 $0.25, 0.50, 0.75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 这 3 个水平间差异不显著, 而这三者均与 $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平差异显著。因此, $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物属于最佳浓度。

2.3 最优退火温度的确定

退火温度的高低直接影响到引物与模板 DNA 的结合, 根据以上正交试验所得到的最优组合, 选择合适的扩增体系进行退火温度梯度的试验。图 7 可见, 退火温度过低扩增特异性差, 杂带多, 背景深; 退火温度过高引物与模板 DNA 结合差, 扩增条带少, 亮度低。从此项试验看, 可以设定 57°C 为最佳退火温度。

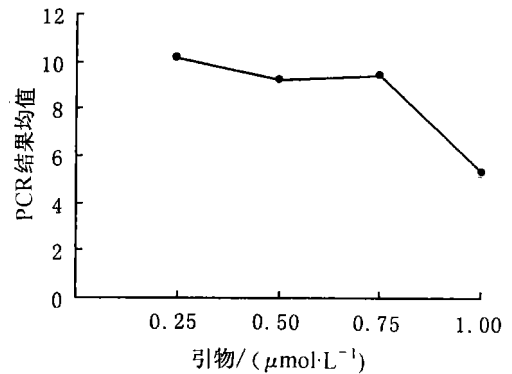


图 6 PCR 结果均值与引物的关系

Figure 6 The relationship of primer concentration and the result of ISSR-PCR

3 讨论

反应条件的变化对 ISSR 扩增影响是比较大的, 特别是 *Taq* DNA 聚合酶, Mg^{2+} 浓度, 引物浓度及退火温度。其反应体系中的 *Taq* 酶, Mg^{2+} 及 dNTP 等是相互影响的, *Taq* 聚合酶依赖于 Mg^{2+} , 而 Mg^{2+} 又受到 dNTP 影响, dNTP 浓度过高则会与 *Taq* 聚合酶竞争 Mg^{2+} , 从而影响到 *Taq* 聚合酶活性。同时在试验中发现, 不同公司生产的试剂对扩增也有一定影响。此试验以乳白石蒜 DNA 为模板, 对反应体系中的主要因素及退火温度进行优化筛选, 建立了石蒜属植物的 ISSR-PCR 反应体系, 即在 $20 \mu\text{L}$ 反应体系中, $2 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{Buffer}$, $\text{Mg}^{2+} 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP 为 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 25.05 nkat 的 *Taq* 聚合酶, 模板 DNA 50 ng , $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物。扩增程序为: 94°C 预变性 3 min。然后进行如下循环: 94°C 变性 30 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 共进行 38 个循环, 循环结束后 72°C 延伸 7 min。

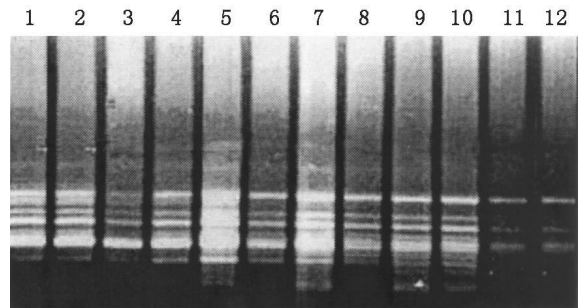


图 7 退火温度对 ISSR 反应的影响

1~12 依次为 $50.1, 50.4, 51.0, 52.2, 53.5, 55.1, 56.6, 58.3, 60.1, 61.2, 61.8, 62.2^\circ\text{C}$

Figure 7 The effect of annealing temperature on ISSR amplification

Lane 1~12 corresponding to $50.1, 50.4, 51.0, 52.2, 53.5, 55.1, 56.6, 58.3, 60.1, 61.2, 61.8, 62.2^\circ\text{C}$

扩增程序为: 94°C 预变性 3 min。然后进行如下循环: 94°C 变性 30 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 共进行 38 个循环, 循环结束后 72°C 延伸 7 min。

以往对 PCR 体系的优化试验, 大多采用单因素梯度试验来进行最佳水平的摸索^[15-23], 不能兼顾到各因素间的交互作用, 且多数单因素试验仅对扩增结果作直观分析, 并未进行统计分析, 无从考察各组分不同水平对扩增结果影响的差异显著性。在单因素试验中, 某组分扩增结果的影响是通过固定其他组分浓度获得的。此项试验采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 对影响石蒜属植物 ISSR-PCR 反应体系的 5 个因素 (*Taq* 酶, Mg^{2+} , 模板 DNA, dNTP, 引物) 在 4 个水平上进行的优化。科学系统地研究了不同因素和不同水平对 ISSR-PCR 的扩增结果影响。在正交试验中, 某一因素对扩增结果的影响是通过固定其浓度, 而动态变化其他多种组分浓度时获得的平均结果。所取得的结果包含了更多的信息, 且工作量较小, 数据分析简易, 并可分析交互作用。但该方法也存在局限性, 对试验结果本身优劣的判断依据仍带有主观性。如何建立对 PCR 扩增结果评判的客观标准, 提高试验结果的可信度和易操作性, 对于促进 PCR 技术的发展具有重要价值。

致谢: 在实验过程中得到了郁重彦先生的帮助, 特此致谢!

参考文献:

- [1] ZIETKIWICZ E, RAFALSHI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**: 176-183.
- [2] GILBERT J E, LEWIS R V, WILKINSON M J, *et al.* Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 1 125-1 131.
- [3] 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.
- [4] PREVOST A, WILKINSON M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **98**: 107-112.
- [5] 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.
- [6] SANKAR A A, MOORE G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**: 206-214.
- [7] JOSHI S P, GUPTA V S, AGGARWAL R 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**: 1 311-1 320.
- [8] 马朝芝, 傅廷栋, TUEVESSON S, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性 [J]. *中国农业科学*, 2003, **36** (11): 1 403-1 408.
- [9] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. *植物学报*, 2000, **42** (7): 741-750.
- [10] GE X J, SUN M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis [J]. *Mol Ecol*, 1999, **8**: 2 061-2 069.
- [11] 刘志高, 董再康, 朱玉球, 等. 乳白石蒜的组织培养 [J]. *浙江林学院学报*, 2006, **23** (3): 347-350.
- [12] 史全良, 诸葛强, 黄敏仁, 等. 用 ITS 序列研究杨属各组之间的系统发育关系 [J]. *植物学报*, 2001, **43** (3): 323-325.
- [13] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 65-79.
- [14] 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.
- [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] 宣继萍, 章镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, **38** (6): 549-550.
- [17] 乔玉山, 章镇, 房经费, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立 [J]. *果树学报*, 2003, **20** (4): 270-274.
- [18] 周俊亚, 宾晓芸, 彭云滔, 等. 罗汉果 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. *广西师范大学学报: 自然科学版*, 2004, **22** (3): 81-84.
- [19] 席嘉宾, 郑玉忠, 杨中艺. 地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2004, **43** (3): 79-84.

- [20] 姚明哲, 王新超, 陈亮, 等. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 茶叶科学, 2004, 24 (3): 172—176.
- [21] 何桥, 梁国鲁, 谢江辉. 莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. 果树学报, 2005, 22 (2): 186—189.
- [22] 袁建国, 邱英雄, 余久华, 等. 百山祖冷杉的 ISSR 分析优化和遗传多样性初步分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 31 (3): 277—282.
- [23] 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.

An inter simple sequence repeats (ISSR) reaction system for *Lycoris* (Amaryllidaceae)

ZHANG Lei-fan, GAO Yan-hui, ZHU Yu-qiu, LIU Zhi-gao, TONG Zai-kang, HUANG Hua-hong

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the genetic diversity of *Lycoris* Herb. (Amaryllidaceae), an orthogonal design was used to optimize an inter simple sequence repeats (ISSR) amplification system on *Lycoris* using five factors (Mg^{2+} , deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), primers, DNA template, and *Taq* polymerase) at four levels of concentrations respectively. A suitable ISSR reaction system was constructed with the 20 μ L reaction system containing 1 \times polymerase chain reaction (PCR) buffer, 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$, 150 $\mu mol \cdot L^{-1}$ dNTP, 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ primer, 50 ng DNA template, and 25.05 nkat *Taq* DNA polymerase. According to the gradient PCR, the optimal annealing temperature for the ISSR reaction was 57 $^{\circ}C$. [Ch, 7 fig. 2 tab. 23 ref.]

Key words: botany; *Lycoris*; inter simple sequence repeats (ISSR); orthogonal design; polymerase chain reaction (PCR) system

首届梁希青年论文奖评选揭晓

首届梁希青年论文奖评选揭晓。浙江林学院环境科技学院杜华强的论文《基于 matlab 遥感数据分形及地统计分析软件实现》获二等奖, 园林学院季梦成的论文《*Neckera noguchii* (Neckeraceae, Bryopsida), a new species from Nepal》获三等奖。

首届梁希青年论文奖评选活动是由中国林学会组织实施的, 目的是为促进林业青年科技人才的成长, 激励广大林业青年科技工作者求真务实, 不断创新。这次评选活动经形式审查、专家初审和评审会严格评审, 共评出一等奖论文 7 篇、二等奖 18 篇、三等奖 29 篇。