

砂珍棘豆 ISSR-PCR 反应条件优化研究

卢 萍¹, 陈 曦¹, 赵萌莉²

(1. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022; 2. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:以砂珍棘豆 (*Oxytropis racemosa* Turcz.) DNA 为材料, 应用分子标记技术, 分析了 DNA 模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度和 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响, 经优化试验建立了砂珍棘豆 ISSR-PCR 反应体系。20 μ L PCR 反应液含有的组分和终浓度分别为: 20 ng DNA 模板, 1 U *Taq* 酶, 0.24 μ mol/L 引物, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.15 mmol/L dNTPs。

关键词:砂珍棘豆; ISSR; PCR; 优化

中图分类号: Q346 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0104-03

Studies on Optimal Conditions of ISSR-PCR in *Oxytropis racemosa* Turcz.

LU Ping¹, CHEN Xi¹, ZHAO Meng-li²

(1. College of Life Sciences and Technology of Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China; 2. College of Ecology and Environment Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: Several factors that affected the ISSR-PCR amplification of *O. racemosa* Turcz., such as concentration of template DNA, primer, Mg^{2+} and dNTP were examined. The optimal ISSR-PCR reaction system in the experiment was established as follows: 20 ng template DNA, 0.24 μ mol/L primer, 2.0 mmol/L $MgCl_2$ and 0.15 mmol/L dNTPs. The research provided some fundamental data to the studies and use of *O. racemosa* Turcz.

Key words: *Oxytropis racemosa* Turcz.; ISSR; PCR; Optimization

砂珍棘豆是豆科棘豆属 (*Oxytropis* DC.) 多年生草本植物, 属于黄土高原—蒙古高原种, 生于海拔 600~1 900 m 的沙地、山坡地、沙滩及河岸, 其分布向东延伸至辽河平原, 向南至黄土高原区, 是沙质草原群落的特征种^[1,2]。砂珍棘豆有一定药用价值, 能消食健脾, 主治小儿消化不良, 在蒙药和藏药中广泛应用, 也可饲用^[1~4]。此外, 植物的花有很好的观赏价值, 可考虑作为花卉资源开发利用^[1], 其根系能防风固沙, 对沙地生态系统保护、可持续发展及生物多样性有重要的作用。

简单重复序列区间 (Inter simple sequence repeats, ISSR) 是一种较新的分子标记^[5], 其原理与 RAPD 相似, 在 SSR 的 3 或 5 端加 1~4 个锚定碱基, 然后以此为引物, 对两端有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增, 经电泳、染色后, 根据条带的有无及相对位置来分析不同样品的 ISSR 分子标记的多态性。与 RAPD 不同之处在于引物序列较长, 退

火所需温度高, 因而有比 RAPD 更高的重复性和稳定性, 多态性产物也更丰富^[5-8], 它结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 在 PCR 反应中模板用量少、操作简便、试验稳定性高。已广泛用于种群生物学、品种鉴定、物种亲缘关系及遗传多样性研究^[8-25]。

目前, 对砂珍棘豆的研究集中在植物学^[1-3]、生态学^[3]和分类学^[1,2,4]等领域, 在 DNA 水平进行种群遗传学的研究甚少。本研究对砂珍棘豆的 ISSR-PCR 的反应条件进行优化, 旨在为利用该分子标记研究砂珍棘豆种群的遗传结构、基因组变异及分化和遗传多样性奠定基础, 为植物的研究利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

在内蒙古乌审旗境内采集砂珍棘豆的成熟叶片, 将植物材料置变色硅胶迅速干燥, 带回实验室置

收稿日期: 2008-08-22

基金项目: 内蒙古自然科学基金 (200607010504); 内蒙古师范大学自然科学基金 (QN005021)

作者简介: 卢萍 (1964-), 女, 蒙古族, 内蒙古海拉尔人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事遗传与分子生物学、分子生态学等领域的研究。

- 80 低温冰箱保存 ,以备 DNA 提取。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

用改进的 CTAB^[26,27] 法提取基因组总 DNA ,

0.8 %琼脂糖凝胶电泳检测模板质量并测定浓度 ,

DNA 用 0.1 ×TE 稀释至 5 ng/μL ,4 保存。

试验所用 ISSR 引物 UBC813 由上海生工公司合

成 ,引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)的第 9

套。设计 4 组优化试验实施 PCR ,具体方案见表 1。

表 1 砂珍棘豆 ISSR-PCR 优化试验设计方案

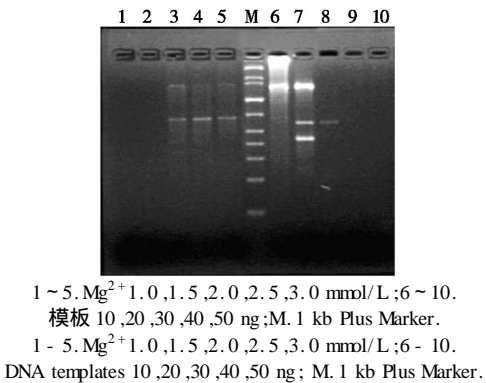
Tab.1 The optimal experiment design of ISSR PCR in <i>Oxytropis racemosa</i> Turcz.							
	DNTP / (mmol/L)	Mg / (mmol/L)	Taq / U	模板/ ng DNA templates	引物/ (μmol/L) Primer	10 ×PCR / μL	ddH ₂ O / μL
1.1	0.10	1.0	1	20	0.24	2	11.2
1.2	0.10	1.5	1	20	0.24	2	10.8
1.3	0.10	2.0	1	20	0.24	2	10.4
1.4	0.10	2.5	1	20	0.24	2	10.0
1.5	0.10	3.0	1	20	0.24	2	9.6
2.1	0.10	2.0	1	10	0.24	2	12.4
2.2	0.10	2.0	1	20	0.24	2	10.4
2.3	0.10	2.0	1	30	0.24	2	8.4
2.4	0.10	2.0	1	40	0.24	2	6.4
2.5	0.10	2.0	1	50	0.24	2	4.4
3.1	0.10	2.0	1	20	0.12	2	10.8
3.2	0.10	2.0	1	20	0.24	2	10.4
3.3	0.10	2.0	1	20	0.36	2	10.0
3.4	0.10	2.0	1	20	0.48	2	9.6
3.5	0.10	2.0	1	20	0.60	2	9.2
4.1	0.05	2.0	1	20	0.24	2	10.8
4.2	0.10	2.0	1	20	0.24	2	10.4
4.3	0.15	2.0	1	20	0.24	2	10
4.4	0.20	2.0	1	20	0.24	2	9.6
4.5	0.25	2.0	1	20	0.24	2	9.3

PCR 扩增程序为:94 预变性 3 min;每循环 94 变性 30 s,52 退火 45 s,72 延伸 90 s,45 个循环,72 7 min,4 保温。扩增产物用 1.5 %琼脂糖凝胶电泳,1 kb Plus Marker 作标准分子量对照,溴化乙锭染色。结果用 Tanon GIS-2010 型凝胶成像系统照相。

2 结果分析

2.1 Mg²⁺ 浓度优化

由图 1 可知,Mg²⁺ 浓度为 1.0,1.5 mmol/L 未出现条带,2.5,3.0 mmol/L 出现的条带数量和清晰度基本相同,2.0 mmol/L 较清晰,选择 2.0 mmol/L 为优化浓度。



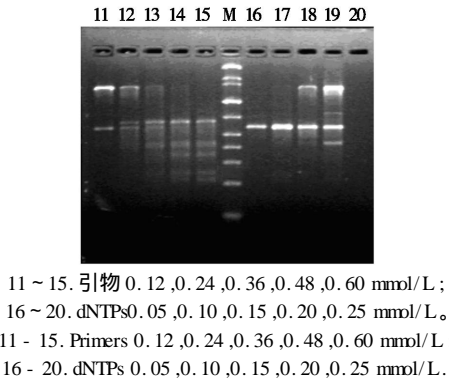
1 ~ 5. Mg²⁺ 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L;6 ~ 10. 模板 10,20,30,40,50 ng;M: 1 kb Plus Marker.
1 - 5. Mg²⁺ 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L;6 - 10. DNA templates 10,20,30,40,50 ng; M: 1 kb Plus Marker.
图 1 Mg²⁺ 和模板浓度对 PCR 的影响
Fig.1 Influences to PCR amplification of different concentration of Mg²⁺ and DNA templates

2.2 模板 DNA 浓度优化

由图 1 可看出,加入模板 DNA 10,20,30 ng 均可扩增出条带,比较而言,20 ng 的条带较多且清晰;40,50 ng 未扩增出条带,故选择 20 ng DNA 模板浓度较合适。

2.3 引物浓度优化

由图 2 可知,引物在 5 个浓度均出现条带,浓度为 0.12 μmol/L 时条带少,浓度为 0.36,0.48,0.60 μmol/L 时清晰度下降且出现非特异性扩增,而 0.24 μmol/L 时条带清晰且产量高,设为选择浓度。



11 ~ 15. 引物 0.12,0.24,0.36,0.48,0.60 mmol/L;
16 ~ 20. dNTPs 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 mmol/L。
11 - 15. Primers 0.12,0.24,0.36,0.48,0.60 mmol/L;
16 - 20. dNTPs 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 mmol/L。
图 2 不同浓度引物和 dNTPs 对 PCR 扩增的影响
Fig.2 Influences to PCR amplifications of different concentration of primers and dNTPs

2.4 dNTPs 浓度优化

由图 2 知,dNTPs 在浓度 0.05,0.10,0.15,0.20 mmol/L 均出现条带。浓度为 0.05,0.10 mmol/L 时

扩增出的条带少,浓度为 0.15 mmol/L 时条带多而清晰,浓度为 0.20 mmol/L 时出现非特异性产物,选择浓度为 0.15 mmol/L。

3 讨论

一般 PCR 反应中 Mg^{2+} 浓度在 1.5 ~ 2.0 mmol/L 较合适^[26-32], *Taq* 酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, *Taq* 酶活性受 Mg^{2+} 浓度影响,对其非常敏感,因而选择合适的 Mg^{2+} 浓度对 PCR 反应的成功至关重要。引物与模板双链杂交体的解链与退火温度也受二价阳离子影响,尤其是 Mg^{2+} 浓度,它能影响扩增产物特异性,扩增片段产率和引物二聚体的形成等,浓度过高可降低扩增的特异性,过低则影响扩增产量,甚至使扩增失败。游离的 Mg^{2+} 也可与 dNTPs 的磷酸基结合,只有 Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度在一定范围才能得到高质量的 PCR 扩增结果^[28-34]。本试验 Mg^{2+} 浓度设为 2.0 mmol/L。

DNA 模板的含量是制约扩增产物及特异性的因子,含量过低则分子碰撞的几率低,无扩增产物或结果不稳定;模板含量过高又会增加非特异性扩增产物^[31]。本试验加入 20 ng DNA 模板浓度较合适。

引物浓度影响到扩增质量,浓度过低不能进行有效扩增,过高会形成引物二聚体,导致条带不稳定及清晰度下降^[32]。本试验优化的引物浓度为 0.24 μ mol/L。

dNTP 浓度在 PCR 反应中一般为 0.02 ~ 0.20 mmol/L,过高会增加碱基错误掺入率,导致非特异性扩增;过低会导致反应速度下降,影响到产物的多样性和特异性^[20]。dNTP 还能螯合一定数量的 Mg^{2+} ,增加 dNTP 浓度将减少 Mg^{2+} 的有效浓度^[21]。本试验加入 0.15 mmol/L 的 dNTP,结果很好。

参考文献:

- [1] 曾建飞. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998:137 - 139.
- [2] 马毓泉. 内蒙古植物志[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1989:309 - 310.
- [3] 赵一之,刘 丽. 内蒙古棘豆属 *Oxytropis* 植物区系生态地理分布特征[J]. 内蒙古大学学报,1997,8(2):199 - 211.
- [4] 阎兴贵. 中国草地饲用植物染色体研究[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1994.
- [5] Zetkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176 - 183.
- [6] 谭天伟,黄留玉,苏国富. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [7] 邹喻苹. 分子标记在植物系统与进化研究中的应用[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [8] 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.
- [9] 张立荣,徐大庆,刘大群. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. 河北农业大学学报,2002, 25(1):90 - 94.
- [10] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2):19 - 20.
- [11] 袁昭岚,沈颂东,黄鹤忠,等. SSR 和 ISSR 分子标记技术及其在遗传多态性方面的应用[J]. 水产养殖, 2005, 26(2):10 - 12.
- [12] Godwin I D, Aiken E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18:1524 - 1528.
- [13] Williams J G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6351 - 6355.
- [14] 谢佳燕,张知彬. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 兽类学报, 2004, 24(1):71 - 75.
- [15] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报, 2004, 3(13):62 - 67.
- [16] 李立会,杨欣明,李秀全. 披碱草属 12 个物种遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8):1522 - 1527.
- [17] 江树业,陈启佟,方宣军. 水稻农垦 58 与农垦 58S 的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2000(1):63 - 66.
- [18] 周延清,景建洲,李振勇,等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性[J]. 遗传, 2004, 26(6):922 - 928.
- [19] 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 - 745.
- [20] 吕艳芳,刘桂丰,姜 静,等. 五针松胚乳 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 植物研究, 2003, 23(4):429 - 432.
- [21] Piffenbach C W, Dveksler G S. PCR 实验指南[M]. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,1998.
- [22] 李 伟,智 慧,王永芳,等. 适合于狗尾草属遗传分析的 ISSR 标记筛选及反应体系优化研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(4):1412 - 1415.
- [23] 肖海峻,孟利前,李玉冰. ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. 内蒙古农业科技, 2006(4):31 - 33, 42.
- [24] 赵 君,苏翻身,于长虹,等. 几种常用的分子标记的比较[J]. 内蒙古农业科技, 1999(3):32 - 33.
- [25] 苏志芳,包阿东,马 庆. SSR 分子标记技术及其在小麦遗传多样性研究中的应用[J]. 内蒙古农业科技, 2008(2):22 - 24, 27.
- [26] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998.
- [27] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998:578 - 614.
- [28] 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.
- [29] 李海生,陈桂珠. 红树植物海桑简单重复序列区间 (ISSR) 条件的优化[J]. 广东教育学院学报, 2004, 24(2):80 - 83.
- [30] 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.
- [31] 杜金昆,姚颖垠,倪中福,等. 普通小麦、斯卑尔小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J]. 遗传学报, 2002, 9(2):445 - 452.
- [32] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京:科学出版社, 2003:251 - 252.