

# 杂草稻 nrDNA ITS 片段的 PCR 扩增 条件优化及测定

刘志文<sup>1,2</sup>, 韩旭<sup>2</sup>, 周索童<sup>2</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 李宪臻<sup>2</sup>, 陈温福<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 水稻研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

**摘要:**对杂草稻的 nrDNA ITS 片段的 PCR 扩增条件进行了优化并测定, 建立的 PCR 最优体系为: 20  $\mu$ L 反应体系含 1  $\mu$ L 模板 DNA, 0.125 mmol/L dNTPs, 0.5  $\mu$ mol/L 正反向引物, 1 U *Taq* 酶, 2.0  $\mu$ L 10  $\times$  *Taq* PCR Buffer; 退火温度为 57  $^{\circ}$ C。这样的条件下充分保证了 ITS PCR 产物的质量和纯度要求, 直接测序结果为 600 bp 左右, 与网上结果十分类似, 表明结果准确可靠。这些 ITS 片段的系统学信息将为杂草稻的起源进化提供有力的分子水平证据。

**关键词:** 杂草稻; nrDNA ITS; PCR 扩增条件; 测序

中图分类号: S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0168-03

## Optimizing of the PCR Amplification Conditions and Sequencing the Weedy Rice nrDNA ITS

LIU Zhi-wen<sup>1,2</sup>, HAN Xu<sup>2</sup>, ZHOU Sue-tong<sup>2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, LI Xian-zhen<sup>2</sup>, CHEN Wen-fu<sup>1</sup>

(1. Rice Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. College of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** The PCR conditions of the weedy rice nrDNA ITS were optimized in this study, as a result, the PCR reactions were carried out as follows: each reaction mixture contained 1  $\mu$ L genomic DNA, 0.125 mmol/L each dNTPs, 0.5 mmol/L forward and reverse primer, 2.0  $\mu$ L 10 $\times$  PCR reaction Buffer, and the final reaction was adjusted to 20  $\mu$ L with sterilized ddH<sub>2</sub>O. The annealing temperature was 57  $^{\circ}$ C. It can assure that PCR products quality and purity using these optimal conditions. The length of the ITS fragments was about 600 bp using the direct sequencing methods and consistent with the genebank data. The phylogenetic information of the weedy rice ITS would conveniently provide the direct molecular evidence to clarify its origin and evolution.

**Key words:** Weedy rice; nrDNA ITS; PCR amplification conditions; Sequencing

在世界各国的水稻, 特别是直播和旱稻种植区内广泛发生的杂草稻, 由于其长期处于恶劣的野生状态中, 经过长期的自然异交, 并经受各种灾害、不良环境和人为选择, 表现出了对环境的高适应性和高变异性, 拥有复杂的遗传基础, 存在着多种多样的有益基因(如抗病、抗旱、耐低温、耐盐碱等), 比栽培稻更能适应恶劣的生存环境。杂草稻与栽培稻有较近的亲缘关系, 二者不存在生殖隔离, 可以作为增加栽培稻的遗传多样性和改良品种的优良种质资源<sup>[1-3]</sup>。因此, 对杂草稻的研究和利用会越来越受

到重视。然而, 为了更好地了解、防治和利用它, 有必要弄清其产生的机理, 明确起源进化。而传统的植物系统学主要是建立在形态解剖学、孢粉学、细胞学、植物地理学和生理生化等性状的表现型基础上的, 因其分析速度慢、耗时长, 并且这些性状易受各种内外环境因素的影响, 同时数量又十分有限, 很难获得准确的系统学结果。

20 世纪 80 年代以来, 分子生物学的迅速发展以及分子生物学技术的日益完善, 使研究者们可通过选择不同物种和亚种中具有代表性的 DNA 片段

收稿日期: 2008-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(30671262); 中国博士后科学基金(20080431156)

作者简介: 刘志文(1972-), 男, 湖北罗田人, 副教授, 博士, 主要从事杂草稻的分子生物学研究。

通讯作者: 陈温福(1955-), 男, 辽宁法库人, 教授, 博士, 主要从事水稻高产育种与栽培技术的研究。

进行克隆、测序, 以及遗传变异和进化分析, 从而在 DNA 水平上为某一物种的起源进化和分类提供最有力和直接的分子依据<sup>[4,5]</sup>。其中, 植物核糖体 DNA(nrDNA) 中的内转录间隔区(ITS) 的保守性十分强, 进化速度较快, 虽总长度只有 600~700 bp, 但可为属下水平的研究提供较丰富的变异位点和信息位点的系统学信息, 已经成为系统学中最常用和方便的核分子标记之一<sup>[6,7]</sup>。ITS 序列的获得一般可采用 PCR 扩增产物直接测序或克隆测序 2 种方法进行, 但前者较后者简捷且廉价, 然而直接测序方法对 PCR 产物质量和纯度要求比较高, 需要摸索最优的反应条件。

本试验旨在优化杂草稻 ITS 片段的 PCR 扩增条件, 获得准确的序列结果, 用于杂草稻的系统学分析, 为杂草稻的起源进化提供分子水平的证据, 明确其起源和进化的本质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集发生于辽宁省水稻主产区的杂草稻材料。

### 1.2 杂草稻 DNA 抽提

采用简易的小量 CTAB 法提取杂草稻 DNA, 取新鲜幼嫩的叶片 0.2~0.3 g, 加入约 500  $\mu$ L 65  $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$  CTAB 提取液研磨, 然后加入约 500  $\mu$ L 提取液冲洗转入 1.5 mL 离心管, 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 并不时轻轻颠倒混匀; 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液后加入 600  $\mu$ L 的氯仿: 异戊醇(24:1), 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 再加 600  $\mu$ L 的氯仿: 异戊醇, 进行 2 次纯化; 取上清液并加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇, -20  $^{\circ}$ C 放置 2~3 h, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 加入 70% 冷乙醇漂洗 3~5 h, 离心弃上清液, 在室温风干后溶于 200  $\mu$ L TE, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 ITS 引物设计和扩增程序

杂草稻 ITS 序列扩增引物参考 White 等<sup>[8]</sup>, 采用双引物 ITS1 和 ITS4 进行扩增, ITS1 设计为 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS4 为 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT TAA-3'。引物由大连宝生物公司完成。

扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 45 s, 最优退火温度 60 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 循环 38 次, 最后在 72  $^{\circ}$ C 保温 20 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增仪 GeneAmp PCR System 9700, 产物在 UVP 凝胶成像系统下观察拍照。

### 1.4 PCR 主要参数的优化和产物的纯化与测序

PCR 扩增反应体积 20  $\mu$ L。在其他参数固定不

变的情况下, 分别对影响 PCR 扩增的几个重要条件和参数进行优化, 退火温度分别设置为 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59  $^{\circ}$ C; 模板 DNA 浓度设置取备用液 0.3, 0.5, 1.0 和 1.5  $\mu$ L; dNTPs (2.5 mmol/L) 设置取样 0.5, 0.75, 1.0, 1.5  $\mu$ L; 双引物(10  $\mu$ mol/L) 设置分别取样 0.5, 0.75, 1.0, 1.5  $\mu$ L; *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U) 设置为 0.5, 1.0, 1.5 U。每一参数优化分别重复至少 3 次。先分别确定单个的最优条件, 后根据成本等因素综合最终确定一个最优的 ITS PCR 反应条件。

扩增试剂、PCR 扩增产物的纯化与直接测序均由大连宝生物公司提供或完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 反应体系的优化

退火温度经过反复多次的试验, 最终确定为 57  $^{\circ}$ C 为最佳退火温度, 过高扩增效果不佳, 过低特异性不强, 会有非特异扩增的弱带出现, 影响直接测序的顺利进行。

试验结果表明, DNA 模板、dNTPs 和双引物分别加样 1.0  $\mu$ L, DNA 聚合酶 1 U 分别为各自条件下的最佳反应参数。虽然分别加大上述试剂用量也有较好的结果, 但相应的成本也在增加, 而且没有必要。但若降低用量, 扩增效果相对较差。

最终建立的 PCR 优化体系为: 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体积含 1  $\mu$ L 模板 DNA, 0.125 mmol/L dNTPs, 0.5  $\mu$ mol/L 正反向引物, 1 U *Taq* 酶, 2.0  $\mu$ L 的 10 $\times$  *Taq* PCR Buffer; 退火温度为 57  $^{\circ}$ C。图 1 所示为在优化后的条件下扩增的结果。

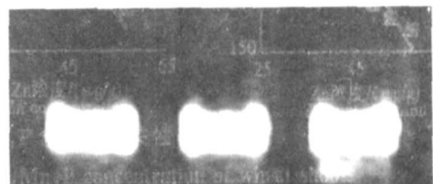


图 1 最优条件下杂草稻 ITS PCR 扩增产物检测效果图

Fig. 1 Amplification patterns of the weedy rice ITS under the optimal conditions

### 2.2 ITS 基因的 PCR 测定分析

在上述的最优扩增条件下, 取 2 个 20  $\mu$ L 的相同反应物混合共 40  $\mu$ L (因测序时需要一定总量的 PCR 产物) 的产物, 其中 5  $\mu$ L 检测用, 35  $\mu$ L 送样宝生物公司进行 PCR 产物(未纯化) 直接测序。ITS 测序结果表明长度大约为 600 bp, 其中一个(104<sup>#</sup>) 的序列结果见图 2, 其全长为 624 bp, 在 NCBI 上进行比较分析表明, 该序列与已发表的水稻 ITS 的序列相似性十分高(99.2%), 测序准确可靠。

104<sup>#</sup> (624 bp): ACTGCGGAGGTCATTGTCTGTCGACCTGACCAAAACAGAC  
CGCGAACGCGTCACCCCTGCCCGCCGAGCGCTCGCGCGGAGGCAA  
CCGAGGCCCGCGGCCGCAACAGAACCCACGGCGCCGACGGCGTCA  
AGGAACACAGCGATACGCCCGCGCCCGCGCTCGGCCCTGGCCGTCC  
GGCGGCGCGGCGCGATACACGAGTTAAATCCACACGACTCTCGGCA  
ACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT  
ACCTGGTGTGAATTGCAGATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGC  
AAGTTGCGCCCGAGGCCATCCGGCCGAGGGCAGCGCTGCTGGGCGT  
CACGCCAAAAGACGCTCCACGCGCCCGCCCTATCCGGGAGGGCGC  
GGGGACGCGGTGTCTGGCTCCCGCGCTCGCGGCGCGGTGGGCGG  
AAGTCGGGCTCGCGCGAAGCGTGCCGGGACAGCGCATGTTGGA  
CAGCTCACGCTGGCTCTAGGCCGCAGTGCACCCGGCGCGCGCCGG  
CGCGATGCGCCCTCAGGACCCAAACGACCGAGAGCGAACGCCTCGG  
ACCGCGACCCAGGTCAGGCGGA

图 2 104<sup>#</sup> 的 ITS 直接测序结果

Fig. 2 The direct sequencing result of 104<sup>#</sup> ITS

### 3 讨论

通常测序一个反应最有效的是 500 bp, 大于 500 bp 需要正反 2 个或测通反应才能得到较为准确结果。在这里, PCR 扩增条件经过适当的优化, 只需一个反应也能得到 600 bp 左右的准确的结果, 这样大大降低了测序的费用, 方便了操作。

应用这种方法, 我们正在不断地获得大量的杂草稻 ITS 序列, 并结合网上公布的栽培稻和野生稻等的 ITS 数据进行分析。这些系统学结果将为水稻改良的优良种质资源—杂草稻的起源提供最直接的证据, 从而揭示其真正的发生机理。为在研究有效防治杂草稻的同时, 保存、开发和利用杂草稻提供理论依据, 并拓宽水稻育种的方向和保证栽培水稻进一步改良和可持续生产。

### 参考文献:

[1] Gu X Y, Chen Z X, Michaele E F. Inheritance of seed dor-

mancy in weedy rice [J]. Crop Science, 2003, 43: 835– 843.  
[2] Griselda A E, Elena S, Sergio V, *et al.* The weedy rice complex in Costa Rica. I. morphological study of relationships between commercial rice varieties, wild *Oryza* relatives and weedy types [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005, 52(5): 575– 587.  
[3] Cao Q J, Lu B R, Xia H, *et al.* Genetic diversity and origin of weedy rice( *Oryza sativa* f. spontanea) populations found in north-eastern China revealed by simple sequence repeat( SSR) markers[ J]. Annals of Botany( London), 2006, 98: 1241– 1252.  
[4] 侯 鑫, 刘俊娥, 赵一之, 等. 基于 ITS 序列和 trnL-F 序列探讨小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间关系[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2): 126– 134.  
[5] Nobuo K, Daiki M, Akira N, *et al.* Attaining inter-subgeneric hybrids in fragrant azalea breeding and the inheritance of organelle DNA[ J]. Euphytica, 2008, 159( 1): 67– 72.  
[6] Qi X H, Zhang M F, Yang J H. Molecular phylogeny of Chinese vegetable mustard( *Brassica juncea*) based on the internal transcribed spacers( ITS) of nuclear ribosomal DNA [ J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54( 8): 1709– 1716.  
[7] 包 颖, 葛 颂. 利用多基因序列探讨稻属药稻复合体二倍体物种的系统发育关系[J]. 植物分类学报, 2003, 41(6): 497– 508.  
[8] White T J, Brunns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [ M] // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al.* PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications. San Diego : Academic Press, 1990: 315– 322.