

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

李 伟, 智 慧, 王永芳, 李海权, 刁现民

(河北省农林科学院谷子研究所, 河北 石家庄 050031)

摘要: 利用公共数据库已有的 ISSR 序列信息, 检验了 29 条 ISSR 引物在谷子等狗尾草属植物基因组的扩增性, 其中 14 条在狗尾草属中有良好扩增, 其余 15 条在狗尾草属中无任何扩增。能稳定扩增的 14 条引物全为 3'-锚定引物, 6 条 5'-锚定引物在狗尾草属中得不到扩增。研究发现 AG, GA 和 CA 重复的引物在狗尾草属植物有较好扩增, 且多态性强。利用正交试验设计, 从 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq 酶 4 种因素、4 个水平对狗尾草属谷子 ISSR 反应体系进行优化, 确定了适合谷子的 ISSR 反应体系, 在 20 μ L 体系中, 含 $1 \times$ PCR buffer、 Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, dNTP 浓度 0.25 mmol/L, Taq 酶 0.4 μ L, 引物浓度 0.25 μ mol/L, 50 ng 模板, 通过梯度 PCR 确定了引物的退火温度。本研究筛选的 ISSR 引物及建立的优化反应体系可用于谷子等狗尾草属植物遗传多样性和基因组研究, 并对其他近缘作物有指导意义。

关键词: 谷子; ISSR 标记; 狗尾草属

中图分类号: S515.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0141-05

Screening of ISSR Primers that Suitable for *Setaria* Species and Their PCR Reaction System Optimization

LI Wei, ZHI Hui, WANG Yong-fang, LI Hai-quan DIAO Xiao-min

(National Millet Improvement Center of China, Institute of Millet Crops, Hebei Academy
of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Twenty nine ISSR primers designed according to the public ISSR database were tested their reaction feasibility in foxtail millet and other *setaria* species genomes, of which 14 primers gave perfect amplification profile and the other 15 made no amplification. All the 14 primers that made good amplification were 3'-anchored. The results also showed that poly(AG) or(GA) and poly(CA) have better amplification and polymorphism than other primers in *setaria* genomes. The orthogonal design was used to optimize ISSR amplification system of *setaria* in four factors(Mg^{2+} , dNTP, primer, Taq polymerase) at four levels respectively. A suitable ISSR reaction system was established, namely 20 μ L reaction system containing 50 ng DNA template, 0.25 μ mol/L primer, $1 \times$ PCR buffer, 0.25 mmol/L dNTP, 0.4 μ L Taq DNA polymerase, 2.0 mmol/L Mg^{2+} . The results obtained can be used for *setaria* genetics and genome research, and are important for related species in connected fields.

Key words: Foxtail millet; ISSR marker; *Setaria*

Ziekiewicz 等^[1]发表了关于锚定的 SSR 作为一种分子标记的工具, 即 ISSR(Inter Simple Sequence Repeat), 其基本原理是利用基因组中存在的众多的 SSR 本身设计引物, 在 SSR 的 3 或 5 加上 1~4 个碱基锚定, 对两侧具有反向排列的 SSR 序列间的基因组片断进行扩增, 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中分

离, 从中鉴定多态性。ISSR 标记操作简便、重复性强、省时省力、消耗低, ISSR 和 RAPD 很相似, 但是比 RAPD 更稳定, 可重复性强, 多态性更好, 而且不需要知道被检测的物种任何基因组的信息, 因此 ISSR 标记很适合基因组信息缺乏物种的研究。由于 ISSR 标记的众多优点, 自发明以来已被广泛应用于生物的遗

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(30630045); 农业部种植业结构调整项目(050501B); 河北省自然科学基金资助课题(C2004000697)

作者简介: 李 伟(1979-), 男, 河北石家庄人, 本科, 助理研究员, 主要从事谷子遗传和基因组研究

通讯作者: 刁现民(1963-), 男, 河北南和人, 理学博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种与分子生物学研究。

传多样性和分子标记研究,在农作物研究中应用尤其多^[2,3]。狗尾草属的研究基础相对薄弱,基因组信息缺乏,遗传分析缺少相应的工具,ISSR 作为一种简便的标记很适合狗尾草属遗传多样性分析。

谷子属于狗尾草属,其抗旱耐瘠是中国北方主要的粮食作物之一,由于属于小作物研究基础薄弱,无任何基因组相关信息,Devos 等^[4]、Wang 等^[5] 用 RFLP 曾经对谷子进行过遗传研究,1998 年 Li Y 等^[6]利用 RAPD 对谷子进行了遗传多样性的研究。由此可见狗尾草属的研究背景少,可利用的标记少,SSR 是较好的一种分子标记,本实验室正致力于自主开发谷子 SSR 标记,因其开发周期长,耗时耗工,达到利用 SSR 标记分析谷子需要的标记数还需一段时间的工作。我们也曾试图利用禾本科其他物种的已有 SSR 标记,研究其在狗尾草属的通用性,但是通过筛选小麦 EST-SSR、高粱、水稻、玉米大约 446 对 SSR 引物,只筛出 48 对可在狗尾草属中有扩增产物,利用这 48 对引物研究狗尾草属遗传多样性显然太少。ISSR 由于其多态性好、操作简便、重复性好,利用其分析狗尾草属的遗传多样性是相对较好的工具。

SSR 是基于 PCR 的一种标记,其反应条件受许多因素的影响,如 Taq 酶量、模板、Mg²⁺、dNTP、引物的浓度都能影响 PCR 的扩增结果,因此,确定某个特定物种和其近缘种的 ISSR 标记扩增所适合的具体引物和反应条件,对于形成稳定高效的反应体系至关重要。以单因素试验,难免顾此失彼,忽视其相互作用,正交试验设计具有均衡分散,综合可比及可伸可缩,效应明确的特点,能够较快的优化反应条件,本试验从 Mg²⁺, dNTP, Taq 酶、引物 4 个因素的 4 个水平对狗尾草属谷子 ISSR 反应体系进行优化分析,并对 ISSR 引物的退火温度进行梯度试验,以期获得狗尾草属优化的 ISSR-PCR 反应体系,为狗尾草属遗传多样性研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

植物基因组 DNA 提取:植物基因组 DNA 采用 SDS 法^[7]提取,取供试材料幼苗叶片 200 mg 用液氮充分研磨,将粉末转至 2 mL Eppendorf 管中,加入 800 μ L DNA 提取缓冲液充分混匀,加入 90 μ L SDS (10%) 溶液,上下颠倒混匀,65℃水浴 15 min,加入 140 μ L KAC(5 mol/L),混匀冰浴 30 min,4℃12 000 \times g 离心 15 min,取上清加氯仿:异戊醇(24:1)500 μ L 抽提,取上清加 600 μ L 异丙醇(4℃预冷),混匀后于

-20℃放置 30 min,4℃12 000 \times g 离心 15 min,去上清后 80% 乙醇洗涤,4℃12 000 \times g 离心 5 min,去上清,放于超净工作台吹干,加入 100 μ L ddH₂O 溶解 DNA,使用时稀释 10~20 倍。

供试材料采自河北省农科院谷子所试验田,正交试验均采用豫谷 1 号的基因组 DNA 为模板,对所建立的反应体系的验证试验采用的植物材料有谷子豫谷 1 号,阴天旱;青狗尾草材料 09001 和 09003;法式狗尾草材料 02006 和 02002。

试验所采用试剂, Taq 酶, dNTP 均购自大连宝生物工程公司。PCR 仪使用 eppendorf PCR 仪。

本试验根据加拿大 UBC 大学网站(<http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer-Sets/Primers-Oct2006.pdf>)得到引物列表,在上海生工生物工程公司合成全部引物,引物见表 2。

1.2 方法

供试材料采用 SDS 法提取总 DNA,经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, DNA 浓度通过 ND-1000 紫外分光光度计测量,终浓度稀释为 50 ng/ μ L。

1.3 退火温度的确定

根据试验选择合适的反应体系,设定退火温度(51 \pm 5)℃,自动生成 1~10 个梯度:47.2, 47.7, 48.6, 49.7, 51.0, 52.4, 53.8, 55.0, 56.1, 57℃,测试最佳退火温度。

1.4 PCR 正交试验设计

针对 Mg²⁺、dNTP、Taq 酶、引物 4 种因素,选用 L16(4⁴) 正交表,设计的 PCR 各反应成分的因素-水平及正交试验表列于表 1。

表 1 PCR 正交试验设计

Tab. 1 Orthoronal design for ISSR-PCR reaction system in *Setaria*

编号 No.	Mg ²⁺ 浓度 /(mmol/L) Mg ²⁺	dNTP 浓度 /(mmol/L) dNTP	Taq 酶/ μ L Taq DNA polymerase	引物/(μ mol/L) Primer
1	2.0	0.15	0.1	0.15
2	2.0	0.20	0.2	0.20
3	2.0	0.25	0.4	0.25
4	2.0	0.30	0.3	0.30
5	2.5	0.15	0.2	0.25
6	2.5	0.20	0.1	0.30
7	2.5	0.25	0.3	0.15
8	2.5	0.30	0.4	0.20
9	3.0	0.15	0.2	0.30
10	3.0	0.20	0.1	0.20
11	3.0	0.25	0.4	0.25
12	3.0	0.30	0.3	0.15
13	3.5	0.15	0.3	0.20
14	3.5	0.20	0.4	0.15
15	3.5	0.25	0.2	0.30
16	3.5	0.30	0.1	0.25

以上 16 个处理, 每个处理 3 次重复, 共 48 个 PCR 管, 按表 1 加样。反应体系总体积 20 μL, 每管还包括 1 × PCR buffer 和 50 ng 的模板 DNA。反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 47~ 49℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 循环 45 次; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。

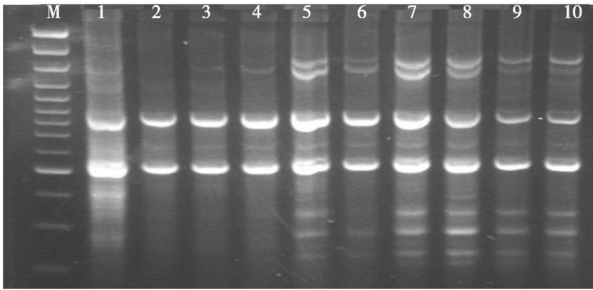
PCR 反应产物加入 2 μL 电泳点样缓冲液, 2% 琼脂糖电泳, 80 V 恒压 1 h, 电泳后在溴化乙锭中染色, 在 BIO-RAD universal HOOD II 上进行凝胶观察和照相, 100 bp DNA ladder(TaKaRa, 中国大连) 作为分子量标准。每个 PCR 反应重复 2~ 3 次。

2 结果与分析

2.1 退火温度的确定

序列退火温度的梯度测验, 结果见图 1。分析该结果, 退火温度较低容易产生弥散的带, 杂带多, 背景很高, 随着退火温度的升高, 引物与模板的结合

特异性增强, 扩增条带特异性增强, 但是随着温度的升高一些非特异带产生, 温度继续升高非特异带逐渐减少, 共利用梯度测验检测 ISSR 引物 29 条(表 2), 分别确定了各自的退火温度。



M. 100 bp 的 ladder; 1~ 10 号温度分别为: 47. 2, 47. 7, 48. 6, 49. 7, 51. 0, 52. 4, 53. 8, 55. 0, 56. 1, 57℃
M is 100 bp ladder; Tm of NO. 1 to 10:47. 2, 47. 7, 48. 6, 49. 7, 51. 0, 52. 4, 53. 8, 55. 0, 56. 1, 57℃, respectively

图 1 引物 UBC810 扩增程序退火温度对扩增的影响

Fig. 1 Gradient PCR for finding Tm of primer UBC810

表 2 合成的 29 条引物及测试的退火温度

Tab. 2 The details of 29 ISSR primers

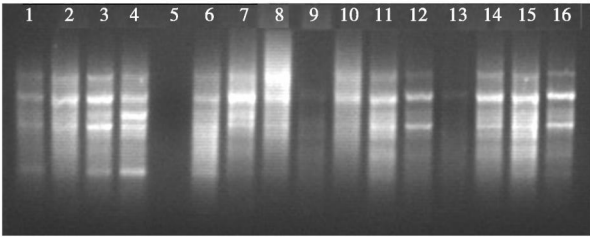
名称 Name	长度 Length	序列 (5' to 3') Sequence	Tm/℃	扩增效果 Ampliatern	Ta/℃	扩增条带数 Numbers of bands	扩增片断大小/bp Size of bands
UBC801	17	(AT) ₈ T	32. 9	无扩增			
UBC804	17	(TA) ₈ A	32. 9	无扩增			
UBC807	17	(AG) ₈ T	52. 2	好	47	6	250~ 800
UBC808	17	(AG) ₈ C	54. 6	好	49	5	480~ 1 100
UBC809	17	(AG) ₈ G	54. 6	好	49	6	190~ 750
UBC810	17	(GA) ₈ T	52. 2	好	47	7	200~ 1 000
UBC811	17	(GA) ₈ C	54. 6	好	49	4	300~ 1 100
UBC812	17	(GA) ₈ A	52. 2	好	47	6	200~ 700
UBC813	17	(CT) ₈ T	55. 4	无扩增			
UBC814	17	(CT) ₈ A	52. 2	好	47	1	1 000
UBC815	17	(CT) ₈ G	54. 6	无扩增			
UBC816	17	(CA) ₈ T	52. 2	好	47	3	600~ 1 500
UBC817	17	(CA) ₈ A	52. 2	好	47	6	260~ 1 400
UBC818	17	(CA) ₈ G	54. 6	好	49	5	500~ 1 100
UBC819	17	(GT) ₈ A	52. 2	好	47	2	900~ 1 600
UBC820	17	(GT) ₈ C	54. 6	无扩增			
UBC821	17	(GT) ₈ T	52. 2	无扩增			
UBC822	17	(TC) ₈ A	52. 2	好	47	3	640~ 1 100
UBC825	17	(AC) ₈ T	52. 2	无扩增			
UBC829	17	(TG) ₈ C	54. 6	好	49	5	500~ 1 000
UBC834	18	(AG) ₈ YT	52. 7	无扩增			
UBC835	18	(AG) ₈ YC	55. 0	好	49	3	350~ 750
UBC872	16	(GATA) ₄	41. 3	无扩增			
UBC884	17	HBH(AG) ₇	49. 8	无扩增			
UBC885	17	BHB(AG) ₇	49. 8	无扩增			
UBC888	17	BDB(CA) ₇	49. 8	无扩增			
UBC889	17	DBD(AC) ₇	49. 8	无扩增			
UBC890	17	VHV(GT) ₇	49. 8	无扩增			
UBC891	17	HVH(TG) ₇	49. 8	无扩增			

2.2 PCR 正交试验设计的分析

3 次正交试验 PCR 给出了稳定的扩增结果(图

2)。从结果明显看出, 随着 dNTP 的增加扩增产物明显增多, 但其特异性差(1~ 4 号), 当 dNTP 浓度在

0.25 mmol/L 时其特异性高,产物稳定可靠(3号);而 dNTP 浓度太低时,直接影响 PCR 扩增,甚至可造成无扩增,第 1,5,9,13 4 个样本在 dNTP 浓度在 0.15 mmol/L 时基本无扩增说明了这一点。PCR 产物受 Mg^{2+} 的影响较大,随着 Mg^{2+} 浓度的增加,扩增产物明显增加,其弥散更加明显。Taq 酶和引物浓度对扩增无太大影响。综合比较后,确定较适宜的反应体系是: Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, dNTP 浓度 0.25 mmol/L, Taq 酶 0.4 μ L, 引物浓度 0.25 μ mol/L。



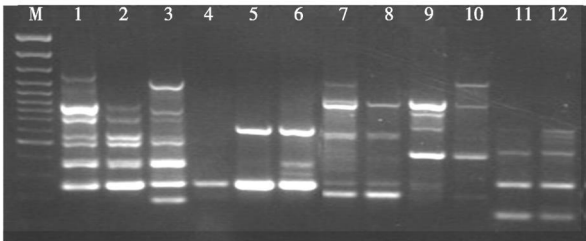
1~ 16 号分别对应表 1 中 1~ 16 号的反应体系
No. 1 to 16 is same as Tab. 1

图 2 正交试验电泳图

Fig. 2 Result of PCR products electrophoresis

2.3 适合于谷子等狗尾草属植物的 ISSR 标记引物筛选

基于 ISSR 标记在水稻、小麦、玉米等禾本科植物的已有研究结果,本研究共设计了 29 对 ISSR 引物,按照上述反应体系检测了每个引物在豫谷 1 号基因组的扩增表现,结果列于表 2。从结果可以看出,29 个引物有 14 个能稳定扩增,15 个引物无扩增。能够扩增的引物扩增的片段大小分布 190~1 600 bp,引物 UBC810 扩增的片段最多,为 7 条;引物 UBC814 给出的最少,为 1 条,平均为 4.4 条。



M. 100 bp 的 ladder; 1~ 6 号是 UBC807 对豫谷 1 号,阴天旱,09001,09003,02006,02002 的扩增; 7~ 12 号是 UBC810 对豫谷 1 号,阴天旱,09001,09003,02006,02002 的扩增
M is 100 bp ladder; No. 1~ 6 is the result of Yu1, Yintianhan, 09001, 09003, 02006, 02002 with primer UBC807 and the same templates
No. 7 to 12 with primer UBC810

图 3 UBC807, UBC810 应用于狗尾草属的扩增

Fig. 3 Result of PCR products electrophoresis of UBC807 and UBC 810

2.4 ISSR-PCR 反应体系在狗尾草属植物中的应用

为检验所建立的反应体系在谷子等狗尾草属植物的可应用性,将上述优化体系 Mg^{2+} 浓度 2.0

mmol/L, dNTP 浓度 0.25 mmol/L, Taq 酶 0.4 μ L, 引物浓度 0.25 μ mol/L 应用于包括豫谷 1 号在内的 6 个狗尾草属的其他材料的扩增反应,包括 2 个谷子品种、2 个青狗尾草品种、2 个法式狗尾草品种。优化的反应体系在这 6 个品种中都得到较好的、清晰扩增条带,且重复性好(图 3),不同物种之间和同一物种的不同品种之间,还表现了丰富的多态性。表明优化的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,可用于狗尾草属遗传多样性和分子标记分析。

3 结论与讨论

在我们合成的 29 个 ISSR 引物中,仅有 14 个引物在谷子等狗尾草属物种中有稳定扩增,在豫谷一号基因组中共扩增出 62 条带,2002 年 Joshi 等^[2]在水稻中应用 ISSR 标记分析水稻的遗传多样性,在谷子和水稻上都能得到良好扩增的引物有 UBC807, UBC808, UBC810, UBC811, UBC814, UBC835, 而引物 UBC813, UBC815, UBC821 在谷子和水稻上都无扩增或扩增弥散, UBC812, UBC816, UBC817, UBC818, UBC819, UBC829 在谷子上有良好扩增而在水稻中无扩增或弥散, UBC834 和 UBC872 在水稻上扩增良好,特异性强,却在谷子中无扩增。从以上结果可以看出,两碱基重复的 ISSR 标记中 AG 和 GA 重复在谷子和水稻中都有良好扩增且特异扩增强,说明在狗尾草属和稻属基因组中含有丰富的 AG 和 GA 重复。两碱基 CT 和 GT 重复在谷子和水稻中的扩增都不好,很可能 CT 和 GT 在 2 个属的基因组中含量相对较少,或分布比较分散,无法得到扩增, UBC816, UBC817, UBC818 都是 CA 重复,这 3 个引物在谷子中有良好扩增,但是在水稻中却无扩增,这一点可能反应了 CA 微卫星重复在狗尾草属和稻属基因组的状况。

本试验合成的 2 个 AT 重复序列,在谷子中得不到任何扩增。在 Brantestam 等^[3]使用 ISSR 标记对大麦的研究中, UBC888, UBC889, UBC890, UBC891 等 5'-锚定 ISSR 引物可以得到 9~14 扩增条带,本试验也合成了 6 条 5'-锚定 ISSR 引物,但是在谷子等狗尾草属植物中无任何扩增,其中的原因值得探讨。

由于 TaqDNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增十分重要,本试验确定的最终适合浓度是 2.0 mmol/L,而 Mg^{2+} 和其他因素之间有相互作用的,所以单纯考虑 Mg^{2+} 浓度是不够的,本试验采用正交试验设计,尽量实现各因素的优化组合,使 PCR 反应体系不只单纯根据单因素调整,最终得到较优化的组合是: Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L, dNTP 浓

度 0.25 mmol/L, Taq 酶 0.4 μ L, 引物浓度 0.25 μ mol/L。

在利用温度梯度 PCR 测试引物的退火温度时, 发现在退火温度很低时易出现弥散的带, 背景重; 当温度合适时, 只产生特异的 PCR 条带, 无弥散带, 且重复时稳定性好; 温度再高一些, 就出现了非特异扩增条带, 这些带一般出现在较 300 bp 小或者大于 1 kb 的位置, 重复性差; 温度继续升高, 这些非特异带逐渐减少, 特异带的亮度变弱, 说明引物与模板的结合能力差, 结合较困难, 导致扩增量少。

优化的 ISSR-PCR 体系在狗尾草属的 3 个种: 谷子、青狗尾草和法式狗尾草中得到较好的扩增, 且多态性好, 利用 1 条引物即可将其区分, 每个物种都有其特异条带, 3 个种之间的种间差异也在图 3 中有明显的显示, 种的特异带十分明显; 种内不同品种间也表现了多态性。因此, 应用 ISSR 能够分析狗尾草属的遗传多样性和系统进化关系。在狗尾草属谷子的已有研究中较多使用 RAPD 随机标记^[6], 但是 RAPD 的多态性差、可重复性差。此外, RFLP 标记^[5,8]和 AFLP 标记均在谷子和狗尾草属遗传多样性研究中的应用^[9], 而 ISSR 具有在狗尾草属中良好的扩增以及好的重复性, 在狗尾草属中引入 ISSR 标记, 无疑会加快狗尾草属的遗传研究, 为遗传背景知识较为薄弱的小作物研究增加了一个有利的工具。

参考文献:

[1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain

reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176– 183.

- [2] 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: 1311– 1320.
- [3] Brantestam A K, Bothmer R V, Dayteg D. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin [J]. Hereditas, 2004, 141: 186– 192.
- [4] Devos K M, Wang Z M, Beales J, *et al.* Comparative genetic maps of foxtail millet (*Setaria italica*) and rice (*Oryza sativa*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96(1): 63– 68.
- [5] Wang Z M, Devos K M, Liu C J, *et al.* Construction of RFLP-based maps of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) Beauv [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96(1): 31– 36.
- [6] Li Y, Jia J Z, Wang Y R, *et al.* Intraspecific and interspecific variation in *Setaria* revealed by RAPD analysis [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1998, 45: 279– 285.
- [7] Fukunaga K, Domon E, Kawase M. Ribosomal DNA variation in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv, and a survey of variation from Europe and Asia [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 751– 756.
- [8] Fukunaga K, Wang Z M, Kato K, *et al.* Geographical variation of nuclear genome RFLPs and genetic differentiation in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49: 95– 101.
- [9] Le Thiery d'Ennequin, Penaud O, Toupance B, *et al.* Assessment of genetic relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP marker [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1061– 1066.