

文章编号: 1001-1498(2007)06-0739-05

云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR反应体系优化研究

缪迎春, 苏建荣*, 张志钧

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要:采用交互正交设计 $L_{64}(4^{21})$ 对濒危植物云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR反应体系分别进行了 5 因素 (Taq 酶; Mg^{2+} ; dNTP; DNA 及引物) 4 水平的优化筛选, SAS 软件统计分析表明: 3 个单因素 (Taq 酶; Mg^{2+} ; dNTP) 和 2 个交互作用 ($Taq \times Mg^{2+}$, $Mg^{2+} \times dNTP$) 对此反应体系有显著影响作用。云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR 反应的优化体系是: 在 20 μ L 反应体系中含有 1 \times PCR buffer, Taq 酶 4 U, Mg^{2+} (2.0 mmol \cdot L $^{-1}$), dNTP (0.4 mmol \cdot L $^{-1}$), DNA 75 ng, 引物 (1.0 μ mol \cdot L $^{-1}$), 退火温度 (54 $^{\circ}$ C)。交互正交设计既能快捷有效地筛选出最佳 PCR 反应体系, 又能揭示试验因素及其交互作用对扩增的影响程度, 分析结果更客观、准确, 具有一定的应用价值。

关键词: 云南红豆杉; 简并锚定微卫星-PCR; 反应体系; 交互正交设计

中图分类号: S718.4

文献标识码: A

Optimization for SSR-anchored PCR Reaction System in Endangered Plant *Taxus yunnanensis*

MIAO Ying-chun, SU Jian-rong, ZHANG Zhi-jun

(Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The interaction among different factors was usually ignored during experimental design with orthogonal design which was widely used in optimizing for PCR reaction system. Orthogonal design $L_{64}(4^{21})$ involving interaction was used to optimize simple sequence repeated-anchored PCR by degenerate primer (SSR-anchored PCR) amplification system on *T. yunnanensis* in five factors: Taq DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTP, DNA and primer at four levels. The analytic results by software SAS showed that: Three factors (Taq DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTP) and the two interactions ($Taq \times Mg^{2+}$, $Mg^{2+} \times dNTP$) had notable effect on the SSR-anchored PCR amplification system; An optimal SSR-anchored PCR reaction system was established containing 1 \times PCR buffer, 4 U Taq DNA polymerase, 2.0 mmol \cdot L $^{-1}$ Mg^{2+} , 0.4 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTP, 75 ng DNA, 1.0 μ mol \cdot L $^{-1}$ primer in a total volume of 20 μ L reaction system. Moreover the optimal annealing temperature (54 $^{\circ}$ C) was proposed by gradient PCR. Orthogonal design involving interaction is of special application value as it can not only screen out the best PCR reaction system quickly and effectively, but also reveal the extent to which the testing factors and their interaction can affect the PCR amplification, and thus make the analytic result more objective and accurate. While, further research of the judgmental standard to the electrophoretogram of PCR amplification products is still needed to improve both the facility of the method and the reliability of experimental data.

Key words: *Taxus yunnanensis*; SSR-anchored PCR; Reaction system; Orthogonal design involving interaction

收稿日期: 2007-05-16

基金项目: 科技部科研院所公益研究专项项目“濒危植物云南红豆杉的资源及保护技术研究”(2004D B3J104)和国家科技支撑项目“特种工业原料林培育技术”(2006BAD18B03)的部分研究内容

作者简介: 缪迎春 (1972—), 女, 云南通海县人, 硕士, 助理研究员。

*通讯作者

简并锚定微卫星-PCR (Simple Sequence Repeat-anchored PCR by degenerate primer) 亦称 SSR-anchored PCR^[1]是简单重复序列区间 (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) 标记技术的 3 种方式之一^[2~4],其基本原理是在不同简单重复序列的 5 或 3 端锚定数个简并碱基形成单一引物,对两个相距较近,方向相反的微卫星 (Simple Sequence Repeat, SSR)及两 SSR 序列间的 DNA 序列进行扩增^[1]。由于简并锚定微卫星-PCR 具有特异性高、重复性强,可防止引物与 DNA 模板结合时发生滑动,避免扩增产物电泳时涂布现象发生^[5]等优点,从而保证了 PCR 扩增产物基因组中相应 SSR 位点的实际长度。目前,简并锚定微卫星-PCR 技术现已广泛用于品种鉴定^[3~6]、遗传作图^[7~8]、基因定位^[9]、分类、进化及遗传多样性^[10]等方面的研究。另一方面,简并锚定微卫星-PCR 技术是 SSR 引物研发方法中较快捷有效、经济实用的方法^[2,11],在适宜的 PCR 扩增体系下,能在一次 PCR 产物中找到基因组中 2 个以上位点的不同组分微卫星,而且扩增每一个位点微卫星只需合成一个引物,从而降低了寻找基因组中微卫星及开发相应引物的费用。

云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu) 因富含抗癌物质紫杉醇、分布广、资源相对丰富而成为我国紫杉醇生产的主要树种^[12]。20 世纪 80 年代以来,云南红豆杉的保护倍受重视,保护级别不断攀升,分别于 1986 年、1993 年和 1999 年被列为云南省二级保护植物、林业部二级保护植物和国家一级保护植物。云南红豆杉遗传多样性的研究也随之受到重视,但仅见等位酶和同功酶水平的研究^[13,14],DNA 水平的遗传多样性研究亟待加强。鉴于此,本文采用交互正交试验设计方法建立和优化云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR 反应体系,以期为开展分子水平的遗传多样性研究和开发 SSR 引物奠定基础,促进云南红豆杉保护遗传学研究的深入进行。

1 材料与方法

1.1 材料来源

云南红豆杉叶片于 2005 年 5 月采自云南省大理州鹤庆县,采用硅胶低温 (-20℃) 保存,提取 DNA 作为简并锚定微卫星-PCR 反应体系的模板。

简并锚定微卫星-PCR 试验所用的 Taq 酶、

dNTP、 Mg^{2+} 均购自上海申能博彩生物科技有限公司,经初步筛选的 5 简并锚定引物 5'-NNVRVRV(CT)₆-3' 作为本研究的固定引物。

1.2 总 DNA 的提取与浓度测定

采用 CTAB 微量法^[15]用经硅胶低温干燥的嫩叶片提取基因组 DNA,用 Beckman DU800 核酸蛋白质分析仪测定总 DNA 浓度,根据 PCR 反应体系的需要稀释至 $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.3 PCR 反应正交设计与扩增程序

1.3.1 正交设计 简并锚定微卫星-PCR 是由简并碱基和某一重复序列两部分组成的单一引物所进行的 PCR 标记,反应条件主要受 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、DNA 和 Primer 的影响^[16],故选其作为试验因素,分别以 A、B、C、D、E 代表,并通过预备试验确定实验因素浓度范围。本研究设计的试验因素及其水平如表 1 所示。由于 Taq 酶和 Mg^{2+} 、 Mg^{2+} 和 dNTP 之间可能存在着交互作用^[17,18],所以选用 $L_{64}(4^{21})$ 表进行有交互作用的正交试验设计,试验共 64 个处理,2 次重复。

表 1 PCR 反应的因素与水平

水平	PCR 反应因素				
	Taq 酶 (A)	Mg^{2+} (B)	dNTP (C)	DNA (D)	Primer (E)
1	1.5	1.5	0.2	60	0.3
2	2.0	2.0	0.3	75	0.7
3	3.0	3.0	0.4	90	0.8
4	4.0	4.0	0.5	105	1.0

注: Taq 酶的单位为 $\text{U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$; Mg^{2+} 和 dNTP 的为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; DNA 的为 $\text{ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$; Primer 的为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3.2 PCR 扩增程序 20 μL 反应体系在 MJ-PTC 200 DNA 扩增仪上扩增,初步反应程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 1 min, 50 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 延伸 10 min; 4 保存。PCR 扩增产物通过 1.5% 琼脂糖电泳,采用 UVP GDS-8000 凝胶成像系统拍照分析。

1.4 优化体系的建立

1.4.1 优化组合筛选 参照文献 [19, 20] 的方法和标准对 PCR 扩增图谱进行评分,主要以图谱中主带的多少、清晰度、重复性对各处理扩增结果记分。条带数量丰富、清晰度高和背景低的最佳产物记为 33 分,与此相反,最差的记为 0 分,分值范围 0~33,然后通过直观分析、方差分析筛选试验因素的最优反应组合水平。

1.4.2 退火温度确定 选用正交试验结果分析、

选定的最优反应组合,用 MJ-PTC 200 DNA 扩增仪自动生成在 46~66 间的 12 个温度进行 PCR 扩增。通过电泳图谱的直观比较筛选出引物 5'-NNVRVRV(CT)₆-3' 的最佳退火温度,组成优化反应体系。本试验设置的 12 个温度为 46.0、46.5、47.7、49.2、51.5、54.4、57.8、61.7、62.8、64.4、65.6、66.0。

1.4.3 稳定性检验 采用各因素最优反应水平组合和最佳退火温度进行同一个模板、同一条引物、不同批次的 7 次重复实验,以验证 PCR 优化反应体系的稳定性和可靠性。

1.5 数据分析

采用 SAS 9.0 软件对 2 次重复的评分结果进行方差分析,确定影响反应的关键因素、具显著交互作用的因素及其最佳反应水平组合。

2 结果与分析

2.1 交互正交试验结果与分析

2.1.1 电泳结果及其评分的直观分析 按照交互正交设计 $L_{64}(4^1)$ 进行 64 组 PCR 扩增,将扩增产物通过 1.5% 的琼脂糖电泳。2 次扩增试验产物的电泳图谱见图 1。

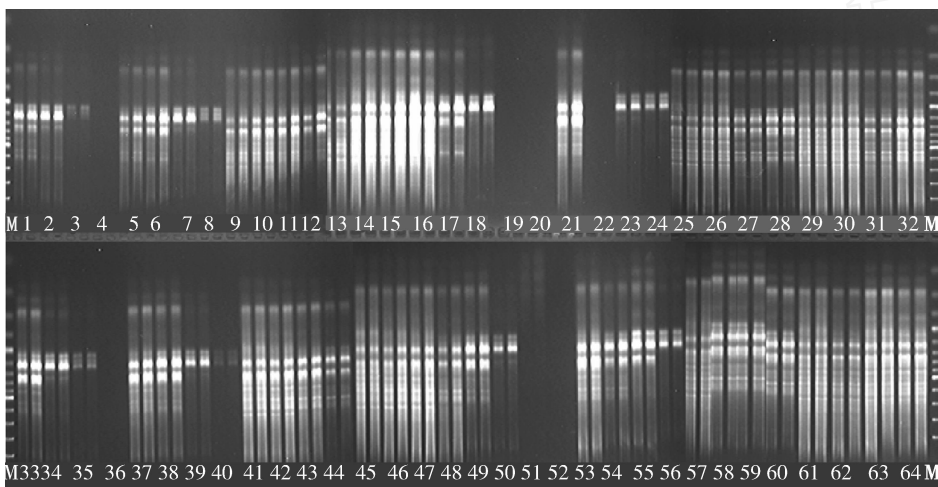


图 1 64 个处理的 PCR 产物电泳图谱

注:M 为标准分量 SM0321,1~64 为试验处理号。

根据打分结果计算不同因素各水平电泳评分平均值和极差(表 2)。

表 2 不同因素与水平的电泳评分平均值和极差

水平	Taq 酶(A)	Mg ²⁺ (B)	dNTP(C)	DNA(D)	Primer(E)
1	13.59	10.88	16.47	12.59	11.63
2	9.16	19.78	11.78	13.41	12.75
3	15.94	12.09	12.53	12.50	12.78
4	11.69	7.63	9.59	11.88	13.22
极差	6.78	12.16	6.88	1.53	1.59

表 2 表明,极差的大小顺序为: Mg²⁺ > dNTP > Taq 酶 > Primer > DNA。因此,可以判断 Mg²⁺ 的影响最大,是反应体系中的关键因子; dNTP 的影响次之,居第 2 位; Taq 酶的影响居第 3 位; DNA 和 Primer 的极差都很小,约为 Mg²⁺ 极差的 1/10,它们对 PCR 扩增的影响也很小。各因素最高平均值对应的水平组合 A3B2C1D2E4 即为直观分析初步筛选的最优组合,但是,该组合没有考虑交互作用,不能准

确反映各因素的作用。因此,需要分析因素间的交互作用及其影响才能确定最优组合,故下面将进一步进行方差分析。

2.1.2 电泳评分结果的方差分析 电泳结果评分值的方差分析表明, Taq 酶、Mg²⁺ 和 dNTP 各水平的差异达极显著水平 ($p=0.01$), DNA 和 Primer 的 F 值仅 0.70 和 0.82, 差异均不显著 ($p=0.05$)。为提高假设检验的灵敏度,将 DNA 和 Primer 的方差合并入误差项^[21]得到方差分析表(表 3)。

由表 3 可知, Taq 酶、Mg²⁺、dNTP、Taq 酶 \times Mg²⁺ 和 Mg²⁺ \times dNTP 的 F 值大小顺序为 Mg²⁺ > Mg²⁺ \times dNTP > Taq 酶 > dNTP > Taq 酶 \times Mg²⁺, 并且 Mg²⁺ 与 Taq 酶、dNTP 的交互作用达极显著水平 ($p=0.01$)。因此,应根据 Mg²⁺ 与 dNTP 的交互作用选定 Mg²⁺ 与 dNTP 的浓度,然后根据选定的 Mg²⁺ 浓度与 Taq 酶交互作用确定 Taq 酶浓度,再根据与 DNA 和 Primer 最大平均值对应的水平数确定其浓度,从而筛选出

PCR 反应各因素的最优组合。

表 3 PCR 反应中各因素的方差分析

变异来源	自由度	方差	均方	F 值
Taq 酶	3	794.19	264.73	14.85**
Mg ²⁺	3	2545.69	848.56	47.59**
dNTP	3	789.75	263.25	14.76**
Taq 酶 × Mg ²⁺	9	780.00	86.67	4.86**
Mg ²⁺ × dNTP	9	3422.19	380.24	21.33**
误差	100	1783.06	17.83	

注: **表示在 0.01 水平上差异极显著。

表 4 为 Mg²⁺ 与 Taq 酶、dNTP 的交互作用下的电泳结果评分平均值。由表 4 可知,在 Mg²⁺ 浓度取 2 水平, dNTP 浓度取 3 水平时,电泳评分平均值最高,达 26.38;在 Mg²⁺ 取 2 水平的条件下, Taq 酶浓度取 4 水平时,电泳评分的平均值最高,达 23.00。从表 2 可知, DNA 浓度为 2 水平时,电泳评分平均值最高达 13.41; Primer 浓度取 4 水平时,电泳评分平均值最大,达 13.22。因此,云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR 反应体系的最适条件应为 A4B2C3D2E4,即 Taq 酶浓度为 4 U · (20 μL)⁻¹, Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol · L⁻¹, dNTP 浓度为 0.4 mmol · L⁻¹, DNA 浓度为 75 ng · (20 μL)⁻¹, Primer 浓度为 1.0 μmol · L⁻¹。该组合 (A4B2C3D2E4) 为 55 号处理,与直观分析得出的结果 (A3B2C1D2E4) 并不一致,其原因是直观分析忽略了因素间的交互作用。图 1 表明,55 号处理的 PCR 扩增产物的电泳效果最好,得分值也最高。可见,考虑交互作用分析得出的结果能客观地反映试验结果,忽视因素间的交互作用会导致分析结果产生偏差。据此,初步确定 55 号处理为反应的优化组合。

表 4 Mg²⁺ 与 Taq 酶、dNTP 交互作用下的电泳评分平均值

Mg ²⁺ 水平	Taq 酶				dNTP			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	9.38	10.38	13.25	10.50	24.75	13.50	4.25	1.00
2	20.88	15.00	20.25	23.00	23.25	18.75	26.38	10.75
3	15.13	6.00	20.25	7.00	9.75	10.00	13.63	15.00
4	9.00	5.25	10.00	6.25	8.13	4.88	5.88	11.63

2.2 PCR 扩增退火温度的确定

退火温度的高低直接影响引物与 DNA 的特异性结合。根据方差分析优选出的 55 号 PCR 扩增体系 (A4B2C3D2E4) 进行退火温度的筛选试验。在 MJ-PTC 200 DNA 扩增仪自动生成 12 个温度 (最小设置为 46 °C, 最大设置为 66 °C), PCR 结果用 1.5%

琼脂糖电泳检测。

图 2 表明,54 °C 下的 PCR 反应结果不仅主带清晰,而且特异性高,是反应的最佳退火温度。退火温度过低时 (46 ~ 49 °C),非特异性扩增多,特异性扩增 (主带) 不明显和发生缺失;而在退火温度过高时 (62 ~ 66 °C),则扩增不出任何条带。

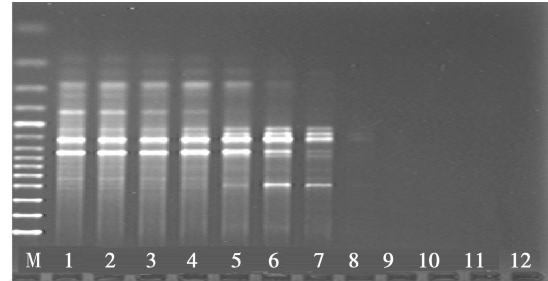


图 2 不同退火温度 PCR 产物电泳图谱

注: 1~12 分别代表退火温度 46.0、46.5、47.7、49.2、51.5、54.4、57.8、61.7、62.8、64.4、65.6、66.0 °C; M 为标准分量 SM0321。

2.3 稳定性验证和最优 PCR 体系确定

采用 55 号处理 (A4B2C3D2E4) 的最优组合在 54 °C 退火温度下重复试验 7 次检验 PCR 扩增产物的稳定性,图 3 为 PCR 扩增产物电泳图谱。

图 3 表明,7 次重复试验的电泳图谱基本一致,每次试验电泳图谱的主带明显,清晰度高,具有很好的重复性和稳定性。在后续实验中,采用该优化体系,利用简并引物 5'-NNVRVRV (CT)₆-3' 成功地找到 32 个云南红豆杉微卫星;所以,最终确定 55 号处理 (A4B2C3D2E4) 和 54 °C 退火温度为云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR 反应的优化体系。

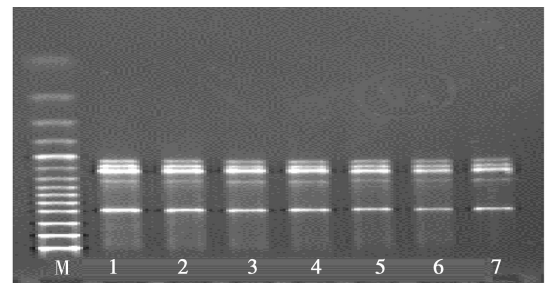


图 3 优化体系的稳定性试验

注: 1~7 代表 A4B2C3D2E4 处理 54 °C 退火温度下的 7 次重复试验, M 为标准分量 SM0321。

3 结论与讨论

(1) 本研究首次利用交互正交设计方法筛选出云南红豆杉简并锚定微卫星-PCR 优化反应体系: 在 20 μL 反应体系中含有 1 × PCR buffer, Taq 酶 4 U,

Mg^{2+} 2.0 mmol · L⁻¹、dNTP 0.4 mmol · L⁻¹, DNA 75 ng, Primer 1.0 μmol · L⁻¹, 退火温度 54 °C。验证表明,优化体系的重复性好,主带清晰、稳定,而且在云南红豆杉的 SSR 引物开发方面具有一定的价值。

(2) 正交设计具有均衡分散、综合可比、效应明确特性,能迅速找出最优水平组合^[21]。它在 PCR 反应体系优化中应用较广泛,但以往类似研究的试验设计未考虑交互作用,判断各因素及其交互作用的主观性很大^[16, 20, 22],对结果的阐述比较模糊、随意。本研究中, Taq 酶和 Mg^{2+} 、 Mg^{2+} 和 dNTP 的交互作用对 PCR 扩增的影响显著,而且 Mg^{2+} 和 dNTP 交互的 F 值较大,所以出现了考虑交互作用和不考虑交互作用所得最优组合不一致的现象。可见,在 PCR 反应体系优化试验设计、分析中不能忽略因素间的交互作用,否则会降低试验的可靠性和对结果解释的客观性。综上所述,交互正交设计既能够快捷、有效地筛选出最佳的 PCR 反应体系,又能揭示各因素及其交互作用对 PCR 扩增的影响程度,分析结果也更客观、准确,因而具有一定的应用价值。然而,该方法对 PCR 扩增效果的评判仍具有一定的主观性,应就其评判标准进行深入研究,以提高方法的易操作性和分析结果的可信度。

(3) Mg^{2+} 和 dNTP、 Mg^{2+} 和 Taq 酶的交互作用主要体现在二方面。一方面, Mg^{2+} 能与 dNTP 分子中的磷酸基团定量地结合,使实际反应中的 dNTP 减少;另一方面, Taq 酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,需要一定浓度的 Mg^{2+} 来激活。因此, Mg^{2+} 、dNTP 和 Taq 酶三因素浓度相互联系,相互制约,它们之间浓度过高或过低都会导致目的产物的减少,其中 Mg^{2+} 的浓度最为关键。

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 (2): 176 ~ 183
- [2] Fisher P J, Gardner R C, Richardson T E. Single locus microsatellite isolated using 5'-anchored PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24 (21): 4369 ~ 4371
- [3] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780 ~ 792
- [4] Lian C L, Zhou Z H, Hogetsu T Z. A Simple Method for Developing Microsatellite Markers using Amplified Fragments of Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) [J]. *J Plant Res*, 2001, 114: 381 ~ 385
- [5] Weising K, Atkinson R G, Gardner R C. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation [J]. *PCR Methods Appl*, 1995, 4 (5): 249 ~ 255
- [6] Culley T M, Wolfe A D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers [J]. *Heredity*, 2001, 86: 545 ~ 556
- [7] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kephart S R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7 (9): 1107 ~ 1125
- [8] 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
- [9] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 348 ~ 353
- [10] 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
- [11] Vander Nest M A, Steenkamp E T, Wingfield B D, et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Plant breeding*, 2000, 119: 433 ~ 436
- [12] 苏建荣, 张志钧, 邓疆. 不同树龄、不同地理种源云南红豆杉紫杉醇含量变化的研究 [J]. *林业科学研究*, 2005, 18 (4): 369 ~ 374
- [13] 陈少瑜, 吴丽圆, 李江文. 云南红豆杉天然种群遗传多样性研究 [J]. *林业科学*, 2001, 37 (5): 41 ~ 48
- [14] 吴丽圆, 陈少瑜, 项伟. 云南红豆杉天然群体内同工酶遗传变异的研究 [J]. *遗传*, 2001, 23 (3): 237 ~ 242
- [15] 王关林, 方宏简. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1998
- [16] 王佳, 梁国华, 缪旻珉, 等. 正交设计优化黄瓜 ISSR 体系 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4 (3): 439 ~ 442
- [17] 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*, 2004, 43 (3): 80 ~ 84
- [18] 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
- [19] 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
- [20] 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
- [21] 李松岗. 实用生物统计 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2002
- [22] 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 (3): 445 ~ 450