

构树 ISSR 反应体系的优化与建立

廖声熙¹, 崔凯^{1*}, 张鹏^{1,2}, 王海英¹, 崔永忠¹, 袁首乾^{1,2}

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学资源学院, 云南昆明 650224)

摘要:利用正交试验对 Taq 酶浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg²⁺ 浓度和模板 DNA 浓度 5 个因素进行优化, 从而建立了一套适宜构树的 ISSR-PCR 反应体系。在 20 μL 的反应体系中, 各反应物的最适宜含量为: 0.07 U · μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶、0.35 μmol · L⁻¹ ISSR 引物、0.3 mmol · L⁻¹ dNTPs、2.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺、1.2 ng · μL⁻¹ 模板 DNA。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 46 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 40 个循环。

关键词: 构树; ISSR; PCR 反应体系; 正交试验优化

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Establishment and Optimization of ISSR Reaction System of *Broussonetia papyrifera*

LIAO Sheng-xi¹, CUI Kai¹, ZHANG Peng^{1,2}, WANG Hai-ying¹, CUI Yong-zhong¹, YUAN Shou-qian^{1,2}

(1. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Faculty of Natural Resources, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The effects of five factors, such as the concentration of Taq DNA polymerase, primers, dNTPs, Mg²⁺ and DNA template, on ISSR-PCR reaction were optimized by orthogonal tests. Thus a suitable ISSR-PCR reaction system for *Broussonetia papyrifera* was established. The optimized ISSR-PCR system for *B. papyrifera* in 20 μL reaction mixture contained 0.07 U · μL⁻¹ Taq DNA polymerase, 0.35 μmol · L⁻¹ ISSR primers, 0.3 mmol · L⁻¹ dNTPs, 2.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺ and 1.2 ng · μL⁻¹ DNA template. The suitable PCR protocol is preliminary denaturation at 94 °C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, anneal at 46 °C for 45 s, extended at 72 °C for 2 min. This study could provide some references for the genetic diversity analysis of *B. papyrifera*.

Key words: *Broussonetia papyrifera*; ISSR; PCR reaction system; optimization by orthogonal tests

构树 (*Broussonetia papyrifera* L.) 为桑科 (Moraceae) 落叶乔木, 俗称谷树或壳树, 我国构树资源丰富, 广泛分布于西北、华北、华南、东南和西南地区, 在中亚至印度、缅甸、老挝、泰国、马来西亚、越南、朝鲜、日本也有分布。其树皮为制布、造纸的长纤维优质原料, 其叶可为饲料, 构树的叶、枝、皮、根皮、果实和乳液有重要的药用价值^[1-3]; 同时, 由于构树的抗

逆性极强, 故其在厂矿中常被利用为绿化抗污树种进行栽植^[4]。

构树资源在中国分布广泛, 对于一些天然分布的构树群体, 人们对其遗传背景知之甚少, 这严重限制了它的推广应用; 因此, 如何提高构树的资源利用率, 挖掘有价值的种质资源材料已成为当今构树发展亟待解决的重要问题。简单序列重复区间 (inter-

收稿日期: 2012-08-10

基金项目: 国家自然科学基金“西南干热河谷野生构树种质评价与分子鉴定研究(30972383)”; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(RIRICAF201007M)

作者简介: 廖声熙(1971—), 男, 贵州黎平人, 副研究员, 主要从事森林培育、森林经营方面研究。

* 通讯作者: E-mail: cafcuikai@163.com.

simple sequence repeat ISSR) 标记是于 1994 年创建的一种基于微卫星 (simple sequence repeat SSR) 序列发展起来的^[5]、利用 PCR 扩增进行检测的、十分有效的分子标记, 该种分子标记的优点是: 在基因组上, 只有与锚定的核苷酸匹配的那些位点才能被靶定, 从而导致位于反向排列的间隔不太大的重复序列间的基因组节段得到扩增, 避免了引物在基因组上的滑动, 可以提高 PCR 扩增反应的专一性。该技术克服了 RFLP 技术费用昂贵和采用同位素标记的局限性, 以及 RAPD 的假阳性, 可以有效地应用于基因多态性分析, 是目前广泛应用的一种新型基因标记^[6-7]。ISSR 是基于 PCR 的一种分子标记技术, 其扩增结果容易受 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 等浓度的影响。为了获得稳定可靠的试验结果, 减少实验的盲目性, 需要对这些因素进行优化。因此, 本研究采用正交试验设计对以上 5 个因素进行筛选, 初步建立了一套适用于构树的 ISSR 反应体系, 为构树的种质创新与分子辅助育种奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样本来源及样本采集方式: 构树叶片采集于云南省红河州石屏县的天然群体 (23°39'11" N, 102°37'15" E), 共采集样本 30 份。由于构树为风媒植物, 为保证样本的代表性, 故采集样本的间隔距离大于 50 m。构树嫩叶 DNA 含量较高, 但色素含量较多, 杂质较多, 影响琼脂糖凝胶电泳效果; 而老叶 DNA 含量低, 不易抽提基因组 DNA。因此, 需采集大小合适, 色素含量较少的较成熟叶片进行试验。采集鲜叶片过后, 使用无水变色硅胶装袋, 干燥 1 个月左右再取用。PCR 反应所用 Taq 酶、10 × Buffer、dNTP 等药品来源于天根生化科技 (北京) 有限公司, ISSR 引物由上海生工合成, 实验中所用的 PCR 仪为 BioRAD 公司生产的 C1000 Thermal Cycler, 凝胶成像系统为 Gene Company Limited 公司的 G: BOX HR。

1.2 基因组总 DNA 提取

参照 Dellaporta 等^[8]的方法, 有改动, 用 CTAB 法制备基因组 DNA, 进行了一定的改进。具体操作如下: 在 1 mL CTAB 抽提液 (质量浓度 $\rho = 2.0\%$ CTAB、0.1 mol · L⁻¹ TrisCl (pH 值 8.0)、20 mmol · L⁻¹ EDTA (pH 值 8.0)、1.4 mol · L⁻¹ NaCl) 中加入 β

- 巯基乙醇, 使其终体积分数达 2%, 将经无水硅胶干燥处理过的叶片, 取出 0.04 g, 倒入已用无水乙醇消毒过的研钵中, 研钵中应先加入 0.03 g PVP, 以去除色素。迅速倒入液氮把叶片磨成细粉末后, 加入双蒸水 1 mL, 迅速转入到 2 mL 离心管中, 摇匀, 使用离心机 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 以洗去色素, 将水倒掉后, 用搅拌的方法将沉淀打散, 再马上加入 1 mL 的 CTAB 溶液置入 65 °C 温育 45 min, 每 10 min 轻摇 1 次, 然后置于离心机中 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 用等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提裂解液, 颠倒 5 min 使之充分混合, 放置于 4 °C, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上相; 再加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提裂解液, 颠倒 5 min 使之充分混合, 于 4 °C, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上相; 加入 2 倍体积的异丙醇, 充分混匀, 于 4 °C, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 用 100% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 于 4 °C, 8 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 去上清, 晾干沉淀; 加入 5 μ L 的 TE (pH 值 8.0) 溶解沉淀, 于 -20 °C 保存。DNA 浓度和纯度用紫外分光光度计测定。

1.3 PCR 正交试验设计

采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ ^[9], 针对 ISSR-PCR 反应体系中的 5 个因素 (包括引物、dNTPs、Taq 酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA) 分别安排 4 个水平进行筛选 (表 1), 设计方案见表 2, 以构树基因组 DNA 为模板, 引物采用加拿大英属哥伦比亚大学报道的 (GT)₆CC。正交表中的每个处理各 3 次重复。

表 1 正交试验因素水平

因素	水平			
	1	2	3	4
引物/(μ mol · L ⁻¹)	0.15	0.25	0.35	0.45
dNTPs/(mmol · L ⁻¹)	0.15	0.20	0.25	0.30
Taq 酶/(U · μ L ⁻¹)	0.05	0.07	0.09	0.11
Mg^{2+} /(mmol · L ⁻¹)	1.5	2.0	2.5	3.0
模板 DNA/(ng · μ L ⁻¹)	1.2	2.4	4.8	9.6

1.4 PCR 扩增、电泳以及凝胶成像

PCR 预扩增的程序设置为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 46.0 °C 45 s, 72 °C 2 min, 40 个循环。扩增完成后 4 °C 保存。将 PCR 扩增产物在用 1 × TBE 配制的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离。在 80 V 的恒流下电泳 90 min。电泳结束后把凝胶置于 EB 溶液中 10 min, 最后在凝胶成像系统中观察记录扩增产物的泳带, 并保存图像。

表2 ISSR-PCR 反应正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

处理	引物/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Taq 酶/ ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	0.15	0.15	0.05	1.5	1.2
2	0.15	0.20	0.07	2.0	2.4
3	0.15	0.25	0.09	2.5	4.8
4	0.15	0.30	0.11	3.0	9.6
5	0.25	0.15	0.07	2.5	9.6
6	0.25	0.20	0.05	3.0	4.8
7	0.25	0.25	0.11	1.5	2.4
8	0.25	0.30	0.09	2.0	1.2
9	0.35	0.15	0.09	3.0	2.4
10	0.35	0.20	0.11	2.5	1.2
11	0.35	0.25	0.05	2.0	9.6
12	0.35	0.30	0.07	1.5	4.8
13	0.45	0.15	0.11	2.0	4.8
14	0.45	0.20	0.09	1.5	9.6
15	0.45	0.25	0.07	3.0	1.2
16	0.45	0.30	0.05	2.5	2.4

1.5 退火温度的优化

依据正交设计的结果,筛选出最优的反应体系,然后在此基础上对退火温度进行梯度试验,设置46.0、46.5、47.5、48.0、48.5、49.0、49.5℃7个温度梯度。每个梯度进行3次重复。循环次数依据之前的经验,设定在40次。

2 结果与分析

2.1 PCR 正交试验直观分析

参照何正文等^[10]和桂腾琴等^[11]的方法,依据胶图条带的强弱和杂带的多少对PCR扩增结果依次打分。对数量多、清晰的条带满分定为10分,最低分定为1分。根据打分情况求出每个因素同一水平下的试验值之和 K_i 以及每一因素水平下的数据平均值 k_i ,并求出同一因素不同水平间平均值的极差 R (表3)。极差 R 反映了各个因素对反应体系的影响,极差越大,表明其对体系的影响越大。由表3可知:各因素不同水平的变化对构树PCR反应的影响从大到小依次为:引物、 Mg^{2+} 、Taq酶、dNTPs和模板DNA的浓度变化。 k_i 值反映了每个因素不同水平对反应体系的影响程度,该值越大标志这个水平在该因素中最好。从而可以看出,引物的第三水平、dNTPs的第四水平、Taq酶的第二水平、 Mg^{2+} 的第二水平、模板DNA的第一水平是各个因素中的最佳水平。

表3 正交设计直观分析

处理均值	引物/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Taq 酶/ ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
K1	22.0	25.6	32.5	13.6	24.1
K2	34.5	28.1	36.2	29.2	35.9
K3	41.1	31.3	25.1	17.3	31.5
K4	26.3	35.6	23.7	21.5	33.3
k1	3.3	8.4	6.4	2.2	8.8
k2	8.6	9.8	9.5	10.3	7.4
k3	12.4	10.4	4.3	3.5	7.1
k4	6.3	12.7	3.1	4.1	6.2
R	9.1	4.3	6.4	8.1	2.2

表4 正交设计方差分析

变异来源	平方和(SS)	自由度(DF)	方差(MS)	F值
引物	81.02	3	27.00	14.06**
dNTPs	27.48	3	9.16	4.77*
Taq酶	35.76	3	11.92	6.21**
Mg^{2+}	47.09	3	15.70	8.18**
模板DNA	2.45	3	0.82	0.43
误差	5.75	3	1.92	
总计	199.55	15		

注: *表示在0.05水平差异显著; **表示在0.01水平差异极显著。 $F_{0.05}(3,15) = 3.29$; $F_{0.01}(3,15) = 5.42$

2.2 PCR 正交试验的方差分析

进一步对各个因素进行方差分析(表4),发现引物、Taq酶和 Mg^{2+} 3个因素对反应体系的影响达到极显著水平($P < 0.01$),dNTPs对反应体系的影响达到显著水平($P < 0.05$),而模板DNA对体系影响不显著。

2.3 5个因素对PCR反应体系的影响

从图1A~E可以看出:引物浓度范围从0.15~0.45 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数呈单峰曲线变化,浓度为0.35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数达到最多;dNTPs的浓度设置在0.15~0.30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数呈上升趋势,浓度为0.30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数达到38条;Taq酶浓度为0.05~0.11 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数也呈现单峰曲线变化,峰值出现在0.07 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; Mg^{2+} 的4个浓度梯度变化趋势同Taq酶相似,其中2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果最佳;当模板DNA浓度设在1.2~9.6 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,扩增条带数随着模板浓度的升高而降低。另外,通过温度梯度筛选,笔者发现退火温度设定在48.5℃时,扩增的条带较多,而且背景比较清晰。采用优化好的体系对红河群体12个个体进行了尝试,发现效果较好(图2)。

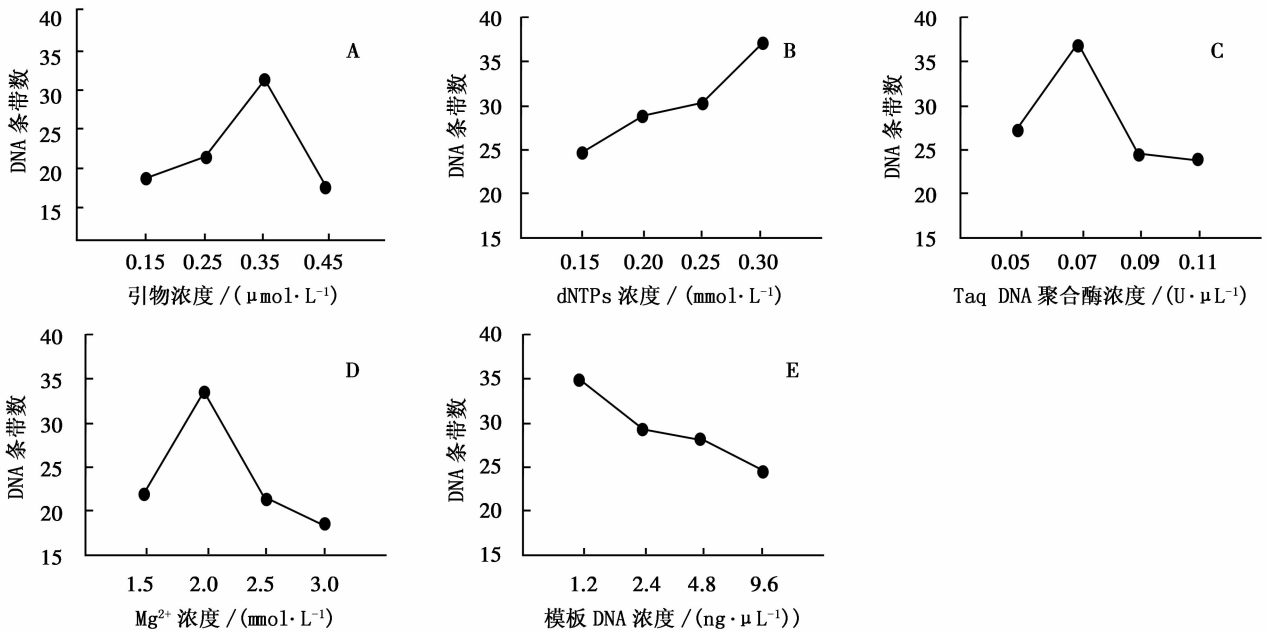


图1 不同因素水平对 ISSR-PCR 的影响

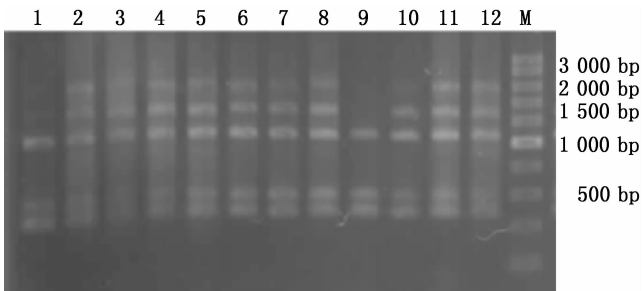


图2 优化体系对构树样品的扩增结果(以红河群体为例)

3 结论与讨论

引物浓度会对 PCR 的条带数、带型产生明显的影响,浓度过低不能扩增,浓度太高产生新的位点,且形成引物二聚体几率增大^[12],同时对背景有一定的影响^[13]。本研究中对引物浓度设置了 0.15 ~ 0.45 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度,发现浓度为 0.35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增片段数达到最多。 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度不仅影响 Taq 酶的活性,还在反应液中相互制约,且与反应液中的模板 DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[14-16]。 Mg^{2+} 设置为 1.5 ~ 3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度时,扩增片段数呈单峰曲线变化趋势,2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度为最适宜。本研究中对 dNTPs 设置的 4 个浓度梯度当中,随着浓度增高,扩增片段数呈增加趋势。PCR 是 DNA 的体外扩增,是通过 DNA 聚合酶的催

化反应来完成,Taq 酶的浓度变化是 PCR 反应中的关键因素,酶用量过高不仅增加成本,还会造成非特异扩增,过低则会降低产物结合效率^[13]。本研究针对 Taq 酶从 0.05 ~ 0.11 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 设置了 4 个浓度梯度,当浓度为 0.07 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时扩增效果最好,然后随着浓度增加扩增片段数反而下降。以上研究为下一步构树遗传多样性分析奠定了基础。

ISSR 标记技术采用的是简单重复序列为引物,通过 PCR 扩增获得实验结果,因此,保证其扩增的重复性非常重要,本实验采用的引物(GT)₆CC 是通过前期预实验大量筛选而确定的,对不同的处理采用 3 个重复,重复性比较好。在前人的报道中,发现不同物种模板 DNA 浓度对体系的影响程度不同。如王瑜等^[17]对紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) ISSR-PCR 反应体系优化过程中发现,体系对于模板浓度非常敏感;而桂腾琴等^[11]对果梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.),以及周凌瑜等^[13]对小苍兰(*Freesia refracta* Klatt.)的 ISSR-PCR 体系优化中发现,模板浓度对反应体系影响不显著,这和本研究得出的结论一致。另外,本研究是在(GT)₆CC 这一条引物基础上对整个体系进行优化,随后在后期实验中会进一步扩大引物筛选范围,以增加该反应体系的通用性。基于笔者之前实验操作中的经验,除了退火温度,不同引物的最优扩增条件基本相似;因此,选用其他引物时,应重点考虑筛选退火温度。

参考文献:

- [1] 张秀实, 吴征镒, 曹子余. 中国植物志—第二十三卷第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 23 - 26
- [2] 吴征镒, 路安明, 汤彦承, 等. 中国被子植物科属综论 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 560 - 563
- [3] 吴征镒, 孙 航, 周浙昆, 等. 中国种子植物区系地理 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 163
- [4] 郑汉臣, 黄宝康, 秦路平, 等. 构树属植物的分布及其生物学特性 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 21(6): 11 - 13
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176 - 183
- [6] 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
- [7] 胡志昂, 王洪新. 分子生态学研究进展 [J]. 生态学报, 1998, 18(6): 565 - 573
- [8] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: preparation II [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1(4): 19 - 21
- [9] 董如何, 肖必华, 方永永. 正交试验设计的理论分析方法及应用 [J]. 安徽建筑工业学院学报: 自然科学版, 2004, 12(6): 103 - 106
- [10] 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
- [11] 桂腾琴, 孙 敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系 [J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108 - 112
- [12] 邹喻萍, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [13] 周凌瑜, 吴晨炜, 唐东芹, 等. 利用正交设计优化小苍兰 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 植物研究, 2008, 28(4): 402 - 407
- [14] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 306 - 308
- [15] 高 丽, 杨 波. 春 兰. ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(3): 305 - 309
- [16] 李文表, 周先叶, 李 勇, 等. 棕榈 ISSR-PCR 反应条件的筛选与优化 [J]. 广西植物, 2006, 26(2): 204 - 208
- [17] 王 瑜, 袁庆华. 紫花苜蓿 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化 [J]. 草地学报, 2007, 15(3): 212 - 215