

## 濒危植物长叶榧 ISSR-PCR 反应体系的建立

金则新, 李钧敏

(台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

**摘要:**以国家 2 级保护植物长叶榧为材料,对 ISSR 反应体系中的各个主要影响因子进行了优化筛选,建立了长叶榧 ISSR-PCR 的反应体系,其较适宜的扩增条件为:10  $\mu$ L PCR 反应体积,1 $\times$  Taq 酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris  $\cdot$  HCl pH9.0,50 mmol/L KCl,0.1% Triton X-100),1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1U Taq 酶(上海华美公司),10 ng 模板 DNA,6 pmol 引物(上海 Sangon 公司);dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol/L,合适的退火温度为 52.4 $^{\circ}$ C。PCR 反应体系的建立为 ISSR 技术分析长叶榧遗传多样性奠定了良好的基础。

**关键词:**长叶榧; ISSR; PCR 反应体系

**中图分类号:**S722.3      **文献标识码:**A      **文章编号:**1001-7461(2006)05-0094-04

### Establishment of ISSR-PCR Reaction System of Endangered Plant *Torreya jackii*

JIN Ze-xin, LI Jun-min

(Ecology Institute of Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000, China)

**Abstract:** The major factors in the reaction system of ISSR amplification of *Torreya jackii*, a Class II plant species under state protection in China, was optimized and selected. The optimal ISSR reaction system was determined as follows: 1  $\times$  Taq polymerase corresponding buffer (10mmol/L Tris  $\cdot$  HCl pH9.0,50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 6 pmol primer, 0.2 mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP for each in total 10  $\mu$ L reaction volume. The optimal annealing temperature was 52.4 $^{\circ}$ C. All the results established a good foundation for the study on the genetic diversity of *T. jackii*.

**Key words:** *Torreya jackii*; ISSR; PCR reaction system

简单重复序列区间(Inter Simple Sequence Repeat, ISSR),又称为 Inter-SSR,这一分子标记是 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的,类似于 RAPD,但它是利用包含重复序列并在 3' 或 5' 端锚定单寡核苷酸的引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增的标记系统<sup>[1]</sup>。ISSR 引物比随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)的引物长,退火温度更高(50 $^{\circ}$ C 左右),因此 ISSR 具有比 RAPD 更高的可重复性和稳定性<sup>[2,3]</sup>。近年来,应用 ISSR 技术对濒危植物进行遗传多样性研究已有较

多报道<sup>[4]</sup>。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子技术,所以同其他标记一样,其最终结果易受多种因素的干扰,如模板 DNA、Taq 酶、dNTP、引物以及 Mg<sup>2+</sup> 等都能影响扩增的结果,甚至其中一个因子的改变都会导致扩增条带弥散、消失及位置的改变,从而严重影响整个实验结果,因此,在研究时都应先建立起合适的反应体系并对其进行优化<sup>[5]</sup>。

长叶榧(*Torreya jackii*)隶属于红豆杉科(Taxaceae),是中国特有的裸子植物,产于浙江和福建,是第三纪残存的孑遗植物,距今约有 2 亿年的历史。

收稿日期:2005-11-28 修回日期:2006-03-06

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y505331)、浙江省教育厅科研计划项目(20040287)。

作者简介:金则新(1960-),男,浙江临海人,硕士,教授,主要从事植物生态学研究。

长叶榧植株稀少,分布狭窄,并且在研究榧属的分布、古植物区系以及第四纪冰期的气候等方面都有重要的意义,被列为国家2级重点保护植物<sup>[6]</sup>。本文以珍稀濒危植物长叶榧的基因组DNA为模板,探讨ISSR-PCR反应体系中7种因素对扩增的影响,以期获得长叶榧ISSR反应的最佳体系,为长叶榧遗传多样性的分析提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料长叶榧采自福建省邵武市将石自然保护区,取植株的幼嫩叶片置于保鲜袋中,封口,于样品贮藏箱(由超低温冰袋保持冷藏条件)带回实验室,-70℃低温冰箱保存,供DNA提取。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA提取与定量 采用改进的SDS法,按文献<sup>[7]</sup>提取基因组DNA。DNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析,用GIS凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照定量,-20℃保存备用。

1.2.2 原初扩增条件及PCR扩增程序 ISSR引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, Set No. 9, No. 801-900)提供的序列,由上海生物工程公司合成。

原初的扩增反应条件为10 μL PCR反应体积,1×Taq酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl pH9.0,50 mmol/L KCl,0.1% Triton X-100),1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.5U Taq酶(上海华美公司),5 ng模板DNA,12 pmol引物(上海Sangon公司),BSA(Bovine serum albumin,小牛血清白蛋白)2 mg/mL,dATP、dCTP、dGTP、dTTP各0.1 mmol/L。根据引物的*T<sub>m</sub>*值及参考文献,初步确定ISSR-PCR扩增程序:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸1.5 min,共35个循环;72℃完全延伸5 min。

所有反应在美国Thermo公司生产的P×2梯度热循环仪中进行,扩增产物在1.6%的琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL溴化乙锭)中电泳,电泳缓冲液为0.5×TBE,用200 bp DNA ladder做标准分子量参照物,用GIS凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照保存。

1.2.3 退火温度的确定 采用梯度PCR模式,自动设定温度从48℃~63℃,生成的温度梯度为

48.1℃、48.5℃、49.3℃、50.7℃、52.4℃、54.4℃、56.3℃、58.3℃、60.6℃、62.0℃、62.7℃、63.2℃。其余PCR扩增程序同1.2.2,以确定最合适的退火温度。

### 1.2.4 长叶榧ISSR-PCR扩增反应体系的优化

ISSR-PCR扩增反应体系的优化按常规采用单因素试验,共试验了6个因素各3个水平(表1)。其余条件同1.2.2。

表1 ISSR-PCR体系优化的因素与水平

Table 1 The factors and levels used in the optimization of ISSR-PCR reaction system

水平	Mg <sup>2+</sup> 浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	dNTP浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	Taq酶用量 /U	模板DNA浓度 /ng	BSA浓度 /mg·mL <sup>-1</sup>	引物浓度 /pmol
1	1.5	0.1	0.5	5	0	6
2	2.0	0.2	0.8	10	2	12
3	2.5	0.2	1	20	4	18

## 2 结果与分析

### 2.1 退火温度的确定

引物的退火温度对ISSR-PCR的影响非常明显,不同的引物其退火温度亦不相同,因而确定一个合适的退火温度非常重要。首先根据原初的PCR反应条件进行引物的初筛,选择能看到清晰条带的引物UBC 834进行退火温度的测定。本实验从48℃到63℃共15℃的温度间隔里,尝试了不同的退火温度(图1)。在退火温度较低时(48.1℃),扩增条带较弱;随着退火温度升高(48.5℃~52.4℃),扩增条带数目最多,条带亮度最亮,并且随着温度的升高,低分子量和高分子量的条带的清晰度增加;当退火温度进一步升高(54.4℃~56.3℃),虽然扩增条带数目也较多,但条带亮度明显减弱;当退火温度在58.3℃~63.2℃的条件下,随着温度的升高,条带逐渐消失。因此,引物UBC 834在本研究中,最适的退火温度为50.7℃~52.4℃,由于较高的退火温度可以获得更为稳定的扩增条带,因此采用52.4℃为长叶榧的最适退火温度。而根据公式 $T_m=4(G+C)+2(A+T)$ <sup>[8]</sup>计算的退火温度为54℃,在退火温度为54℃时,虽然条带数目也较多,但亮度明显减弱。对于不同的引物,先根据公式计算引物的退火温度,对于具相似退火温度的引物采用52℃进行筛选,选择清晰,不弥散的引物进行下一步研究,而对于退火温度差距较大的,则再次采用梯度PCR去进行退火温

度的筛选。

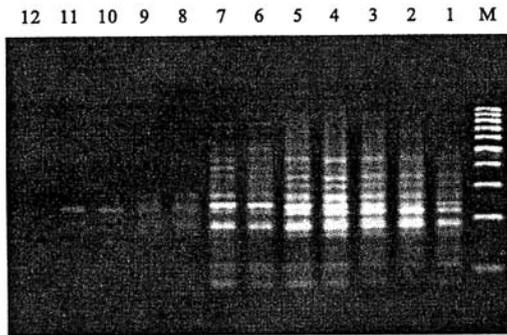


图1 退火温度对长叶榧 ISSR 扩增的影响

Fig. 1 The effect of annealing temperature on *T. jackii* ISSR amplification

M: 200 bp DNA ladder 标准分子量参照物

1~12: 退火温度分别为 48.1°C、48.5°C、49.3°C、50.7°C、52.4°C、54.4°C、56.3°C、58.3°C、60.6°C、62.0°C、62.7°C、63.2°C

## 2.2 $Mg^{2+}$ 浓度对 ISSR 扩增的影响

$Mg^{2+}$  可以通过影响 Taq DNA 聚合酶的活性, 从而影响 PCR 扩增<sup>[8]</sup>。在一定的浓度范围内, 随着  $Mg^{2+}$  浓度的增高, 扩增的特异性减弱, 背景增高。在长叶榧的 ISSR-PCR 扩增中,  $Mg^{2+}$  浓度的变化对 ISSR 条带的数量和强弱影响较大(图 2)。当  $Mg^{2+}$

浓度较低时(1.5 mmol/L)时, 条带清晰可见; 而  $Mg^{2+}$  浓度增加至 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L 时, 条带数目减少, 且背景增高, 可能是由于  $Mg^{2+}$  浓度导致一些非特异性的扩增。因此本研究中, 我们确定  $Mg^{2+}$  浓度的最佳用量为 1.5 mmol/L。

## 2.3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

在 PCR 扩增反应中, dNTP 是 PCR 的原料, 浓度过高会产生错误掺入, 浓度太低导致产率太低, 通常 dNTP 浓度范围在 0.02~0.20 mmol/L 之间<sup>[8]</sup>。本实验对不同浓度 dNTP 进行 PCR 扩增(图 2)。当 dNTP 浓度为 0.1 mmol/L 时, 条带数目较少, 亮度较弱; 随着浓度的升高, 条带数目增多, 亮度增加, 当浓度增加到 0.2 mmol/L 时, 条带数目最多, 清晰度最高, 亮度最大。因此, 确定 dNTP 浓度的最适浓度为 0.2 mmol/L。

## 2.4 Taq 酶单位对 ISSR 扩增的影响

Taq 酶的用量是影响 PCR 的一个重要因素, 浓度过低不能扩增, 浓度太高会产生非特异性扩增。本实验在 10  $\mu$ L 反应体积中, 从 0.5~1 U 分别进行了扩增实验(图 2)。Taq 酶为 0.5 U 时, 条带较弱; 当 Taq 酶浓度增高时, 条带亮度逐渐增加, 当 Taq 酶为 1 U 时, 条带亮度最亮。因此, 本研究认为在 10  $\mu$ L 反应体积中最适的 Taq 酶量为 1 U。

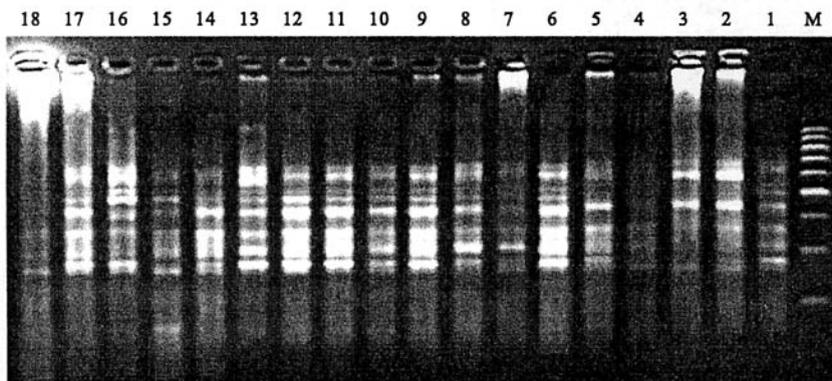


图2 几种因素对长叶榧 ISSR 扩增的影响

Fig. 2 The effect of amplification conditions on *T. jackii* ISSR amplification

M: 200 bp DNA ladder 标准分子量参照物

1~3:  $Mg^{2+}$  浓度分别为 1.5、2.0、2.5 mmol/L; 4~6: dNTP 浓度分别为 0.1、0.15、0.2 mmol/L; 7~9: Taq 酶的用量是 0.5、0.75、1 U; 10~12: 模板 DNA 量分别为 2.5、5、10 ng; 13~15: BSA 浓度为 0、2、4 mg/mL; 16~18: 引物浓度分别为 6、12、18 pmol

## 2.5 模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响

模板 DNA 量的变化对 ISSR 带的数量影响不大,但对条带的强弱影响较大。10  $\mu$ L 反应体积中,当模板 DNA 的量为 5 ng 时,条带亮度较低;当模板 DNA 量扩大到 10 ng 和 20 ng 时,对扩增的影响差异不大,均可获得清晰的条带,亮度较大。因此本研究采用在 10  $\mu$ L 反应体积中最适的模板 DNA 用量为 10 ng。

## 2.6 BSA 用量对 ISSR 扩增的影响

BSA 对于酶活性有一定的促进作用<sup>[9]</sup>,可以降低 ISSR 扩增的背景。但在本研究中,发现添加 BSA 虽然可以降低扩增的背景,但同时条带数目和亮度也明显下降(图 2)。因此在本研究采用不添加 BSA 的方法。

## 2.7 引物浓度对 ISSR 带的影响

在本研究中,引物浓度的变化对 ISSR 带的数量和强弱影响较明显(图 2)。当引物浓度为 6 pmol 时,条带亮度最大;随着引物浓度升高到 12 pmol 和 18 pmol 时,高分子量的条带丢失,而低分子量的条带扩增更为明显,同时条带亮度略有下降。引物浓度过低会使 PCR 扩增条带的强度减弱,而引物浓度过高会造成非特异性的扩增,因此本研究选择每 10  $\mu$ L 反应体积中 6 pmol 引物。

## 3 结论与讨论

扩增条件的变化会对 ISSR 图谱产生较大的影响,从而影响 ISSR 分析的准确性和稳定性,因此为了获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱,对长叶榧进行引物的筛选、ISSR-PCR 扩增条件的优化及不同引物的退火温度的确定,建立了重复性好、分辨

率高的 ISSR-PCR 反应体系。本研究结果显示濒危植物长叶榧的 ISSR 分析较适宜的扩增条件为:10 L PCR 反应体积,1 $\times$ Taq 酶配套缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl pH9.0,50 mmol/L KCl,0.1% Triton X-100),1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 U Taq 酶(上海华美公司),10 ng 模板 DNA,6 pmol 引物(上海 Sangon 公司);dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol/L。最适的退火温度为 52.4 $^{\circ}$ C。以此条件对同一长叶榧植株 DNA 进行 3 次 ISSR 分析,结果可靠,带型稳定。

## 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] 邹喻辛,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.
- [3] Esselman E J, Li J Q, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insperrata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Mol. Ecol., 1999, (8): 443-451.
- [4] 葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等.孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 研究[J].生物多样性,2003, 11(4): 276-287.
- [5] 何桥,梁国鲁,谢江辉.莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用[J].果树学报,2005, 22(2): 186-189.
- [6] 于永福.中国野生植物保护工作的里程碑—国家重点保护野生植物名录(第一批)出台[J].植物杂志,1999, (5): 3-11.
- [7] 李钧敏,柯世省,金则新.濒危植物七子 DNA 的提取及分析[J].广西植物,2002, 22(6): 499-502.
- [8] 卢盛栋.现代分子生物学实验技术(第二版)[M].北京:中国协和医科大学出版社,1999.
- [9] 边才苗,李钧敏,金则新,等.牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用[J].遗传,2002, 24(3): 279-282.