

## 黄皮 ISSR-PCR 反应体系的优化

李开拓<sup>1,2</sup>, 赵依杰<sup>3</sup>, 钟凤林<sup>1,2</sup>, 王江波<sup>1,2</sup>, 施维属<sup>1,2</sup>, 潘东明<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>福建农林大学园艺学院, 福州 350002; <sup>2</sup>福建农林大学园艺产品贮藏保鲜研究所, 福州 350002;

<sup>3</sup>福建省福州市农业科学研究所, 福州 350018)

**摘要:**为应用 ISSR 分子标记对黄皮种质资源、分子标记辅助选择育种及其遗传多样性研究, 通过单因素和正交试验对 ISSR-PCR 反应体系进行优化。结果表明, 采用改良 SDS 法提取的 DNA 条带完整、无 RNA 污染, 适于 ISSR-PCR 扩增; 黄皮 ISSR 分析最适的扩增体系是: 20  $\mu$ l 的反应体系中含 30 ng 的模板 DNA、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.4  $\mu$ mol/L 引物、0.3 mmol/L dNTPs 以及引物 (gA)8C 的最佳退火温度为 52.4 $^{\circ}$ C。

**关键词:**黄皮; ISSR-PCR; 优化

中图分类号: S188

文献标识码: A

论文编号: 2009-0690

### Optimization of ISSR-PCR Reaction System in Wampee

Li Kaituo<sup>1,2</sup>, Zhao Yijie<sup>3</sup>, Zhong Fenglin<sup>1,2</sup>, Wang Jiangbo<sup>1,2</sup>, Shi Weishu<sup>1,2</sup>, Pan Dongming<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

<sup>2</sup>Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; <sup>3</sup>Fuzhou Institute of Agricultural Science, Fuzhou 350018)

**Abstract:** To study the extraction method of genomic DNA and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for wampee. The improved SDS method was used to extract DNA. The factors influencing ISSR-PCR were investigated by a single factor test and orthogonal design experiment. The researcher used improved SDS method to extract DNA of Wampee, which meets ISSR requirements in quantity and purity. And a better amplification system of ISSR was obtained with the reaction system containing 30ng template DNA, 1.5U *Taq* DNA polymerase, 0.4  $\mu$ mol/L primers, 0.3mmol/L dNTPs in the total volume of 20 $\mu$ l. The optimized annealing temperature was 52.4 $^{\circ}$ C for primer (gA)8C. The stable and reproducible optimal ISSR-PCR reaction system and suitable annealing temperature are established for Wampee, which had laid the good foundation for ISSR analysis on studies of germplasm resources identification, molecular marker assisted breeding and genetic diversity.

**Key words:** wampee, ISSR-PCR, optimization

### 0 引言

黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels 属芸香科柑桔亚科黄皮族黄皮属 (*Clausena Burm.f.*) 植物, 别名黄皮子、黄弹子、黄坛子等。原产于中国南方的热带亚热带常绿特产物, 在中国主要分布于广东、广西、福建、海

南、四川、云南和台湾等地区, 已有 1500 多年的栽培历史<sup>[1-2]</sup>。简单重复序列间扩增 (ISSR) 是一种新型的简单序列重复区间 DNA 扩增多态性检测技术, 由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等<sup>[3]</sup>首次于 1994 年提出, 与其他分子标记相比具有很大的优越性, 如实验操作简

**基金项目:**台湾农业新品种、新技术引进创新研究与示范 (2007BAD07B00)、台湾果树新品种与品质控制新技术引进创新研究 (2007BAD07B01)

**第一作者简介:**李开拓, 男, 1982 年出生, 博士生, 从事果树分子生物学研究。通信地址: 350002 福建省福州市福建农林大学园艺学院。Tel: 0591-83701719, E-mail: lkt1215@163.com。

**通讯作者:**潘东明, 男, 1956 年出生, 教授, 博士生导师, 享受国务院特殊津贴, 从事园艺产品采后贮藏保鲜研究。Tel: 0591-83701719, E-mail: pdm666@126.com。

**收稿日期:**2009-4-4, **修回日期:**2009-4-22。

单、快速、成本低、重复性好等特点。近年来,ISSR 分子标记已广泛应用于苹果<sup>[4]</sup>、龙眼<sup>[5]</sup>、荔枝<sup>[6]</sup>等多种果树上。目前,采用分子标记对黄皮的种质资源进行研究的相对较少。据报道,刘小梅等<sup>[7-8]</sup>以酸黄皮为材料,对黄皮 RAPD 反应体系进行了优化并对 14 个黄皮品种进行了 RAPD 分析;林旗华等<sup>[9]</sup>以广西无核黄皮为试材,对黄皮 ISSR 反应体系进行了优化,但并未对反应体系的主要影响因子模板用量、引物浓度、dNTPs 浓度等进行优化,缺乏系统地探索其最佳反应条件。作者通过对 ISSR-PCR 反应中的主要影响因子进行单因素和正交试验,比较系统的研究了影响黄皮 ISSR-PCR 反应体系的主要因子,建立了适宜黄皮 ISSR 分析的扩增体系,为开展黄皮遗传变异、品种鉴定以及系统进化等研究奠定一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2007 年 9 月,取福州市闽侯县黄皮成年树‘六挡鸡

心’的嫩叶提取 DNA。

### 1.2 主要药品与试剂

引物为上海生工公司 811(gA)8C, dNTPs 为 Promega 公司产品, *Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品,其余药品为国产分析纯试剂。

### 1.3 方法

1.3.1 总 DNA 提取 采用改良的 SDS 法<sup>[10]</sup>。

1.3.2 扩增反应程序 ISSR 扩增反应条件:20 $\mu$ l 的反应体系, PCR 反应在热循环仪 Biometra T-gradient 上进行,94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,52  $^{\circ}$ C 退火 60 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,40 次循,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4 ISSR 反应体系的优化

1.4.1 单因素试验 对 ISSR-PCR 反应体系的主要影响因子模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物、dNTPs 浓度进行单因素试验,各因素的水平如表 1。

1.4.2 正交试验优化 在单因素试验的基础上对模板、*Taq* DNA 聚合酶、引物、dNTPs 浓度 4 种因素,选用 L

表 1 ISSR-PCR 体系的因素-水平

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
模板 DNA(ng)	1	10	20	40	80	160	200	500	1000
dNTPs(mmol/L)	0.05	0.15	0.25	0.35	0.45	0.55	0.75		
<i>Taq</i> DNA 酶(U)	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0			
引物( $\mu$ mol/L)	0.05	0.15	0.25	0.35	0.45	0.55	0.75		

表 2 ISSR-PCR 正交试验设计[L(3<sup>4</sup>)]

	DNA(ng)	引物( $\mu$ mol/L)	dNTP(mmol/L)	<i>Taq</i> DNA 酶(U)	Buffer( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O( $\mu$ l)
1	30	0.30	0.20	0.5	2.0	16.4
2	30	0.35	0.25	1.0	2.0	16.1
3	30	0.40	0.30	1.5	2.0	15.8
4	40	0.30	0.25	1.5	2.0	15.6
5	40	0.35	0.30	0.5	2.0	15.6
6	40	0.40	0.20	1.0	2.0	15.6
7	50	0.3	0.30	1.0	2.0	15.1
8	50	0.35	0.20	1.5	2.0	15.1
9	50	0.40	0.25	0.5	2.0	15.1

(3<sup>4</sup>)进行正交试验(如表 2)。

### 1.5 引物退火温度的优化

设定退火温度梯度(48~58  $^{\circ}$ C),自动形成 12 个梯度,从中选择 48  $^{\circ}$ C、50  $^{\circ}$ C、52.4  $^{\circ}$ C、53.6  $^{\circ}$ C、54.8  $^{\circ}$ C、56  $^{\circ}$ C、58  $^{\circ}$ C 7 个温度对引物 811(gA)8C 进行筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 检测

用 1%琼脂凝胶电泳,检测其完整性,从图 1 可以

看到点样孔清晰,条带完整,无 RNA 污染,适于 ISSR-PCR 扩增。

### 2.2 单因素优化结果

2.2.1 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 试验在 20  $\mu$ l 反应体系中,设定 9 个浓度梯度处理,扩增后检测结果表明(如图 2):在其它条件一致的情况下,DNA 模板量对 PCR 扩增影响很小,模板 DNA 在 10~160 ng 内均能扩增获得比较稳定且清晰的带型。

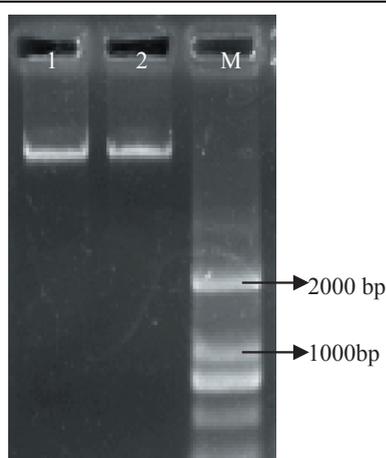


图1 DNA模板电泳图

考虑到结果的稳定性和可重复性,选用40 ng作为适宜的模板浓度。

2.2.2 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响  
dNTPs 是 PCR 反应的原料,其浓度取决于扩增片段的长度。试验设计了7个浓度梯度,在第3(0.25 mmol/L)和4(0.35 mmol/L)两个浓度梯度时,能扩增出清晰

谱带(如图3)。当浓度低于0.25 mmol/L时,扩增条带不完全;高于0.35 mmol/L时,出现条带微弱、条带丢失的现象。因此,选择浓度0.35 mmol/L为适宜浓度。

2.2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响  
试验设计了7个引物浓度梯度,结果表明(如图4),不同引物浓度对扩增结果有较大影响,引物浓度在0.35~0.45  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增效率高,谱带比较全面,稳定,无特异性谱带。当引物浓度低于0.35  $\mu\text{mol/L}$ 时,条带扩增不完全;高于0.45  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增的条带不清晰且有部分缺失。所以试验选用引物浓度为0.45  $\mu\text{mol/L}$ 为适宜浓度。

2.2.4 *Taq*DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 扩增结果的影响  
在 ISSR-PCR 反应体系中,*Taq*DNA 聚合酶用量直接影响到扩增反应的成功与否。试验对比设置了6个 *Taq*DNA 聚合酶用量梯度,结果表明(如图5),在20  $\mu\text{L}$ 的反应体系中,*Taq*DNA 聚合酶用量在0.5~2.0 U范围内均可以得到重复清晰的带型,且无特异性扩增。当浓度小于0.5 U时,PCR 扩增不充分,产物量减少,条带弱。从经济适用的角度考虑,确定1.0 U/20  $\mu\text{L}$ 为适宜

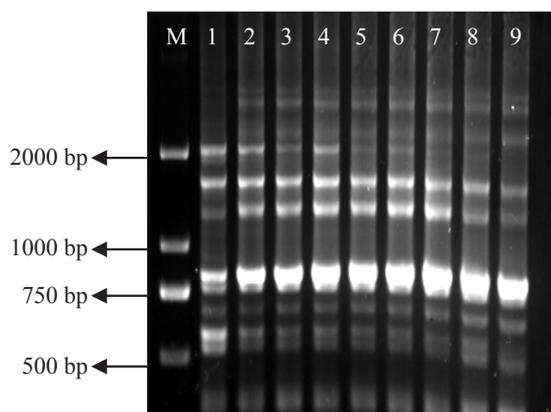


图2 模板对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

(1~9为模板梯度, M: marker)

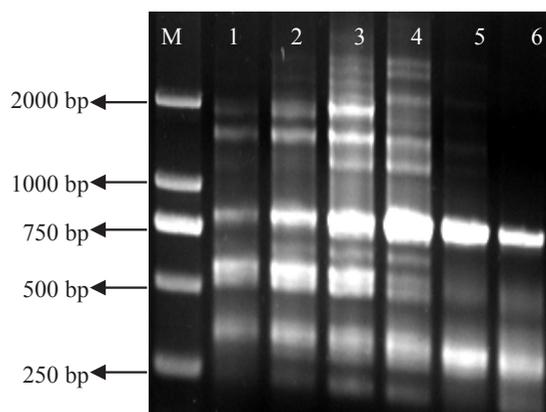


图3 dNTPs 对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

(1~6为dNTPs梯度, M: marker)

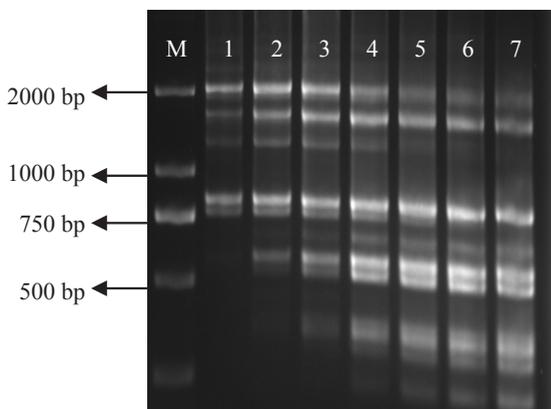
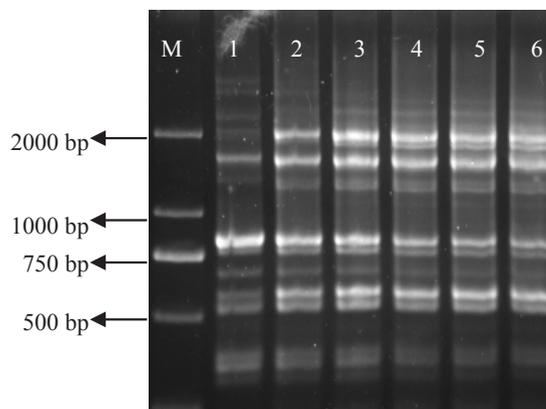


图4 引物对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

(1~7为引物梯度, M: marker)

图5 *Taq*酶对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

(1~6为*Taq*酶梯度, M: marker)

*Taq*DNA 聚合酶浓度。

### 2.3 正交试验优化结果

根据单因素试验结果,采用L(3<sup>4</sup>)正交试验,设计4因素3水平试验方法(表2),进一步优化黄皮 ISSR-PCR 反应体系,结果如图6所示,在单因素优化

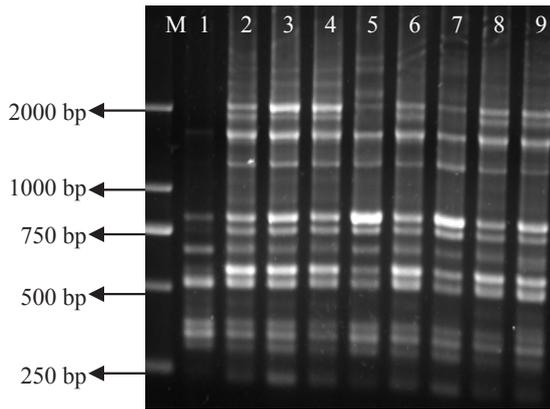


图6 正交设计 ISSR-PCR 反应扩增结果  
(1~9为处理编号,M:marker)

的基础上,进行的正交试验基本能够扩增出较好清晰的条带。在9个处理组中,第3号处理扩增效果最好,谱带强,多态性高。因此获得的黄皮最佳 ISSR 扩增反应条件为:反应体系总体积 20 μl, 10 × Buffer 2 μl, 模板 DNA 30 ng, dNTPs 0.3 mmol/L, 引物 0.4 μmol/L,

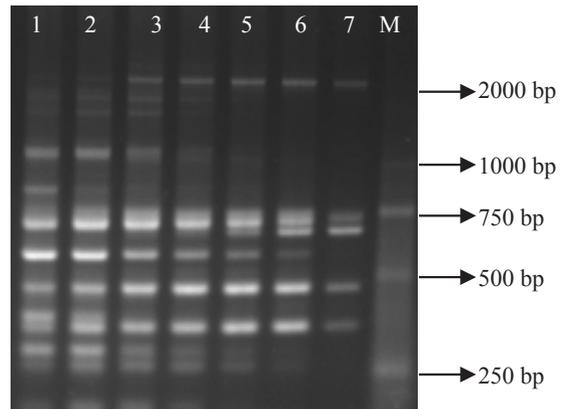


图7 退火温度梯度优化结果  
(1~7为退火温度梯度,M:marker)

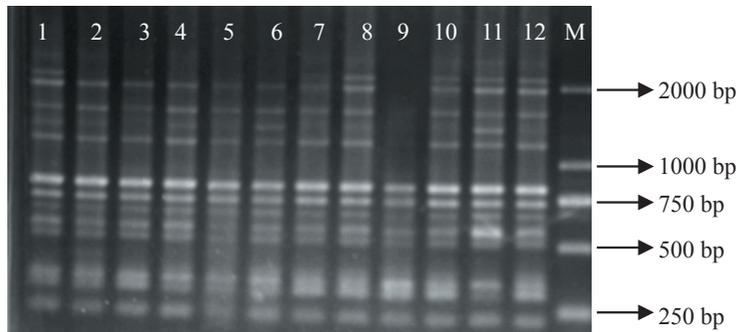


图8 引物811对黄皮12个样品的ISSR扩增结果

*Taq*DNA 聚合酶 1.5 U,其他体积用无菌双蒸水补充。

### 2.4 优化反应体系的确定

根据正交试验第3号的最佳处理结果,在52.4℃的退火温度下,对黄皮的12个品种进行ISSR-PCR扩增,得到清晰,稳定的ISSR谱带,且具有较多条带(图8)。

## 3 讨论

研究表明,ISSR标记作为检测大量样本的遗传多态性是比较稳定的,但影响扩增的因素是复杂的,反应参数选择不当,会对结果产生影响。因此,要获得较稳定、清晰、可重复的谱带,有必要对ISSR-PCR反应体系的主要影响因子模板、dNTPs、引物、*Taq*酶以及退火温度进行梯度试验。

适宜的模板量是保证特异性扩增的前提,模板DNA的含量是制约扩增产物得率及特异性的一个重要因素,模板含量过低,分子碰撞的机率低,偶然性大,扩增产物不稳定;含量过高会降低特异性扩增效率,增

加非特异性产物,造成弥散型电泳结果。但一般来说,DNA浓度有一个比较宽的适用范围,一般为20~80 ng<sup>[11]</sup>。从试验结果来看,反应中模板浓度高低对扩增产物的带型和扩增量无显著影响,在10~200 ng间均能扩增出较好的条带。因此,模板浓度对黄皮ISSR-PCR反应要求不是太严格。

底物dNTPs是PCR反应的原料,其浓度直接影响产物的产量、特异性及合成的忠实性<sup>[11, 12]</sup>。一般使用浓度在50~200 μmol/L之间,dNTPs浓度过高会聚合酶错误的掺入,而且还会与反应混合物中的*Taq*酶竞争Mg<sup>2+</sup>,抑制聚合酶的活性;dNTPs浓度偏低,会影响合成效率,使dNTP过早消耗完,而使产物单链化,影响扩增效果。从试验结果来看,dNTPs浓度对黄皮ISSR-PCR反应的影响比较大。

引物浓度对PCR反应的特异性和扩增产物都有一定的影响。引物浓度过低,则由于有引物的竞争,模板的部分位点不能检测出来,从而造成差异的假相<sup>[13]</sup>。引

物浓度过高,则会出现非特异性扩增及引物二聚体的产生,从而与靶序列竞争 *Taq* 酶和 dNTPs,影响靶序列的产量,同时也增加了实验成本。因此,引物的质量和浓度对 PCR 反应有着极为重要的作用。

*Taq*DNA 聚合酶在 PCR 中的用量受反应体积、酶的活性及酶的耐热性等因素制约,使用高浓度的 *Taq*DNA 酶不仅造成经济上的浪费,而且容易导致非特异性扩增产物积累<sup>[14]</sup>; *Taq*DNA 酶用量偏低会使新链合成效率下降,导致扩增产物减少。从实验结果的稳定性和经济的角度考虑, *Taq*DNA 酶采用 1.0~1.5 U/20  $\mu$ l 的反应体系较为适宜。

在 ISSR 反应中,不同植物种类有不同的退火温度,因此针对不同的作物种类,有必要进行最佳退火温度的测定。从理论上讲,在一定的温度范围内,退火温度越高,扩增的特异性也就越高,退火温度越低,扩增产物的特异性也就降低。退火温度的选择与引物的长度和 G+C 含量有关。一般引物都有自己的理论  $T_m$  值,  $T_m=4(G+C)+2(A+T)$ 。但作者发现不同 ISSR 引物间的退火温度变异系数较大,因而难以通过某一特定引物退火温度来预测其他引物的退火温度;另外,由于理论预测与实验相关较大且不具有强烈的相关关系,因此也不能通过理论计算来获得最佳退火温度;再者,有研究表明即使亲缘关系较近的物种间差异也可能较大,说明也难以从已有植物种类的退火温度来推测尚未获得的植物种类的退火温度<sup>[15]</sup>。因此,对于每一引物的最佳退火温度的确立需要试验进行,而不能仅靠理论推算或在理论推算的基础上进行某种校正而获得。

#### 4 小结

作者通过单因素和正交试验对 ISSR 扩增黄皮基因组 DNA 的主要影响因子进行筛选和分析,建立了适宜于黄皮 ISSR 分析的扩增体系:20  $\mu$ l 的反应体系中含 30 ng 的模板 DNA、1.5 U *Taq*DNA 聚合酶、0.4  $\mu$ mol/L 引物、0.3 mmol/L dNTPs 以及引物(gA)8C 的最佳退火

温度为 52.4  $^{\circ}$ C。

#### 参考文献

- [1] 翁树章.华南特种果树栽培技术[M].广州:广东科技出版社,1997:1-2.
- [2] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等.现代中药学大词典(下册)[M].北京:人民卫生出版社,2001:1895.
- [3] 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.
- [4] 宣继平,章镇.适合于苹果 ISSR 反应体系的建立[J].植物生理学通讯,2002,38(6):549-550.
- [5] 曾黎辉,洪自同,许家辉,等.龙眼 ISSR 反应体系的建立和优化[J].中国农学通报,2007,23(9):111-114.
- [6] 王江波,钟凤林,潘东明,等.荔枝 ISSR 扩增条件优化[J].中国农学通报,2008,24(2):71-74.
- [7] 刘小梅,潘建平,姜玲.黄皮 RAPD-PCR 反应体系的优化[J].广东农业科学,2006,(3):28-31.
- [8] 刘小梅,潘建平,曾杨,等.黄皮种质资源的 RAPD 分析[J].广东农业科学,2007,(2):13-15.
- [9] 林旗华,张泽煌.黄皮 ISSR 分析体系的建立与优化[J].福建果树,2008,(3):33-36.
- [10] 李开拓.黄皮种质资源的 ISSR 分析[D].福州:福建农林大学,2008.
- [11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [12] Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(19): 5275-5279.
- [13] Smith J J, Scott-Craig J S, Leadbetter J R, et al. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis[J]. Mol Phylogenet Evol, 1994,3(2):135-145.
- [14] 张恒庆,安利佳.红松 RAPD 实验中各组成成份含量对实验结果的影响[J].植物研究,1999,19(2):183-188.
- [15] 彭海,张静,张梁,等.长豇豆品种 ISSR-PCR 最佳退火温度的筛选[J].长江蔬菜,2007:9.