

五节芒 ISSR-PCR 反应体系的优化

金琳, 葛刚, 陈少凤*, 杨赛钢, 章泉 (南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330031)

摘要 [目的] 保护五节芒的种质资源并为其开发利用奠定基础。[方法] 以五节芒 DNA 为材料, 分析 DNA 浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶的含量以及退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响。并通过单因子试验对 ISSR-PCR 反应体系进行优化。[结果] 建立了五节芒 ISSR-PCR 的最佳体系: 25 μ l 反应体系中 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l、0.2 mmol/L 4 \times dNTP、1.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.75 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 51 ~ 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。利用优化反应体系从 100 个 ISSR 通用引物中筛选出了 11 个稳定性高、重复性好的引物。[结论] 这一优化体系的建立为今后利用 ISSR 标记技术研究五节芒遗传多样性奠定了基础。

关键词 五节芒; 基因组 DNA; ISSR-PCR; 优化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)29-14041-03

Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Miscanthus floridulus*

JIN Lin et al (School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract [Objective] The research aimed to protect the germplasm resources of *Miscanthus floridulus* and lay the foundation for its development and utilization. [Method] With DNA of *M. floridulus* as materials, the effects of DNA concentration, Mg^{2+} concentration, dNTP concentration and *Taq* DNA polymerase content, and annealing temperature on the results of amplification ISSR-PCR results were analyzed. By using single factor test, ISSR-PCR reaction system was optimized. [Result] The optimum system of ISSR-PCR for *M. floridulus* was as follows: 25 μ l system containing 0.2 mmol/L 4 \times dNTP, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.75 U *Taq* DNA polymerase. PCR reaction procedure was as follows: pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 5 min, denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 51 ~ 53 $^{\circ}$ C for 30 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 50 s, 40 cycles; re-extension at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. 11 primers with high stability and good repeatability were screened from 100 ISSR common primers by using the optimized reaction system. [Conclusion] This optimal system laid the foundation for the research on the genetic diversity of *M. floridulus* by using ISSR technology.

Key words *Miscanthus floridulus*; Genomic DNA; ISSR-PCR; Optimization

五节芒 [*Miscanthus flavidus* (Labill.) Warb. ex Schum. et Laut.] 为禾本科 (Gramineae) 芒属 (*Miscanthus Anderss*) 多年生草本植物, 原产于东亚地区^[1]。五节芒不仅可作药用、观赏, 而且可作为纺织、造纸材料和新型生物能源等。学者们从五节芒的形态学、生态学、资源利用、生理生化等方面展开了基础性研究^[2-12], 但尚未见有关 ISSR 分子在五节芒上的研究报道。

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 又称为简单序列重复区间扩增, 是 Zietkiewicz 等于 1994 年在 SSR 基础上创建^[13]。其操作简单, 遗传多态性高, 重复性好, 而且为显性标记。ISSR 技术已在品种鉴定、遗传作图和居群遗传学等研究中有应用, 在遗传多样性和亲缘关系研究中的应用极为广泛。利用 ISSR 分析五节芒的遗传多样性可为保护种质资源和能源开发奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 供试材料五节芒采自婺源大鄣山。采样时选择健康嫩叶, 放入硅胶, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

Taq DNA 聚合酶、dNTP、 Mg^{2+} 均为上海申能博彩生物有限公司产品; 试验所用 ISSR 引物为上海生工生产的 100 个通用引物; PCR 反应在 2720 Thermal Cycler 上进行。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取、纯化与检测。 采用改良的 CTAB 法^[14] 提取五节芒叶片的基因组 DNA, 然后进行 DNA 纯化, 放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存; 模板 DNA 经过纯化后, 用 UV-1700 分

光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} 的值, 检测 DNA 纯度。

1.2.2 PCR 扩增条件及电泳。 以五节芒基因组 DNA 为模板, 根据预试验的结果, 对影响 ISSR-PCR 扩增的主要参数设置了不同的梯度 (表 1)。ISSR-PCR 反应总体体系为 25 μ l。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 51 ~ 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s; 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 恒温保存。

表 1 影响 ISSR-PCR 扩增的主要参数

Table 1 The primary parameters influencing the amplification of ISSR-PCR

参数 Parameters	梯度 Gradients
DNA 模板浓度 // ng	25, 50, 100, 200, 400
循环数 // 次	30, 35, 40, 45
dNTP 浓度 // mmol/L	0.1, 0.2, 0.3
Mg^{2+} 浓度 // mmol/L	1.0, 1.5, 2.0, 2.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 // U	0.75, 1.00, 1.25, 1.50

PCR 产物每管加入 2 μ l 上样缓冲液 (30.00% 蔗糖, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯酚), 采用 1.50% 琼脂糖凝胶检测, EB 染色, 电压为 110 V, 电流 80 mA, 稳压电泳 60 min。在凝胶成像分析系统上观察并拍照记录。

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系和退火温度的优化设计。 PCR 反应的优化包括反应体系各成分的含量和退火温度的优化, 主要参数设置见表 1。退火温度设置在 51 ~ 53 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板浓度对反应体系的影响 DNA 模板浓度是影响 ISSR-PCR 的一个因子。模板浓度过低, 扩增不稳定或无法扩增; 模板浓度过高, 又会相应增加非特异性扩增的出现^[15]。该试验设置了 5 个梯度 (图 1)。结果显示, DNA

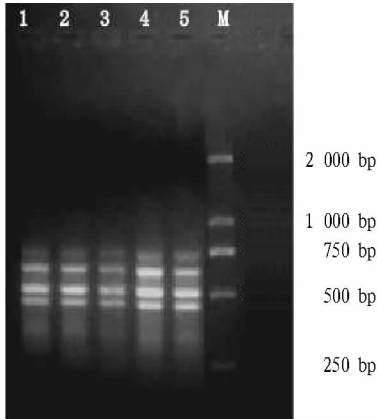
基金项目 国家“973”项目子项目。

作者简介 金琳 (1982 -), 女, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生态学。* 通讯作者, E-mail: sfchen@ncu.edu.cn。

收稿日期 2009-06-18

浓度为 25 ~ 400 ng 时均能成功扩增出条带,但 DNA 浓度为 50 ng 时扩增效果最好,符合试验的要求。

2.2 循环次数对反应体系的影响 循环次数对扩增的影响很大,循环次数少,扩增产物少;随着循环次数的增多,扩增产物也越多,但循环次数并不是越多越好,随着原料的消耗和出现非特异性扩增机会的增加,循环超过最佳次数时扩增受影响,最终影响扩增效果。该试验设置了 4 个不同循环次数(图 2)。结果显示,循环 30 次看不到扩增的条带,35 次条带很弱,45 次条带模糊不清,循环 40 次为最佳,扩增的条带最清楚,主次分明。因此,试验确定循环 40 次为最佳循环次数。

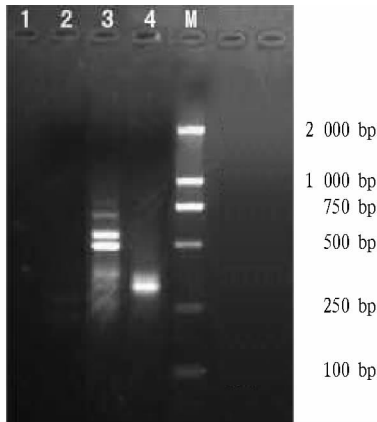


注:1~5 泳道的模板 DNA 浓度分别为 400,200,100,50,25 ng。

Note: The concentration of template DNA in lane 1-5 are DNA template 400, 200, 100, 50, 25 ng resp.

图 1 模板 DNA 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 1 Effect of template DNA concentration on ISSR amplification



注:1~4 泳道分别为循环 30,35,40,45 次。

Note: The cycle number for lane 1-4 are 30, 35, 40, 45 resp.

图 2 循环数对 ISSR 扩增的影响

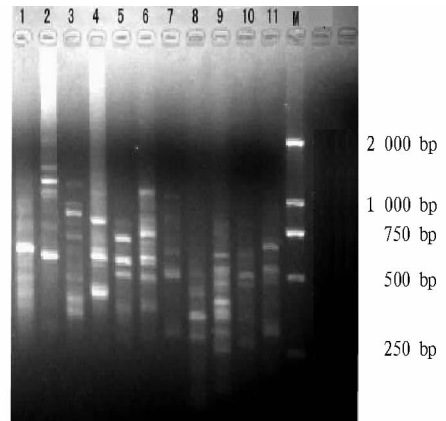
Fig. 2 Effect of cycle number on ISSR amplification

2.3 引物对反应体系的影响 不同的引物和退火温度对扩增有直接的影响。从 100 个 ISSR 通用引物中筛选出 11 个适合五节芒基因组 DNA 的引物(表 2):ISSR809、819、820、822、824、860、885、889、884、887、888。退火温度在 ISSR 反应体系中起着至关重要的作用。退火温度过低能保证引物与模板结合的稳定性,但也会引起引物与模板产生错配,产生非特异性条带;退火温度过高则会抑制引物与模板的结合^[16]。最终确定退火温度一般低于引物 T_m 值的 1~2 °C 为宜(图 3)。

表 2 引物序列与退火温度的关系

Table 2 The relationship between primer sequence and annealing temperature

序列号 Sequence No.	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature
ISSR-809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	53
ISSR-819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	51
ISSR-820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	53
ISSR-822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	51
ISSR-824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	53
ISSR-860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	52
ISSR-884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	51
ISSR-885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	52
ISSR-887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	51
ISSR-888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	52
ISSR-889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	51



注:1~11 泳道的 ISSR 引物依次为 809、820、824、819、822、860、885、889、884、887、888。

Note: Lane 1-11 are ISSR-809, 820, 824, 819, 822, 860, 885, 889, 884, 887, 888 resp.

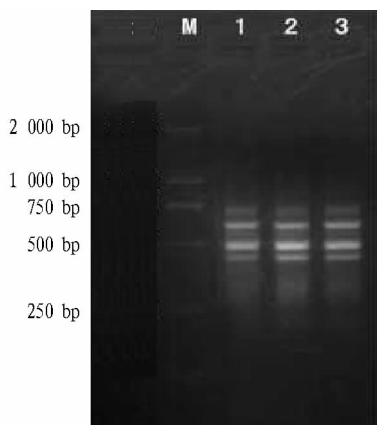
图 3 引物在最佳退火温度下扩增

Fig. 3 Primer amplification under optimal annealing temperature

2.4 dNTP 浓度对反应体系的影响 dNTP 是 PCR 反应的原料。dNTP 浓度过低,分子碰撞的几率降低,导致扩增带产率低,因而条带模糊;而 dNTP 浓度过高导致 *Taq* DNA 聚合酶在非靶位置启动与核苷酸的错配,产生错误掺入,从而降低了准确率^[17]。该试验设置了 3 个梯度的 dNTP 浓度(图 4)。结果显示,dNTP 浓度为 0.1~0.3 mmol/L,均能成功扩增,而当 dNTP 浓度 0.2 mmol/L 时,扩增效率最高,条带最亮。因此,该试验采用 0.2 mmol/L 为最佳 dNTP 浓度。

2.5 *Taq* DNA 聚合酶浓度对反应体系的影响 *Taq* DNA 聚合酶是 PCR 反应中的重要因子。该试验设置了 4 个梯度(图 5)。结果显示,*Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.75~1.50 U 时,均能成功扩增出条带;考虑到经济的原因,选择 0.75 U 为最佳 *Taq* DNA 聚合酶浓度。

2.6 Mg^{2+} 浓度对反应体系的影响 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 不足,则 *Taq* DNA 聚合酶的作用效率低。同样,引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度二价阳离子的影响,特别是其中的 Mg^{2+} 浓度能影响反应的特异性和扩展片断的产率^[18]。该试验设置了 4 个 Mg^{2+} 浓度梯度

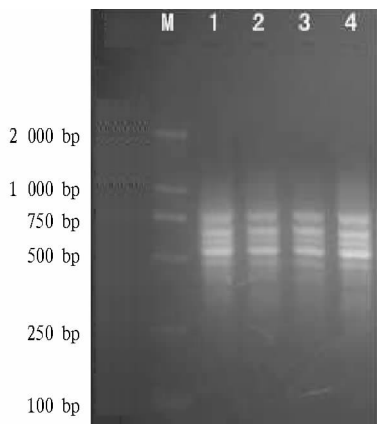


注:1~3 泳道的 dNTP 浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mmol/L。

Note:dNTP concentration in Lane 1-3 are 0.1, 0.2, 0.3 mmol/L resp.

图 4 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification



注:1~4 泳道的 *Taq* DNA 聚合酶浓度依次为 0.75、1.00、1.25、1.50 U。

Note:*Taq* DNA polymerase concentrations in lane 1-4 are 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 U resp.

图 5 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of *Taq* DNA polymerase concentration on ISSR amplification

(图 6)。结果显示, Mg^{2+} 浓度为 1.0~2.5 mmol/L, 均能成功扩增出条带, 而当 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L 时扩增效率最高, 条带最清楚, 亮度最亮。故试验确定 1.5 mmol/L 为最适 Mg^{2+} 浓度。

2.7 ISSR-PCR 反应体系的建立 根据以上试验结果, 笔者认为 ISSR 扩增的反应体系为 25 μ l, 体系中 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、4 \times dNTP 0.2 mmol/L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 51~53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 恒温保存。

3 讨论

ISSR 反应体系受诸多因素的影响, 为了获得重复性高的 ISSR 条带, 提高分析的准确性, 有必要对各种影响因子进行优化。影响 ISSR 扩增效果的主要因素 Mg^{2+} 适宜范围为 1.0~2.5 mmol/L, dNTP 适宜范围为 0.1~0.3 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶适宜用量为 0.75~1.50 U。在这些范围内均没有目的片段的消失, 仅仅是条带明亮度的问题。五节芒 ISSR



注:1~4 泳道的 Mg^{2+} 浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L。

Note: Mg^{2+} concentrations in lane 1-4 are 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L resp.

图 6 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 6 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

分子标记体系的建立还需要在各自适宜范围内微调, 最终建立优化体系。

退火温度和循环次数对该试验影响很大。一般退火温度低于引物 T_m 值的 1~2 $^{\circ}$ C, 这与引物的 T_m 值有直接的关系。循环次数主要与 DNA 浓度有关。在 30~40 次, 随着次数的增加条带变得更清晰, 目的片段更完整, 但是达到 45 次时, 出现较多非特异性产物。退火模板 DNA 浓度主要影响扩增条带的明暗度, 这与王桂娟等试验的结果相同^[19]。选择 DNA 模板浓度 50 ng 最佳的模板浓度, 使条带更清晰明亮。

其次, *Taq* DNA 聚合酶等药品的不同生产厂家、不同生产批次和仪器的不同型号对试验结果都会有影响, 因此, 尽量在相同条件下进行试验。同时, 试验熟练程度和操作规范也直接影响试验的结果, 一时的疏忽会导致试验的不可重复性。

参考文献

- [1] 刘亮. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 4.
- [2] CHOU C H, CHUNG Y T. The allelopathic potential of *Miscanthus floridulus*[J]. Bot Bull Academia Sinica, 1974, 15: 14-27.
- [3] 黄家雍, 廖江雄, 诸葛莹. 甘蔗与河八王、五节芒、滇蔗茅属间交配性及杂交 F_1 无性系的形态学和同工酶分析[J]. 西南农业学报, 1997, 10(3): 92-98.
- [4] 朱邦长, 叶玛丽, 张川黔, 等. 五节芒茎芽繁殖技术的研究[J]. 四川草原, 1995, 1(6): 30-34.
- [5] 赵南先, 萧运峰. 安徽省的芒属植物资源及其开发[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(4): 374-382.
- [6] 萧运峰, 王锐, 高洁. 五节芒生态生物学特性的研究[J]. 四川草原, 1995(1): 25-29.
- [7] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 856.
- [8] 萧运峰, 高洁. 五节芒的分化类型及生产状况的比较研究[J]. 四川草原, 1998(1): 21-50.
- [9] KAO W Y, TSAI T T, CHEN W H. A comparative study of *Miscanthus flavidus* (Labill) Warb and *M. transmorrisonensis* Hayata; photosynthetic gas exchange, leaf characteristics and growth in controlled environments[J]. Annals of Botany, 1998, 81: 295-299.
- [10] 刘亮, 朱明, 朱太平. 芒荻类植物资源的开发和利用[J]. 自然资源学报, 2001, 16(6): 562-563.
- [11] 周昌弘, 黄生, 陈淑华, 等. 台湾芒属植物生态与演化[J]. 科学发展月刊, 1999, 27(10): 1158-1169.
- [12] 易豪雄, 胡达礼, 何欠元. 五节芒稻遗传基础异质性的证实[J]. 江西大学学报: 自然科学版, 1987, 11(1): 49-53.
- [13] ZIETKIEWICZ E, RAFALSK A, LUBUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20: 176-183.

W1、W2 处理减产 46% 和 17%、W3 和 W4 增产 8% 和 0.3%；和当地历年产量水平相比，W3、W4 和 CK 产量可达到当地高产田水平，W2 可达中产量水平，W1 只能达到中偏下水平。

从相关系数 R 看出，灌水量对各因素的贡献大小依次为产量 > 千粒重 > 子粒重 > 不孕小穗数 > 穗粒数 > 小穗数 > 子粒与茎秆比。

表 2 不同灌水量对产量结构及产量的影响

Table 2 The effects of different irrigation amount on the yield structure and yield

项目 Item	小穗数//个 Spikelet number	穗粒数//粒 Grain number per spike	不孕小穗数//个 Sterile spikelet number	千粒重//g 1 000-grain weight	子粒总重//g Total weight of grains	子粒与茎秆比 Ratio of grain to stem	产量 kg/hm ² Yield	灌水量//m ³ /hm ² Irrigation amount
W1	12.1	16.7	32	38.6	65.5	0.95	4 492.5	2 631.4
W2	13.2	24.4	31	42.8	96.6	1.04	5 210.5	3 199.4
W3	14.9	32.0	17	48.0	139.6	1.00	9 051.0	4 006.5
W4	13.2	25.4	25	45.8	116.9	1.15	8 408.5	5 372.9
CK	14.2	26.6	23	46.7	103.1	0.93	8 384.0	4 803.4
R	0.481	0.555	-0.581	0.771	0.619	0.474	0.842	-

注：R 为产量因素与灌水量的相关系数。

Note: R was the correlation coefficient between yield factors and irrigation amount.

3.2.2 灌水量与产量的关系。对表 2 进行相关分析后，得出灌水量与春小麦产量的回归方程：

$$Y = 7 \times 10^{-4} X^3 + 0.004 4 X^2 - 11.049 X + 113 56 \quad (R^2 = 0.894 2) \quad (1)$$

其中，Y 为春小麦产量，X 为灌水量。从图 3 可以看出，随着灌溉量的增加，春小麦产量增产幅度非常明显，当水量继续增大时，产量呈下降趋势。该试验中灌水量达到 W3 处理时，产量达到高峰，当灌水量大于此量时，产量反而呈下降趋势，因此要提高产量需考虑其他因素^[4]。

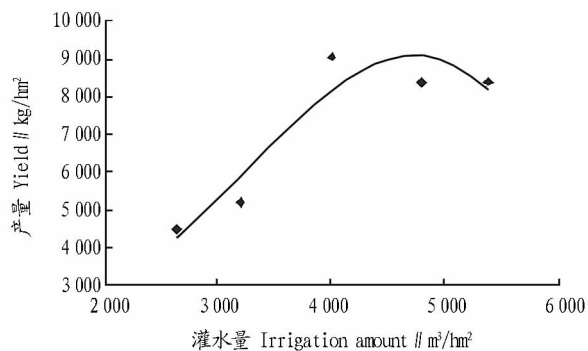


图 3 沙漠边缘春小麦灌水量与产量关系

Fig. 3 The relationship between irrigation amount and yield of wheat on the edge of desert

4 灌溉制度设计

(1) 春小麦最小耗水阶段在从播种期到出苗期，这时利用春季解冻后的底墒，即可发芽出苗；从出苗期到拔节期属蹲苗期，这时对土壤水分要求较低。就该实验区情况，土壤水分下限控制到田间持水量的 40%~45%，头水在拔节前 10~15 d 灌溉，灌水量在 900~1 000 m³/hm²，占总灌水量的 25%。

(2) 从拔节期到抽穗期，既是营养生长与生殖生长的并进期，又是小穗小花的分化期，对水分的需求最大。土壤水分直接关系到有效小穗数和穗粒数的多少，应达到田间持水量的 70% 以上，所以二水应在孕穗期灌溉，灌水量在 1 100~1 200 m³/hm²，占总灌水量的 30%。

(3) 从开花期到灌浆期，适宜的水分供应可提高千粒重，最终形成较高的产量，这就要求土壤水分占田间持水量的 70% 以上。因此三水在开花期灌溉，灌水量为 1 100~1 200 m³/hm²，占总灌水量的 30%。

(4) 从乳熟期到成熟期，需水量少，叶片生理机能逐渐衰老，适量灌水可防止叶片早衰、防御高温、干热风，对产量形成“补偿作用”。四水在乳熟前 3~4 d 灌溉，灌水量在 500~600 m³/hm²，占灌水量的 15%。

试验证明，这一灌溉方案，较一般灌水量节水 500 m³/hm²，增产 133 kg/hm²^[9]。

参考文献

- 王润元. 中国西北地区农作物对气候变化的响应[M]. 北京: 气象出版社, 2008.
- 刘小刚, 张富仓, 田育丰, 等. 限量灌溉对石羊河流域春小麦跟区水氮迁移和利用的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(6): 57-61.
- 杜群. 西北地区水资源可持续管理与防治土地退化的区域政策——以石羊河流域为例[J]. 资源科学, 2004, 26(6): 77-82.
- 吉恒英, 李馨. 不同灌水量对长绒棉产量的影响[J]. 干旱区研究, 2008, 25(5): 695-699.
- 邓捷, 周世峰, 吴涤非. 节水灌溉条件下作物的经济效益分析[J]. 排灌机械, 2005, 23(3): 39-41.
- 刘明春, 马兴祥, 张惠玲. 河西走廊东部灌溉春小麦生物特征及需水规律浅析[J]. 干旱地区农业研究, 2000, 18(4): 45-49.
- 邓振镛. 高原干旱气候作物生态适应性研究[M]. 北京: 气象出版社, 2005.
- 邓振镛. 干旱地区农业气象研究[M]. 北京: 气象出版社, 1999.
- 李秀军, 李取生, 孙长占. 气象测报灌溉管理技术[J]. 地理科学, 2002, 22(5): 631-635.
- 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19.
- 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 7-14.
- 王桂娟, 陈茂盛, 向振勇. 小桐子 ISSR-PCR 体系的优化[J]. 研究报告, 2008(3): 162-164.

(上接第 14043 页)

- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- 杨华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 体系反应体系的条件优化[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 152-155.
- 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用[J]. 遗传, 2004, 24(5): 613-616.