马氏珠母贝ISSR-PCR反应条件优化

吕林兰[1],杜晓东[2],王嫣[3,4],石耀华[3,4],王爱民[3,4*]　(1.盐城工学院,江苏盐城224003;2.广东海洋大学,广东湛江524025;3.海南大学海洋学院,海南海口570228;4.海南省热带水生生物技术重点实验室,海南海口570228)

摘要　采用ISSR技术对马氏珠母贝进行PCR扩增,100个引物筛选出48个呈阳性反应的引物。对影响ISSR-PCR反应的Mg^{2+}浓度、模板浓度、Taq酶浓度、引物退火温度和反应循环数进行了优化,并对甲酰胺对试验的影响进行了初步探讨。结果表明:优化的马氏珠母贝ISSR反应条件为①反应体系2.5 μl 10×buffer,镁离子浓度1.5 mmol/L,Taq酶1.0 U,200 nmol/L ISSR引物,模板浓度为50 ng/μl,2%甲酰胺,0.10 mmol/L dNTP,加双蒸水至总体积25 μl;②反应程序预变性94 ℃,5 min;变性94 ℃,30 s;退火52 ℃,1 min;延伸72 ℃,2 min;39个循环;延伸72 ℃,7 min。

关键词　马氏珠母贝;ISSR;优化;条件
中图分类号　Q78　　文献标识码　A　　文章编号　0517-6611(2006)22-5806-02

简单重复序列间扩增多态性(ISSR)是由Zietkiewicz等[1]最早提出来的。ISSR分子标记是在SSR(简单重复序列)标记基础上发展起来的一种新技术。其基本原理是在SSR引物的5’或3’端加锚1～4个　嘌呤或　嘧啶碱基,然后以此为引物,对两侧具有反向排列SSR的一段基因组DNA进行扩增,而不是扩增SSR本身。由于重复序列和锚定碱基是对具有相同重复形式的许多SSR座位进行筛选,使得最终扩增的ISSR片段不致于太多,扩增产物适于聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离[2]。ISSR标记在多数物种中是显性标记或共显性,在无需知道物种的基因组的情况下即可进行PCR扩增。目前已广泛用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究中[3]。

ISSR引物长度一般为15～23个碱基,操作简单,标记重复性好,稳定程度高,多态性丰富[4],克服了RAPD标记稳定性差[5-6]、RFLP费用高[7]、AFLP操作繁琐[4],而且不需预先知道其靶序列。所以,对于目前大多遗传背景研究得还不太清楚的水产动物,在研究其遗传多样性方面具有较大的应用潜力。该文以我国主产海水珍珠的马氏珠母贝DNA为模板,探讨了ISSR引物的筛选和反应条件的优化。

1　材料与方法

1.1　基因组DNA的制备　供试马氏珠母贝[*Pinctada martensii*(Dunker)]取自海南省三亚市近海。取其贝壳肌0.2 g于75%酒精中保存,备用。DNA提取按常规的酚/氯仿提取方法,用0.8%生理盐水清洗贝壳肌,于研钵中加液氮磨成粉末状,加入500 μl组织匀浆缓冲液,混匀后后加入终浓度为0.8%和100 g/ml蛋白酶K,消化过夜,分别用等体积的饱和酚、饱和酚∶氯仿(1∶1)、氯仿抽提,2倍体积的冷冻无水乙醇沉淀,70%酒精洗涤后干燥,TE(pH 8.0)溶解,置4 ℃保存,备用。

1.2　反应体系的优化　ISSR引物购自加拿大哥伦比亚大学(set No.9,No.801-900)。PCR反应体系参照Tsumura等的报道[8],并且进行适当的调整。对影响反应体系的Mg离子(1.0、1.2、1.5、1.8、2.0 mmol/L)、Taq酶(2.0、1.0 U)和模板浓度(50、25 ng/μl)3因素进行组合,共得到20个组合,并且研究了甲酰胺对试验效果的影响。

1.3　反应程序的优化　调整了在反应程序中对整个反应起重要影响的退火温度。根据厂家推荐的各引物的退火温度和碱基序列,共设计了37、45、52、55、60 ℃ 5个温度值。另外,为了提高工作效率,比较了40、45 2个不同循环数对PCR扩增结果的影响。

1.4　PCR扩增产物的电泳　PCR反应在PTG-100(M.J Research)扩增仪上进行,扩增产物用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶分离,染色参照Sanguinetti等快速银染法[9]染色,染色时间一致。DNA片段通过计算机凝胶成像系统观察记录。

2　结果与分析

2.1　PCR反应体系的优化　模板浓度(A_1 50 ng/μl、A_2 25 ng/μl),Taq酶(B_1 2.0 U、B_2 1.0 U)及Mg离子(C_1 1.0 mmol/L、C_2 1.2 mmol/L、C_3 1.5 mmol/L、C_4 1.8 mmol/L、C_5 2.0 mmol/L)3因素组合得到20个组合(表1)。

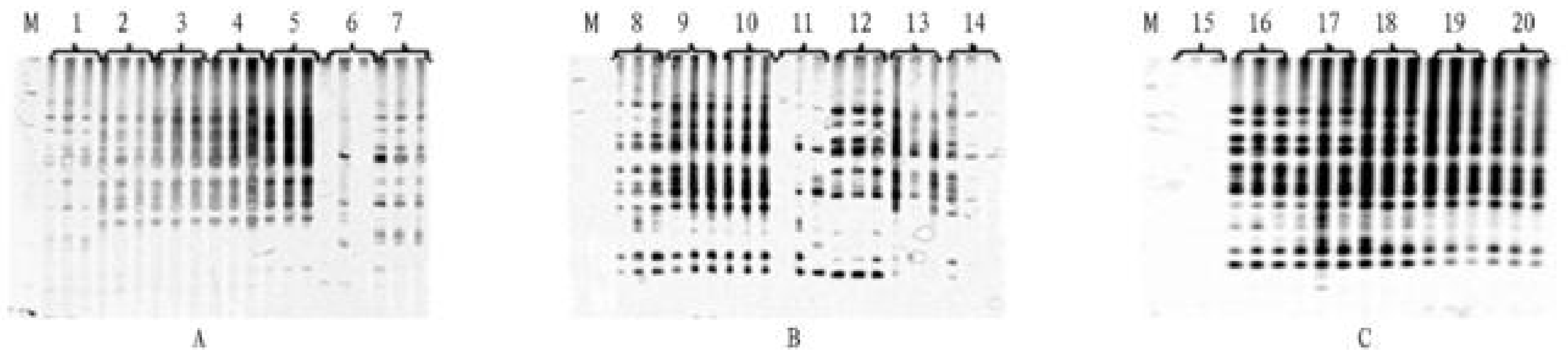
表1　镁离子、Taq酶和模板浓度各水平组合

1～10组	$A_1B_1C_1$	$A_1B_1C_2$	$A_1B_1C_3$	$A_1B_1C_4$	$A_1B_1C_5$	$A_1B_2C_1$	$A_1B_2C_2$	$A_1B_2C_3$	$A_1B_2C_4$	$A_1B_2C_5$
11～20组	$A_2B_1C_1$	$A_2B_1C_2$	$A_2B_1C_3$	$A_2B_1C_4$	$A_2B_1C_5$	$A_2B_2C_1$	$A_2B_2C_2$	$A_2B_2C_3$	$A_2B_2C_4$	$A_2B_2C_5$

为了保证试验的可信度和易分辨度,各组试验均采用同一模板,引物选用扩增效果较好的S891,按常规扩增程序进行扩增,即94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,52 ℃ 2 min,72 ℃ 2 min,2～4步骤44个循环,72 ℃ 10 min试验结果见图1。扩增效果和试验成本表明,组合$A_1B_2C_3$最好(图1第8组),即25 μl反应体系:模板浓度为50 ng/μl,Taq酶1.0 U,镁离子浓度在1.5 mmol/L扩增效果较好。

2.2　反应程序的优化　研究表明,大多数引物在52 ℃时得到稳定的扩增效果。对于含AT多的引物(801、802、803、804、805、806),即使在37 ℃时也不能得到扩增产物。而退火温度太高时,扩增的带相对少,而且不稳定。试验表明,在退火温度为52 ℃时,大多数引物能获得最好的扩增效果。该试验设计了2组扩增程序(表2)。

基金项目　国家自然科学基金资助项目(39969003,30360084);国家863计划项目(2002AA603022)。
作者简介　吕林兰(1976-),女,重庆人,讲师,从事贝类遗传育种和养殖方面的研究。*通讯作者。
收稿日期　2006-08-26



注: 每3 个泳道为1 组; A 为1 ～7 组, B 为8 ～14 组, C 为15 ～20 组。

图1　体系优化电泳图谱

表2　ISSR 反应程序

1 组		2 组	
步骤	程序	步骤	程序
1	预变性:94 ℃5 min	1	预变性: 94 ℃5 min
2	变性 : 94 ℃1 min	2	变性:94 ℃30 s
3	退火:52 ℃2 min	3	退火:52 ℃1 min
4	延伸:72 ℃2 min	4	延伸:72 ℃2 min
5	2 ～4 步骤:44 个循环	5	2 ～4 步骤:39 个循环
6	延伸:72 ℃10 min	6	延伸:72 ℃7 min

研究表明, 两组扩增程序结果并没有明显区别, 但第2 组程序比第1 组省时1 .5 h, 提高了工作效率。

2 .3　呈阳性反应的引物　按照上述优化, 得到反应体系, 并且进行引物的筛选。25 μl 反应体系:2 .5 μl 10 ×buffer ,1 .5 mmol/ L $MgCl_2$,200 nmmol/ L ISSR 引物,2 % 甲酰胺,1 .0 U Taq 酶,0 .10 mmol/ L dNTP ,50 ng DNA , 加双蒸水至总体积25 μl 。反应程序:94 ℃预变性5 min ,39 个循环(94 ℃30 s ,52 ℃1 min ,72 ℃2 min) , 最后72 ℃延伸7 min 。结果表明, 在100 个ISSR 引物中共检测到呈阳性反应的引物48 个。呈阳性反应引物的碱基序列见表3 。

表3　呈阳性反应的ISSR 引物

引物	序列	引物	序列
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	847	CACACACACACACACARC
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC
813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA
814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT
815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG
816	CACACACACACACACAT	855	ACACACACACACACCYT
817	CACACACACACACACAA	856	ACACACACACACACCYC
822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	865	CCGCCGCCGCCGCCGCCG
824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
825	ACACACACACACACACT	874	CCCTCCCTCCCTCCCT
827	ACACACACACACACACCG	878	GGATGGATGGATGGA
829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	881	GGGTGGGGTGGGGTG
830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	886	VDVCTCTCTCTCTCTCT
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	887	DVDTCTCTCTCTCTCTC
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	888	DBDCACACACACACACA
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	889	DBDACACACACACACAC
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	890	VHVGTGTGTGTGTGTGT
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	891	HVHTGTGTGTGTGTGTG
843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC
844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	898	GATCAAGCTTNNNNNNAT
845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	899	CATGGTGTTGGTCATTCTTCC
846	CACACACACACACACART	900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA

注: R = (A, G) ; Y = (C , T) ; B = (C , G, T) ; D = (A , G , T) ; H = (A , C , T) ; V = (A, C , G) ; N = (A, C , G , T) 。

3　讨论

研究表明, 影响ISSR-PCR 反应的主要因子是反应体系中 Mg^{2+} 浓度、Taq 酶和模板浓度。TaqDNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, 对 Mg^{2+} 浓度敏感, 而且引物与模板双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响, 特别是 Mg^{2+} 浓度。Mg^{2+} 浓度的降低会导致扩增产物的减少, 而 Mg^{2+} 浓度过高会降低产物的特异性。与RAPD 标记相比较,ISSR 对 Mg^{2+} 浓度比较敏感[10] , 所以 Mg^{2+} 浓度的调整尤为重要。研究表明, 随着 Mg^{2+} 浓度的升高, 非特异扩增产物的增多, 扩增得到的DNA 片段因连成一片而模糊不清。在 PCR 反应体系中, Taq 酶的使用量也是影响试验的一个重要因素。使用高浓度的 Taq 酶, 不仅成本过高, 而且导致产物的特异性降低, 而其浓度过低又会导致产物的合成效率降低。同时, 模板浓度也是制约产物特异性和合成效率的一个重要因子。若模板浓度过低, 则扩增产物不稳定, 而若模板浓度过高, 则非特异性带增加。

在 PCR 扩增程序中, 退火温度是影响扩增效果的一个重要环节。引物退火温度受碱基序列长短和 GC 含量的影响[11] 。该研究根据引物提供的参考退火温度, 不同引物采用不同的退火温度。试验表明, 在以马氏珠母贝为模板的PCR 反应中, 大多数引物在52 ℃时得到较好的扩增效果。而对于参考退火温度较高(60 ℃以上) 或参考退火温度较低(40 ℃以下) 的引物, 在其参考退火温度和52 ℃时几乎都不能得到扩增产物。

甲酰胺具有减少背景和增加产物稳定性的作用。由于ISSR 引物含有简单重复序列, 甲酰胺可以有效地防止引物自身形成二级结构。Tsumura 等在分析 Douglas-fir (*Psedotsuga menziesii*) 和 Sugi (*Cryptoneria japonica*) 时认为,2 % 甲酰胺可以提高绝大多数引物扩增产物的清晰度, 但其浓度过高则会抑制反应的进行[8] 。该试验也得到与之相符的结论, 在反应体系中加入甲酰胺后, 可明显减少背景, 扩增结果更加清晰。

研究表明, 马氏珠母贝优化的ISSR 反应条件: ①反应体系为2 .5 μl 10 ×buffer , 镁离子浓度1 .5 mmol/ L , Taq 酶1 .0 U, 200 nmmol/ L ISSR 引物, 模板浓度为50 ng/ μl ,2 % 甲酰胺,0 .10 mmol/ L dNTP , 加双蒸水至总体积25 μl ; ②反应程序为预变性94 ℃,5 min ; 变性为94 ℃,30 s ; 退火52 ℃,1 min ; 延伸72 ℃, 2 min ;39 个循环; 延伸72 ℃,7 min 。

ISSR 标记可以在没有任何分子生物学研究基础的情况下进行基因组分析, 呈孟德尔方式遗传, 一般呈显性或共显

(下转第5855 页)

(上接第5807页)

性标记。目前应用于马氏珠母贝群体遗传分析的方法主要有同工酶和RAPD分子标记等[10,12-14]。其中,RAPD与ISSR标记一样属于随机扩增,不同的是ISSR引物序列来源于简单重复序列区域,比随机扩增的多态DNA(RAPD)引物序列长,所以退火温度较高。钱韦等采用RAPD和ISSR标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性,认为这2种标记都可用来进行遗传多样性评估,但ISSR标记比PARD检测多态性更为敏感,反应系统更为稳定[15]。试验表明,在100个引物中有48个呈阳性反应,而且个体间都表现出明显的多态性,说明ISSR标记适用于马氏珠母贝的群体遗传分析。笔者应用该优化的反应体系,对马氏珠母贝育种群体遗传结构变化的研究取得了满意的结果。

参考文献

[1] ZIERKIEWICZ E,RAFALSKE A,LABUDA D.Genome fingerprint by sequence repeat (SSR)-archored polymerase chain reaction amplification[J].Genome,1994,20:178-183.

[2] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物DNA标记辅助育种[M].北京:科学出版社,2001:10-21.

[3] 周延清.DNA分子标记技术在植物研究中的应用[M].北京:化工工业出版社,2005:143-161.

[4] KARP A,KRESOMCH S,BHAT K V,et al.Molecular tools in plant genetic resources conservation:a guide to the technologies[M].Rome:International Plant Genetic Resources Institute,1997.

[5] HANSEN M,HALLDÉN C S.Error rates and polymorphism frequecies for three RAPD protocols[J].Plant Mol Biol Rep,1998,16:139-146.

[6] VIRK P S,ZHU J,NEWBURY H J,et al.Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice(*Oryza sativa*) germplasm[J].Euphytica,2000,112:275-284.

[7] 张玲,丁雷,岳永生.生物技术在鱼类种质资源研究中的应用[J].水利渔业,1999,19(6):1-2.

[8] TSUMURA Y,OHBA K,STRAUSS,S H.Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir(*Pseudotsuga menziesii*) and sugi(*Cryptomeria japonica*)[J].Theor Appl Genet,1996,92:40-43.

[9] SANGUINETTI C J,DIAS NETO E,SIMPSON A J.Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J].Biotechniques,1994,17:914-921.

[10] 王爱民,邓凤娇,张锡元,等.马氏珠母贝遗传多样性的RAPD分析[J].武汉大学学报:自然科学版,2000,46(4):467-470.

[11] 郑景生,吕蓓.PCR技术及实用方法[J].分子植物育种,2003,1(3):381-394.

[12] 李广丽,叶富良.马氏珠母贝不同组织同工酶的比较[J].水产学报,2000,24(5):417-421.

[13] 阎冰,叶力,邓凤娇,等.马氏珠母贝与解氏珠母贝的随机扩增多态DNA分析[J].广西科学,2001,8(4):287-290.

[14] 丁小雷,邓凤娇,王爱民,等.野生马氏珠母贝子一代的遗传多样性[J].动物学杂志,2003,38(1):2-7.

[15] 钱韦,葛颂,洪德元.采用RAPD和ISSR标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J].植物学报,2000,42(7):741-750.