

正交优化法建立沙打旺ISSR-PCR 最佳反应体系

陈志宏¹, 黄琳帆¹, 张新全², 王志刚¹

(1. 全国畜牧兽医总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100094; 2. 四川农业大学动物科技学院草业科学系, 四川雅安 625014)

摘要 根据正交试验设计的原理, 设计了探索性正交试验和细调性正交试验来确定沙打旺ISSR-PCR 体系中各成分的浓度。得到既稳定又能扩出最多条带的适合沙打旺的ISSR-PCR 最佳反应体系, 即20 μ l 的反应体系中含有1 \times buffer, dNTP 0.2 mmol/L, Taq 酶1.0 U, 引物0.3 μ mol/L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, DNA 模板2.5 ng/ μ l。然后对沙打旺ISSR-PCR 最佳反应体系进行梯度退火试验, 得到这条引物的最佳退火温度为54.1 $^{\circ}$ C。这一最佳体系的建立为今后利用ISSR 标记技术, 研究沙打旺的遗传多样性提供了标准化程序。

关键词 沙打旺; ISSR; 正交优化; 反应体系

中图分类号 Q946.33 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)13-2980-02

Establishment of *Astragalus adsurgens* ISSR-PCR Optimal Conditions with Orthogonal Optimization Method

CHEN Zhi-hong et al. (Center of Genetic Resources of Livestock, Fowl and Herbage, China Animal Husbandry & Veterinary Institute, Beijing 100094)

Abstract Orthogonal design is applied to the ISSR-PCR conditions optimization in this paper. Two orthogonal experiments were made to investigate the amplification efficiency of different amplification conditions. As a result, a satisfactory ISSR technique system for *Astragalus adsurgens* with desirable repeatability and polymorphic bands was established. In a total volume of 20 μ l ISSR-PCR system, it contained 1 \times buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.3 μ mol/L Primer, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1 U Taq DNA polymerase and 2.5 ng/ μ l template DNA. The optimal annealing temperature of this primer for ISSR-PCR reaction was proposed by gradient PCR and it was 54.1 $^{\circ}$ C. The result provided standardizing ISSR-PCR program for the analysis of genetic diversity of *Astragalus adsurgens*.

Key words *Astragalus adsurgens*; ISSR; Orthogonal optimization; Reaction conditions

沙打旺 (*Astragalus adsurgens* Pall) 又名直立黄芪, 为豆科黄芪属多年生草本植物, 根系发达, 主根粗大, 是优良牧草^[1]。沙打旺原产黄河故道地区, 是我国特有的栽培牧草、绿肥和水土保持等兼用型草种, 在我国人工栽培已有近百年^[2]。沙打旺经济价值高, 营养成分丰富而齐全, 蛋白质含量高^[3]。从分子水平系统地研究沙打旺的遗传多样性, 对其资源的开发和持续利用有重要意义。

ISSR (Inter-simple sequence repeat), 即简单重复序列区间, 是由 Zietkiewicz 等在 1994 年创建的^[4]。ISSR 标记是利用在基因组中常出现的简单重复序列作为引物, 由 1~4 个碱基组成的串联重复和 1~2 个非重复的锚定碱基组成, 锚定碱基避免了引物在与 DNA 模板结合时在基因组上的滑动, 这样就提高了 PCR 的专一性。ISSR 操作简便、成本较低、重复性高、多态性好, 其引物设计比较简单, 不需要知道简单重复序列两端的碱基序列^[5-7]。已在多种动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性等研究方面得到应用^[8-13]。

虽然 ISSR 有诸多优点, 但 ISSR 分子标记技术基于 PCR 反应, 受到多种反应条件的影响, 不同物种对反应的要求也存在差异, 因此在进行 ISSR 分子标记技术时应首先对其反应条件进行优化^[14]。该试验采用 2 次正交试验, 设 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、引物 4 因素 3 水平, 对沙打旺 ISSR-PCR 反应体系进行优化, 以期快速地建立适合沙打旺 ISSR-PCR 反应体系, 为沙打旺分子水平的进一步研究打下良好的基础。

1 材料与试验方法

1.1 材料 沙打旺种子来自全国畜牧兽医总站畜禽牧草种质资源保存利用中心牧草基因库。Taq 酶、dNTP、10 \times PCR buffer、 Mg^{2+} 、引物均购自上海生工。Marker 购自赛百盛, 共 10 条带(分别是: 200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、

2 000 bp)。PCR 仪为美国产 GeneAmp PCR System 9700。

1.2 DNA 提取 将每份材料的种子萌发至有一定数量的幼嫩叶片, 液氮冷冻研磨处理后, 参照 Frederick 等(1998) CTAB 的方法并略作改进提取叶片 DNA^[15]。具体步骤是: 取 1.0~1.5 g 幼嫩叶片放入小研磨中, 加入液氮研磨成粉末, 转移至 15 ml 的离心管中。将预热的 CTAB 裂解液 5 ml, 倒入有叶片的离心管并混匀, 放入 65 $^{\circ}$ C 恒温水浴 30 min, 其间轻轻地上下颠倒几次。然后向离心管中加入等体积氯仿异戊醇 (24:1, V/V), 再在水浴震荡器中振荡 10 min 左右, 至管中溶液分层, 放入离心机, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 重复上述步骤 2~3 次(第 2 次加 RNA 酶)。最后加入等体积异丙醇, 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待出现 DNA 絮状沉淀, 钩出沉淀至 1.5 ml 离心管中; 用 70% 乙醇洗涤 3 次, 再用无水乙醇洗涤数次, 每次至少 20 min, 然后风干沉淀; 加入适量 TE 溶解 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 并在分子生物学分光光度计中测其浓度和 A_{260}/A_{280} 的值。将 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 的 DNA 分装稀释保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3 PCR 扩增 PCR 扩增在美国产 GeneAmp PCR System 9700 上进行, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 然后置于 4 $^{\circ}$ C 待电泳检测。

扩增结束后, 每管各加入上样缓冲液 4 μ l 混匀后, 取 10 μ l 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶中含 0.05% 的溴化乙锭, 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 电压 60 V, 电泳结束在 BIO-RAD Gel Doc-XR 凝胶成像系统上观察照相。

1.4 ISSR-PCR 反应体系的正交试验 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 根据相关文献^[8-13] 的 ISSR-PCR 反应体系, 首先对 dNTP、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、Taq 酶浓度进行 4 因素 3 水平的探索性正交试验, 探索性正交试验因素水平和正交设计见表 1、2。再根据探索性正交试验的结果, 缩小各个因素的浓度梯度进行细调性正交试验, 细调性正交试验因素水平和正交设计见表 3、4。除表中变化因素外, 每管中还含有 1 \times buffer 和 50 ng

作者简介 陈志宏(1974-), 女, 内蒙古包头人, 硕士, 畜牧师, 从事牧草种质资源保护及遗传多样性研究。

鸣谢 四川农业大学草业科学系刘伟老师和曾兵博士。

收稿日期 2006-03-26

模板 DNA, 引物序列为 5 - GAGAGAGAYF 3 [Y = (C, T)], 试验设 2 次重复。

对细调性正交试验结果用 BIO RAD GelDoc- XR 凝胶成像系统中 Quantity One 软件测出每个条带的相对浓度值, 然后进行正交直观分析^[16]。

表1 探索性正交试验水平- 因素

水平	dNIP mmol/L	Taq 酶 U 20 μ	Ri ners μ mol/L	Mg ²⁺ mmol/L
1	0.1	0.5	0.2	1
2	0.3	1.5	0.4	2
3	0.5	2.5	0.6	3

表2 探索性正交试验设计[L₉(3⁴)]

处理组合	dNIP mmol/L	Taq 酶 U 20 μ	Ri ners μ mol/L	Mg ²⁺ mmol/L
1	0.1	0.5	0.2	1
2	0.1	1.5	0.4	2
3	0.1	2.5	0.6	3
4	0.3	0.5	0.4	3
5	0.3	1.5	0.6	1
6	0.3	2.5	0.2	2
7	0.5	0.5	0.6	2
8	0.5	1.5	0.2	3
9	0.5	2.5	0.4	1

表3 细调性正交试验水平- 因素

处理组合	dNIP mmol/L	Taq 酶 U 20 μ	Ri ners μ mol/L	Mg ²⁺ mmol/L
1	0.15	0.5	0.2	1.5
2	0.20	1.0	0.3	2.0
3	0.25	1.5	0.4	2.5

表4 细调性正交试验设计[L₉(3⁴)]

处理组合	dNIP mmol/L	Taq 酶 U 20 μ	Ri ners μ mol/L	Mg ²⁺ mmol/L
1	0.15	0.5	0.2	1.5
2	0.15	1.0	0.3	2.0
3	0.15	1.5	0.4	2.5
4	0.20	0.5	0.3	2.5
5	0.20	1.0	0.4	1.5
6	0.20	1.5	0.2	2.0
7	0.30	0.5	0.4	2.0
8	0.30	1.0	0.2	2.5
9	0.30	1.5	0.3	1.5

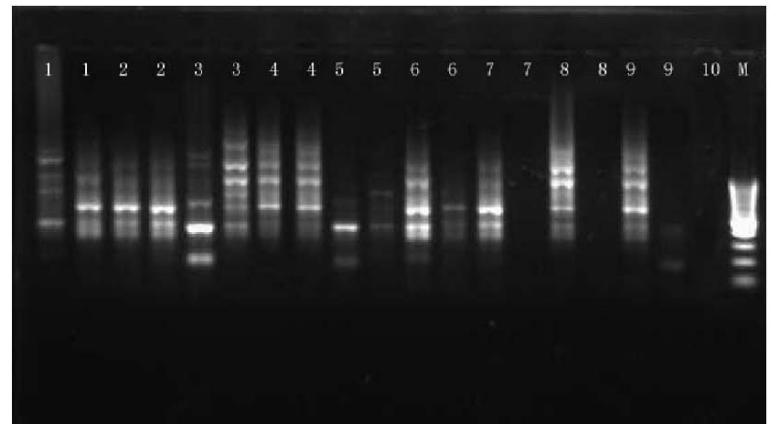
1.5 体系稳定性检测 选用其他的模板 DNA, 分别用细调性正交试验 9 个处理组合中的最好组合和统计理论上的最佳处理组合进行 ISSR-PCR。检测 2 个体系的稳定性并比较 2 个体系的扩增效率。

1.6 最佳退火温度的确定 在试验确定的最佳反应体系基础上, 在德国 Eppendorf 公司产 Mastercycler Gradient PCR 仪上进行最佳退火温度的筛选。设置了 11 个退火温度: 46.1、46.8、47.9、49.2、50.8、52.5、54.1、55.6、56.9、57.9、58.5。

2 结果与分析

2.1 探索性正交试验结果及其分析 探索性正交试验结果见图 1, 探索性正交试验结果不太理想, 正交试验各个处理组合的结果不尽相同, 有 1 个组合没有扩出条带, 有些组合只有 1 个能扩出条带, 另外一个重复不能扩出条带, 说明这些处理组合的反应体系重复性不太好。其原因可能是由于探

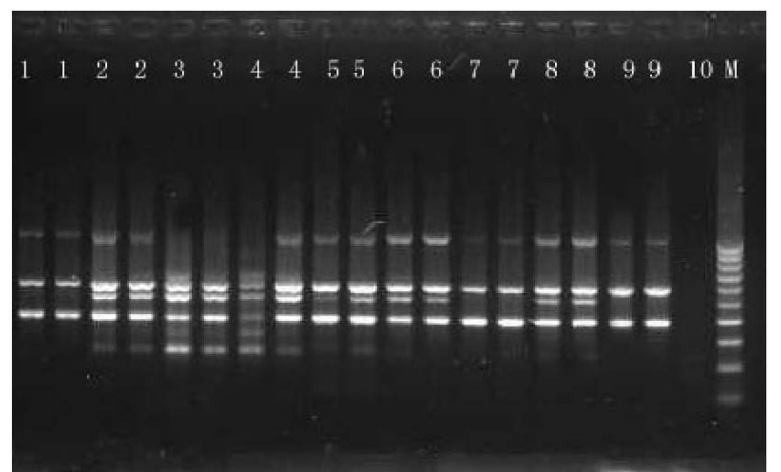
索性正交试验所设计的各个因素的梯度比较大, 有些组合偏离最优的组合较远。其中 2、4 号处理组合重复性好, 条带清晰。说明他们所对应的条件离优化中心偏离不是很大。再以这 2 个处理组合的条件为基点, 缩小各个因素的梯度进行细调性正交试验。



注: M. Marker; 1~9. 处理组合 1~9; 10. 对照 (未加模板 DNA)。

图1 探索性正交试验结果

2.2 细调性正交试验结果及其观察分析 结果见图 2, 所有的处理组合都扩出了大约为 400 和 600 bp 的 2 条带。其中 3、4 号处理组合扩出较多条带但 2 次重复结果不太一样, 扩增背景也较深, 说明这 2 个反应体系不太稳定。1、7 和 9 号处理组合扩出了 3 个条带, 条带也比较清晰、重复性较好。6 号处理扩出了 4 个条带, 而且条带清晰、重复性好。试验效果最好的是 2、5 号处理组合, 总共扩增出 5 个条带而且条带清晰、重复性也好, 为最佳的处理组合。



注: M. Marker; 1~9. 处理组合 1~9; 10. 对照 (未加模板 DNA)。

图2 细调性正交试验结果

2.3 细调性正交试验结果的正交直观分析 具体计算结果见表 5, 在 9 个处理组合中 2 号处理组合的相对浓度和最大, 说明该组合的扩增效率最高, 综合细调性正交试验的观察结果, 2 号为 9 个处理组合中最佳处理组合。而 R 值的大小反映了该因素对扩增结果的影响程度, 细调性正交试验结果的直观统计分析表明, 在此次细调性正交试验所设计的各因素的浓度梯度下, Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的总浓度影响最大, 其次分别是 dNIP 浓度、Mg²⁺ 浓度、引物浓度。利用 T 值可以确定每一个因素各水平的最佳浓度, 每一个因素的 3 个 X 中最大的 X 值所对应的水平即为该因素最佳浓度, 此次试验的最佳处理组合为: dNIP 0.2 mmol/L, Taq 酶 1.0 U, 引物 0.3 μ mol/L, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, 再加上 1 \times buffer 和 2.5 ng/ μ l 的 DNA 模板。这个最佳处理组合从理论上来说, 应该是最理想的条件体系。为了验证这个推论, 用这个最佳处理组合和 2 号处理组合进行比较, 所用的 DNA 为其他材料的 6 份 DNA。结果见图 3, 由图 3 可知 2 个体系的扩增结果都不错, 2 个体系扩增条带基本一样, 但最佳处理组合扩增出的有些条

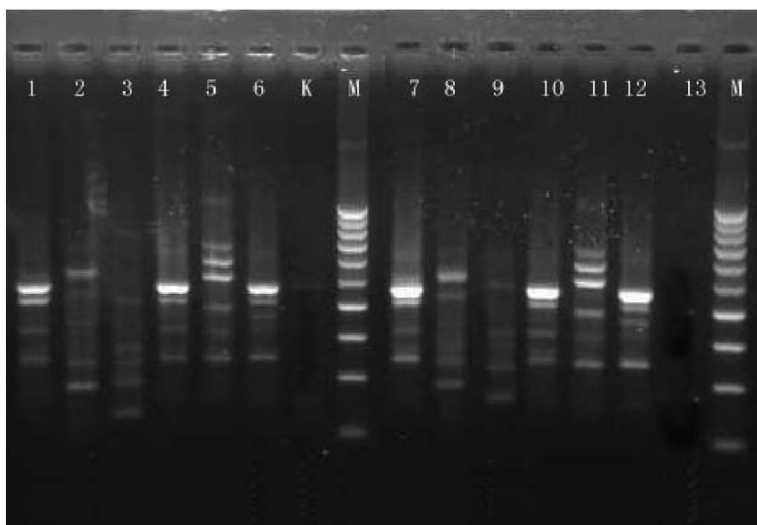
带明显比2号处理组合扩增处理的亮。所以选用最佳处理组合为正式试验的ISSR PCR反应体系,即20 μ 的反应体系中含有1 \times buffer, dNTP 0.2 mmol/L, Taq 酶1.0 U, 引物0.3 μ mol/L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, DNA 模板2.5 ng/ μ 。

表5 细调性正交试验结果 $L_9(3^4)$

处理组合	dNTP mmol	Taq 酶 U 20 μ	Primers μ mol/L	Mg^{2+} μ mol/L	相对浓 度和
1	1	1	1	1	124.754
2	1	2	2	2	236.347
3	1	3	3	3	214.277
4	2	1	2	3	173.052
5	2	2	3	1	218.975
6	2	3	1	2	213.267
7	3	1	3	2	119.339
8	3	2	1	3	207.146
9	3	3	2	1	170.458
T_1	575.377 0	417.144 0	545.167 0	514.486 0	
T_2	605.293 5	662.466 5	579.855 5	568.952 5	
T_3	496.941 5	598.001 5	552.589 5	594.473 5	
X_1	191.792 3	139.048 0	181.722 3	171.395 3	
X_2	201.764 5	220.822 2	193.285 2	189.650 8	
X_3	165.647 2	199.333 8	184.196 5	198.157 8	
R	36.117 3	81.774 2	11.562 8	26.762 5	

2.4 最佳退火温度的筛选 退火稳定的梯度PCR试验结果

见图4,由图4可见,当退火温度比较低时,ISSR-PCR扩增的效果条带很多而且模糊,背景也较深,说明当退火温度较低的时候ISSR-PCR扩增的特异性不好。当退火温度比较高时扩增的条带较少,而且条带也较弱,扩增效率不高。当退火温度在54.1 $^{\circ}$ C时,扩增条带比较亮,条带清晰。因此确定这条引物的最佳退火温度为54.1 $^{\circ}$ C。



注:1~6为用2号处理组合的体系对另外6个沙打旺材料DNA进行ISSR-PCR扩增的结果;7~12为用最佳处理组合的体系对另外6个沙打旺材料DNA进行ISSR-PCR扩增的结果。

图3 2种反应体系扩增结果

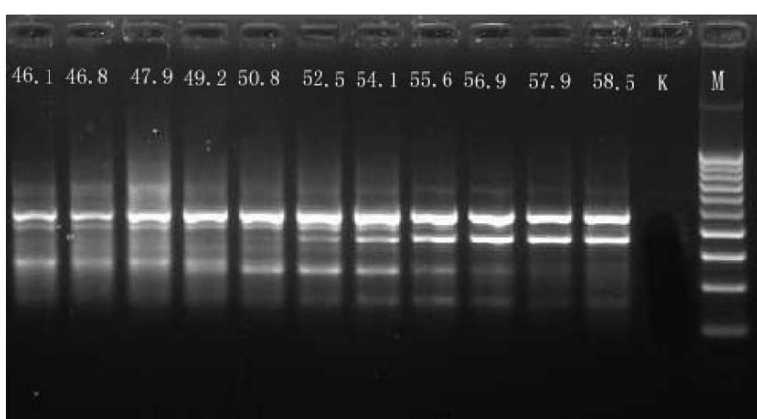


图4 不同退火温度对扩增的影响

3 讨论

(1)ISSR分子标记技术基于PCR反应,其扩增条带虽然较RAPD标记稳定,但同样受反应条件和扩增程序变化以及物种不同的影响。采用不同的体系组合和扩增程序其结果有一定差异,此次试验也证实了这一观点。因此在利用ISSR分子标记技术时,首先应对其反应条件进行优化。反应条件一旦确定,就应该保持不变,同时还应该使用同一厂家的药剂和同一PCR仪等设备,以保证ISSR分析结果的可靠性。

(2)已有的关于PCR体系优化的试验报道,大多采用单因素试验设计^[17,18],对每个因素设计不同的梯度,进行多次梯度试验,找到适合的ISSR-PCR反应体系。这样过程繁琐,且不能保证是最佳的试验体系。而正交设计的基本特点是:用部分试验来代替全面试验,能通过部分试验找到最优的水平组合(包括处理组合中没有的水平组合)^[19]。正交试验的关键是合理地设计各个因素的水平组合,对于一个全新的ISSR-PCR反应体系,此次试验先设计了探索性正交试验,再根据结果缩小各因素的梯度,设计细调性正交试验,并对细调性试验结果进行直接观察分析和正交直观分析,找到最佳试验组合,取得了较好的试验结果,大大地缩短了试验进程。

参考文献

- [1] 陈默君,贾慎修.中国饲用植物M.北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 赵明,段金殿,黄文哲.中国黄芪属(Astragalus Linn.)药用植物资源现状及分析J.中国野生植物资源,2000,19(6):5-10.
- [3] 陈建纲.沙打旺的栽培技术及其去毒J.养殖技术顾问,2004(4):1.
- [4] ZEILDEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [5] 解新明,卢小良.SSR和ISSR标记及其在牧草遗传与育种研究中的应用前景J.草业科学,2005,22(2):30-37.
- [6] 孙烘,程静,詹克慧.ISSR标记技术及其在作为遗传育种中的应用J.分子植物育种,2005,3(1):123-127.
- [7] REDDY K D, NAGARAJU J, ABRAHAME G. Genetic characterization of the silkworm Bombyx mori by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR[J]. Heredit, 1999, 83:681-687.
- [8] 李永祥,李斯深,李立会.披碱草属12个物种遗传多样性的ISSR和SSR比较分析J.中国农业科学,2005,38(8):1522-1527.
- [9] GUPTA M, CHYI Y S, ROMERO SEVERSON J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89:998-1006.
- [10] 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.
- [11] NAGAOKA T, OGHARA Y. Applicability of inter simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:597-602.
- [12] JOSH S P, GUPTA V S, AGGARWAL R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:1311-1320.
- [13] KOSTIA S, RUOHONENLEHTO, VARMO S L. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Atiodactyla and evolution of the BvtASINE[J]. Heredit, 2000, 84:37-45.
- [14] 刘海河,侯喜林,张彦萍.西瓜ISSR体系的正交优化研究J.果树学报,2004,21(6):615-617.
- [15] F 奥斯伯.精编分子生物学试验指南M.北京:科学出版社,1998.
- [16] 明道绪.生物统计附试验设计M.3版.北京:中国农业出版社,2002.
- [17] 周延清,景建洲,李振勇.怀地黄ISSR扩增条件优化的研究J.西北植物学报,2004,24(1):6-11.
- [18] 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.
- [19] 崔令江.正交优化法及其实际应用J.重型汽车,1991(24):21-26.