

大豆 ISSR-PCR 反应体系的优化

何海燕, 沙伟, 张艳馥

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以黑龙江省大豆为材料,利用正交试验设计,对大豆 ISSR-PCR 反应体系中的 5 种主要因素(Mg^{2+} 、引物、dNTPs、模板 DNA 量、Taq 酶量)在 4 个水平上进行体系优化。结果确定了大豆 ISSR-PCR 反应的最佳体系(25 μ L)为: Mg^{2+} 浓度 1.85 mmol · L⁻¹、dNTPs 浓度 1.2 mmol · L⁻¹、引物浓度 1.2 μ mol · L⁻¹、模板 DNA 60 ng、Taq 酶量 0.7 U。利用该最佳体系,选取引物 855 对 25 份材料进行扩增,以验证该体系的稳定性。建立了适于大豆的 ISSR-PCR 反应体系,为利用 ISSR 标记技术开展黑龙江省大豆遗传多样性分析提供了依据。

关键词:大豆;ISSR-PCR;体系优化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)03-0510-04

Optimization for ISSR-PCR Reaction System of Soybean

HE Hai-yan, SHA Wei, ZHANG Yan-fu

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: Orthogonal design was adopted to optimize ISSR-PCR amplification system on soybean in five factors (Mg^{2+} , dNTPs, primer, DNA template and Taq DNA polymerase) at four levels respectively, with 25 soybean germplasm from Heilongjiang Province as material. The most suitable ISSR-PCR system for soybean was established, namely 25 μ L reaction system containing 1.85 mmol · L⁻¹ Mg^{2+} , 1.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 60 ng DNA template, 1.2 μ mol · L⁻¹ primer, and 0.7 U Taq DNA polymerase. Under the optimized reaction conditions, 25 soybean were easily amplified with primer 855. The result provided a standardizing program for the analysis of interspecies genetic diversity of soybean of Heilongjiang Province.

Key words: Soybean; ISSR-PCR; System optimization

大豆是重要的油料作物和粮食品种,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源。东北是中国大豆的主要产区,经过长期自然选择和人工选择,形成了种类丰富的大豆种质资源,共有大豆种质资源 3 226 份,占全国大豆种质资源的 13%^[1]。因此,东北地区大豆种质资源的利用和保护对全国大豆市场供求具有重要的影响。培育高产、优质、抗病虫、抗逆的优良新品种仍是首要目标,而种质资源遗传多样性保护和利用的拓展是实现这一目标的主要限制因素。

ISSR 标记 (Inter Simple Sequence Repeat, 简单重复序列区间扩增)是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等^[2]于 1994 年提出的,是在 SSR (Simple Sequence Repeat, 简单重复序列) 基础上创建、基于 PCR 扩增的一种新型分子标记技术。即在 SSR 序列的 3' 端或 5' 端加上 1~4 个随机核苷酸,在 PCR 反应中,锚定引物可以引起特定位点退火,导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间的 DNA 片段进行 PCR 扩增。所扩增的 inter SSR 区域的多个条

带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳得以分辨^[3]。ISSR 分子标记通常为显性标记,呈孟德尔式遗传,具有技术简便快速、稳定性强、DNA 多态性高等优点。ISSR 技术是基于 PCR 的一种分子标记技术,其扩增结果易受 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、Taq 酶、模板 DNA 等因子浓度的影响,对于不同的反应体系和扩增程序,ISSR 的结果是不同的。因此,在用该技术进行大豆遗传多样性检测之前,应先建立一个合适的 ISSR-PCR 反应体系,以期获得可靠的结果。该研究对上述各因子的最佳反应条件进行了优化,建立了适于黑龙江省大豆的 ISSR 反应体系,旨在为黑龙江省大豆的分子鉴定和遗传关系的分析提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取来自黑龙江省不同生态区的 25 个大豆品

收稿日期:2009-12-30

基金项目:黑龙江省教育厅科研资助项目(10551331)。

第一作者简介:何海燕 (1985-),女,在读硕士,现从事植物遗传学研究。E-mail: hehaiyan122@163.com。

通讯作者:沙伟,教授,博士生导师。E-mail: Shw1129@263.net。

< ^ 1 2 & < Â³ w J „ ! ^ %o! l q ° ô ! À T ç
U V W X ! B -] O/a Q { 5 r š å À & L Y^G
M@KUNQ %%%B ù d + ¶ 1 g 8 H I Öš ð õ ,
œ! +6WU MI ! e ! 8 ' Y@ Ô € B - Ä° g « g 8
« ¾ H I Öš , œ& Ç v j E C ! õ ° i 8
S+/O@7 ^ Ë Öì 9 E C t { ï 8 &

&4! # [\ X Y
&4! 4# ! " í N. - &) * „ K ; # À 3 x t
/ Y- + • ()) I Tu : " N. - ! À %! Q t ' µ ¶ .
. 1 ° » - Tu : N. - t ä å n ! " À RK7K(HKF0
" (~ ù #± • - ï á - ï q b w j Úw ! ^ Z q ,
f ^ ! %7I + #Q^t « 7 È! -] !%a Q { 5 r š
å À & E C Ö G H ° I " a & ' N. - ^ ï 9 E C
t { ï i î &

&4! 4! # Q(8:^/8 Ÿ 1 2 e f # » j ý p Q(8:
^/8 t 9 , ÿ @ u » " M! e ! 8 ' L Y^Gí i N.
- D' Y@ Ô D #~ > , ç é Ä x y ï 9 ¥ L ! " À Q
" > #! 9 c x y E C & ¥ L \ %. c & ž £ ' p 5
ú c 5 t u » Ÿ ! Ö & _ +6WU o p M! e #! 49 #Q
a • x ç i ! 9 #Q& o & : ! ~ : ! Ö @ë ! o \$!
%& ~ AE1 ^ , : " %6æ ^/8 á Ä x y « - &

Q(8:^/8 ž £ ¾• ^ \$" >a ; Ž n 9 ? A% >a
Ž n \$%G9! a § " & ? A! =! a a < ! ? A! >% ,
" %! a a < &%? A% a r š &

} & ^/8 q r —* 0] ê i Ö}

E%: * & P&B" 5" 4% %%& / " & H! 0 # \$:(/(*- . 9. ' *#

u » ` @2U

v „ .) 4	M! e	g? 23+ Q! &	g? 23+ Q! &	L Y^G	i i N. -	Y@ Ô
	g? 23+ Q! &	g? 23+ Q! &	g? 23+ Q! &	7I	S	
&	84%	84! %	%4" %	9' 4%	%49%	
!	84%	84>%	84%%	' %4%	%4! %	
\$	84%	84' %	848%	' >4%	%4-%	
>	84%	840%	84! %	' 04%	%40%	
9	84-9	84! %	84%	' >4%	%40%	
'	84-9	84>%	%4" %	' 04%	%4-%	
=	84-9	84' %	84! %	9' 4%	%4! %	
O	84-9	840%	84&%	' %4%	%49%	
"	840%	84! %	84&%	' 04%	%4! %	
8%	840%	84>%	84! %	' >4%	%49%	
&&	840%	84' %	%4" %	' %4%	%40%	
&!	840%	840%	84%	9' 4%	%4-%	
&\$	840%	84! %	84! %	' %4%	%4-%	
&>	840%	84>%	84&%	9' 4%	%40%	
&9	840%	84' %	84%	' 04%	%49%	
&	840%	840%	%4! %	' >4%	%4! %	

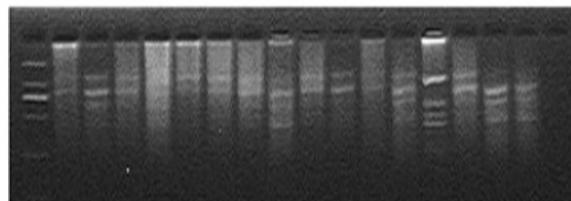
&4! 4\$# Q(8:^/8 ÷ 0 & r s K ; # Q(8:^/8 ž
£ ù 8 À ! d ' µ ¶ . , " p ç • è . #! ° x y »

- ! 1 ° ä U È ^ %!9_Y+, & " À y 1 t & \$%1!1
° Ö TMÙ ' %? A& 1 ° ä i 5 Y! 9 ÿ ~ è Ý . ,
i Ð p Ö " S1^ RN(:O@%#%± Ý n —&
&4! 4># Q(8:^/8 } \$ • T s L T U V & f ; # À
ö ° t 8 S+/O@9 i ! 9 a & ' 1 2 t Tu :
N. - j ï 9 E C B / t } ^ ' p x y C y & ^/8
« - ¾• 5 § " z w " À ö ° t & , 8 t § " z
w ! u ^ ö ° t 8 ^ S+/O@9! § " z w £ ö ' • !
q Ö ¾• o Ž &

! #] ^ + M_

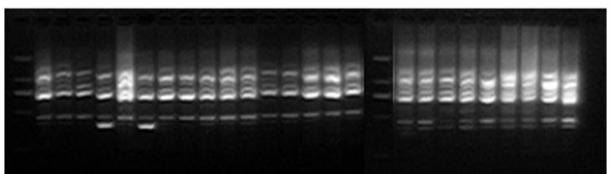
! 4&# Q(8:^/8] ê i Ö[\] ^
i 9 | } - Ñ &â , \$~ Q" > # i 9 E C ¥ L
5 ! ' p > P # e ! ' p & 9' && « - i & # e ! ' p
! '\$''' = O '' &% &> « - i ! # e ! ' p & ' 8' &
« - i \$ # e ! , # e { i , ! ' p & \$ « - i > #
e ! % # e Ø Å n i T B w } Ü & u Ë Ë i p V E
W & ' Q(8:^/8 ž £ } ^ ' p ^ \$ ž £ ' ' q
! 9 # Q & _ +6WU o p M! e #! 49 # Q ! M! e p w
&40? ? 23+ Q! & L Y^G p w &4! ? 23+ Q! & 8
p w &4! # ? 23+ Q! & i i N. - ' %7I ' Y@ Ô %4= S&
q Ö i , ^ P Å • x ç &

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



& b & ^ p à v , ! . c ! % M ^ N Q % %
& b & ! YUK@K7C76?TKU@ZKL A@K Y@K! % M \$ N Q % % ? @KU
L & # Q(8:^/8] ê [\] ^
A(5? & 3.*; ' \$B" & .(/ >+0 G! 0 P&B" 5" 4% - *. (54
! 4! # Q(8:^/8 å v —* ¥ i ' 0 \ Ù
À i 9 ¥ L , • t ' p x y c q Ö 8 t Q(8:
^/8 E C ! ÿ i { Ü [« - i Ø Å n # e & ® À 8
S+/O@9! § " z w 9! a !! 9 a 1 2 € i ü Ü [« -
i Ø Å n # e " Ñ ! #! c & / , ' p § - & ' Q(8 9
: Ø N n t . / &

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 23 24 25



M \$ N Q % % ? @KU

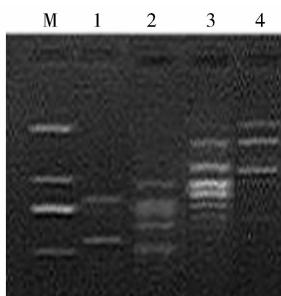
L ! # i i O@9 0 Q(8 q r] ^

A(5? ! # 2 # \$:(/(*- >+0 *: *; ' \$B" & .(8 (B \$& # * & O@9

!4\$# —* K(° / s | Q(8:^/8 0 ± 2
 ^ „ ¥ & ' Q(8:^/8 } , ' p !j ý þ Q:
 (8:^/8 « -t u » ®\$í î N.-' ♫ 8 ' MI!e'
 L. Y^Gí Y@N.- j ÓÔt þ w ¥ B< o ♫ þ à &
 | } ♫ ♫ !MI!e ¥ ý þ Q(8:^/8 ž £ t ¿ @u » !
 q þ w ~ &= %b &4Q? ?23+ Q!&5 TMÖ€ î « -i
 # e !GÑ MI!e þ wt üû ÜG! « -# e t Tß w
 i Ø Ån ý - Ž & ý MI!e þ w ~ &4Q? ?23+ Q!&
 Ö! « -# e } Tß !Ø Ån } Ü & L. Y^Gþ w Ä
 Y@ØD ý Kï Ñ Q(8:^/8 ž £ t | " !MI!e'
 L. Y^GÄ Y@Øt ...ý þ !P¶ - , u » t þ w v
 G; v i !ý ý þ « -# e t ØP!ý o L þ wt z
 / ~ " ī t > ¿ Öf â « -i Tß 'Ø Ån Út #
 e !ÓEC 5 § Øt L. Y^Gt þ w ^ &! ?23+ Q!&
 Y@ØD ^ % S & ♫ 8 Å N.- t þ w j Q(8:^/8
 « -| } P" • ý þ !f Ø & u » t + ...7 Å B i
 § Øt ♫ 8 þ w ^ &! #?23+ Q!& i i Ø ^
 %7l+ !9 #Q!&

!4# j k ÁÈ | Q(8:^/8 0 ± 2

À 0 Ä 0 B } ^ ' p x y >Oa b9> a § " z
 w n w E C & 1 0 | } ♫ ♫ !~ z w { i Ö! « -#
 e . Tß !, Ø Ån o Ü!GÑ § " z w t ÜG! «
 -# e t Tß w i Ø Ån - Ž !d â v " ī t § "
 z w !Öt ♫ 8 t Ø Ån • Ÿ & - E E I Ó E C 0
 Å ♫ 8 Øt § " z w ^ 9! a & u E TM§ « -#
 e t Tß w i Ø Ån 0 » < &, ♫ 8 t § Ø § " z
 w &



M\$ NQ %%? @!K%&] >YBK @7K@7I Ø? HU@UKAG>A 9%
 9! @L 9>a UK@K@K@KE

L \$# j k ÁÈ | Q(8:^/8 0 ± 2
 A(5? \$# EB* *//*, " / %44*% (45 ' *# \$* &%, & " 4
 >+0 @H! 0 %\$:/(; %(" 4

\$# f ,

Q(8' Åñ n H I T - ^/8 ž £ !q « -# e
 . { 8- ^Nñ n p ï !, ♫ N Á ž £ # \$ j « - 3/
 • t Ž • 0 Åo ♫ 8 < t ý þ (9) & u E !@r ý Q:
 (8:^/8 B C | } t p ï n ' @ë n i â è n &

^/8 ž £ ' p 5 MI!e þ w j ž £ t , • n i
 « - • (€ Öy þ & MI!e ¥ Y@ØB • j Ø ž £ 0
 % O t !, MI!e v Ø!P 1 Ø L. Y^GÖ L. Y^Ø Ø
 o " !P a « ž £ ! « -ù 8 K • • !Å! « - G " %
 MI!e v ê ç Å! L. Y^G! Ø MI!e ; ó i Y@Øy
 n & E Y!MI!e 9 ¿ ý þ G H ♫ 8 ; N.- i i t
 | Ø!b ä h Š ^/8 | } t 3 Ž () & Ø E C , • t
 MI!e þ w ^ &4Q? ?23+ Q!&

L. Y^Gþ ^/8 ž £ t | 2!Š; ? • N.- t Ø
 | !q þ w & M; Q(8 « -# e æ D Ä Z Y Á 0 t
 Ü () & ý þ w { i Ö! ' Å » ¼æ(i ! « -ù 8
 • e !P h Š # e í , o T % þ w { GÖ!" \ _ ö i
 « - t i E (!ž " \ _ ; Y@Øw x MI!e !Ø ž £
 ' p 5 MI!e t Ø • þ w ö i !Y@Øy n Á / ý þ &
 Ø. / B / t § Ø L. Y^þ w ^ &! ?23+ Q!&

Y@Øt ý n ; Å D 9 ¿ Üp / ^/8 « -ž £
 t | " !¥ ^/8 ž £ 5 } @ @ t u Å & Y@Øþ w
 v i « - " (i !# e ê % Y % Ø þ w v G M E ù g
 1 , • n # e !ä % o - a < i ~ () & Ø E C 0 Å t
 Y@ØD ^ % S g 9 # Q&

¤ 8 þ w ý þ / « - = D !þ w v i o i x y
 Ö • « - !v G E ö l ¤ 8 e j ' !h Š # e o p i
 Ä Tß w % ó () & Ø E C , • t ♫ 8 þ w ^ &!
 #?23+ Q!&

i i N.- ¥ Q(8:^/8 ž £ ' p t " , @ @ t
 ý þ u » !q U w % o q @ G () & i i N.- D D ý
 þ N Q(8:^/8 « - • } !i i N.- D v i ! ' Å »
 ¼ t æ(i ! « -ù 8 o p i ; P « -ù 8 % i D
 v Ø!, • « - • (ö i ! ' , • n ù 8 - a () &
 & ' Q(8:^/8 ž £ j > ~ N.- þ w o v ý Å ! a
 Ü ' %7l i i N.- i i { Ø § &

< ; & u » 5 TMt ... + 7 Å !Å i 9 E C t \
 • E E i p V E W t !9 a & ' Q(8:^/8 ž £ t }
 ^ ' p \$ž £ " ' q ^ 9 # Q & _ + 6 W M U o þ MI!e #
 !49 # Q ! MI!e þ w &4Q? ?23+ Q!& L. Y^Gþ w
 &! ?23+ Q!& ♫ 8 þ w &4! #?23+ Q!& i i
 N.- D ' %7l ' Y@Ø % S & q Ø ! ' ^ P Å • x
 ç & E } ^ ' p t à B ^ W A Q(8 ñ n H I R K
 p V E W & ' 9 : Ø N n ' " i 1 , 9 : N #) >
 < . § &

... + P Q

(&) # = \$ E 4 ^ d 9 & ' < = N c t 9 : Ø N n . / (N) 4 ^ N \$
 d , ^ (H &) !! % \$ 4 " Q @ < 54 (GLE 27 R K K Ø F N A K Ø 2 W
 (H A I (22 A I (2 E T K Ø A . 2 U K C C 2 W B A @ N) 4 * @ I 37 I \$ M C C U

- Thesis of Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, 2003.)
- [2] Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase Chain reaction amplification [J]. Genomes, 1994, 20: 176 – 183.
- [3] 周延清. 三种经济植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 分析、fad 基因克隆和农杆菌介导的遗传转化 [D]. 西安: 西北大学, 2005. (Zhou Y Q. Genetic diversity of three economical plants by ISSR and RAPD analysis, fad gene cloning and agrobacterium – mediated genetic transformation [D]. Xi'an: Northwestern University, 2005.)
- [4] 王晓丹, 吕慧颖, 张敬, 等. 以 PCR 为目的地的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 891 – 894. (Wang X D, Lu H Y, Zhang J, et al. Comparative study on methods of extracting DNA from soybean leaf for PCR [J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(6): 891 – 894.)
- [5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传, 2002, 24(5): 613 – 616. (Wang J B. ISSR markers and their applications in plant genetics [J]. Hereditas, 2002, 24(5): 613 – 616.)
- [6] 郭丁丁, 马逾英, 唐琳, 等. 白芷 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31(2): 45 – 48. (Guo J J, Ma Y Y, Tang L, et al. Optimization for the reaction system of angelica dahurica ISSR-PCR [J]. Journal of Chengdu University of TCM, 2008, 31(2): 45 – 48.)
- [7] 杨华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 反应体系的条件优化 [J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 152 – 155. (Yang H, Song X Z, Yin G T, et al. Optimization of ISSR reaction system for daemonerops margaritae [J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2006, 26(2): 152 – 155.)
- [8] 任海霞, 宫志远, 曲玲, 等. 平菇 ISSR-PCR 反应体系影响因素研究 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(4): 35 – 37. (Ren H X, Gong Z Y, Qu L, et al. Studies on the influence factors of the ISSR-PCR reaction system on pleurotus ostreatus [J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(4): 35 – 37.)
- [9] 张维铭. 现代分子生物学实验手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 251 – 252. (Zhang W M. Handbook of modern molecular biology experiments [M]. Beijing: Science Press, 2003: 251 – 252.)
- [10] 沙伟, 王助文, 曹同. 正交设计优化缩叶藓属植物的 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 生物技术, 2009, 19(5): 32 – 34. (Sha W, Wang Z W, Cao T. Study on optimization for ISSR-PCR reaction system of ptychomitrum using orthogonal design [J]. Biotechnology, 2009, 19(5): 32 – 34.)
- [11] 杜金昆, 姚颖琪, 倪中福, 等. 普通小麦、斯卑尔小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究 [J]. 遗传学报, 2002, 29(2): 445 – 452. (Du J K, Yao Y Y, Ni Z F, et al. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compactum and progeny of recurrent selection [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(2): 445 – 452.)

2010 中国国际大豆食品加工技术及设备展览会胜利闭幕

2010年5月6~8日,由中国食品工业协会豆制品专业委员会和中日流通产业发展委员会共同主办的2010中国国际大豆食品加工技术及设备展览会(简称:2010SPEE)在上海光大会展中心隆重召开。据主办方统计,本届展览会有146家企业参展,展出面积达到8000平方米,专业观众超过了10128人次,无论是展会规模还是参观人数均远远高于上届展会。展会凸显出我国大豆食品种类丰富,大型设备、自动化流水生产线逐渐增多以及自主研发能力显著提高三大行业特点。

在展览同期,还召开了首届以“为人类提供健康、美味的大豆食品”为主题的(中国)国际大豆食品产业发展大会。本届大会由中国食品工业协会豆制品专业委员会和国家大豆产业技术研发中心产后处理和加工研究室共同发起并主办。大会分为学术专场和企业专场。在学术专场上,国内外的学者就国际和中国大豆食品行业发展的现状及趋势,大豆食品的专业理论知识、新技术的应用等方面作了精彩的学术报告。在企业专场上,部分企业代表介绍了各自企业的创业历程,并与参会代表分享了发展中的成功经验。

会议最后进行了“中国豆制品质量安全示范单位”授牌仪式,杭州华源豆制品有限公司等22家企业获得了中国豆制品质量安全示范单位称号。

2010中国国际大豆食品加工技术及设备展览会暨首届(中国)国际大豆食品产业发展大会的胜利召开,进一步加强了大豆食品加工的学术交流,提升了参展企业的形象,必将对我国大豆食品产业的健康快速发展起重要推动作用。