

研究简报

红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素^①

冯富娟 王凤友^② 刘彤

(东北林业大学森林资源与环境学院 哈尔滨 150040)

摘要 本文探讨了红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) ISSR实验中的各种影响因素,分别对红松的鲜叶、干叶、胚和胚乳4种材料进行了DNA的提取和PCR扩增,证明4种取样方式都是可行的。另外分析了模板的纯度和浓度、dNTP浓度以及TaqDNA聚合酶的浓度等对ISSR-PCR扩增的影响;尝试了不同的退火温度、延伸时间和循环次数,筛选出17个扩增稳定且多态性丰富的ISSR引物;建立了红松ISSR的最佳反应体系,为进行红松种群间遗传分化的研究奠定基础。

关键词 红松, ISSR, 影响因素, 最佳体系

The Influence Factors of the ISSR-PCR Experiment System on *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.

FENG Fu-Juan WANG Feng-You^② LIU Tong

(Faculty of Forest Resources and Environment, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract The study focuses on the influential factors of ISSR experiments used to analyze Korean pine. Comparative experiments on DNA extraction and PCR amplification among fresh leaves, dry leaves, embryos and endosperms were conducted. The results showed that the four kinds of materials were all feasible. The effect of purity and concentration of template, dNTP and TaqDNA polymerase on amplification was analyzed. Different annealing temperature, extension time and cycle times were also compared. 17 primers with stable amplification and rich polymorphism for ISSR were screened. The reaction condition of ISSR experiment of Korean pine was discussed, which was a basis for the study on genetic divergency among Korean pine populations.

Key words *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc., ISSR, Influential factors, Optimal system

近几年,在PCR基础上检测简单重复序列(SSR)指纹的技术得到很大的发展。在真核生物基因组中广泛存在着SSR,并具有丰富的多态性。这种PCR是用SSR作为引物(16~18个碱基),扩增重复序列之间的区域,并检测该区域DNA序列上的多态性,称之为ISSR(inter simple sequence repeat)。此技术类似于RAPD,是显性标记,而且都具有不要求预知基因组序列信息,所需的模板DNA用量少,实验操作简便,费用较低等特点。两者相比,ISSR

①国家十五攻关子课题资助项目(2002BA515B0404)。

②通讯作者。Author for correspondence.

收稿日期:2003-04-21 接受日期:2003-07-18 责任编辑:孙冬花

扩增产物的特异性更强,稳定性更高(钱韦等,2000)。Jonsson 等(1996)的研究也认为在进行植物遗传多样性的研究时可优先考虑使用 ISSR。ISSR 技术已经广泛应用于遗传图谱的构建、种群遗传学以及系统发育等方面的研究。国内最初是在水稻等作物中研究较多 (Joshi *et al.*, 2000; 何予庆等, 2001), 但近年来在林木方面开始采用此方法 (Arcade *et al.*, 2000; 姜静等, 2003)。

虽然 ISSR-PCR 具有重复性高的优点,但其扩增结果往往会受到多个因素的影响,如模板浓度、引物浓度、TaqDNA 聚合酶用量、退火温度和延伸时间等。为了确保 ISSR 分析结果的可靠性和可重复性,本实验以红松 (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) 所提取的 DNA 为材料,探讨了影响 ISSR-PCR 反应的多个因素,建立了红松 ISSR-PCR 最佳反应体系,为进行红松种群间遗传分化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采集汤旺河林场的 80~120 年生的红松新鲜幼叶,一部分从野外采集后,直接用冰壶保存到实验室,置于 -70℃ 冰箱中备用,另一部分利用变色硅胶干燥(材料与硅胶的体积比为 1:10),硅胶变色后需马上更换,直到叶子变脆,实验室常温保存 5~6 个月;采集的种子 4℃ 保存,将胚和胚乳分离。

1.2 DNA 提取的方法

4 种材料均采用传统的 CTAB 法提取 DNA (邹喻萃等, 2001)

1.3 PCR 扩增程序

本实验采用了 Tsumura 的体系 (Tsumura *et al.*, 1996), 94℃ 充分变性 7 min, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 40 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。其中 TaqDNA 聚合酶由 PROMEGA 公司提供,引物和 dNTP 由 TaKaRa 公司提供,PCR 反应在美国 MJ 公司的 PC-200 型 PCR 循环仪上进行。

1.4 检测方法

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,紫外光下 UVP 凝胶成像系统观察并成像。

2 结果与分析

2.1 提取的材料对 ISSR-PCR 扩增的影响

本实验所采用的鲜叶、干叶、胚和胚乳等,均提取到了 DNA,而且获得了稳定的扩增结果(图 1),但 4 种材料 DNA 获得率有所不同。鲜叶提取 DNA 得率高, DNA 降解较少,一般 0.1 g 叶子,可以获得纯化的 DNA 为 2 500~7 500 ng;用干叶提取 DNA 得率较低,一般 0.2 g 干叶可获得大约 300~500 ng 纯化的 DNA;从胚中提取 DNA 较为方便,一个胚可以获得大约 1 000~5 000 ng 纯化的 DNA;本实验还证明从胚乳中提取 DNA 是可行的,0.1 g 胚乳可获得 500~3 000 ng 的 DNA。

实验结果表明用红松的 4 种材料提取 DNA 进行 ISSR 实验都是可行的。以上实验无疑为分子标记实验中取样的工作提供了新思路——应该结合物种本身特点和各实验室的具体条件来确定最佳的取样方法。

2.2 模板对 ISSR-PCR 的影响

2.2.1 模板纯度对 ISSR-PCR 扩增的影响 一般 PCR 反应的模板需要纯化, 粗提取的 DNA 含有大量的 RNA、蛋白质和多糖等杂质, 会对扩增有影响, 需要用 RNA 酶和蛋白酶去除, 并要用氯或酚仿抽提 (克拉尔克, 1997)。本实验分别对纯化后和未纯化的 DNA 进行了扩增, 结果表明模板中含有少量的 RNA 和蛋白质不会抑制 TaqDNA 聚合酶的作用, 模板的纯度不会对扩增结果产生明显影响 (图 1)。

2.2.2 模板浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 PCR 反应中对模板浓度要求的范围较宽, 一般每个反应中 5~500 ngDNA 都能提供好的结果, 但不同类群的 DNA 进行 PCR 扩增时, 适合的浓度不同。本实验中模板浓度的测定采用凝胶电泳法, 用 λ DNA 作为对照, 对 10~200 ng 的模板分别进行了 PCR, 发现在此范围内模板浓度对扩增结果基本无影响 (图 1)。

2.3 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响

dNTP 是 PCR 的原料, 常用的浓度范围为 $50\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 浓度过高会产生错误掺入, 浓度太低导致产率太低 (张恒庆等, 1999)。本实验对不同浓度的 dNTP 进行 PCR, 结果表明, dNTP 在 $150\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间扩增结果一致, 在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时条带不够清晰, 在 $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上带型会产生变化, 所以本实验采用 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度, 在此浓度下, 扩增稳定, 重复性强 (图 2)。

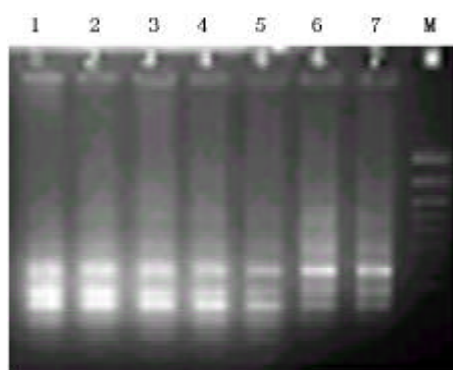


图1 不同模板的 ISSR-PCR 电泳结果

M. 标准分子量 (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1.2 kb, 1 031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp); 1. 胚乳提取模板的扩增图谱; 2. 胚提取模板的扩增图谱; 3. 干叶提取模板的扩增图谱; 4. 未纯化的模板的扩增图谱; 5~7. 每 $20\ \mu\text{L}$ 体系中 40, 10 和 200 ng 模板的扩增图谱, 所用引物为 808 号

Fig. 1 Electrophoresis results of ISSR-PCR with different templates

M. DNA molecular weight markers (3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1.2 kb, 1 031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp); 1. Amplified bands with the template extracted from endosperm; 2. Amplified bands with the template extracted from embryos; 3. Amplified bands with the template extracted from dried leaves; 4. Amplified bands with the unpurified template; 5-7. Amplified bands with the template of 40, 10 and 200 ng (note: the primer number is 808)

重复性强 (图 2)。

2.4 TaqDNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 的影响

在 PCR 反应中, 不同厂家和不同批号的

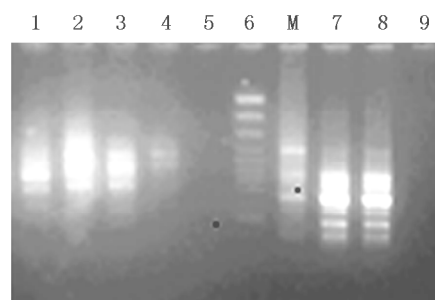


图2 不同浓度TaqDNA聚合酶及dNTP的ISSR-PCR 电泳结果

M. 分子量标准(同上); 1~5. $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTP 对 811 号引物的扩增图谱; 6~9. 2, 1.5, 1 和 0.5 U 的 TaqDNA 聚合酶对 834 号引物的扩增图谱

Fig. 2 Electrophoresis results of ISSR-PCR with different amount of Taq DNA polymerase, dNTP M. DNA molecular weight markers; 1-5. Amplified bands with NO.811 primer and dNTPs of 200, 150, 100 and $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 6-9. Amplified bands with NO.834 primer and Taq DNA polymerase of 2, 1, 0.5 and 0.5 U

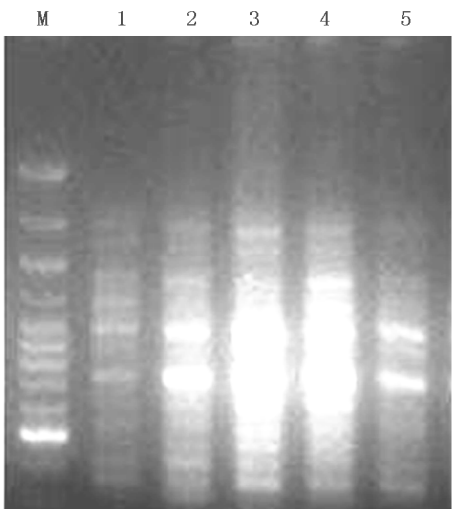


图3 不同浓度引物的 ISSR-PCR 电泳结果
M. 分子量标准(同上); 1~5. 5, 15, 30, 40 和 50 ng 引物浓度的扩增图谱, 所用引物为 834 号
Fig. 3 Electrophoresis results of ISSR-PCR with different amount of primer
M. DNA molecular weight markers; 1-5. Amplified bands with NO.834 primer of 5, 15, 30, 40 and 50 ng

TaqDNA 聚合酶的用量不同。酶的用量是影响PCR的一个重要因素, 浓度过低不能扩增, 浓度太高产生非特异性扩增。本实验采用的酶购自 Promega 公司, 每个反应体系中从0.5~2 U分别进行了扩增实验, 0.5 U时无扩增, 1 U和1.5 U时扩增谱带结果稳定一致, 重复性好, 2 U时带型发生变化, 结果如图 2。由于 TaqDNA 聚合酶的成本较高, 所以在确保实验结果稳定的前提下, 采用了较低的浓度1 U/每个反应体系。

2.5 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响
引物浓度会对PCR的带型产生明显的影响, 浓度过低不能扩增, 浓度太高产生新的位点(邹喻萃, 2001)。为了减少非特异性扩增, 加强重复性, 本实验在确保产量的前提下, 采用了较低的引物浓度为30 ng /20 μ L (相当于0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 结果稳定, 重复性较好(图 3)。

2.6 退火温度对 ISSR-PCR 的影响
微卫星引动的PCR和RAPD-PCR很相似, 退火温度明显影响扩增带的式样。本实验从45~55 $^{\circ}$ C尝试了不同的退火温度, 发现正如 Meyer (邹喻萃等, 2001)在鹰嘴豆种间分析的 ISSR 引物的退火温度时所说, 不同引物具有不同的最适退火温度。本实验在52 $^{\circ}$ C的退火温度下, 在100个引物中筛选出 17 个稳定扩增的引物(表 1)。

2.7 延伸时间对 ISSR-PCR 的影响
在 ISSR 反应中延伸温度一般为 72 $^{\circ}$ C, 除了退火温度外, 延伸时间是另外一个重要影响因素, 延伸时间的长短和扩增片段的长度有关, 两者呈正相关。时间过短, 无法完成扩增,

表1 ISSR引物序列
Table 1 ISSR primer sequences

引物序号与序列	The number of primers and their sequences (5'~3')				
2 核苷酸重复 Dinucleotide	834 (AG) ₈ YT	853 (TC) ₈ RT	818 (AG) ₈ C	848 (CA) ₈ RG	
	828 (TG) ₈ A	808 (AG) ₈ T	809 (AG) ₈ G	823 (TC) ₈ C	
	822 (TC) ₈ A	812 (GA) ₈ A	811 (GA) ₈ C	807 (AG) ₈ T	
	827 (AC) ₈ G	845 (CT) ₈ RG	820 (GT) ₈ C		
4 核苷酸重复 Tetranucleotide	873 (GACA) ₈				
5 '锚定的重复 Primer aimed at 5'-end	884 HBH (AG) ₇				

R 代表 A 和 T, Y 代表 G 和 C, B 代表 C、G 或 T, H 代表 A、C 或 T
R stands for A and T, Y for G and C, B for C, G or T, H for A, C or T

表2 红松ISSR-PCR反应体系

Table 2 The reaction system of ISSR-PCR on Korean pine

成分 Components	母液浓度 Concentrations of stocking solution	反应总体积 20 μL 各成分加入的量(μL) Total reaction volume: 20 μL amount of each component(μL)	每个反应中 各成分的含量 Content of each component in per reaction
ddH ₂ O		11.0	
MgCl ₂	25 mmol·L ⁻¹	1.2	1.5 mmol·L ⁻¹
Primer	15 ng·(μL) ⁻¹	2.0	30 ng
4 × dNTP	10 mmol·L ⁻¹ /each	1.6	0.2 mmol·L ⁻¹
Buffer	10 ×	2.0	1 ×
DNA polymerase	5 U·(μL) ⁻¹	0.2	1 U
Template	10~20 ng·(μL) ⁻¹	2.0	20~40 ng

产量低；时间过长，会产生非特异扩增。本实验进行了 1 min、1.5 min 和 2 min 3 种尝试，发现不同引物最适的延伸时间不同。因为对红松来说，不同引物所扩增的片段大小的范围不同，而且跨度较大，一般在 2.5 kb~300 bp 之间，1 min 时，多数引物无扩增带或带型很少，2 min 时多数引物获得了稳定扩增，带型较为丰富，在本研究中所有引物均采用 2 min 的延伸时间。

2.8 循环次数对 ISSR-PCR 的影响

PCR 的循环次数决定产量，次数太少，产物量极低，次数太多，达到反应平台后，循环不会使产物明显增加，反而引起非特异性扩增。本实验进行了 30、35、40 和 45 次循环的

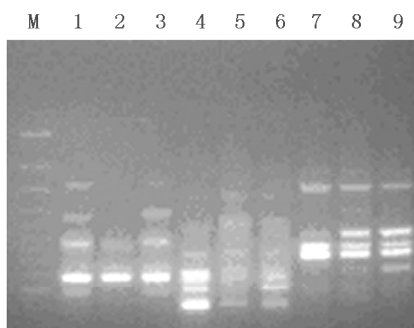


图4 红松ISSR-PCR 电泳图谱

M. 分子量标准(同上); 1~3. 828 号引物对 3 个个体的扩增图谱; 4~6. 827 号引物对 3 个个体的扩增图谱; 7~9. 811 号引物对 3 个个体的扩增图谱

Fig. 4 Electrophoresis results of ISSR-PCR with the template from Korean pine

M. DNA molecular weight markers; 1-3. Amplified bands with NO.828 primer and the templates from 3 independent samples; 4-6. Amplified bands with NO.827 primer and the templates from 3 independent samples; 7-9. Amplified bands with NO.811 primer and the templates from 3 independent samples

尝试，30 个循环时，扩增不稳定，35 个循环时，部分引物的扩增带型较弱，40 和 45 个循环时，扩增结果一致，可见在本实验中，40 个循环已经达到要求了。

实验中 Mg^{2+} 的浓度也是一个重要因素，它对 TaqDNA 聚合酶的活性、退火和产物的特异性都有影响，但对 Mg^{2+} 的浓度的研究进行的较多，已经达到一致，所以本实验不再进行过多的研究，采用每个反应体系中 1.5 mmol·L⁻¹ 的浓度，扩增效果稳定

综上所述，我们得出比较稳定的红松 ISSR-PCR 的反应体系，在 20 μL 的反应体系中， Mg^{2+} 的浓度为 1.5 mmol·L⁻¹，引物的浓度为 1.5 ng·(μL)⁻¹，dNTP 的浓度为 0.2 mmol·L⁻¹，TaqDNA 聚合酶的用量为 1 U，模板 DNA 的用量为 20~40 ng，如表 2。按照此体系，在 52℃ 的退火温度下，延伸 2 min，40 个循环，扩增的重复性好，多态位点丰富(图 4)。

3 讨论

本实验所采用的鲜叶、干叶、胚和胚乳等材料各有优缺点。鲜叶的优点是提取 DNA 得率高, DNA 降解较少, 但不足之处在于野外取样后需要 4°C 保鲜, 不便于长途运输。干叶的优点是野外取样携带方便, 便于保存, 缺点是得率较低, 研磨困难, 所耗费药品较多。从胚中提取 DNA 的优点是得率高, 提取简单, 含有的多糖等杂质少, 而且种子便于携带和长期保存, 但该方法不适合于胚很小的物种。从胚乳中提取 DNA 是可行的, 缺点在于胚乳中含有较多的脂类物质, 十分粘稠, 提取困难, 需要多次抽提。4 种方式各有优缺点, 工作中可结合实际情况来选择。

本实验证实了模板的纯度不会影响扩增结果, 和邹喻萃等(2001)在银杉的 RAPD 实验中提出未纯化的 DNA 不会影响扩增的结论一致。此外, 模板浓度在 10~200 ng 之间扩增结果相同, 说明 ISSR-PCR 对模板浓度的要求范围较宽, 具有很好的可重复性和稳定性。

参 考 文 献

- 克拉尔克著(顾红雅译), 1997. 植物分子生物学实验手册. 北京: 高等教育出版社
- 何予庆, 张宇, 孙梅, 何光存, 王松文, 朱英国, 2001. 利用 ISSR 分子标记研究栽培水稻和野生稻亲缘关系. 农业生物技术学报, 9: 123~127
- 邹喻萃, 葛颂, 王晓东, 2001. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社
- 张恒庆, 安利佳, 祖元刚, 1999. 红松 RAPD 中各种组成成分含量对实验结果的影响. 植物研究, 19: 183~186
- 钱韦, 葛颂, 洪德元, 2000. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 42: 741~750
- 姜静, 刘桂丰, 杨传平, 武金华, 范志勇, 2003. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化. 生态学报, 22(3): 91~93
- Arcade A, Anselin F, Rampant F P, Lesage M C, Paques L E, Prat D, 2000. Application of AFLP, RAPD, and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor Appl Genet*, 100: 299~307
- Jonsson B O, Jonsdottir I S, Cronberg N, 1996. Clonal diversity and allozyme variation in populations of the arctic sedge *Carex bigelowii* (Cyperaceae). *J Ecol*, 84: 449~459
- Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, Ranjekar P K, Brar D S, 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet*, 100: 1311~1320
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H, 1996. Diversity and inheritance of intersimple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet*, 92: 40~45