

棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化

李文表^{1,2}, 周先叶¹, 李 勇², 张寿洲^{2*}

(1. 华南师范大学 生命科学院, 广东 广州 510631; 2. 深圳市仙湖植物园, 广东 深圳 518004)

摘 要: 应用 ISSR 技术对棕榈(*Trachycarpus fortunei*)进行分析研究, 对影响 ISSR 反应的各种因子进行探讨, 确定了该研究的最佳反应条件, 建立了棕榈 ISSR 反应的最佳反应体系, 为进行棕榈居群遗传多样性的研究奠定了基础。

关键词: 棕榈; ISSR 标记; 条件优化

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)02-0204-05

Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei*

LI Wen-biao^{1,2}, ZHOU Xian-ye¹, LI Yong², ZHANG Shou-zhou^{2*}

(1. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China)

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) is a good molecular marker for revealing genetic diversity. Reaction system differed in different species, so optimization of ISSR-PCR reaction is very important. The study discussed mainly the factors impacting the banding patterns of PCR. To optimize the reactions, several parameters were tested, including the concentration of DNA template, $MgCl_2$, dNTP, primer and Taq polymerase with different annealing temperature. Optimal PCR (20 μ L) mix for *Trachycarpus fortunei* contained 10.6 μ L double deionized water, 2.0 μ L 10 $\times$ stock buffer, 0.1 mmol/L of each dNTP, 3.0 mmol/L primer, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 unit of DNA polymerase and 25 ng DNA template.

Key words: *Trachycarpus fortunei*; ISSR marker; Optimization

SSR 是广泛分布于真核生物基因组的简单重复序列 (Simple Sequence Repeat), 由于其可以呈现极高的多态性而被广泛应用。在 SSR 基础上, Zietkiewicz 于 1994 年提出一种新的分子标记——Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) (Zietkiewicz, 1994), ISSR 技术以在 SSR 引物的 3' 端或 5' 端锚定 1~4 个简并碱基作为扩增引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的基因组 DNA 序列进行扩增 (张维铭, 2003)。其优点是在基因组上只有那些与锚定的核苷酸匹配的才能被靶定, 可以避免 SSR 在基因组上的滑动, 提高了扩增的专一性, 而且不需预先知道其

序列信息。目前 ISSR 标记已被迅速应用于居群遗传学、品种鉴定、物种分类与系统学比较以及物种的进化关系等研究 (张维铭, 2003)。

ISSR 技术操作简单, 其原理与 RAPD 相似, 但比 RAPD 更稳定, 多态性更高。就不同植物类群而言, ISSR 的最佳反应条件会有所差别, 主要的影响因子有模板 DNA 浓度、 Mg^{2+} 用量、dNTP 浓度、退火温度、热循环数及不同厂家生产的药品与仪器。目前, 对于 ISSR 反应体系的某些影响因子已有一些初步的研究 (余艳等, 2003; 张志红等, 2004)。

棕榈 (*Trachycarpus fortunei*) 分布于中国, 日

收稿日期: 2004-12-27 修回日期: 2005-05-16

作者简介: 李文表 (1977-), 女, 河北武邑人, 硕士研究生, 从事棕榈居群生物学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: <shouzhou@msn.com>.

本、缅甸也有分布,因其独特的外形而倍受人们喜爱,在园林上得到广泛应用(裴盛基等,1991;刘海桑,2002)。此外还具有较高的经济价值,与人们的生产、生活密切相关,用其叶鞘纤维制造的棕绳、棕毛刷等纤维产品被广泛应用,全身可药用(裴盛基等,1991)。目前已经有一些有关棕榈科植物分子系统学方面的研究,如 Hahn(2002)和 Baker 等(2000)利用 *atpB*, *rbcL*, 18S nrDNA 和 5S nrDNA 序列研究棕榈植物的系统关系;Loo 等(1989)用 RAPD 方法对 *Licuala glabra* var. *glabra*; Haymes 等(2004)用 AFLP 和 SSR 对海枣(*Phoenix dactylifera*)进行了遗传多样性研究。而用 ISSR 分子标记来研究棕榈科植物,至今未见报道。由于棕榈类植物含有较多的糖类、酚类等杂质(Aichitt 等,1993),提取的 DNA 的纯度不够高,对反应条件可能会有一些影响,故对 ISSR 反应条件进行筛选和优化是非常必要的。

本文以棕榈的基因组 DNA 为模板,在 20 μL 反应体系中,以较常用的 807 (AG)₈T, 835 (AG)₈YC, 836 (AG)₈YA, 842 (GA)₈YG 为引物,用宝生物工程(大连)有限公司和广州华美公司生产的 Taq DNA 聚合酶探讨 ISSR 反应条件优化。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用棕榈材料来自云南、广西、湖南三个省的 12 个自然居群及部分栽培个体。共采集到 260 个样本,从中随机选取 10 个样本用于本实验的分析。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用改进的 CTAB (hexadecyl-Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 法从棕榈叶中提取基因组 DNA(邹喻苹等,2001),融于 0.1 $\times$ TE,并稀释到 25 ng/ μL ,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

在 DNA 提取过程通过多抽提两次,分别用 70% 和无水酒精洗涤两次来纯化。

1.2.2 PCR 扩增 本文通过对棕榈 ISSR 反应体系中模板 DNA 的含量、 Mg^{2+} 的浓度、dNTP 的用量、引物的浓度及退火温度设置不同梯度,依次对其进行筛选优化。此外还对生产厂家的 PCR 仪以及不同生产厂家生产的 Taq DNA 聚合酶扩增效果进行

比较。起始反应体系:20 μL 体系中含 2.0 μL 10 $\times$ stock buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.75 mmol/L MgCl_2 , 50 ng DNA 模板, 1.0 U Taq 聚合酶,以双蒸水补足体系至 20 μL 。dNTP 和引物是由上海生工生物公司生产的, Taq DNA 聚合酶由宝生物公司和华美公司提供,反应在 eppendorf 梯度 PCR 仪和 MJ Research PTC-100TM 仪上进行。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 7 min。扩增结果用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外光 UV 凝胶自动成像系统成像。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 ISSR 反应体系的影响

模板 DNA 量设置了 6 个梯度: 12.5、25、37.5、50、62.5 ng 和 75 ng。研究结果表明,在一定范围内模板 DNA 含量对棕榈 ISSR 扩增结果的影响较小,以上均能看到扩增条纹,但 12.5 ng 的模板扩增出的条带较弱,当模板含量高于 50 ng 时,出现成片产物,而且反应不稳定。考虑棕榈类植物基因组 DNA 中含有的酚类等杂质较多(Aichitt 等,1993),在实验中用普通方法提取的 DNA 和经过纯化处理的 DNA 作为模板,比较其扩增结果。发现模板 DNA 纯度对扩增结果影响不大,最终采用较低的 DNA 模板含量 25 ng。

2.2 Mg^{2+} 对棕榈 ISSR 的影响

本研究设置了终浓度为 0、1.5、1.25、2.5、2.75 mmol/L 和 3.0 mmol/L 五个 Mg^{2+} 浓度梯度。试验结果表明,没有 Mg^{2+} 不能扩增出任何条带;当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时,扩增效果最佳(图 1)。

2.3 dNTP 浓度对 ISSR 反应的影响

在本研究中设置 0.025 mmol/L、0.05 mmol/L、0.075 mmol/L、0.1 mmol/L、0.15 mmol/L 和 0.2 mmol/L 6 个浓度梯度进行比较。研究发现, dNTP 浓度小于 0.05 mmol/L 时扩增出的条带模糊,浓度高于 0.15 mmol/L 时结果不稳定,当 dNTP 浓度为 0.1 mmol/L 时扩增出的条纹最佳。

图 1 与图 2 中每个梯度设置一个重复(图 1、2)。

2.4 引物浓度对 ISSR 反应的影响

本文在 20 μL 体系中,对引物浓度设置了 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L

和 0.5 mmol/L 五个梯度。比较发现 0.3 mmol/L 的引物能够扩增出清晰、重复性好的条纹。



图 1 Mg^{2+} 浓度试验

Fig. 1 Testing of Mg^{2+} concentration

引物 808(AG)₃C 和引物 857(AC)₃YG 的电泳图谱, Mg^{2+}

浓度分别为 1.5, 1.75, 2.5, 2.75 和 3.6 mmol/L.

Amplified results of primer 807(AG)₃C and primer 857(AC)₃YG, testing concentration were 1.5, 1.75, 2.5, 2.75 and 3.6 mmol/L.



图 2 退火温度扩增试验

Fig. 2 Testing of annealed temperature

引物 807(AG)₃T 和引物 844(CT)₃RC 的电泳图谱, 退火温度分别为 50, 51, 52, 53, 54, 55 °C.

Amplified results of primer 808(AG)₃T and primer 844(CT)₃RC, The temperature were 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C.

2.5 退火温度及热循环数对 ISSR 的影响

根据 ISSR 引物计算出的退火温度在 52 °C 左右, 设置了 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C 六个梯度进行试验。结果发现 50 °C, 51 °C, 55 °C 不能扩增出任何条纹, 大多数引物 52 °C 时能扩增出稳定清晰的条带。因此, 52 °C 的退火温度为本研究最佳退

火温度(图 2)。

2.6 Taq DNA 聚合酶与 PCR 厂家及型号的不同对 ISSR 扩增效果的影响

本研究分别用宝生物工程(大连)有限公司生产的 Taq DNA 聚合酶设置了 0.5 U、1.0 U 和 1.5 U 三个梯度。结果表明, 在 20 μ L 体系中, Taq DNA 聚合酶的量为 0.5 U 时, 条带较弱, 且扩增结果不稳定, 故认为 1 U Taq DNA 聚合酶为最佳反应量。用华美公司生产的 Taq DNA 聚合酶进行同样的摸索试验, 得到同样的结论, 说明使用宝生物工程(大连)有限公司和华美公司生产的 Taq DNA 聚合酶对棕榈 ISSR 扩增结果影响不大。

本实验在爱普生(eppendorf)公司梯度 PCR 仪上对棕榈基因组 DNA 进行 ISSR 反应条件的筛选与优化。再在 MJ Research 公司的 PTC-100™ 的 PCR 仪上进行。

两次不同药品与仪器的试验结果发现 ISSR 的最佳反应条件相同, 说明此研究筛选优化的 ISSR 扩增条件可重复性好, 稳定性高, 受仪器型号和药品批号的影响不大。

2.7 反应条件的确定

经过反复试验表明, 棕榈 ISSR 20 μ L 的最佳反应体系为: 10 $\times$ buffer 2.0 μ L, 0.1 mmol/L dNTP, 0.3 mmol/L 引物, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 25 ng 模板 DNA, 1 U Taq DNA 聚合酶, 以双蒸水补足体系至 20 μ L。最佳反应程序: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环, 72 °C 最后延伸 7 min。此反应条件扩增出的条带清晰, 可重复性好(图 3)。

3 讨论

PCR 扩增容易受到诸多因素的影响: 如模板 DNA 的用量与纯度、dNTP 用量、引物浓度、 $MgCl_2$ 的用量及扩增程序与循环数等。基因组 DNA 是体外扩增的模板, 其用量和纯度直接影响 PCR 的产量和效率。ISSR 对 DNA 模板的许可范围较大, 5~50 ng 范围的 DNA 均能提供较好的结果(邹喻苹等, 2001)。ISSR 对模板浓度与纯度要求并不是很高(张志红等, 2004; 冯富娟等, 2004), 本实验未对模板 DNA 进行纯化, 同样得到较好的扩增结果。dNTP 是 PCR 的原料, 其浓度直接影响扩增效果, 浓度过高会导致错误掺入; 浓度过低, 扩增产物少,

而且有可能使产物单链化, dNTP 一般浓度为 0.05~0.2 mmol/L(张维铭, 2003)。引物浓度太低无扩增产物, 太高会造成模板与引物的错配, 甚至形成引物二聚体(张维铭, 2003)。引物浓度一般为 0.1~1.5 mmol/L(王建波, 2002)。Taq DNA 聚合酶是 PCR 反应的催化剂。Taq DNA 聚合酶量少会影响

扩增的产率, 浓度过高又会造成浪费。聚合酶要靠二价阳离子 Mg^{2+} 激活才能发挥其作用, 故优化 Mg^{2+} 对 PCR 反应, 尤其对 ISSR 是非常重要的。实验中 Mg^{2+} 对 ISSR 反应的影响十分明显。一般的 PCR 反应中 Mg^{2+} 浓度为 1.5~2.0 mmol/L(张维铭, 2003)。

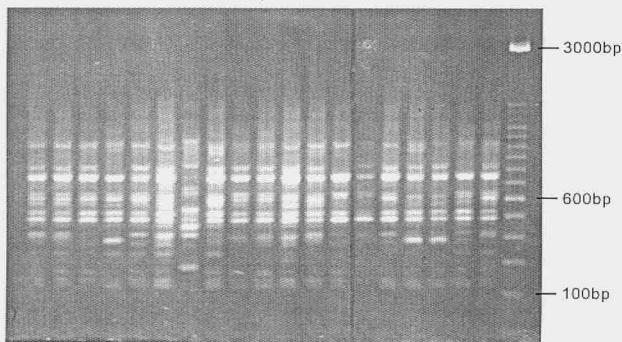


图 3 引物 810 用优化后的反应条件对棕榈部分样品的扩增谱带
Fig. 3 The ISSR profile from primer 810 for some sample with the optimized condition

最佳扩增程序提供 PCR 最佳扩增效果。反应程序中对扩增效果影响最大的是退火温度。退火温度由引物长度及 GC 含量决定, 具体可由公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 确定(张维铭, 2003), 退火温度一般取 $T_m - 5^\circ C$ 。但事实上 T_m 值受到各反应成分的浓度影响很大, 故由 T_m 计算出的退火温度只是一个大致值, 具体 PCR 反应仍需要具体摸索。有些研究认为不同引物具有不同的最适退火温度(余艳等, 2003; 王建波, 2002; 冯富娟等, 2004; 廖文芳等, 2004), 但另外也有研究表明对同样材料不同的 ISSR 引物用同样的退火温度即可扩增出稳定的、多态性高的产物(肖龙莺等, 2003; 葛永奇等, 2003; Qiu 等, 2004; Adams 等, 2003; Hatcher 等, 2004)。本实验每个引物均在 $52^\circ C$ 的退火温度时能够扩增出清晰、稳定的条带。在此退火温度下从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条能够扩增出稳定、清晰、多态性高条带的引物, 与后者的研究结果一致。

ISSR 反应特异性和稳定性都很强(冯富娟等, 2004)。用宝生物公司生产的 TaqDNA 聚合酶在 eppendorf 梯度循环仪上进行筛选优化最佳 ISSR-PCR 反应条件。同样的条件用华美公司生产的聚

合酶 MJ Research 公司的 PTC-100™ 循环仪上进行同样的试验, 得到同样较好的扩增效果。说明优化后的 ISSR 反应条件具有很高的稳定性和可重复性。不同型号的 PCR 循环仪与不同公司生产的 Taq 酶的筛选优化结果相同, 验证了 ISSR 反应的可重复性高, 稳定性好的特点。这说明, 稳定、可重复性好的理想 ISSR 反应条件是可以经过反复筛选与优化得到的。

本实验稳定的 ISSR 反应体系可以为棕榈 ISSR 实验的后续工作提供参考, 特别是可为运用 ISSR 技术进行棕榈遗传多样性研究奠定一定的基础。该研究对探讨影响 ISSR 反应的影响因子及进行有关实验具有一定的参考价值。

参考文献:

- 刘海桑, 2002. 观赏棕榈[M]. 北京: 科学出版社, 303.
- 邹喻平, 葛 颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 9-26.
- 张维铭. 2003. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 249-252.
- 裴胜基, 陈三阳, 童绍金. 1991. 中国植物志(1)[M]. 北京: 科学出版社, 11-13.
- Adams RP, Schwarzbach AE, Pandey RN. 2003. The concord-

- ance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotype; an example from *Juniperus* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 375—387.
- Aichitt M, Ainsorth CC, Thangavelu M. 1993. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. *Plant Mol Bio Rep*, **11**(4): 317—319.
- Baker WJ, Hedderson TA, Dransfield J. 2000. Molecular phylogenetic of calamus (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**(2): 218—231.
- Feng FJ (冯富娟), Wang FY (王凤友), Liu T (刘彤). 2004. The influence factors of the ISSR-PCR experiment system on *Pinus koraiensis* Sieb. Et Zucc (红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素) [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **21**(3): 326—331.
- Ge YQ (葛永奇), Qiu YX (邱英雄), Ding BY (丁炳扬), et al. 2003. An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba* (孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析) [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**(4): 276—287.
- Hahn WJ. 2002. A molecular phylogenetic study of the Palmae (Arecaceae) based on aptB, rbcL and 18S nrDNA sequences [J]. *Systematic Biology*, **51**(1): 92—112.
- Hatcher PE, Wilkinson MJ, Albani MC, et al. 2004. Conserving marginal populations of food plant (*Impatiens noli-tangere*) of an endangered moth (*Eustroma reticulatum*) in a changing climate [J]. *Biological Conservation*, **116**: 305—317.
- Haymes KM, Ibrahim IA, Mischike S, et al. 2004. Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree tropes [J]. *J Agric Food Chem*, **52**: 5 456—5 462.
- Liao WF (廖文芳), Xia NH (夏念和), Deng YF (邓云飞), et al. 2004. Study on genetic diversity of *Manglietia decidua* (Magnoliaceae) (华木莲的遗传多样性研究) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **26**(1): 58—64.
- Loo AHB, Tan HTW, Kumar PP, et al. 1989. Population analysis of *Licuala glabra* var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling [J]. *Annals of Botany*, **84**: 421—427.
- Qiu YX, Hong DY, Fu CX, et al. 2004. Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**: 583—596.
- Wang JB (王建波). 2002. ISSR markers and their applications in plant genetics (ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用) [J]. *Hereditas* (遗传), **24**(5): 613—616.
- Xiao LQ (肖龙寿), Ge XJ (葛学军), Gong X (龚洵), et al. 2003. Genetic diversity of *Cycas guizhouensis* (贵州苏铁遗传多样性研究) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25**(6): 648—652.
- Yu Y (余艳), Chen HS (陈海山), Ge XJ (葛学军). 2003. Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers (简单重复序列区间) (ISSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), **11**(1): 15—19.
- Zhang ZH (张志红), Tan FX (谈凤笑), He HH (何航航), et al. 2004. Optimization of ISSR analysis for *Excoecaria agallocha* L. (红树植物海漆 ISSR 条件的优化) [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报(自然科学版)), **43**(2): 63—66.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, **20**: 176—183.

(上接第 136 页 Continue from page 136)

- flora from Guangdong (广东种子植物区系地理成分研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), **14**(4): 307—320.
- Ma HJ (马洪菊), He P (何平), Chen JM (陈建民), et al. 2002. On the protection of the resources of the rare and endangered plants in Chongqing (重庆市珍稀濒危植物的现状与保护对策) [J]. *J Southwest China Normal Univ (Nat Sci)* (西南师范大学学报(自然科学版)), **27**(6): 932—938.
- Wu ZY (吴征镒). 1991. The areal-types of the China genera of seed plants (中国种子植物属的分布区类型) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 增刊: 1—139.
- Wu ZY (吴征镒), Zhou ZK (周浙昆), Li DZ (李德铎), et al. 2003. The areal-types of the world families of seed plants (世界种子植物科的分布区类型统计) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25**(3): 245—257.
- Yuan XF (袁小凤), He P (何平), Ma WH (马文辉), et al. 1999. On the protection of the resources of rare and endangered plants in Three-Gorge Reservoir Area (三峡库区珍稀濒危植物的现状与保护对策) [J]. *J Southwest China Normal Univ (Nat Sci)* (西南师范大学学报(自然科学版)), **24**(4): 180—185.
- Zou XH (邹新慧), He P (何平), Chen JM (陈建民). 2002. Studies on floristic elements of rare and endangered plants and national conservative plants in Yunnan (云南省珍稀濒危植物及国家保护植物区系成分分析) [J]. *J Southwest China Normal Univ (Nat Sci)* (西南师范大学学报(自然科学版)), **27**(6): 939—944.