

# 亮叶蜡梅 ISSR 反应体系的建立与优化

周明芹<sup>1</sup> 阮锐<sup>2</sup> 陈龙清<sup>2</sup>

1. 长江大学园艺园林学院, 荆州 434025; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

**摘要** 为了建立和优化亮叶蜡梅(*Chimonanthus nitens* Oliv.)的 ISSR 反应体系,对模板 DNA 的浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度等影响因子进行了筛选。结果表明:在 25  $\mu$ L 的反应体系中,含有 40 ng 模板 DNA、1 U *Taq* 酶、0.2 mmol/L dNTP、0.3  $\mu$ mol/L 引物、1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer 的扩增效果最好。利用该优化的反应体系,筛选出了 12 条稳定性强、清晰度高、多态性高的 ISSR 引物,并对筛选出的 12 条引物在不同退火温度(51~56  $^{\circ}$ C)下的扩增效果进行了比较,从而确定了每个引物的最佳退火温度。

**关键词** 亮叶蜡梅; PCR 条件; ISSR 反应体系

**中图分类号** S 685.99 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0167-04

亮叶蜡梅(*Chimonanthus nitens* Oliv.)系蜡梅科蜡梅属植物,自然分布于湖北宜昌,湖南新宁、江华,广西阳朔,江西南部及浙江中南部<sup>[1]</sup>,其枝叶繁茂,叶色亮绿并有光泽,观赏价值高;且生性强健、易繁殖、耐粗放管理,是很好的街道绿化及园林美化树种。

ISSR (inter-simple sequence repeat)也称锚定简单重复序列(anchored simple sequence repeats, ASSR),是由 Zietkiewicz 等<sup>[2]</sup>提出的。虽然该标记为显性标记,但是它具有引物设计简单、利用率高、稳定性强、重复性好、多态性高、操作过程简便快捷、成本低等优点,已经被广泛地用于植物的亲缘关系分析<sup>[3]</sup>、遗传图谱的构建<sup>[4]</sup>、品种的鉴定与分类<sup>[5]</sup>、种群的遗传结构评价及遗传多样性分析<sup>[6]</sup>等方面。

目前,关于亮叶蜡梅的研究主要涉及花粉形态、叶表皮特征、解剖结构及同工酶等方面,而用 ISSR 标记技术对其进行相关的研究还未见报道。由于 ISSR 标记技术也是基于 PCR 的一种标记,其扩增结果受到多种因素的影响。高质量的总 DNA、优化的 PCR 反应体系及扩增条件是获得可靠分子标记结果的前提。笔者通过对模板 DNA 的浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度等影响因子的筛选,建立起亮叶蜡梅的优化 ISSR 反应体系,为以后用 ISSR 标记研究亮叶蜡梅的遗传多样性及其种群的遗传结构奠定

基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以采自湖南江华和浙江龙泉的 2 个亮叶蜡梅自然居群的单株为试验材料。每个居群内样品的采集采取随机取样的方法,相邻单株间的距离保证 10 m 以上,并且尽可能地分布于整个居群。从植株上尽量选取无病虫害感染的叶片 8 片左右,先用自来水将叶片上的灰尘冲洗干净,再用吸水纸将叶片上残留的水分吸干,然后剪掉叶柄和主叶脉,最后用变色硅胶干燥保存。

### 1.2 试验方法

1) 叶片总 DNA 的提取。参照 Loh 等<sup>[7]</sup>的 CTAB 法并加以改良来提取叶片基因组 DNA。具体步骤如下:①称取 0.4 g 经硅胶干燥保存的叶片,于液氮中研磨至粉末,迅速转移到 10 mL 离心管中;加入 6 mL 不含 CTAB 的缓冲液(含有 200 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、50 mmol/L EDTA、250 mmol/L NaCl、2% PVP)及 50  $\mu$ L 2-巯基乙醇,65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。②10 000 r/min 离心 12 min,弃上清液;往沉淀中加入 5 mL 65  $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ CTAB 提取液(含有 2% CTAB、100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、50 mmol/L EDTA pH 8.0、1.4 mol/L

收稿日期: 2010-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571310)和湖北省自然科学基金项目(2010CDB04404)

周明芹,博士,讲师,研究方向: 园林植物种质资源的利用及分子生物学。E-mail: zhoulmqzds@126.com

通讯作者: 陈龙清,博士,教授,研究方向: 园林植物种质资源的利用与创新。E-mail: chenlq0206@126.com

NaCl),65℃水浴 45 min。③10 000 r/min 离心 12 min 后,取上清液加入等体积的氯仿/异戊醇(24∶1),充分混匀,冰上静置 10 min;重复该步骤 1 次。④10 000 r/min 离心 12 min,取上清液,加入等体积的异丙醇于-20℃沉淀 DNA 20 min。⑤10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀,用 75%的乙醇清洗沉淀 3 次,每次 30 min。⑥用适量的 TE 缓冲液溶解 DNA,并加入 5 μL RNaseA 于 37℃水浴 30 min 消化 RNA。⑦重复步骤③、④、⑤,但此次改用 2 倍体积 95%乙醇加 0.1 体积 3 mol/L 醋酸钠沉淀 DNA。⑧最后用 150 μL 的 TE 缓冲液溶解 DNA。

2)ISSR 分析及相关条件筛选。①PCR 反应体系的优化。模板 DNA 的浓度、*Taq* 酶的用量、引物浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度及 dNTP 浓度等因素都会影响扩增的结果。经过多次试验比较发现每个 PCR 反应(反应体系为 25 μL)加 1 U *Taq* 酶和 0.2 mmol/L dNTP,扩增结果比较好。在保持这 2 个条件不变的情况下,进一步筛选了引物浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度及模板 DNA 的浓度,见表 1(表中 1~18 表示参与筛选的反应体系的编号)。②引物筛选。引物序列由加拿大 UBC 大学提供,引物合成由 Invitrogen 公司完

表 1 ISSR-PCR 反应体系的筛选

Table 1 The selection of the optimal ISSR-PCR reaction system			
编号 Number	模板 DNA 的用量/ng Concentration of template DNA	引物浓度/(μmol/L) Concentration of primers	Mg <sup>2+</sup> 浓度/(mmol/L) Concentration of Mg <sup>2+</sup>
1	30	0.2	1.5
2	30	0.2	1.8
3	30	0.2	2.0
4	30	0.3	1.5
5	30	0.3	1.8
6	30	0.3	2.0
7	30	0.4	1.5
8	30	0.4	1.8
9	30	0.4	2.0
10	40	0.2	1.5
11	40	0.2	1.8
12	40	0.2	2.0
13	40	0.3	1.5
14	40	0.3	1.8
15	40	0.3	2.0
16	40	0.4	1.5
17	40	0.4	1.8
18	40	0.4	2.0

成。随机从浙江龙泉居群和湖南江华居群中各取 1 个 DNA 样品,利用优化的反应体系,退火温度 52℃,对合成的 38 条 ISSR 引物进行初步筛选。由于每条引物的最佳退火温度不一样,选择 51、52、53、54、55、56℃等 6 个退火温度,对初步筛选出来的引物进一步进行退火温度的比较试验,以确定每个引物的最佳退火温度。③PCR 扩增程序。94℃,4 min;94℃,45 s,51~56℃,45 s,72℃,100 s,38 个循环;72℃,7 min。④琼脂糖凝胶电泳。以 1×TAE 为电泳缓冲液,取 10 μL 的扩增产物在含有 0.5%EB 的 1.6%琼脂糖凝胶上电泳 2 h 左右(5 V/cm)。电泳结束后利用凝胶成像系统拍照并保存。

2 结果与分析

2.1 优化的 ISSR 反应体系

通过对上述 18 个反应体系的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测,观察比较电泳图谱,确定体系 13 的扩增效果最好,即在 25 μL 的反应体系中,含有 40 ng 模板 DNA、1 U *Taq* 酶、0.2 mmol/L dNTP、0.3 μmol/L 引物、1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、2.5 μL 10×buffer。

2.2 引物的筛选及多态性

利用优化的 ISSR 反应体系,从 38 个 ISSR 引物中筛选出了 12 个引物,引物的序列及最佳的退火温度见表 2。该 12 个引物因为均能够扩增出清晰、重现性好、多态性高的条带,可用于亮叶蜡梅的 ISSR 分析(图 1、图 2、图 3)。

3 讨论

本研究中所用的改良 CTAB 法提取的亮叶蜡梅基因组 DNA 的质量好、纯度高,完全能满足亮叶蜡梅 ISSR-PCR 扩增的要求。

影响 ISSR 标记结果的因素很多,为了获得重复性好和可靠性较高的扩增带谱,提高分析的准确性,必须对反应体系进行优化。根据本试验的结果,在保持 *Taq* 酶和 dNTP 浓度不变的前提下,引物和 Mg<sup>2+</sup> 的浓度以及引物的退火温度对扩增结果的影响比较大。Mg<sup>2+</sup> 浓度不仅影响了 *Taq* DNA 聚合酶的活性,而且对退火温度及产物的特异性有影响<sup>[8]</sup>。

引物浓度是特异性扩增的关键,引物浓度过低不能扩增,浓度过高会降低 PCR 扩增的特异性,增

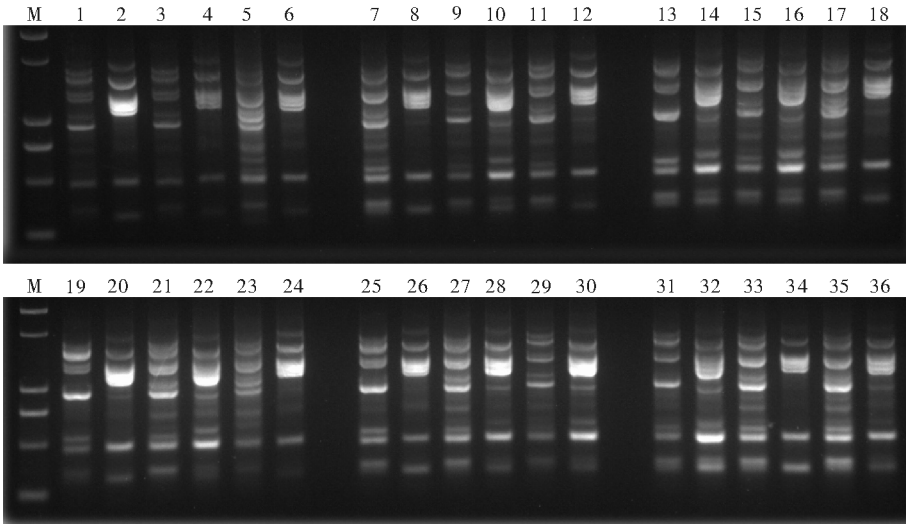
加形成引物二聚体的概率<sup>[9]</sup>。退火温度不仅与引物 进行 ISSR 标记之前,确定每个引物的退火温度非 的序列有关,而且与物种 DNA 的序列有关,因此在 常重要<sup>[10]</sup>。

表 2 筛选出的 12 个 ISSR 引物的序列及其退火温度<sup>1)</sup>

Table 2 The sequences and annealing temperature of the 12 selected ISSR primers

引物 Primers	序列 Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	引物 Primers	序列 Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
ISR1	(AG) <sub>8</sub> T	52	ISR13	(TG) <sub>8</sub> G	55
ISR3	(AG) <sub>8</sub> YT	52	ISR14	(TG) <sub>8</sub> RT	52
ISR4	(AG) <sub>8</sub> C	55	ISR15	(GA) <sub>8</sub> YC	52
ISR7	(AG) <sub>8</sub> YA	55	ISR19	(GA) <sub>8</sub> YT	52
ISR9	(AC) <sub>8</sub> YG	52	ISR20	(GT) <sub>8</sub> YG	52
ISR11	(AC) <sub>8</sub> YT	53	ISR21	(CA) <sub>8</sub> T	52

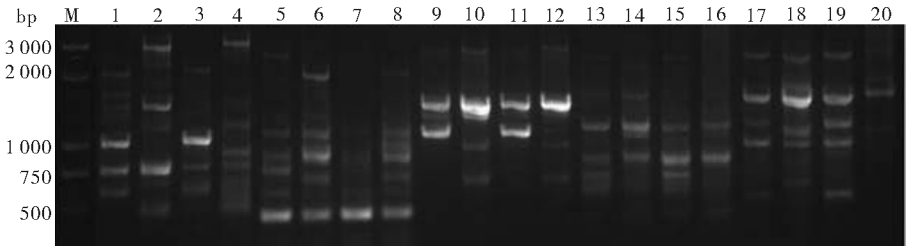
1)R=A,G; Y=C,T.



M. Marker; 1,2,3,4,5,6,..... 35,36 道分别为反应体系 1,2,3,.....,18 扩增的带型 The samples in 1-2,3-4,.....35-36 lanes were from reaction system 1,2,.....,18, respectively.

图 1 反应体系的电泳图谱

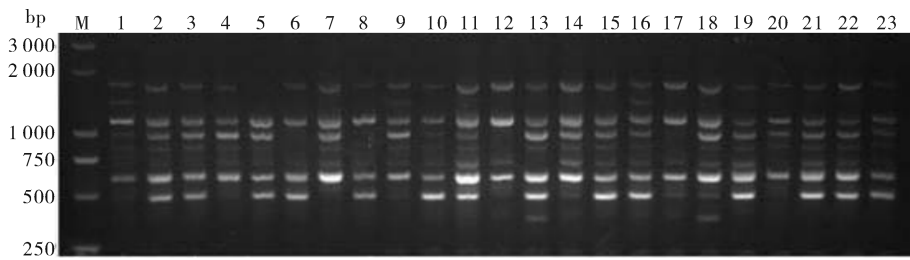
Fig.1 The electrophoretic gel of the reaction system used in this work



M. Marker; 1~4,5~8,9~12,13~16,17~20 道分别为引物 ISR9,ISR10,ISR11,ISR12,ISR13 扩增的带型 The bands in the lanes of 1-4,5-8,9-12,13-16,17-20 were amplified using primers ISR9,ISR10,ISR11,ISR12,ISR13, respectively; 1,3,5,7,9,11,13,15,17, 19 道的模板 DNA 从浙江龙泉居群同一单株上获得 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19 lanes shared the same template DNA (ZJLQ21);2,4, 6,8,10,12,14,16,18,20 道的模板 DNA 从湖南江华居群同一单株上获得 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 lanes shared the same tem- plate DNA (HNJH10);1,2,5,6,9,10,13,14,17,18 道的退火温度均为 52℃; 3,4,7,8,11,12,15,16,19,20 道的退火温度均为 55℃ The annealing temperature of the lanes of 1,2,5,6,9,10,13,14,17 and 18 was 52℃,the annealing temperature of the lanes of 3,4,7, 8,11,12,15,16,19 and 20 was 55℃.

图 2 部分 ISSR 引物的退火温度比较

Fig.2 The comparative analysis of annealing temperature of some ISSR primers



M. Marker; 1~23 为来自浙江龙泉居群的样品 1-23 lanes represent the samples from population ZJLQ.

图 3 引物 ISR7 对浙江龙泉居群(ZJLQ)部分样品的扩增

Fig. 3 The amplified bands of the samples from population ZJLQ using primer ISR7

参 考 文 献

[1] 陈龙清,陈俊愉. 蜡梅属植物的形态、分布、分类及其应用[J]. 中国园林,1999,15:76-77.

[2] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics,1994,20:176-183.

[3] 张靖国,胡红菊,徐育海,等. 部分湖北海棠种质的鉴定及亲缘关系分析[J]. 华中农业大学学报,2009,28(6):736-740.

[4] LEVI J, THMAS C E, TREBITSH T, et al. An extended link-age map for watermelon based on SRAP, AFLP, SSR, ISSR, and RAPD markers [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2006,131:393-402.

[5] ZHAO W, MIAO X, ZANG B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR mark-ers [J]. Acta Genetica Sinica, 2006,33:851-860.

[6] 胡磊,高丽,杨波. 利用磁珠富集法开发花桐木微卫星引物[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5):629-633.

[7] LOH J P, KIEW R, KEE A, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the i-identification of *Caladium bicolor* cultivars[J]. Ann Bot, 1999, 84:155-161.

[8] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化-学工业出版社,2005:108-127.

[9] 魏小玲,曹福祥,陈建. 海南木莲基因组 DNA 提取及 ISSR 反应-体系的优化[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(5):91-96.

[10] 褚云霞,汤庚国,张永春,等. 蜡梅 ISSR 反应体系的优化[J]. 北方园艺,2007(10):161-163.

Establishment and optimization of ISSR reaction  
system for *Chimonanthus nitens* Oliv.

ZHOU Ming-qin<sup>1</sup> RUAN Rui<sup>2</sup> CHEN Long-qing<sup>2</sup>

1. College of Horticulture and Garden, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;  
2. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Based on screening several key reaction conditions of ISSR (inter-simple sequence repeat) markers, such as the concentrations of template DNA, primers and Mg<sup>2+</sup>, an optimal ISSR reaction system for *Chimonanthus nitens* was established, namely, 40 ng genomic DNA, 0.3 μmol/L primer, 1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 1 U Taq, 0.2 mmol/L dNTP, and 2.5 μL 10× buffer were contained in 25 μL reaction system. Using this optimal ISSR reaction system, 12 polymorphic primers were screened out. Furthermore, the best annealing temperature of the every selected primer was decided according to the amplified results with different temperatures among 51 °C and 56 °C.

**Key words** *Chimonanthus nitens*; PCR conditions; ISSR reaction system

(责任编辑:陆文昌)