

文章编号:1673-7636(2009)05-0291-05

剑麻 ISSR 反应体系的建立与分析

张燕梅,李俊峰,陆军迎,周文钊*,梁辉,张浩,戴梅莲
(中国热带农业科学院亚热带作物研究所 广东 湛江 524091)

摘要:本文研究了模板 DNA 浓度、镁离子浓度、引物浓度、dNTP 及酶含量、退火温度及反应缓冲液中明胶或 BSA 含量等对 ISSR 反应体系的影响,通过优化反应条件初步建立了适合于剑麻 ISSR 反应的扩增体系,为进一步利用 ISSR 分子标记开展剑麻遗传多样性分析,种质资源鉴定和分子标记辅助育种等研究提供参考。

关键词: 剑麻; ISSR

中图分类号 S563.8 文献标志码 A

Establishment and Analysis of ISSR Reaction System for Sisal

ZHANG Yan-mei, LI Jun-feng, LU Jun-ying, ZHOU Wen-zhao*,
LIANG Hui, ZHANG Hao, DAI Mei-lian

(South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences,
Zhanjiang Guangdong 524091, China)

Abstract: The main influencing factors of ISSR were studied and the experiment parameters were optimized. By adjusting the concentrations of DNA template, Mg^{2+} , dNTP primer, the contents of *Taq* DNA polymerase, annealing temperature and PCR buffer (BSA or gelatin plus/free), a satisfactory ISSR reaction system for sisal was established. The results would provide reference for genetic diversity analysis, germplasm identification and marker-assisted selection of sisal with ISSR marker.

Key words: sisal; inter-simple sequence repeat (ISSR)

剑麻是我国主要的热带纤维作物,其纤维具有拉力强、抗撕裂、耐磨、防腐等,广泛应用于国防、航海、交通运输、石油、冶金等领域^[1]。近年来,天然纤维消费的时尚性和剑麻产品的不可替代性使剑麻产品凸现出巨大的市场空间,大大推动了剑麻产业的发展。由于剑麻生命周期长,有性杂交育种效率低,剑麻育种已开始由常规育种向分子育种跨越。国外近几年在剑麻抗病育种^[18]、体胚发生和植株再生^[9,13,15]、遗传转化^[5]以及遗传多样性分析^[6,7,17]等方面取得了一定进展。在国内,利用分子标记辅助育种及转基因导入外源或自身抗病基因等方法来培育剑麻抗病新品种是目前研究的热点。

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)是 Zietkeiwicz 等于 1994 年发展起来的一种微卫星基础上的分子标记。其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物,即在 SSR 的 3' 或 5' 端锚定 1-4 个简并碱基,在 PCR 反应中,锚定引物与基因组中特定位点结合,导致与锚定引物互补的间隔不太大的反向排列的重复序列间 DNA 片段扩增,避免了 SSR 在基因组上的滑动,大大提高了 PCR 扩增的专一性^[20]。ISSR 引物具有物种间通用性好,多态性较高,检测方便且费用低等特点,目前已广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性分析及进化研究等^[14]。

收稿日期:2009-06-30

基金项目:中国热带农业科学院亚热带作物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(sscri200802)、国家麻类产业技术体系建设专项资金资助项目(项目编号:nycytX-19-E02)和 2007 年公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-018)

作者简介:张燕梅(1975-),女,博士,助理研究员,主要从事作物遗传育种研究。Tel: 07592859216 E-mail:zhangyanmei0710@126.com

* 通讯作者:zwenzhao@163.com

本研究对影响剑麻 ISSR 反应体系的因素进行分析,初步建立了适合于剑麻的 ISSR 反应体系,为下一步利用 ISSR 分子标记技术开展剑麻研究奠定基础。

1 试验材料

本研究所用试验材料为中国热带农业科学院亚热带作物研究所剑麻种质资源圃的 57 份剑麻品种或品系。从当年生的吸芽上采集嫩叶用来提取总 DNA,ISSR 引物序列为加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的 100 条 ISSR 引物,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

2 试验方法

2.1 DNA 提取及质量检测

采用天泽公司的柱式植物 DNAout 试剂盒提取,试验材料经液氮快速研磨后先加入 750 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的裂解液,充分混匀后 65 $^{\circ}$ C 预热 5-10 分钟,室温 13,000 rpm 离心 5min,取上清液 500 μ l 分别进行抽提、漂洗后过柱,最后用 100 μ l 洗脱液洗脱 2 次,加入适量的 RNA 酶,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

取 DNA 原液 2 μ l,加等体积溴酚兰上样缓冲液,1.0%琼脂糖凝胶电泳,0.5 μ g/mL EB 染色。于紫外灯下拍照。

取 DNA 原液 10 μ l,用 Eppendorf 公司的 Bio-photometer 核酸蛋白分析仪测定 DNA 溶液在 260 nm、280 nm 处的吸收值及 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 比值,测定 DNA 原液的浓度及纯度。

2.2 ISSR 反应体系的建立

PCR 反应在 Takara PCR Thermal cycler Dice TP650 扩增仪上进行。扩增反应的总体积为 20 μ l,分别从 DNA 模板、镁离子浓度、引物浓度、dNTP 浓度、酶浓度、BSA 浓度、明胶浓度及退火温度等 8 个方面进行单因素分析,DNA 模板分别取 DNA 原液(60 ng/ μ l)、稀释 5 倍(12 ng/ μ l)、10 倍(6 ng/ μ l)、20 倍(3 ng/ μ l)、50 倍(1.2 ng/ μ l)和 100 倍(0.6 ng/ μ l)6 个梯度;镁离子取 1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、5.0 mmol/L 6 个浓度梯度,引物分别取 2.5 pmol/L、3.75 pmol/L、5 pmol/L、10 pmol/L、15 pmol/L 和 20 pmol/L 6 个浓度梯度,dNTP 分别取 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、3.0 mmol/L、4.0 mmol/L 5 个浓度梯度,酶浓度为 1.5U、1.25U、1.0U、0.75U、0.5U、0.25U 6 个浓度梯度,BSA 浓度为 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2.5 mg/mL、5 mg/mL 6 个浓度梯度,明胶浓度为 0、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5% 6 个浓度梯度,退火温度分别取 40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 和 57 $^{\circ}$ C 6 个退火温度。每次优化时取 4 个模板,2 个以上引物进行扩增。先对每个因素进行优化分析,待扩增反应的组份确定后,再进行退火温度的优化。PCR 产物加入 4 μ l 上样缓冲液经 1.2%琼脂糖凝胶电泳,0.5 μ g/mL EB 染色后于紫外灯下拍照保存(Image-quant 300)。所有 PCR 扩增试剂均购自大连宝生物工程公司。

3 结果与分析

3.1 ISSR 反应体系的建立与 PCR 扩增

根据电泳检测结果,最终确定的 PCR 扩增体系和反应程序分别为 20 μ l 的反应体系,50ng DNA 模板,10 \times buffer (500 mmKCl,100 mm Tris-HCl,pH8.3,and 0.01%(w/v) gelatin),Mg²⁺2.0 mmol/L,dNTP (dATP,dCTP,dGTP 和 dTTP 各 0.2 mmol/L),引物 0.375 μ mol/L,1.0U of Takara Taq DNA polymerase。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性(5 min),然后进入 35 个循环(95 $^{\circ}$ C(30 s),55 $^{\circ}$ C(45 s),72 $^{\circ}$ C(2 min)),最后 72 $^{\circ}$ C(10 min),4 $^{\circ}$ C 保存。用此反应体系去扩增由哥伦比亚大学开发的 100 条 ISSR 引物,共获得了 22 条多态性好,可重复扩增的 ISSR 引物。表 1 为多态性引物序列,图 1 为引物 815 的部分电泳检测结果。

3.2 影响 ISSR 反应体系的因素分析

模板浓度直接影响扩增产物的重复性、特异性和产量,分析表明模板浓度为 6 ng/ μ l 扩增效果

表 1 多态性 ISSR 引物及引物序列
Table 1 Nucleotide sequences of ISSR primers

ISSR Primers	Primer sequences 5'- 3'	ISSR Primers	Primer sequences 5'- 3'
807	(AG) ₈ T	811	(GA) ₈ C
815	(CT) ₈ G	820	(GT) ₈ C
823	(TC) ₈ C	824	(TC) ₈ G
834	(AG) ₈ YT	835	(AG) ₈ YC
836	(AG) ₈ YA	844	(CT) ₈ RC
846	(CA) ₈ RT	848	(CA) ₈ RG
850	(GT) ₈ YC	853	(TC) ₈ RT
854	(TC) ₈ RG	856	(AC) ₈ YA
857	(AC) ₈ YG	864	(ATG) ₆
866	(CTC) ₆	873	(GACA) ₄
880	(GGAGA) ₃	881	(GGGTG) ₃

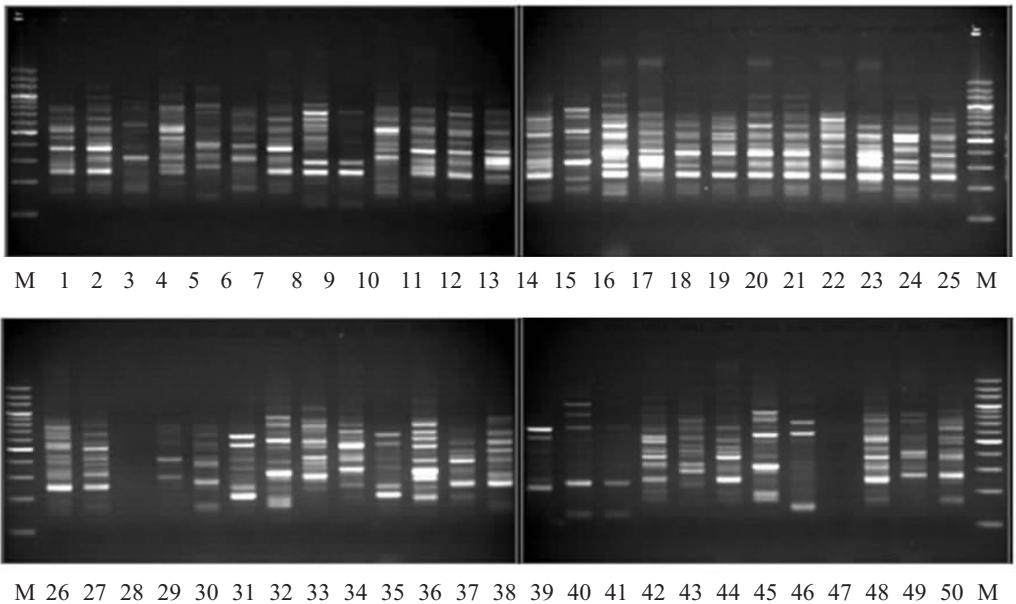


图 1 引物 815 对 50 份剑麻种质 ISSR-PCR 电泳检测结果
Fig1. The ISSR amplicon profiles of fifty sisals detected by 1.2% agarose gels using primer 815.
M:200bp DNA ladder marker.

较为理想,12 ng/μ l 和 3 ng/μ l 次之,1.2 ng/μ l 和 0.6 ng/μ l 扩增效果较差,主要表现为大片段减少,扩增效率也较低。但过高的模板浓度同样抑制 PCR 扩增并且存在 DNA 模板污染。

由于引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响,且 *Taq* DNA 聚合酶需 Mg^{2+} 激活,因此需确定每次扩增反应的最佳镁离子浓度。分析显示镁离子浓度取 2.0 mmol/L、2.5mmol/L、3.0 mmol/L 时扩增较理想,1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 次之,5.0 mmol/L 则相对较差,主要表现为条带清晰且扩增效率相对较高,条带数相对较多。

不同的引物浓度对扩增结果影响较大。引物浓度梯度分析表明 20μ l 的反应体系引物浓度取 12.5 μ mol/L,10μ mol/L 和 7.5 μ mol/L 时扩增效果较好,1.25 μ mol/L 时扩增最差,几乎无扩增或扩增效率很低。随着引物浓度的减少,小片段扩增减少。

dNTP 是 PCR 扩增的原料,浓度太高产生错误掺入,使带型发生改变,浓度太低产率太低,不利于扩增。分析表明:dNTP 浓度为 2.0 mmol/L 扩增效果最好,1.0 mmol/L 次之,浓度过低则小片段无扩增,大片段相对较弱,浓度过高大片段无扩增。Keohavong 等认为大片段消耗 dNTP 多,大大降低了游离 dNTP 的浓度,从而降低了 PCR 反应的总体效率,因此建议在扩增大片段时使用较高的 dNTP 浓度(Keohavong 等,1988b)。

Linz 等的研究表明在标准化的相同的 PCR 条件下,不同来源的 Taq DNA 聚合酶在扩增效率,扩增片段的长度和保真度上都有差异(Linz 等,1990)。酶浓度梯度分析表明 20 μ l 的反应体系加入 0.75U 或 1.0U 的酶扩增效果较为理想,0.5U 次之,过低(0.25U)和过高(1.5U)的酶浓度均对 PCR 扩增有一定影响。

有报道称反应体系中加入一定量的明胶或 BSA 有利于实验结果的稳定。本研究表明加入一定量的明胶(0.01%)或 BSA(100 μ g/mL)扩增效果比不加时要好,主要表现为实验重复性好,产物亮度要强,条带相对清晰,且反应体系中加入明胶比加入 BSA 的扩增效果要好,但同时加入明胶和 BSA 或过高浓度的明胶和 BSA 均不利于 PCR 扩增。Cha 等认为明胶或 BSA 有利于提高酶的稳定性(Cha 等,1992)。

Kwok 和 Coen 等认为提高退火温度、降低退火和延伸时间可以提高 PCR 的特异性,同样,在扩增大片段(大于 1kb)时有必要延长每一步的时间以得到充分扩增(Kwok 等,1990;Coen,1991)。退火梯度分析显示延伸时间对实验结果影响不大,但退火温度过低带型模糊,过高则条带数相对减少且不同的引物的最佳退火温度不同(图 2)。

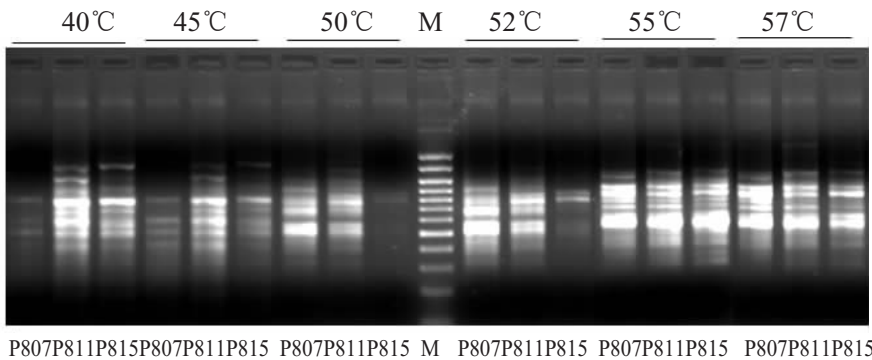


图 2 引物 P807、P811 和 P820 不同退火梯度扩增结果

Fig.2 Influence of the annealing temperature upon amplification results with primers P807, P811 and P820.
M: 100bp DNA ladder marker.

4 讨论

PCR 扩增容易受诸多因素的影响,尽管目前有使用于大多数模板和寡核苷酸引物的标准缓冲液,但对于特定 PCR 的最佳反应条件还是随着模板和引物以及反应液中其它成分浓度的不同而不同。不合适的反应条件容易导致不确定的产物或没有扩增。本研究表明,模板和引物浓度以及延伸时间对 PCR 扩增的忠实性、特异性以及重复性有一定影响,而 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度以及退火温度和反应缓冲液组成对实验结果影响较大。

DNA 模板的质量和数量在 PCR 扩增中至关重要,而且影响 PCR 产物的大小。Arnau 等采用 3 ng、10 ng 和 25 ng 的 DNA 模板能获得相同的扩增结果,但浓度过高带亮度减弱并且大片段减少。Arnau 等认为过量的模板会增加错配的机会,从而增加非特异性的程度,但如果起始模板用量太少,扩增高分子量、低拷贝数的靶序列时再现性不好,常常检测不到 PCR 产物(Arnau 等,2002)。此外,过高浓度的 DNA 模板抑制物含量也会相应增加,过高浓度的抑制物对酶的活性有一定抑制,不利于扩增。

有关引物浓度对 PCR 扩增的影响时有报道。当引物浓度太低时不能扩增,但太高产生新的扩增带。可能过量的引物有利于模板 DNA 变性后快速与引物退火,而不是与自身退火,但引物与模板比例对 PCR 扩增的特异性也非常重要,比例太高,则易产生非特异产物,且易形成引物二聚体,但比例太低,PCR 扩增效率就会受抑制。

Mg^{2+} 是 PCR 扩增中的关键因子。分析显示不同浓度的 Mg^{2+} 对产物带型影响较大,由于 dNTP 与寡核苷酸结合 Mg^{2+} 它们浓度的任何改变都会影响有效 Mg^{2+} 浓度,通常 PCR 的缓冲液中应用镁离子的最佳浓度相当低(1.5 mmol/l) Riedel 等认为适当增加镁离子的浓度可减少非特异性扩增(Riedel 等,1992) 但 Harris 等也有一些相反的报道(Harris and Jones,1997)。

任何一种酶都要求最适的反应条件,不同的实验室、不同型号的 PCR 仪对实验结果影响都很大,鉴于此,为了获得真正有意义的数据,提高扩增产量和增加产物的特异性,建议在 PCR 扩增之前先对反应条件进行优化。

参考文献:

- [1] Arnau, G., Lallemand, J., and Bourgoin, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. *Euphytica*, 2002, 129: 69-79.
- [2] Cha, R.S., Zarbl, H., Keohavong, P., and Thilly, W.G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA) application to the c-H-ras Gene[J]. *PCR Methods and Appl.*, 1992, 2: 14-20.
- [3] Coen, D.M. The polymerase chain reaction. In *Current protocols in molecular biology*[J]. Wiley Interscience. New York, 1991, 40(15): 01-15.
- [4] Dieffenbach, C.W., Dveksler, G.S. PCR Primer: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 ([美]迪芬巴赫 德维克勒著,黄培堂,俞炜源,陈添弥等译.1998 科学出版社).
- [5] Flores-Benitez, S., Jimenez-Bremont, J.F., Rosales-Mendoza, S., Arguello-Astorga, G.R., Castillo-Collazo, R., Alpuche-Solis, A.G. Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment[J]. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2007, 91: 215-224.
- [6] Gil Vega, K., Gonzalez Chavira, M., Martinez, de la Vega O., Simpson, J., and Vandemark G. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. *Azul* using RAPD markers[J]. *Euphytica*, 2001, 119: 335-341.
- [7] Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., and Simpson, J. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties [J]. 2006, 170(4): 904-909.
- [8] Harris, S., and Jones, D.B. Optimisation of the polymerase chain reaction[J]. *Br. J. Biomed. Sci.*, 1997, 54: 166-173.
- [9] Hazra, S.K., Das, S., and Das, A.K. Sisal plant regeneration via organogenesis[J]. *plant cell, tissue and organ culture*, 2002, 70: 235-240.
- [10] Keohavong, P., Wang, C.C., Cha, R.S., and Thilly, W.G. Enzymatic amplification and characterization of large DNA fragments from genomic DNA[J]. *Gene*, 1988b, 71: 211-216.
- [11] Kwok, S., Kellogg, D.E., McKineey, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., and Sninsky, J.J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type I model studies [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 999-1005.
- [12] Linz, U., Delling, U., and Rubsamen-Waigmann, H. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction[J]. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1990, 28(1): 5-13.
- [13] Nikam, T.D., Bansude, G.M., Aneesh Kum, K.C. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr.ex.Engelm) [J]. *Plant Cell Rep.*, 2003, 22: 188-194.
- [14] Pradeep Reddy, M., Sarla N., and Siddiq, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [15] Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A., Rodriguez-Garay, B. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul[J]. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 2007, 43: 569-575.
- [16] Riedel, K.H., Wingfield, B.D., and Britz, T.J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers[J]. *FEMS.Microbiol. Lett.*, 1992, 92: 69-72.
- [17] Rodriguez-Garay, B., Lomeli-Sencion, J.A., Tapia-Campos, E., Gutierrez-Mora, A., Garcia-Galindo, J., Rodriguez-Dominguez, J.M., Urbina-Lopez, D., Vicente-Ramirez, I., Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. *Azul* and *Agave angustifolia* Haw.var.*Lineno*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2009, 29(1): 220-228.
- [18] Verastegui, A., Verde, J., Garcia, S., Heredia, N., Oranday, A., Rivas, C. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi[J]. *World J Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 24: 1249-1252.
- [19] Xiong Heping et al. Bast Fiber Crops breeding. China Agricultural Science and Technology Publishing House 2008 (熊和平主编,麻类作物育种学,2008,中国农业科学技术出版社).
- [20] Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.