

流苏石斛 ISSR- PCR 反应体系的优化^{*}

马佳梅^{1, 2}, 殷寿华¹

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 以流苏石斛为材料, 对影响 ISSR- PCR 扩增结果的因素进行了探讨, 建立了适合流苏石斛 ISSR- PCR 分析的最佳反应体系. 在 20 μL 反应体系中含 1 × buffer, 2. 0 mmol/L Mg²⁺, 1. 0 mmol/L dNTP s, 1. 0 μmol/L 引物, 0. 5 U Taq DNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA. 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 50 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 7 min.

关键词: 流苏石斛; ISSR; 反应体系; 优化

中图分类号: Q 943. 2 文献标识码: A 文章编号: 0258- 7971(2008) S1- 0406- 05

流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook) 为兰科石斛属多年生附生植物, 为中药石斛的来源之一, 且具有观赏价值, 产广西南部至西北部、贵州南部至西南部、云南东南部至西南部. 生于海拔 600 ~ 1 700 m 的密林树干上或山谷阴湿岩石上^[1]. 一方面, 近年来, 国内外对著名中药石斛和观赏用石斛的开发应用较多, 环境的破坏和人为掠夺性采挖严重; 另一方面, 石斛属植物的生境独特, 对小气候环境要求十分严格, 而人类活动导致的生境破坏更加剧了野外资源的减少. 因此, 深入了解环境变化对石斛属植物种群遗传多样性及其遗传结构的影响, 对恢复和增强石斛受威胁种群具有重要意义.

ISSR(inter- simple sequence repeat) 是一种建立在 PCR 反应基础上的 DNA 分子标记, 由 Zietkiewicz 等人于 1994 年创建^[2]. ISSR 技术的原理和操作与 SSR, RAPD 非常相似, 结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 它在引物设计上比 SSR 技术简单得多, 不需要知道 DNA 序列即可用引物进行扩增, 但其产物多态性远比 RFLP, SSR, RAPD 更加丰富, 可以提供更多的关于基因组的信息, 而且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 实验重复性更好^[3~ 6].

而采用 ISSR 技术对野生流苏石斛的遗传多样性和居群遗传结构进行的研究目前尚未见报道.

1 材料与方法

1. 1 材料 实验所用的流苏石斛居群材料采集于西双版纳的绿石林、银厂、红石崖、勐醒矿山、曼丕等地的石灰山, 共 5 个居群.

1. 2 方法

1. 2. 1 DNA 提取与检测 本实验采用改进的 CTAB 法^[7]提取 DNA, 获取的总 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶检测, 据相对的 EB 染色荧光强度, 对总 DNA 浓度进行粗略估算, 最终 DNA 模板质量浓度定量在 2. 5~ 5 ng/μL, 放在冰箱备用.

1. 2. 2 ISSR- PCR 反应条件优化设计 为了确定最佳的 ISSR- PCR 反应条件, 采用 20 μL 反应体系, 对影响 ISSR- PCR 反应的主要参数(Mg²⁺, dNTP s, Taq DNA 聚合酶, 模板 DNA, 退火温度) 设置了梯度, 各反应参数梯度见表 1, 并用引物 UBC880 对最佳反应条件进行筛选. 本实验引物是根据加拿大哥伦比亚大学公布的第 9 套 ISSR 引物序列, 由上海生工生物技术有限公司合成.

^{*} 收稿日期: 2008- 04- 03
基金项目: 院省合作重大专项(2000WK- 07).
作者简介: 马佳梅(1981-), 女, 山东人, 硕士生, 主要从事保护生物学方面的研究.
通讯作者: 殷寿华, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事保护生物学等方面的研究, E- mail: ysh@xtbg.org.cn.

表 1 ISSR- PCR 反应体系各成分优化实验设计
Tab. 1 Optimum design of components for ISSR- PCR protocol

ISSR- PCR 反应参数	梯度
模板 DNA/ng	2, 5, 5, 10, 20, 30, 40
Mg ²⁺ / (mmol·L ⁻¹)	1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5
dNTPs/ (mmol·L ⁻¹)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0
引物/(μmol·L ⁻¹)	0.5, 1, 2, 3, 4
Taq DNA 酶/U	0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5

1.2.3 ISSR- PCR 扩增与产物检测 PCR 反应在 ABI 2720 Thermal Cycler PCR 仪上进行, 根据参考文献, 初步确定扩增程序为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 45 s, 50 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃延伸 7 min. 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 电泳结束后在凝胶成像系统(GelDoc- It Imaging System) 观察记录.

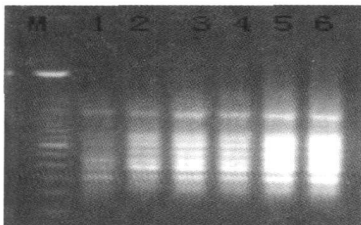
2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 ISSR- PCR 反应的影响 ISSR 反应对模板含量不甚敏感, 一般 25 μL 反应体系中 DNA 在 5~ 50 ng 均可获得较一致的结果^[8]. 由图 1 可以看出流苏石斛 ISSR 反应对模板 DNA 浓度不甚敏感, 模板含量许可范围较大. 在 20 μL 反应体系中, 含有 5~ 40 ng 模板 DNA 时均能获得比较清晰的谱带, 但在 10 ng 时扩增出的条带最多且清晰, 又考虑到结果的稳定性和可重复性, 因此选择 10 ng 作为适宜的模板浓度.

2.2 Mg²⁺ 浓度对 ISSR- PCR 反应的影响 Mg²⁺ 浓度是影响 ISSR- PCR 扩增的一个重要因

素, 它影响 PCR 扩增的特异性和扩增片段的产率. 图 2 结果表明: 当 Mg²⁺ 浓度为 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 时, 虽然有谱带出现, 但扩增出的谱带较少, 且产物不稳定, 常出现非特异性产物. 当 Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L 时, 扩增出了清晰稳定的条带, 且无非特异性扩增. 浓度为 2.5 mmol/L 和 3.0 mmol/L 时, 扩增的谱带北京模糊难辨且不稳定. 当 Mg²⁺ 浓度为 3.5 mmol/L 时, 仅产生一些小的非特异性片段. 因此选择 2.0 mmol/L 的 Mg²⁺ 浓度作为流苏石斛 ISSR 分析的最佳浓度.

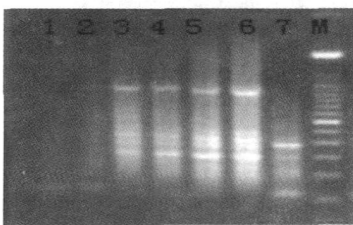
2.3 dNTPs 浓度对 ISSR- PCR 反应的影响 PCR 反应中, dNTP 的浓度一般为 20 ~ 200 μmol/L, 浓度过高可加快反应速度, 同时可增加碱基的错误深入率和实验成本, 而浓度过低则会导致反应速度的下降, 影响到产物的多样性和特异性^[9, 10]. 本实验设置了 5 个 dNTP 浓度梯度, 图 3 结果表明: 当浓度为 0.5 mmol/L 时, 几乎无扩增产物; 在 0.75~ 1.25 mmol/L 时, 均能扩增出清晰的谱带; 在 1.5 mmol/L 时, 出现一些非特异性谱带. 所以选择 1.0 mmol/L 的 dNTP 浓度.



1~ 6 模板用量分别是 2, 5, 5, 10, 20, 30, 40 ng; M: 100 bpDNA Marker

图 1 模板 DNA 浓度对 ISSR 反应的影响

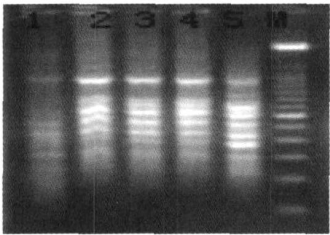
Fig. 1 Effects of template DNA concentrations on ISSR reaction



1~ 7 Mg²⁺ 浓度分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol/L; M: 100 bpDNA Marker

图 2 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 反应的影响

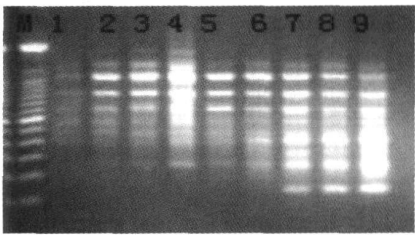
Fig. 2 Effects of Mg²⁺ concentrations on ISSR reaction



1~ 5dNTPs 浓度分别为 0.5,0.75,1.0,1.25,0.4,1.5 mmol/L; M: 100 bpDNA Marker

图 3 dNTPs 浓度对 ISSR 反应的影响

Fig. 3 Effects of dNTPs concentrations on ISSR reaction



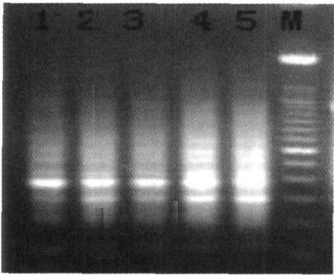
1~ 9 引物浓度分别为 0.1,0.2,0.3,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 μmol/L; M: 100 bpDNA Marker

图 4 引物浓度对 ISSR 反应的影响

Fig. 4 Effects of primer concentrations on ISSR reaction

2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 本实验设置了 9 个引物浓度梯度,分析其对 ISSR 扩增结果的影响.图 4 表明:当浓度为 0.1 μmol/L 时,几乎无扩增产物;在 0.2~ 0.5 μmol/L 时,虽然扩增谱带较一致,但谱带模糊不易辨认;在 1.0 μmol/L 时,扩增谱带较清晰且比较稳定.当引物浓度为 2.0~ 4.0 μmol/L 时,谱带出现弥散状态,故本实验选用引物浓度为 1.0 μmol/L.

2.5 TaqDNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响 TaqDNA 聚合酶是影响 ISSR-PCR 反应的一个重要因素,浓度过低扩增产率下降,浓度太高产生非特异性扩增,且造成浪费本实验设置了 5 个梯度,如图 5 所示,当 TaqDNA 聚合酶含量为 0.5~ 1.0 U 时,均能扩增出较为清晰的谱带,且在重复实验中扩增产物稳定、重复性高.当含量为 1.25~ 1.5 U 时,扩增谱带模糊难以辨认.从节约成本的角度考虑,本实验采用的 TaqDNA 聚合酶用量为 0.5 U.



1~ 5TaqDNA 聚合酶用量分别为 0.5,0.75,1.0,1.25,1.5 U; M: 100 bpDNA Marker

图 5 TaqDNA 聚合酶用量对 ISSR 反应的影响

Fig. 5 Effects of TaqDNA poly merase concentrations on ISSR reaction

2.6 退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响 为了

确定所选引物各自最佳的退火温度,我们参照 Bornet 和 Branchard^[11]的报道及各引物的 T_m 值,设置 5 个间隔均匀的温度梯度用于本实验.筛选出的引物及其退火温度见表 2.

2.7 循环数对 ISSR 反应的影响 在确定的以上各因素最佳条件的基础上,分别试验了 30,35,40,45 个循环数对扩增反应的影响,结果表明:30 个循环时,扩增谱带较弱,扩增效率低;35 个循环时,扩增谱带清晰、稳定;40 和 45 个循环时,扩增谱带太强,不易辨认,且产物不稳定有非特异性扩增.因此本实验采用的循环次数为 35.

通过上述实验对流苏石斛 ISSR-PCR 扩增的反应体系进行了优化.在 20 μL 反应体系中含 1 × buffer, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 1.0 mmol/L dNTP s, 1.0 μmol/L 引物, 0.5 U TaqDNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA.扩增程序为:94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 45 s, 50 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 45 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 7 min.

3 讨 论

由于 ISSR-PCR 反应收到各种因素的影响,为了获得稳定性和可靠性较高的谱带,必须对其影响因素进行优化,筛选出最适合研究物种 ISSR-PCR 扩增反应的条件.

ISSR 反应对 DNA 模板含量不甚敏感,在本实验中,5~ 10 ng 的模板 DNA 含量均可扩增出较清晰、一致的谱带,当 DNA 含杂质较多时,有必要进行纯化,或者应采用有效浓度范围内的较低浓度,使抑制聚合酶活性的因子影响降低.本实验提取的 DNA 在不进行纯化的情况下,尽可能的采用较低的模板浓度进行扩增. Mg²⁺ 浓度是影响 ISSR-PCR 扩增的一个重要因素. Mg²⁺ 浓度不仅影响

表 2 筛选出的引物、序列及退火温度
Tab. 2 Sequences and annealing temperatures of different primers

引物(5' - 3')	序列	退火温度/ °C
807	(AG) ₈ T	52
810	(GA) ₈ T	52
825	(AC) ₈ T	46
834	(AG) ₈ YT	50
836	(AG) ₈ YA	50
840	(GA) ₈ YT	50
846	(CA) ₈ RA	50
849	(GT) ₈ YA	50
880	GGA GAG GAG AGG AGA	50
884	HBH(AG) ₇	52
887	DVD (TC) ₇	52
900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	52

Taq 酶活性, 还能与反应液中的 dNTP、模版 DNA 及引物结合, 影响引物与模版的结合效率、模版与产物的解链温度及产物的特异性和引物二聚体的形成^[12]. 在一般的 PCR 反应中, 0. 5~ 2. 0 mmol/L 是比较合适的 Mg²⁺ 浓度^[9]. 而在本实验中确定的最佳 Mg²⁺ 浓度为 2. 0 mmol/L. dNTPs 是 ISSR-PCR 反应的原料, 当 dNTPs 浓度过高, 会导致 PCR 错配, 从而使扩增出现非特异性扩增; 浓度过低, 又会影响合成效率, 甚至会因过早的消耗而使产物单链化, 影响扩增效果^[9], 本实验考虑到实验成本和结果的稳定性, 选择 1. 0 mmol/L 的 dNTPs 浓度. 引物浓度对扩增谱带多少以及一些带的强弱和清晰度有一定的影响. 引物浓度的变化实质上是改变了引物的模版配对几率, 从而影响扩增效果; 浓度过高会引起错配和非特异性产物扩增且可增加引物之间形成二聚体的几率; 引物浓度过低则无法扩增出所有的 ISSR 位点^[13], 本实验经实验验证选用引物浓度为 1. 0 μmol/L. 在 PCR 反应中, *Taq* DNA 聚合酶浓度过高, 不仅成本过高, 而且容易产生非特异性产物. *Taq* DNA 聚合酶浓度过低, 会导致产物的合成效率下降. 一般随机扩增反应中, *Taq* DNA 聚合酶的用量在 0. 5~ 5 U 之间^[9],

经实验验证且从节约成本的角度考虑, 本实验采用的 *Taq* DNA 聚合酶用量为 0. 5 U. 退火温度的高低也会影响扩增带的多少和一些带的清晰度. 退火温度的高低也会影响扩增带的多少和一些带的清晰度. 另外, 同一引物, 不同样品所用的退火温度也可能不同. PCR 循环数对扩增产物量有明显的影响, 选择适宜的循环次数将会获得良好的扩增图谱. 从理论上说, 循环次数少, 产物量少; 循环次数越多, 增产物产率越高. 但实际上, 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^[13].

参考文献:

[1] 郎楷永, 陈心启, 吉占和. 中国植物志 (17~ 19 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
[2] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomica, 1994, 20: 176-183.
[3] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 780-792.

[4] DIRLEWANGER E, PRONIER V, PARVERY C, et al. Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L.) using morphological and molecular markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 888-895.

[5] ESSELMAN E J, LI J Q, CRAWFORD D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae) : comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers[J]. *Mol Ecol*, 1999, 8: 443-451.

[6] GILBERT J E, LEWIS R B, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to access genetic variability in plant germplasm collections[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 1 125-1 131.

[7] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Vtocher-nical Bulletin*, 1987, 19: 11-15.

[8] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析的应用[J]. *生物学通报*, 2004, 39(2): 19-21.

[9] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.

[10] 孙晴, 徐莺, 颜钊, 等. 麻疯树 RAPD 分析的影响因素[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(3) : 259-261.

[11] BOMET B, BRANCHARD M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2001, 19: 209-215.

[12] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.

[13] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[14] 张志红, 谈月笑, 何航航, 等. 红树植物海漆 ISSR 条件的优化[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(2) : 63-66.

Optimization of ISSR- PCR reaction system in *Dendrobium fimbriatum* Hook

MA Jia-mei^{1,2}, YIN Shou-hua¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Menglun 666303, China;
2. The Graduate of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The major factors in the reaction system of ISSR-PCR reaction for *Dendrobium fimbriatum* Hook were optimized. The proper ISSR-PCR reaction system was determined as follows: 20 μ L reaction system containing 1 $\times$ PCR buffer, 2. 0 mmol/ L Mg^{2+} , 1. 0 mmol/L dNTPs, 1. 0 μ mol/L primer, 0. 5 U *Taq* DNA polymerase, 10 ng template DNA. The amplification was after 1 cycle initial denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 35 cycles of 45 s at 94 $^{\circ}$ C , 45 s annealing at 94 $^{\circ}$ C , and extension of 45 s at 72 $^{\circ}$ C , and a final 7 min extension at 72 $^{\circ}$ C, after which the samples were held at 4 $^{\circ}$ C .

Key words: *Dendrobium fimbriatum* Hook; ISSR; reaction system; optimization

* * * * *
(上接第 402 页)

Impact of construction of Dali-Lijiang highway on landscape pattern

DUAN He-xiang¹, WANG Chong-yun¹, PENG Ming-chun¹, LANG Xue-dong¹, LIU Tao¹, ZHAO Qin²
(1. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China;
2. Research Institute of Highway Ministry of Communication, Beijing 100088, China)

Abstract: Using the remote sensing and geographical information technology, the landscape of the Dali-Lijiang highway were classified and charted and changes in the landscape before and after the highway construction were analyzed. The result showed: the landscape pattern will change after the highway construction. Patch number, Patch density increased and Largest patch index decreased showing the landscape heterogeneity increased. From the analysis of different buffers we can get: the impact of highway construction on the landscape pattern is more serious in the small rang alongside the line.

Key words: highway construction; landscape pattern; remote sensing(RS); geographic information system(GIS)