

# 小桐子 ISSR-PCR 体系的优化

王桂娟<sup>1</sup> 陈茂盛<sup>1</sup> 向振勇<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院西双版纳热带植物园, 勐腊 666303; <sup>2</sup> 云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)

**摘要:** 采用正交试验设计方法, 建立了小桐子 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序。结果表明, 在 20 $\mu$ l 反应体系中含有 1 $\times$  PCR 缓冲液、200 $\mu$ mol/L dNTP、0.5 $\mu$ mol/L 引物、2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5U Tag DNA 聚合酶和 90ng 模板 DNA 最适用于小桐子 ISSR-PCR 扩增。适宜的扩增程序为 94 7min; 94 1min, 44 -56 (退火温度随引物不同而定) 45s, 72 1min, 35 个循环; 72 7min; 4 保存。

**关键词:** 小桐子 ISSR 正交优化

## Optimization of ISSR-PCR System in *Jatropha curcas*

Wang Guijuan<sup>1</sup> Chen Maosheng<sup>1</sup> Xiang Zhenyong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303; <sup>2</sup>College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**Abstract:** In this paper, the orthogonal design was used to establish an ISSR-PCR reaction system and amplification program of *Jatropha curcas*. The results indicated that 20 $\mu$ l reaction system containing 1 $\times$  PCR buffer, 200 $\mu$ mol/L dNTP, 0.5 $\mu$ mol/L Primer, 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5U Tag DNA polymerase and 90ng template DNA was suitable to ISSR-PCR amplifying. Amplification program as followed: Pre-denaturation at 94 for 7min; Denaturation at 94 for 1min; Annealing at 44 -56 for 45s; Extending at 72 for 1min; After 35 cycles, then extending again at 72 for 7min and keeping at 4 .

**Key words:** *Jatropha curcas* L. ISSR Orthogonal optimization

小桐子 (*Jatropha curcas* L.) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属 (*Jatropha curcas* L.), 原产于中美洲, 现主要分布于非洲、拉丁美洲、亚洲。在我国云贵高原南部年降雨量仅 400~500mm 的干热河谷地区, 以及海拔 1 600m 以下没有重霜的亚热带地区旺盛生长, 开花结实。在广东、广西、四川、贵州、台湾及沿海等地均有分布<sup>[1]</sup>。小桐子种子油具有优良的燃烧特性, 从其种子中生产的新型燃料适用于各种柴油发动机, 并在闪点、凝固点、硫含量、一氧化碳排放量和颗粒值等关键技术均优于国内 0 号柴油<sup>[2]</sup>, 极具开发价值, 因而目前引起国内外研究人员的广泛关注。小桐子作为一种绿色、环保、可再生的生物柴油, 在缓减我国的能源供应、促进资源、环境、社会经济的和谐发展中有巨大的潜在应用价值。目前对小桐子的一些研究主要集中在生理生化和毒理学领域方面, 对小桐子遗传演化、种质资源评价、遗传育种等方面的研究较少。通过对小桐子 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序进行优化, 旨在建立一个较为可靠的小桐子 ISSR-PCR 反应系统, 为进一步研究小桐子的遗传多样性、群体结构以及品种选育等工作的展开奠定良好的基础。

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 是一种基于 SSR (Simple Sequence Repeat) 和 PCR 技术的分子标记, 于 1994 年由 Zietkiewicz 等创建<sup>[3]</sup>。ISSR 标记多态性高、费用低、稳定性好、方便易用, 目前被广泛用于遗传图谱构建、种质资源鉴定、植物进化和遗传多样性分析等领域的研究<sup>[4-8]</sup>。由于 ISSR 标记是基于 PCR 的反应, 其多态性、清晰度以及稳定性受不同实验因子影响, 因此采用正交试验设计, 进行 ISSR-PCR 反应体系

收稿日期: 2007-12-28

基金项目: 中科院西双版纳热带植物园创新工程试点经费 (0501073003)

作者简介: 王桂娟 (1974-), 女, 汉族, 硕士, 主要从事生物多样性研究; E-mail: wanggj@xtbg.org.cn

通讯作者: 陈茂盛, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究; E-mail: chenms@xtbg.org.cn Tel: 0691-8715474

的优化和扩增程序的选择是应用 ISSR 标记的关键。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

小桐子叶片采自云南省勐腊县勐仑镇的野生种。

### 1.2 试剂与仪器

所用 ISSR 引物为加拿大哥伦比亚大学设计的第 9 套引物序列。网址: [http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer\\_Sets/Primers.pdf](http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf), 由上海生工生物工程公司合成。dNTP 和 DNA marker 购自昆明云科生物工程公司, Taq DNA 聚合酶购自东洋纺公司, 琼脂糖购自美国 UVP 公司。PCR 扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司, 紫外透射凝胶成像系统 (Gel Doc-it imaging system 3UV™ Transilluminator) 购自美国 UVP 公司。

### 1.3 基因组 DNA 提取

采用改良 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取基因组 DNA, 0.8%琼脂糖凝胶上检测 DNA 质量, 紫外分光光度计检测 DNA 浓度, 稀释至 30ng/μl 备用。

### 1.4 PCR 扩增

扩增程序为 94 预变性 7min; 94 变性 1min, 44 ~56 复性 45s, 72 延伸 1min, 35 个循环; 72 延伸 7min; 4 保存。反应结束后, 取 10μl 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳 (含 0.05%的溴化乙锭), 用紫外凝胶成像系统观测并拍照。

### 1.5 PCR 反应体系的正交试验

根据预备试验结果, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 对主要影响因子做如下处理 (表 1)。引物选用 ISSR-36, 总反应体积 20μl, 其中 1×PCR 缓冲液和 90ng DNA 模板不变, 设 2 次重复。

表 1 ISSR-PCR 各因子正交设计表

处理编号	dNTP (μmol/L)	Primer (μmol/L)	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	Taq DNA polymerase (U)
1	150	0.5	1.0	0.5
2	150	1.0	1.5	1.0
3	150	1.5	2.0	2.0
4	200	0.5	1.5	2.0
5	200	1.0	2.0	0.5
6	200	1.5	1.0	1.0
7	250	0.5	2.0	1.0
8	250	1.0	1.0	2.0
9	250	1.5	1.5	0.5

### 1.6 模板 DNA 浓度筛选

选用 ISSR-34 引物, 以不同浓度的 DNA 为模板, 用得到的最佳反应体系进行扩增。DNA 模板浓度设 30、90、150、210、270 和 330ng 共 6 个处理。

### 1.7 退火温度及反应循环次数筛选

选用 ISSR-58 引物 (理论 T<sub>m</sub> 值 53.8 ), 以优化的反应体系和 DNA 模板浓度对退火温度及循环次数进行优化, 分别设 50 , 35 循环; 50 , 45 循环; 53 , 35 循环; 53 , 45 循环; 56 , 35 循环; 56 , 45 循环; 共 6 个处理。

### 1.8 优化体系稳定性检测

随机选择 6 个 ISSR 引物, 以优化的 PCR 反应体系、DNA 模板浓度、退火温度及循环数进行扩增, 2 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR-PCR 反应体系的正交优化

如图 1 所示,在 9 个处理组合中,dNTP、Primer、 $Mg^{2+}$ 和 Taq 酶 4 个主要影响因子浓度组合不同,扩增效果存在明显的差异。其中处理 4、5、7,条带清晰、多态性最好。在 dNTP 的 3 个浓度梯度中,当 dNTP 浓度为  $200 \mu\text{mol/L}$  时,扩增效果最好;处理 6 效果不佳可能是因为引物浓度大或者  $Mg^{2+}$ 浓度小所致。在引物的 3 个浓度梯度中,当引物浓度为  $0.5 \mu\text{mol/L}$  时,扩增效果最好;处理 1 效果差,可能与 dNTP、和 Taq 酶用量少有关。在  $Mg^{2+}$ 的 3 个浓度梯度中,当  $Mg^{2+}$ 浓度为  $2.0\text{mmol/L}$  时,扩增效果最好;处理 3 效果差可能与 dNTP、Primer 浓度低或 Taq 酶用量大有关。在 Taq 酶的 3 个梯度中,用量为  $0.5$  时,处理 5 最好;用量为  $1.0$  时,处理 7 最好;用量为  $2.0$  时,处理 4 最好,为减少费用,可选用  $0.5\text{U}$ 。综合以上分析,在小桐子 ISSR-PCR 的  $20 \mu\text{l}$  反应体系中  $200 \mu\text{mol/L}$  dNTP、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  Primer、 $2.0\text{mmol/L}$   $MgCl_2$ 、 $0.5\text{U}$  Tag DNA 聚合酶的组合应该是最佳选择。

### 2.2 模板 DNA 浓度对 ISSR 扩增效果的影响

使用 ISSR-34 引物,以不同浓度的 DNA 为模板,扩增结果表明,随着模板浓度升高,扩增出的条带亮度增加(图 2)。由于过暗或过亮的条带会对读带造成一定困难,因此选用  $90\text{ng}$  为最佳模板 DNA 浓度。

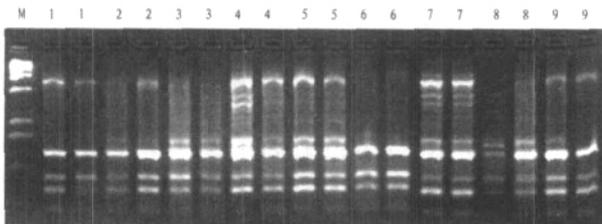


图 1 正交设计的 ISSR-PCR 反应体系扩增结果  
M 为 Marker,1~9 为处理组合编号(表 1),引物为 ISSR-36

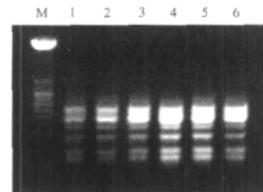


图 2 不同模板 DNA 浓度的 ISSR-PCR 扩增  
M 为 Marker,1~6 分别为 30、90、150、210、270 和 330ng 模板 DNA,引物为 ISSR-34

### 2.3 退火温度及循环次数对 ISSR 扩增效果的影响

使用 ISSR-58 引物,在不同退火温度和循环次数下扩增,结果表明,处理间没有明显差异(图 3),说明对于 ISSR-58 引物,退火温度和循环次数在一定范围内的变化不影响扩增结果。为减少扩增时间,选 35 个循环。

### 2.4 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序的稳定性检测

综合上述分析,小桐子 ISSR-PCR 最佳反应体系及扩增程序如下:  $1 \times$ PCR 缓冲液、 $200 \mu\text{mol/L}$  dNTP、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  引物、 $2.0\text{mmol/L}$   $MgCl_2$ 、 $0.5\text{U}$  Tag DNA 聚合酶和  $90\text{ng}$  模板 DNA。扩增程序为  $94 \quad 7\text{min}$ ;  $94 \quad 1\text{min}$ ,  $44 \sim 56 \quad 45\text{s}$ ,  $72 \quad 1\text{min}$ , 35 个循环;  $72 \quad 7\text{min}$ ; 4 保存。随机选择 ISSR-49、ISSR-56、ISSR-40、ISSR-52、ISSR-60、ISSR-46 共 6 个引物,对上述小桐子 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序进行稳定性检测。结果表明,6 个引物均能扩增出清晰、稳定、重复性好的条带(图 4),表明所建立的 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序适用于小桐子的 ISSR 标记研究。

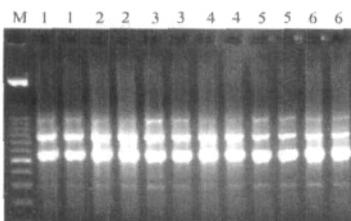


图 3 不同退火温度和循环次数的 ISSR-PCR 扩增  
M 为 Marker,1  $50^\circ\text{C}$ ,35 循环;2  $50^\circ\text{C}$ ,45 循环;3  $53^\circ\text{C}$ ,35 循环;4  $53^\circ\text{C}$ ,45 循环;5  $56^\circ\text{C}$ ,35 循环;6  $56^\circ\text{C}$ ,45 循环,引物为 ISSR-58

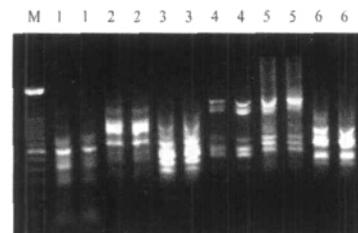


图 4 不同 ISSR 引物用优化 ISSR-PCR 体系的扩增结果  
M 为 Marker,1~6 分别为引物 ISSR-49、ISSR-56、ISSR-40、ISSR-52、ISSR-60 和 ISSR-46

### 3 讨论

在 PCR 反应体系中, dNTP、引物、 $Mg^{2+}$ 和 Taq 酶是 4 个主要的影响因子, 它们之间的相互作用会影响扩增结果。对于不同物种或不同试验条件下, 需要对这些因子的最佳组合浓度进行优化。在本试验当中, 不同处理间确实存在明显差异。dNTP、primer 和  $Mg^{2+}$  分别在  $150 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.5 \mu\text{mol/L}$  和  $1.0 \text{mmol/L}$  时, 扩增效果最差, 说明小桐子 ISSR-PCR 扩增体系中, 当 dNTP、 $Mg^{2+}$  和 primer 的浓度分别达到某个阈值时, 即使调节其它因子的浓度也不能得到理想的扩增结果, 因子之间的相互作用只在一定的浓度范围内起作用。而 Taq 酶的用量在 0.5~2.0 的 3 个梯度都可以扩增出比较好的结果, 可能与酶本身的性质有关。

模板 DNA 浓度主要影响扩增条带的明暗度, 因此在实验当中, 可根据每个引物的具体扩增效果适当调节模板浓度, 以便于得到清晰可辨的条带。另外, 退火温度和循环次数也是 PCR 反应中的重要因子, 它们的变化通常会对扩增结果产生影响。但在实验中, 退火温度和循环次数并没有明显影响扩增结果, 可能与引物的特异性较强有关; 也可能是所建的小桐子 ISSR-PCR 扩增体系比较稳定, 因此对反应条件的变化具有较强的承受能力。

虽然 ISSR 标记具有比较好的稳定性和重复性, 由于 PCR 反应制约因素比较多, 因此尽量在相同的条件下进行扩增反应是实验成功的关键。

#### 参考文献

- 1 钟志权.热带植物研究, 1984, 25: 62-65.
- 2 谭中月, 雷彻虹.攀枝花科技与信息, 2006, 31( 2): 37-39, 59.
- 3 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D.Genomics, 1994, 20: 176-1831.
- 4 宣继萍, 章镇, 房经贵.果树学报, 2002, 19( 6): 421-423.
- 5 邱英雄, 傅承新, 何云芳.林业科学, 2002, 38( 6): 49-52.
- 6 Ammiraju J SS, Dholakia BB, Santra DK, et al.Theor Appl Genet, 2001, 102: 726-732.
- 7 Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar RR, et al.PNAS, 2002, 99( 9): 5836-5841.
- 8 祁建民, 王涛, 吴为人, 等.作物学报, 2006, 32( 3): 373-378.
- 9 肖璇, 孙敏, 乔爱民, 等.生物技术, 2005, 15( 1): 44-47.

( 上接第 152 页)

- 17 Arencibia A, Gentinetta E, Cuzzoni, et al. Molecular Breeding, 1998, 4: 99-109.
- 18 林良斌, 官春云, 等.作物学报, 1999, 25( 4): 447-450.
- 19 何业华.湖南农业大学博士后研究工作报告, 2001.
- 20 熊兴华, 官春云, 等.湖南农业大学学报(自然科学版), 2002,( 2): 97-99.
- 21 陈锦清, 朗春秀, 胡张华, 等.农业生物技术学报, 1999, 7( 4): 316-320.
- 22 田惠岳.农牧产品开发, 2000,( 3): 14.