

越桔 ISSR-PCR 反应体系建立与优化^①

谌 月, 鲁 艳, 李 凌

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 以改良 CTAB 法提取越桔(*Vaccinium* Linn.) 品种薄雾 DNA 为材料, 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 表探讨了 Tag 酶; Mg^{2+} ; DNA; dntps 及引物浓度 5 个主要因素对越桔 ISSR-PCR 扩增反应的影响, 通过直观分析和方差分析结合, 建立了越桔 ISSR-PCR(20 μ L) 最佳反应体系, 各组分的浓度为: Tag 酶 0.75 U, Mg^{2+} 1.875 mmol/L, DNA 0.8 mmol/L, dntp 0.1 mmol/L, 引物 0.2 μ mol/L. 在此基础上探讨了引物 UBC835 的最佳退火温度、循环次数和延伸时间, 结果分别为 54.2 $^{\circ}$ C、35 次、60 s. 选用两个引物对 21 份越桔资源进行 ISSR 扩增, 结果显示优化的体系稳定性较高.

关 键 词: 越桔; 简单序列重复区间(ISSR); 正交设计; 直观分析; 方差分析

中图分类号: S663.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0026-08

简单序列重复区间(inter simple sequence repeat, ISSR)由 ZIETKIEWICZ 等人于 1994 年创立, 是一种基于微卫星发展起来的分子标记方法, 结合了 SSR 和 RAPD 的优点^[1], 近几年已广泛应用于桃、狗牙根和菊花^[2-4]等植物研究中. 越桔(*Vaccinium vitis-idaea* Linn.) 俗称蓝莓, 杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* Linn.) 灌木或小乔木, 果实为蓝色浆果, 富含多种维生素、黄酮和花青素等抗氧化活性物质, 食用价值高^[5]. 我国从 1983 年开始引种栽培, 先后从美国、加拿大等地引入 100 余个品种^[6], 由于引种途径等原因, 当前生产上广泛存在着同名异物、同物异名等现象^[7], 而越桔许多品种形态差异较小, 用常规方法难以鉴别, 因此分子标记能够为越桔种质资源的分析和品种亲缘关系的鉴定提供更准确的依据.

GARRIGA M 等人利用 ISSR 与 SSR 技术对蓝丰、薄雾和奥尼尔等多个越桔品种进行分析, 对比两种技术发现 ISSR 比 SSR 稳定性、灵敏度更高, 更适合于越桔种质资源的鉴定; 於虹^[8]、宋杨^[9]利用 ISSR 技术对南高丛、北高丛越桔及兔眼越桔进行亲缘关系鉴定; 李广平等人^[10]通过正交设计试验及单因子优化试验对蓝莓 ISSR 反应条件的 5 个主要因素进行了探讨. 由于 ISSR 是一种基于 PCR 的分子标记技术, 其稳定性受 Tag 酶、dNTPs、引物等因素的影响较大, 因此需要建立一个稳定可靠的 ISSR-PCR 反应体系. 正交试验可避免传统单因素试验顾此失彼的缺点, 并且能通过有限的试验组合找出最佳的反应条件及各因素对试验的影响主次. 本试验从 Tag 酶; Mg^{2+} ; DNA; dNTPs 及引物这 5 个主要因素 4 个水平出发, 结合直观分析和方差分析, 以求获得越桔 ISSR-PCR 反应体系的最佳组合.

1 材料和方法

1.1 材 料

供试的越桔取自西南大学园艺园林学院园林植物栽培与育种实验室, 分别为南高丛品种: 奥尼尔、薄

^① 收稿日期: 2016-09-28

基金项目: 重庆市科技成果转化项目(cstc2013jcsf-nycgzhA80001).

作者简介: 谌 月(1991-), 女, 重庆渝北人, 硕士研究生, 主要从事园林植物育种与栽培研究.

通信作者: 李 凌, 教授, 硕士研究生导师.

雾、V3、南好、夏普蓝、莱格西；北高丛品种：达柔、蓝丰、蓝线、布里吉塔.

1.2 试验试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、巯基乙醇、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、氯仿、异戊醇、醋酸钾、无水乙醇、75%乙醇、RNase(10 mg/mL)、Tag 酶； Mg^{2+} ；dntps 和 DNAmarker 均购于 TaKaRa(大连)公司. ISSR 引物根据加拿大哥伦比亚大学公布的序列设计，本试验所用引物 UBC835 序列为：(AG)₈YC；UBC807 序列为：(AG)₈T；UBC827 序列为：(AC)₈G，其中 Y=(C,T). 由北京鼎国生物工程有限公司合成.

1.3 方 法

1.3.1 基因组 DNA 提取

越橘基因组提取参考张鲁杰等人^[11]方法并结合实际情况进行适当调整以获得高质量的 DNA. 主要步骤：取长势旺盛的越桔叶片 1 g 去主脉撕成小碎片置于研钵中，加入一小勺 PVP 防止材料褐化，加入液氮快速研磨，立即转移粉末至离心管中，加入 60 μ L 巯基乙醇和在 65 $^{\circ}$ C 下预热 30 min 的 2%CTAB 裂解液 3 mL，混匀，65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h，每隔 15 min 轻轻上下摇匀一次，凉至室温，加入 200 μ L 提前预冷的醋酸钾，混匀冰浴 30 min，12 000 r/min，离心 5 min，取上清液，加入等体积的 V(氯仿)：V(异戊醇)=24：1，静置 5 min，12 000 r/min，离心 8 min，取上清液，加入 2 μ L RNase，37 $^{\circ}$ C 消化 20 min，再加入等体积的 V(氯仿)：V(异戊醇)=24：1，静置 5 min，12 000 r/min，离心 8 min，取上清液加入 400 μ L 醋酸钾和 2 倍体积无水乙醇，混匀冰浴 20 min，12 000 r/min，离心 5 min，弃上清液，75%乙醇、无水乙醇各洗一次，烘干，加入无菌水于-20 $^{\circ}$ C 保存.

用 0.8%琼脂糖电泳及 Nanodrop2000 检测 DNA 质量，无菌水稀释至 0.8 mmol/L.

1.3.2 正交试验设计

采用 L₁₆(4⁵)正交设计表(表 1)，选用越桔品种薄雾 DNA 为模板，引物 UBC835 进行试验，每个处理重复 2 次. 各处理总体积为 20 μ L，均加入 2 μ L 无 Mg^{2+} 10 $\times$ buffer，不足用超纯水补足.

表 1 PCR 体系优化正交试验表[L₁₆(4⁵)]

处理	Tag 酶浓度/ U	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	模板浓度/ (mmol · L ⁻¹)	dNTPs 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	引物浓度/ (μ mol · L ⁻¹)
1	0.50	0.625	0.20	0.1	0.1
2	0.50	1.250	0.40	0.2	0.2
3	0.50	1.875	0.60	0.3	0.3
4	0.50	2.500	0.80	0.4	0.4
5	0.75	0.625	0.40	0.3	0.4
6	0.75	1.250	0.20	0.4	0.3
7	0.75	1.875	0.80	0.1	0.2
8	0.75	2.500	0.60	0.2	0.1
9	1.00	0.625	0.60	0.4	0.2
10	1.00	1.250	0.80	0.3	0.1
11	1.00	1.875	0.20	0.2	0.4
12	1.00	2.500	0.40	0.1	0.3
13	1.25	0.625	0.80	0.2	0.3
14	1.25	1.250	0.60	0.1	0.4
15	1.25	1.875	0.40	0.4	0.1
16	1.25	2.500	0.20	0.3	0.2

1.3.3 PCR 反应条件及电泳成像

PCR 反应在 Eppendorf Mastercycle 上进行, 扩增程序: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min; 53 ℃~56 ℃ 45 s; 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存. 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 70 min 检测. 在凝胶成像系统上拍照, 并用 Quantity One 4.3.1 软件分析.

1.3.4 退火温度的确定

根据正交试验结果, 选择最佳组合进行退火温度梯度试验. 梯度设置以引物 T_m 值为基准上下浮动 1~2 ℃ 于 Eppendorf Mastercycle 梯度 PCR 仪上进行.

1.3.5 循环次数和延伸时间的确定

用最佳反应体系对循环次数和延伸时间进行梯度试验.

1.3.6 最佳体系和程序的验证

用最佳反应体系和反应程序对 21 份越桔材料进行稳定性验证.

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

对越桔 DNA 提取方法适当改进(图 1), 获得 DNA 质量较好, 纯度高, 主带清晰, 无拖带, 杂质去除彻底, 适合做 ISSR-PCR 扩增模板.

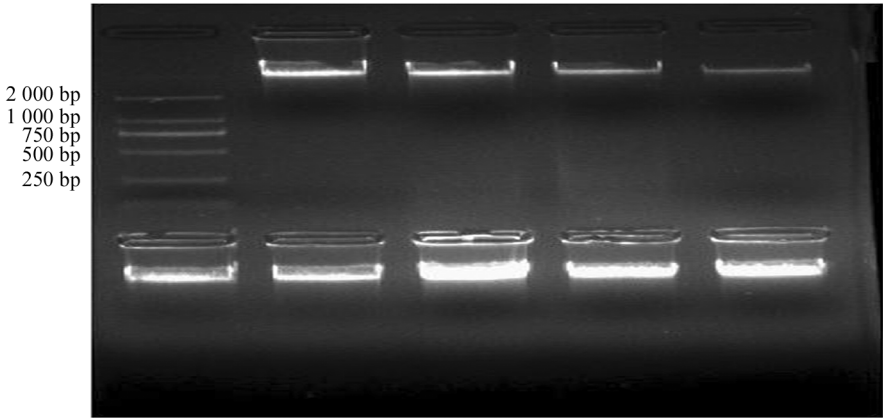


图 1 部分材料基因组电泳检测

2.2 PCR 正交设计直观分析

正交试验结果见图 2, 16 个组合除第 1,5,9,13 组合外均能扩出条带, 参照何正文等^[12]的方法对各组合打分, 条带丰富, 清晰且稳定的记 16 分, 最差的记 1 分, 两次重复单独记分. 根据打分求出每一因素同一水平下的均值 K_i , 并求出同一因素不同水平下平均值的极差 R (表 2).

表 2 正交设计直观分析

记分结果	Tag 酶	Mg ²⁺	模板	dNTPs	引物
k_1	9.000	1.000	4.875	6.125	2.875
k_2	6.250	5.000	5.000	5.000	7.875
k_3	4.375	9.750	4.625	5.750	6.250
k_4	3.250	7.125	8.375	6.000	5.875
R	5.750	8.750	3.750	1.125	5.000

极差 R 反应了各因素对结果的影响水平, R 越大影响越显著, 由表 2 可知各反应因素对蓝莓 ISSR

(20 μL) 反应体系的影响从大到小依次为: Mg^{2+} , Tag 酶, 引物, 模板, dNTPs. 每一因素水平下的平均值 K 反映了影响因素在该水平下对反应体系的影响大小, K 越大, 反应水平越好. 由直观的图片(图 2)可以看出, 在 16 种组合中, 反应最好的是第 7 组, 其分值也是最高的. 为了进一步确认第 7 组是否为最优组合, 还应进行方差分析和因素内多重比较分析.

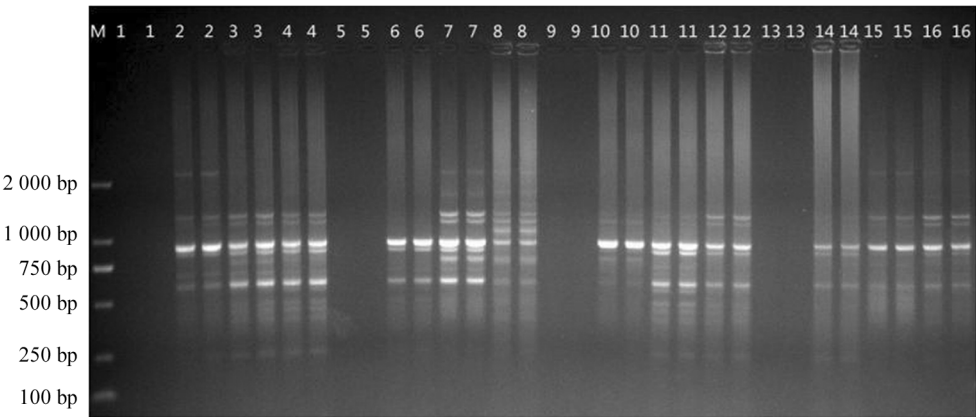


图 2 正交试验产物电泳结果

2.3 正交设计方差分析

经 SPSS17.0 软件方差分析和多重比较分析, Tag 酶, Mg^{2+} , DNA, dntps, primer 的 P 值均小于 0.01 (表 3), 说明这几个因素对反应的影响都是极具有统计学意义的. 且由 F 值可知, 各因素对反应的影响大小顺序与极差分析结果一致且极具有统计学意义, 可进一步进行因素内多重比较分析.

表 3 正交试验方差分析

源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	P
Tag	151.594	3	50.531	179.667**	0.004
Mg^{2+}	328.094	3	109.365	388.852**	0.001
DNA	75.844	3	25.281	89.889**	0.002
dntps	6.094	3	2.031	7.222**	0.003
引物	104.344	3	34.781	123.667**	0.002
误差	4.500	16	0.281		
总计	1 717.000	32			

注: ** 代表 0.01 水平差异显著.

经多重分析表明, 在 20 μL 体系中, Mg^{2+} 的 4 个水平是影响 PCR 结果的重要因素之一, Mg^{2+} 不仅影响 Tag 酶活性还能与体系中 dntps、DNA 和引物结合, 过量易生产非特异性扩增产物, 过少使产量不足^[9]. 本试验中由直观分析和方差分析综合可知: Mg^{2+} 浓度对反应的结果影响最大, 且当浓度为 1.875 mmol/L 时试验均值最高(图 3(a)), 从泳道 1、5、9 未扩出带, 而 3 和 7 带型清晰也能看出水平 3 的 Mg^{2+} 浓度为该体系中的最佳水平, 因此选择 1.875 mmol/L 为 Mg^{2+} 反应最佳水平.

本试验中 Tag 酶用量对 PCR 反应的影响仅次于 Mg^{2+} , 试验结果均值在 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 U 各水平间差异具有统计学意义, 且随浓度增加而降低(图 3(b)), 研究表明 Tag 酶浓度过高易产生非特异性条带, 扩增条带减弱, 清晰度下降^[13]. 从试验效果和经济角度出发选择 0.5 U 为最佳反应浓度较合适.

引物浓度过高易引起错配和非特异性产物增加, 多重比较分析结果均值随引物浓度先上升后下降(图 4(a)), 在 0.2 处达最高, 从处理 2 和 7 的条带明显好于 1(0.1 $\mu\text{mol/L}$) 和 14(0.4 $\mu\text{mol/L}$) 能看出 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 较其他水平效果好. 因此选择 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 为引物反应浓度.

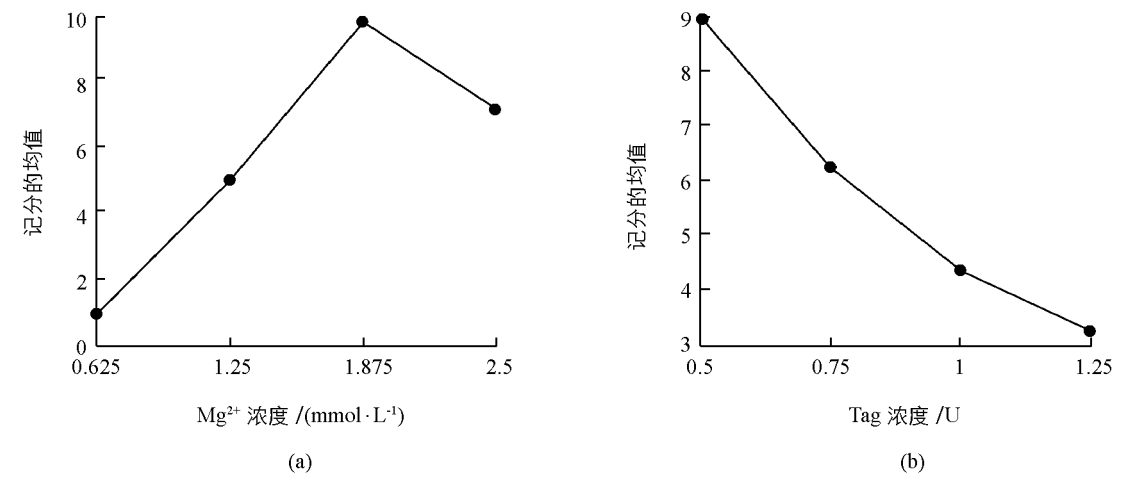


图 3 Mg^{2+} 浓度、Tag 酶浓度与均值多重比较分析直观图

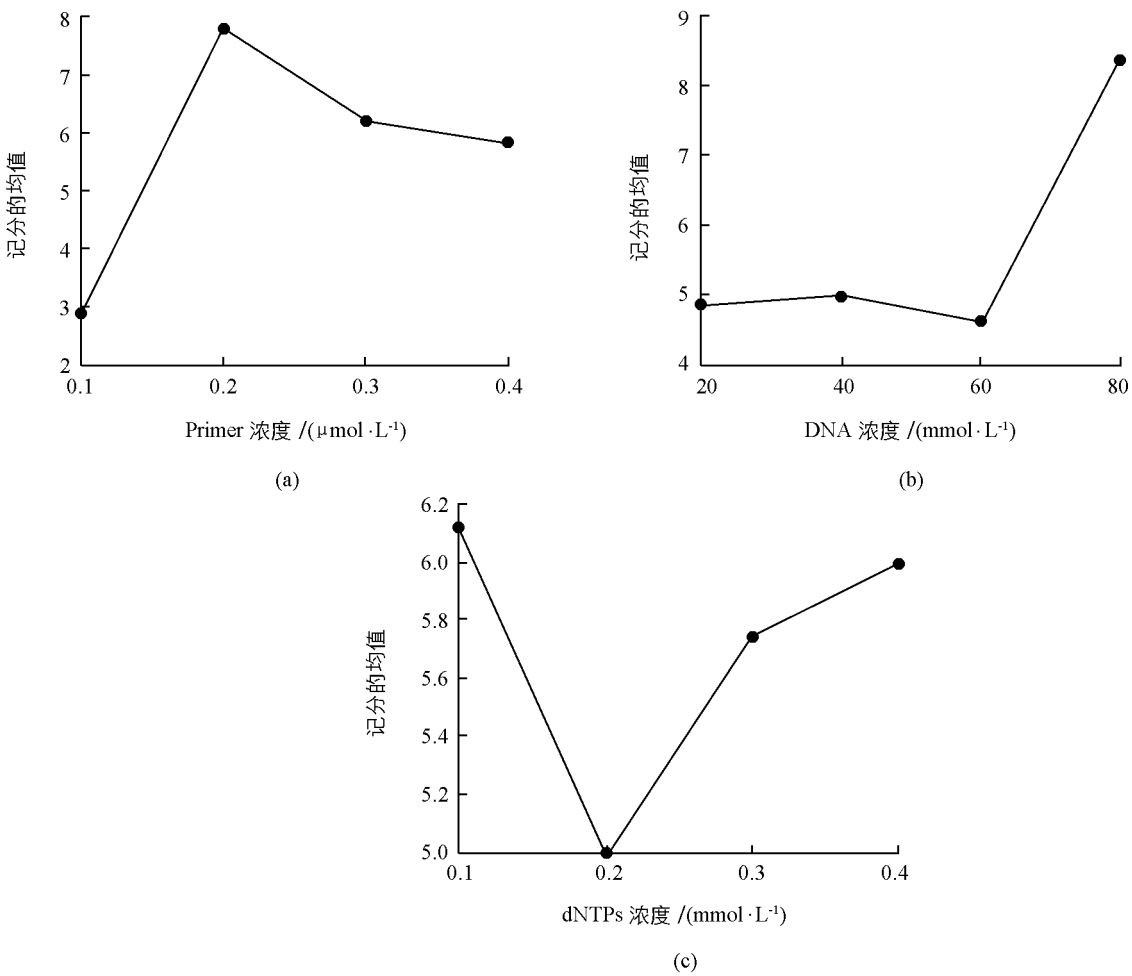


图 4 引物、模板、dNTPs 浓度与均值多重比较分析直观图

在 PCR 扩增中，模板加入的浓度与其种类、纯度、扩增目的等有关^[14]，基因组常用范围为 20~80 mg/L。本试验中 DNA 质量浓度在 80 mg/L 时结果均值最大，与李广平^[10]研究结果不同。

dNTPs 为 PCR 反应的原料，浓度过低扩增产物量下降，过高错配几率增加，本试验中结果均值随 Dntp 浓度先下降后上升，从经济角度考虑选用 0.1 mmol/L 作为最佳浓度。

综合以上正交试验的直观分析和方差分析得出：越桔 ISSR-PCR(20 μ L)体系中各组分的最佳浓度为：Tag 酶 0.75 U； Mg^{2+} 1.875 mmol/L；DNA 80 ng；dNTPs 0.1 mmol/L；引物 0.2 μ mol/L. 这与正交组合中得分最高的 7 组合(Tag 酶 0.5 U)相比，除 Tag 酶浓度不同外，其余均相同。

2.4 不同退火温度对越桔 ISSR-PCR 反应体系的影响

以越桔品种薄雾为材料，根据正交试验结果选择最佳组合进行引物 UBC835 退火温度梯度试验，由图 5 可知，退火温度较低时，扩增条带弱，背景模糊，随着温度提高，条带逐渐清晰，由于 ISSR 引物较长，可适当提高退火温度以提高扩增产物的特异性. 因此选择 54.2 $^{\circ}$ C 作为 UBC835 的最佳退火温度。

2.5 循环次数和延伸时间对越桔 ISSR-PCR 扩增的影响

ISSR-PCR 的循环次数对扩增效果具有重要影响，不同材料所需循环次数不同. 循环次数过少，扩增产物少，部分条带无法检测，循环次数过多会引起非特异性结合增加，产生弥散状条带. 由图 6 可知，当循环次数为 25 和 30 时，扩增条带较少而暗，当循环次数为 35 和 40 时扩增条带清晰，亮度高，当循环次数为 45 时，条带弥散并出现杂带干扰，因此，选择 35 次为越桔 ISSR-PCR 扩增的最佳循环次数。

延伸时间一般为(0.5~1 min) * 待扩增片段长度. 参照郑珊等^[15]的延伸时间，设置 30,60,90,120 s，4 个梯度，在 60 s 时获得最佳扩增效果，因此本试验选择延伸时间为 60 s。

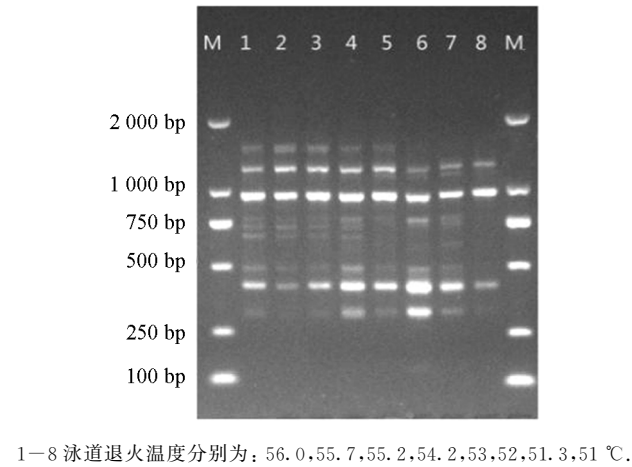


图 5 退火温度对 ISSR-PCR 扩增的影响

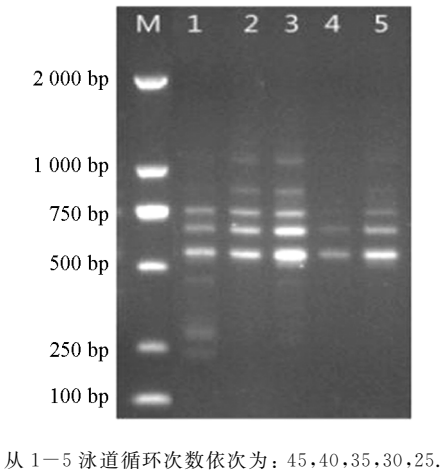


图 6 循环次数对 ISSR-PCR 扩增影响

2.6 最佳反应体系和反应程序的验证

用筛选获得的体系和程序并随机选取引物 UBC807 和 UBC827 对 21 份越桔资源进行 ISSR-PCR 扩增，结果见图 7. 两个引物扩增条带清晰、多态性高，说明该反应体系和程序稳定，适合越桔 ISSR 反应。

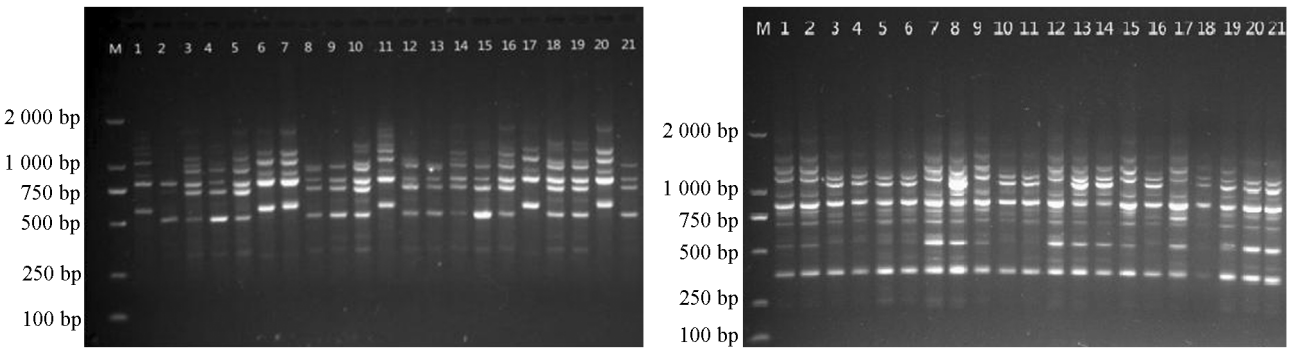


图 7 UBC807(左)和 UBC827 对 21 份越桔材料扩增情况

3 讨论和结论

ISSR 作为一种新型分子标记技术, 在植物种质资源鉴定、遗传多样性和亲缘关系的研究中已得到较为广泛的应用. ISSR-PCR 反应中所用引物来自于简单重复序列区域, 引物序列较长, 退火温度较高, 比 RAPD 等具有更高稳定性和灵敏性. 但 PCR 扩增易受 Tag 酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 等组分浓度的影响, 在对不同植物材料扩增之前应先优化反应体系. 本试验以正交设计从复因子试验中挑选部分有代表性的组合进行实验, 相对于单因素设计和完全组合设计减少了处理组合, 节省时间和财力. 直观分析得出最佳浓度与组合 7 最为接近, 并结合方差分析得出最佳反应体系(20 μ L): Tag 酶 0.75 U; Mg^{2+} 1.875 mmol/L; DNA 0.8 mmol/L; dNTPs 0.1 mmol/L; 引物 0.2 μ mol/L; 2 μ L 10 $\times$ buffer (Mg^{2+} free), 不足用超纯水补足. 引物 UBC835 最佳退火温度 54.2 $^{\circ}$ C, 最佳循环次数为 35 次, 最佳延伸时间为 60 s.

试验中得出 Mg^{2+} 和 Tag 酶浓度对反应影响最大, 而 dNTPs 影响最小, 而在其他物种的 ISSR 体系优化试验中^[16-18]发现 dNTPs 对反应的影响也是较大的, 这可能与 PCR 扩增的不稳定性和打分的主观性有关^[19]. 因此如果能建立更为客观的 PCR 评价标准将更好的促进体系优化. 本研究运用得出的最佳浓度组合对 21 份越桔资源进行 ISSR 扩增, 取得了理想的效果. 因此不同植物在初建立 PCR 反应体系时, 在参照亲缘关系较近物种的反应体系时, 应先进行正交设计, 对不确定的因素再进行单因素试验, 这样能快速建立高效的 PCR 反应体系.

参考文献:

- [1] GARRIGA M, PARRA, PABLO A, CALIGARI, PETER D S. Application of Inter-Simple Sequence Repeats Relative to Simple Sequence Repeats as a Molecular Marker System for Indexing Blueberry Cultivars [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2013, 93(5): 913-921.
- [2] 罗 慧, 丁广文, 郭启高, 等. 基于 ISSR 标记的 44 份桃种质资源遗传多样性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(5): 45-50.
- [3] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 园艺学报, 2007, 31(05): 112-120.
- [4] 王文恩, 包满珠, 张俊卫, 等. 狗牙根辐射诱变后代变异植株的形态特征比较和 ISSR 分析 [J]. 草业科学, 2009, 6(12): 320-328.
- [5] 李宏平, 江 曼, 石 佳, 等. 越橘“V₃”品种四倍体诱导及鉴定研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2013, 38(2): 90-95.
- [6] 崔建民, 刘红霞, 邹荣仟, 等. 越橘种质资源遗传多样性和亲缘关系研究 [J]. 果树学报, 2010, 27(3): 373-378.
- [7] 李雪松, 赵 康, 李 凌. 越橘“Legacy”离体培养及秋水仙素诱变研究初报 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(5): 51-57.
- [8] 於 虹, 顾烟, 贺善安, 等. 越橘品种的 ISSR 鉴定及其亲缘关系分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 512-515.
- [9] 宋 杨, 张红军, 窦连登. 越橘品种资源亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中国果树, 2014(6): 17-20.
- [10] 李广平, 柴梦颖, 张长青. 蓝莓 ISSR-PCR 反应体系建立与优化 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(12): 134-137.
- [11] 张鲁杰, 夏秀英, 徐 娜, 等. 高效提取越橘成熟组织基因组 DNA 的方法 [J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 205-208.
- [12] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [13] 王永清, 付 燕, 杨 芩, 等. 枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 林业科学, 2014, 4(46): 201-211.
- [14] 桂腾琴, 孙 敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系 [J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.
- [15] 郑 姗, 张立杰, 谢丽雪, 等. 蓝莓品种 ISSR 指纹图谱构建的初步研究 [J]. 福建农业学报, 2014, 29(12):

1198—1201.

- [16] 郭凌飞, 邹明宏, 曾 辉, 等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 林业科学, 2008, 11(5): 37—42.
- [17] CARVALHO M, MATOS M, CARNIDE V. Fingerprinting of *Vaccinium* *Corymbosum* Cultivars Using DNA of Fruits [J]. Horticultural Science, 2014, 41(4): 175—184.
- [18] 胡 甦, 王永清, 陶 炼. 三角紫叶酢浆草叶色变异株系的 RAPD 和 ISSR 标记初步鉴定 [J]. 园艺学报, 2011, 38(5): 930—938.
- [19] 曹嵩晓, 李娟玲, 刘国民. 利用单因子和正交设计双重实验方法优化广藿香 ISSR-PCR 实验体系 [J]. 热带生物学报, 2011, 3(2): 321—325.

Establishment and Optimization of an ISSR-PCR Reaction System for *Vaccinium* Linn.

CHEN Yue, LU Yan, LI Ling

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Based on the genomic DNA extracted from *Vaccinium* Linn. cultivar Misty with a modified CTAB method, five factors influencing ISSR were optimized in an orthogonal-design experiment. Through intuitive analysis and variance analysis, an optimal ISSR-PCR reaction system was established for this fruit crop, namely $10 \times$ buffer $2 \mu\text{L}$; 0.75 U Taq DNA polymerase; 1.875 mmol/L Mg^{2+} ; 80 ng template DNA; 0.1 mmol/L dNTPs; and $0.2 \mu\text{mol/L}$ primer. The optimal annealing temperature, number of cycles and extension time of primer UBC835 were investigated, and the results were 54.2°C , 35 cycles and 60s, respectively. Twenty-one *Vaccinium* accessions were used to test the stability of the optimized reaction system. The results indicated that the optimized reaction system was very stable.

Key words: *Vaccinium* Linn.; inter simple sequence repeat (ISSR); orthogonal design; intuitive analysis; variance analysis

责任编辑 潘春燕

