

地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化^{*}

席嘉宾, 郑玉忠, 杨中艺

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 在利用 ISSR 技术对地毯 *Axonopus compressus* (Sw.) Beauv. 种质资源的遗传多样性进行研究的实验过程中, 对影响 PCR 扩增效果的一些因素诸如 DNA 的提取、模板 DNA 质量浓度、Taq 酶的选择及其用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 的用量以及退火温度等指标进行筛选和优化, 筛选优化出可用于地毯草 ISSR-PCR 分析最适宜的 PCR 反应条件: 10 μ L PCR 反应体积中, 10 $\times$ Taq 酶配套缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 0.75 U Taq DNA 聚合酶 (上海申能博彩), 0.375 μ mol/L 引物, 180 μ mol/L dNTP, 1.5~2.0 mmol/L $MgCl_2$, 10 ng 模板 DNA。

关键词: 地毯草; 遗传多样性; ISSR; 实验条件; 优化

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 03-0080-05

地毯草 *Axonopus compressus* (Sw.) Beauv. 是禾本科地毯草属的一种多年生草本植物, 具有匍匐茎蔓延迅速, 耐热、耐水淹、耐贫瘠、对管理的要求低等优点。目前我国热带亚热带地区被广泛用于建植公共绿地草坪、水土保持和公路护坡草坪。该草种在我国热带亚热带地区的大部分地区都有野生种质资源分布。目前世界各国对地毯草种质资源的研究还只停留在一些简单的调查上, 还没有把性状的鉴定与控制性状的基因以及基因的传递和变异规律的研究结合起来。而对这一领域的研究, 无疑可以为将来地毯草种质资源的开发和利用以及培育具有自主知识产权的国产草坪草新品系 (种) 提供重要的理论依据^[1]。简单重复序列区间扩增多态 (ISSR) DNA 分析由 Zietkiewicz 等^[2]于 1994 年建立。该技术具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需 DNA 量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点, 同时也具有 SSR 的稳定性^[3]。因此, 近年来已迅速应用于品种鉴定^[4]、种质资源遗传多样性^[5]等领域的研究。但至今未见应用于地毯草种质资源方面的研究。

ISSR 技术虽然具有重复性高、原理简单的优点, 但不同反应体系也可产生不同的结果。为了确保 ISSR 分析结果的可靠性和重复性, 进行 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化是非常必要的。本研究探讨了适合于地毯草种质资源 ISSR 反应的最佳体系, 为将来进一步利用该标记技术研究地毯草种质资源的遗传多样性以及构建物理图谱奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

地毯草样品采集于我国的广东、云南和马来西亚等地。采样时每个样品尽量取同一部位的成熟叶片 3~5 片, 同一种群不同个体之间的距离保持在 3 m 以上, 采集的叶样装在密封袋硅胶干燥保存。采集时间为 2001 年 10 月至 2002 年 9 月。合计 15 个居群, 244 个个体。

1.2 主要实验仪器与试剂

主要仪器: Fastprep 植物组织破碎仪 (FastPrep[®] FP220, 美国 Qbiogen); Hoefer DyNa Quant 200 荧光仪; PCR 扩增仪 (Biometra pc 48, 德国); DF-D 型恒压恒流电泳仪 (北京东方仪器公司); DYY-II 型水平电泳槽 (北京青云航空仪表厂); 各型号微量移液器 (Eppendorf 公司)。16-2 型高压灭菌锅 (沈阳依专医疗器械厂); 各种吸头 (国产)。

主要试剂: ISSR 引物购自加拿大大不列颠哥伦比亚大学 (University of British Columbia, Set No. 9, No. 801-900); 100 bp DNA Ladder Plus 购自 MBI Fermentas; Taq polymerase 选用上海申能博彩的产品; dNTP 购自上海生工生物工程有限公司; 琼脂糖购自 Gene 公司。其它试剂为国产分析纯。

1.3 植物 DNA 提取与检测

地毯草总 DNA 的提取采用改进的 FastPrep 法。

* 收稿日期: 2004-03-18

基金项目: 科技部重大专项基金资助项目 (J2002-B-006); 中山大学张宏达科学研究基金资助项目

作者简介: 席嘉宾 (1970 年生), 男, 讲师; 通讯联系人: 杨中艺; E-mail: adszyv@zsu.edu.cn

所提取的总 DNA 首先以 Hoefer (DyNA Quant 200) 荧光仪和紫外分光光度计定量检测其浓度, 并用 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳 ($0.5 \times \text{TAE}$) 对所提取 DNA 的质量进行检测。

1.4 试验处理

本实验 DNA 模板质量浓度设计 10 个处理, 分别是 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$; Mg^{2+} 浓度梯度设置 8 个处理, 分别是 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L ; dNTP 浓度梯度设置 6 个处理, 分别是 120, 160, 180, 200, 240, 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$; Taq 酶的使用量设置 6 个处理梯度, 分别是 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50 U; 引物的退火温度在理论退火温度上下进行设置, 每次设置 4 个温度梯度, 直到筛选出最佳引物为止。

1.5 ISSR 反应以及电泳

本实验初始聚合酶链式反应 (PCR) 扩增体系设定为: 0.75 U Taq DNA 聚合酶, 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTP, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 10 ng 模板 DNA。本实验 PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 使模板 DNA 变性, 然后进入下列温度循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s、不同温度下 (根据不同的引物而定) 退火 45 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共计 45 个循环; 循环结束后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 10 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 终止反应。扩增反应结束后, 在 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶中分离扩增产物, EB 染色, 电压为 5 V/cm。当溴酚蓝指示剂距离前沿约 2~3 cm 时停止电泳。在自动凝胶成像系统上观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

应用改进的 CTAB 微量 Fastprep 法所提取的 DNA 呈白色沉淀, 电泳所显示的 DNA 完整, 带型清晰一致 (图 1)。从实验效果来看, 应用这一方法提取 DNA, 不仅省时省力, 而且提取效率很高。一般每人每天可以提取 100 多个样品, 而且所提取的总 DNA 的浓度基本一致, 避免了人工研磨样品所造成的 DNA 浓度不一致, 进而影响后期逐个调整模板浓度带来的诸多不便等问题。

2.2 DNA 模板质量浓度

DNA 模板最质量浓度是影响 ISSR-PCR 扩增效果的一个重要的因子。模板质量浓度过低, 扩增产物不稳定或无扩增产物; 模板质量浓度过高, 又会相应增加非特异性产物的出现。本实验在 2~100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 之间设置了 10 个模板质量浓度梯度参加 PCR 反应, 退火温度根据理论计算的退火温度

56 $^{\circ}\text{C}$, 用 3 个引物 (835, 841, 874) 进行扩增实验, 实验结果见表 1。

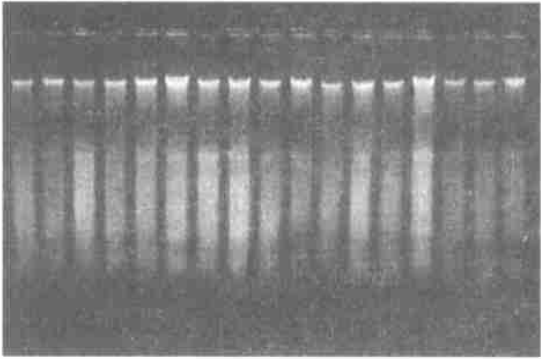


图 1 广东饶平样品总 DNA
Fig 1 Total DNA extracted from the samples Raoping, Guangdong

表 1 不同模板 DNA 质量浓度对 PCR 结果的影响¹⁾

引物	模板 DNA 质量浓度/($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)									
	2	4	6	8	10	20	40	60	80	100
835	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
841	—	—	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-

1) + 表示有扩增产物; ++ 表示扩增效率高; +/- 表示扩增产物不稳定; — 表示无扩增产物

表 1 表明, 模板 DNA 质量浓度对地毯草 ISSR 的扩增结果也存在一定的影响, 其中当模板质量浓度在 8~20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时均可以扩增出基本相同的带型, 而以模板质量浓度为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时最为稳定; 当模板 DNA 质量浓度低于 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时, 无扩增产物; 而当 DNA 质量浓度大于 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时扩增产物不稳定。在检测地毯草遗传多样性的研究中, 我们所采用的地毯草 DNA 模板的质量浓度为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

2.3 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度

在确定了模板质量浓度以后, 我们就 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度设计了互作组合浓度, 希望找出一个合理的, 能够扩增出清晰带型的浓度组合, Mg^{2+} 和 dNTP 浓度对 PCR 扩增结果的影响如表 2 所示。

表 2 表明, 当 Mg^{2+} 浓度在 0.5~1.5 mmol/L 之间时, 虽然有带型出现, 但扩增产物不稳定, 且扩增出的带型较少, 并常常出现非特异性产物。当大于或等于 2.5 mmol/L 时, 扩增产物不稳定或无扩增产物出现。而当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时, 均能得到清晰稳定的条带, 且无非特异性扩增。因此我们确定 Mg^{2+} 的最佳用量为 2.0 mmol/L 或 1.5 mmol/L , 具体所选用浓度视具体引物而定。

在所确定的几个 dNTP 浓度中, 当 dNTP 的浓度大于 240 $\mu\text{mol/L}$ 时, 无扩增产物或扩增产物不稳定。当浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 虽然无非特异性扩增出现, 但是所得到的带型比较模糊, 辨认带型比较困难。当 dNTP 的浓度为 180 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 的浓度为 1.5 mmol/L 和 2.0 mmol/L 以及当 dNTP 的浓度为 160 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时, 都可以得到比较清晰的带型, 不过以 dNTP 浓度为 180 $\mu\text{mol/L}$ 和 Mg^{2+} 的浓度为 2.0 mmol/L 组合所得到的带型最为清晰, 无非特异性扩增, 且重复性也高。

表 2 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度对 PCR 扩增结果的影响¹⁾

Tab 2 Effect of concentrations of Mg^{2+} and dNTP on PCR results	
dNTP 浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$c(\text{Mg}^{2+})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$
	0.5 0.8 1.0 1.2 1.5 2.0 2.5 3.0
120	+/- + + + + + +/- -
160	+/- +/- + + + ++ +/- -
180	+/- +/- + + ++ ++ +/- -
200	+/- +/- + + + + +/- -
240	- +/- +/- +/- +/- + +/- -
300	- - +/- +/- +/- +/- - -

1) + 表示有扩增产物; ++ 表示扩增效率高; +/- 表示扩增产物不稳定; - 表示无扩增产物所用引物为 841; 所用样品采自云南思茅。

2.4 Taq 酶的选择与用量

在确定了模板质量浓度、 Mg^{2+} 以及 dNTP 浓度后, 实验设置了 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50 U 酶含量梯度, 结果表明, 在 10 μL 的反应体系中, 使用 0.5~0.75 U Taq 酶含量均可以得到重复清晰的带型, 无非特异性扩增, 但当高于 1.0 U 个单位时, 虽然也能得到扩增产物, 但同时也出现非特异性扩增产物, 同时扩增产物主带相连, 模糊难以辨认。因此在地毯草 SSR-PCR 的反应体系中, Taq 酶的用量以 0.5~0.75 U 范围中所扩增的反应效果最佳。在我们所构建优化的地毯草 SSR-PCR 的反应系统中, Taq 酶的用量取 0.75 U。

许多实验已证明, 当其它条件一致时, 对同一样品使用不同厂家的 Taq 酶产品, PCR 扩增的带谱会有所不同。不仅如此, 在实验中还发现, 即使是同一厂家的 Taq 酶产品, 在分析同一批样品时也应尽量选择同一批次生产的 Taq 酶产品, 否则也会出现带型不稳以及亮带等现象 (图 2), 影响实验效果。

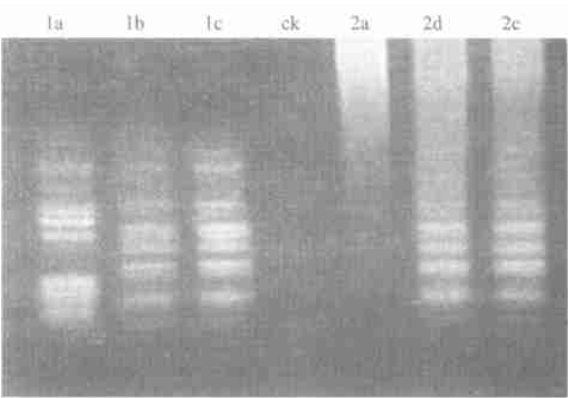


图 2 上海申能博彩公司不同批次 Taq 酶的 PCR 结果
Fig 2 PCR results obtained from different batches of TaqDNA polymerase

为马来西亚样 (a 为样品 1; b 为样品 2; c 为样品 3)。其中 1a, 1b, 1c 为同一批 Taq 酶产品扩增出的带型; 2a, 2b, 2c 为另一批 Taq 酶产品扩增出的带型, ck 为负对照。

2.5 退火温度

通过对所选引物的退火温度对扩增结果影响的梯度实验结果表明: 虽然根据理论退火温度的计算公式 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 计算出的几个引物的退火温度分别为: 引物 840 理论温度为 56 $^{\circ}\text{C}$, 引物 887 的理论温度为 42 $^{\circ}\text{C}$, 引物 890 的理论温度为 52 $^{\circ}\text{C}$ 。但是在地毯草的 PCR 扩增反应中, 理论退火温度下所扩增出的带型并不理想甚至无带型出现。而当引物 840 的实际退火温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 引物 887 的实际退火温度为 48 $^{\circ}\text{C}$, 引物 890 的实际退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时带型最为清晰。其它所选引物在扩增出清晰带型时的理论退火温度和实际退火温度也存在着较大的出入。

这一结果与他在其它植物上的试验结果一致^[6,7]。

2.6 优化系统对地毯草叶样的扩增效果

在 ISSR 反应体系中, PCR 扩增结果很容易受诸多因素的影响, 如模板质量浓度与纯度、Taq 酶的选择与用量、 Mg^{2+} 质量浓度、dNTP 的用量、扩增反应程序以及退火温度等, 为了获得重复性和可靠性较高的带谱, 提高地毯草遗传多样性分析的准确性, 我们有必要在实验前对其影响因子进行合理的构建和优化, 筛选出最为理想的反应条件。通过反复实验研究, 认为地毯草分析较为适宜的扩增条件是: 10 μL PCR 反应体积中, 1 $\times$ Taq 酶配套缓冲液 (10 mmol/L Tris HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, w = 0.1% Triton X-100), 0.75 U Taq DNA 聚合酶 (上

海申能博彩), 0.375 μmol/L 引物, 180 μmol/L dNTP, 1.5~2.0 mmol/L MgCl₂, 10 ng 模板 DNA。

利用该反应体系对加拿大哥伦比亚大学提供的 100 个引物进行了筛选, 从所筛选出的引物对地毯草遗传多样性的检测研究中我们发现, 用该优化系统所产生的 ISSR 标记位点清晰, 反应系统稳定, 检测多态性能力较强, 并具有较好的重复性 (见图 3), 可用于地毯草遗传多样性的分析和研究。

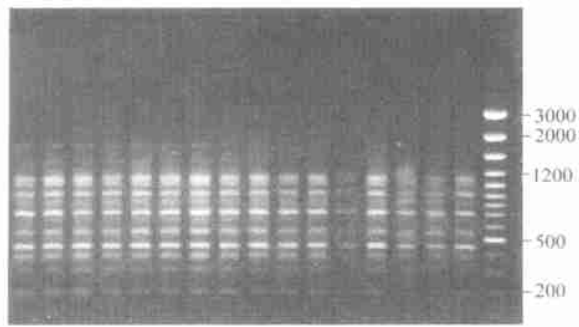


图 3 引物 889 对云南思茅 16 个地毯草个体扩增的 ISSR 带型

Fig 3 ISSR profiles of 16 samples from Simao (Yunnan) population, using primer 889
M: 100 bp DNA ladder plus

3 讨 论

完整、高质量的 DNA 是获得重复性好、准确可靠的 ISSR-PCR 结果的保证。有关植物 DNA 提取的方法很多, 其中以 Doyle 等人于 1987 年提出的 CTAB 法的应用最为广泛^[8]。本实验采用了改进的 CTAB 微量 Fastprep 法进行 DNA 提取。该法是在室温下采用 FastPrep 植物组织破碎仪代替传统的 CTAB 液氮研磨植物叶片法, 具有快速、便捷和微量的好处。同时, 这一提取方法非常适用于野外采样后用硅胶干燥草坪植物叶片样品的保存和提取, 而且也使 ISSR 技术在草坪植物遗传多样性检测中的标准化以及规模化成为可能。模板 DNA 质量浓度对地毯草 ISSR 的扩增结果的影响范围较对较小, 如果所建的扩增系统比较好的话, 模板 DNA 质量浓度在 8~20 ng/μL 的范围均可以扩增出基本相同的带型, 因而在具体的实验中, 模板 DNA 浓度可以不作为重点优化的对象。

Mg²⁺ 浓度是影响 ISSR-PCR 结果的一个重要因素。Mg²⁺ 浓度不仅影响 Taq 酶的活性, 还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[9]。在一般的 PCR 反应中, 0.5~2.0 mmol/L 是较合适的 Mg²⁺ 浓度范

围^[10], 本研究所得到的 Mg²⁺ 优化浓度范围 1.5~2.0 mmol/L 也证实了底物这一点。而 dNTP 是 ISSR-PCR 反应的原料, dNTP 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^[10]。在一般的 PCR 反应中, dNTP 浓度在 20~200 μmol/L 的范围是比较合适的浓度范围^[10]。在我们的实验中, 发现最为理想的 dNTP 浓度是 180 μmol/L。

在 ISSR-PCR 反应体系中, Taq 酶的种类以及使用量直接影响扩增反应的成功与否。使用高浓度的 Taq 酶不仅提高了成本, 而且也容易产生非特异性扩增产物; 而当 Taq 酶浓度过低时, 则会导致产物的合成效率下降。同时不仅不同厂家从不同菌株上分离的 Taq 酶在性能上可能有些差异, 而且同一厂家不同批次的产品也有可能存在一定的差异, 因此, 为了减少实验误差, 应尽量使用同一厂家同一批次生产的产品。

在同一 PCR 反应系统中, 退火温度不同, 产生错配的程度也不同, 通常较低的温度在保证引物与模板结合稳定性的同时, 也会使引物与模板之间未完全配对的一些位点间得到扩增, 即产生一定的错误扩增。因此, 在允许的范围内, 选择较高的退火温度可减少引物和模板之间的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性^[10]。此外, 同一引物, 不同植物样品所用的退火温度可能大不相同, 如余艳等用 ISSR 技术检测沙冬青 *Ammopiptanthus mongolicus* 时, 引物 880 和 889 的退火温度分别为 52℃和 50℃^[9], 而我们在做地毯草样品时发现这两个引物的最佳退火温度分别是 62℃和 59℃。

在筛选地毯草的适宜引物时, 所选引物如果在大部分地毯草的 DNA 样品中都不能扩增出带型, 可以说明该引物的序列与地毯草基因组的同源性较低, 不宜用来作为地毯草植物 ISSR-PCR 扩增的引物。这就要求实验前筛选或设计引物时一定要慎重、辩证。目前国际上研究者所用引物基本上均为加拿大哥伦比亚大学生产的引物试剂盒, 不过现在我国上海生工 (Sango) 公司已自行开发出 ISSR 引物试剂盒, 这为今后国内相关领域的研究提供了极大的便利。

当然, 影响地毯草产生良好清晰带型的因素很多, 在具体的实验中, 不同的系统构建和优化需要灵活调节, 只有这样, 才能得到重复性强的结果。

参考文献:

[1] 席嘉宾, 杨中艺. 中国地毯草野生种质资源调查[J]. 草

业学报, 2004, 13(1): 35—41.

[2] ZIETICWIEZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176—183.

[3] 何予卿, 张宇, 孙海, 等. 利用标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 123—127.

[4] AMMIRAJU J S S, DHOLAKIN B B, SANTRA D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 726—732.

[5] LIA G S. Genetic variation and clonal diversity of *Psam-mochloa villosa* (*Poaceae*) detected by ISSR markers [J]. Ann Bot, 2001, 87: 585—590.

[6] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间(ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15—19.

[7] 宣继萍, 章镇. 适合于苹果 ISSR 的反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 549—550.

[8] DOYLE J J, DOULE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11—15.

[9] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 7—14.

[10] LU S D. Current Protocols for Molecular Biology[M]. Second edition Beijing Peking Union Medical College Press, 1999: 458—463. (in Chinese).

Establishment and Optimization of ISSR Reaction System for Carpetgrass

XI Jia bin, ZHENG Yu zhong, YANG Zhong yi

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Factors which affect the ISSR analysis in the study of the genetic diversity of carpetgrass, such as genomic DNA extraction, concentration of template DNA, Taq DNA polymerase, Mg^{2+} concentration, dNTP and annealing temperature, were studied for optimizing conditions of the ISSR-PCR. The results showed that the conditions being suitable for ISSR-PCR of carpetgrass were as follows: $1\times$ Taq buffer (10 mmol/L Tris HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X 100), 0.75 U Taq DNA (produced by Shenneng company), 0.375 μ mol/L primer, 180 μ mol/L dNTP, 1.5~2.0 mmol/L $MgCl_2$, and 10 ng template DNA.

Key words: carpetgrass; genetic diversity; ISSR; experimental conditions; optimization