

香蕉 ISSR 反应体系的建立

王钱洁, 秦永华, 陈厚彬, 胡桂兵

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:以35份香蕉品种为材料,采用正交设计 $L_{25}(5^6)$ 对PCR反应中的DNA质量浓度、*Taq* DNA聚合酶用量、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、退火温度及甲酰胺浓度等6个因素在5个水平上进行了优化试验.建立了稳定的、可重复的香蕉ISSR最佳反应体系和PCR扩增参数.确定在25 μ L的反应体系中,DNA模板质量浓度为0.8 ng/ μ L, Mg^{2+} 浓度为1.5 mmol/L,dNTPs浓度为0.3 mmol/L,引物浓度为0.2 μ mol/L,*Taq*酶为1.25 U,退火温度为52 $^{\circ}$ C.

关键词:ISSR; 香蕉; 体系优化; 正交试验

中图分类号:S668.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)01-0013-04

Establishment of an Inter-Simple Sequence Repeats Reaction System (ISSR) for Banana (*Musa AAA*)

WANG Qian-jie, QIN Yong-hua, CHEN Hou-bin, HU Gui-bing

(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A suitable ISSR-PCR amplification system of banana was established using thirty five banana cultivars as materials. Orthogonal design was used to optimize the reaction condition of ISSR experiment in six factors (DNA, *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , primer, formamide and annealing temperature) at five levels respectively. A stable and repeatable reaction system of ISSR for banana was established. PCR reaction volume of 25 μ L included 0.8 ng/ μ L DNA template, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L primer concentration and 1.25 U *Taq* DNA polymerase dosage, and proper annealing temperature was 52 $^{\circ}$ C.

Key words: ISSR; banana; optimum system; orthogonal design

分子标记技术以其反映大量遗传信息、不受时间和空间制约的特点,在辅助植物遗传育种领域已经得到广泛应用.但每种标记各有优缺点,RAPD技术快速、简便、经济但重复性不佳;RFLP、AFLP技术分辨力高,重复性较好,但操作复杂,试验成本较高;简单重复序列(SSR)技术特异性、多态性、重复性均较好,但需要知道重复序列两端的DNA序列来设计特异的引物,因此只能局限于一些重要的物种^[1].简单重复序列中间区域(Inter-simple sequence repeats,

ISSR)技术是由 Zietkiewicz 等^[2]创建的一种微卫星类分子标记技术.其原理是真核生物广泛存在 SSR,如(GA)_n、(AT)_n、(GAA)_n等,利用 SSR 本身设计引物,通常为16~18个碱基序列.为扩增出反向排列的、间隔不大的重复序列间的基因组片段,通常在引物的5'或3'末端添加几个非重复的锚定碱基以保证引物与基因组DNA中SSR的5'或3'末端相结合. ISSR通常为显性标记,具有多态性好、DNA用量少、技术要求低、成本低廉等优点.更重要的是,ISSR扩

收稿日期:2008-12-08

作者简介:王钱洁(1981—),男,硕士,现为复旦大学博士研究生;通讯作者:胡桂兵(1969—),男,教授,博士,E-mail:guibing@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2006A20201007)

增的退火温度较高,从而保证了 PCR 扩增的可重复性^[3]. 因此,ISSR 在植物遗传育种中具有广阔的应用前景. 目前,ISSR 分子标记技术已经在李^[3]、苹果^[4]、柑橘^[5]、甘蔗^[6]、莲雾^[7]、杨梅^[8]等果树上广泛应用,并且建立了柑橘^[9]、苹果^[10]等品种的指纹图谱,ISSR 分子标记技术在果树上已显示出了广阔的应用空间. 香蕉是世界四大名果之一,也是最重要的热带亚热带水果之一,具有极高的经济价值和营养价值. 而有关 ISSR 分子标记技术在香蕉上的研究鲜见报道. 本研究以香蕉为材料,通过对 ISSR 反应体系各影响因子进行优化,建立了适合香蕉的 ISSR 反应体系,为该技术在香蕉种质资源研究和遗传育种研究中的应用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

35 份香蕉品种,均取自东莞香蕉蔬菜研究所香蕉种质资源圃. 以 GCTCV-119 和巴西蕉品种为模板对 ISSR 反应体系进行优化.

Taq DNA 聚合酶,购自 TaKaRa 公司;dNTPs、甲酰胺,购于上海生工生物工程有限公司;100 条 ISSR 引物,参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的序列由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[11]提取香蕉幼叶基因组 DNA,用分光光度计(BioPhotometer)和凝胶电泳法检测 DNA 的浓度和质量,并将 DNA 稀释至 5.0 ng/ μ L 备用.

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应在 Bio-Rad 公司生产的 iCycler Thermal Cycler 5828R 仪器上进行,扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,进行 35 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存.

PCR 产物用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染色后在 Bio-Rad 公司的 Gel-2000 凝胶成像系统上观察,并采集图像.

1.2.3 PCR 反应体系的正交试验 采用正交设计助手软件设计 $L_{25}(5^6)$ 正交试验, DNA 模板设置 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ng/ μ L; Mg^{2+} 浓度设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; dNTPs 浓度设置 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L; 引物浓度设置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ mol/L; *Taq* 酶设置 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 U;此外,还设计了甲酰胺体积比梯

度,即 0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0%,反应总体积为 25 μ L. 共 25 个试验组合(表 1).

1.2.4 退火温度的筛选 利用正交试验从 100 条引物选出对香蕉品种扩增性较好的引物,对 35 个香蕉品种进行 ISSR 扩增. 然后利用扩增效果较好的引物 818、847 和 855,设置 55、54、53、52、51、50、49 和 48 $^{\circ}$ C 共 8 个温度梯度,以香蕉品种 GCTCV-119 和巴西的 DNA 为模板进行 ISSR 扩增. 并确定各引物最佳的退火温度.

表 1 ISSR $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计表

Tab. 1 ISSR $L_{25}(5^6)$ orthogonal design

组 合	$\rho(\text{DNA})/$ (ng $\cdot$ μ L ⁻¹)	$c(\text{Mg}^{2+})/$ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)	$c(\text{dNTP})/$ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)	$c_{\text{引物}}/$ (μ mol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U	φ (甲酰 胺)/%
1	10	0.5	0.10	0.1	0.50	0
2	10	1.0	0.15	0.2	0.75	0.5
3	10	1.5	0.20	0.3	1.00	1.0
4	10	2.0	0.25	0.4	1.25	1.5
5	10	2.5	0.30	0.5	1.50	2.0
6	15	0.5	0.15	0.3	1.25	2.0
7	15	1.0	0.20	0.4	1.50	0
8	15	1.5	0.25	0.5	0.50	0.5
9	15	2.0	0.30	0.1	0.75	1.0
10	15	2.5	0.10	0.2	1.00	1.5
11	20	0.5	0.20	0.5	0.75	1.5
12	20	1.0	0.25	0.1	1.00	2.0
13	20	1.5	0.30	0.2	1.25	0
14	20	2.0	0.10	0.3	1.50	0.5
15	20	2.5	0.15	0.4	0.50	1.0
16	25	0.5	0.25	0.2	1.50	1.0
17	25	1.0	0.30	0.3	0.50	1.5
18	25	1.5	0.10	0.4	0.75	2.0
19	25	2.0	0.15	0.5	1.00	0
20	25	2.5	0.20	0.1	1.25	0.5
21	30	0.5	0.30	0.4	1.00	0.5
22	30	1.0	0.10	0.5	1.25	1.0
23	30	1.5	0.15	0.1	1.50	1.5
24	30	2.0	0.20	0.2	0.50	2.0
25	30	2.5	0.25	0.3	0.75	0

2 结果与分析

2.1 正交试验优化组合

以 GCTCV-119DNA 为模板,选用 824、836 和 889 共 3 条引物进行正交试验. 结果表明,在 25 个组合中,扩增效果有明显差异(图 1). 从图 1 可以看出,第 13 个组合在不同的 3 个引物扩增下,无论在条带数量,还

是条带亮度方面均表现不错. 最佳组合的选择标准是条带多、清晰、且条带表现相对稳定. 因此, 第 13 个组合为香蕉 ISSR 最佳体系, 即 DNA 模板质量浓度为 $0.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L , dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L , 引物浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶为 1.25 U , 总反应体积 $25 \mu\text{L}$.

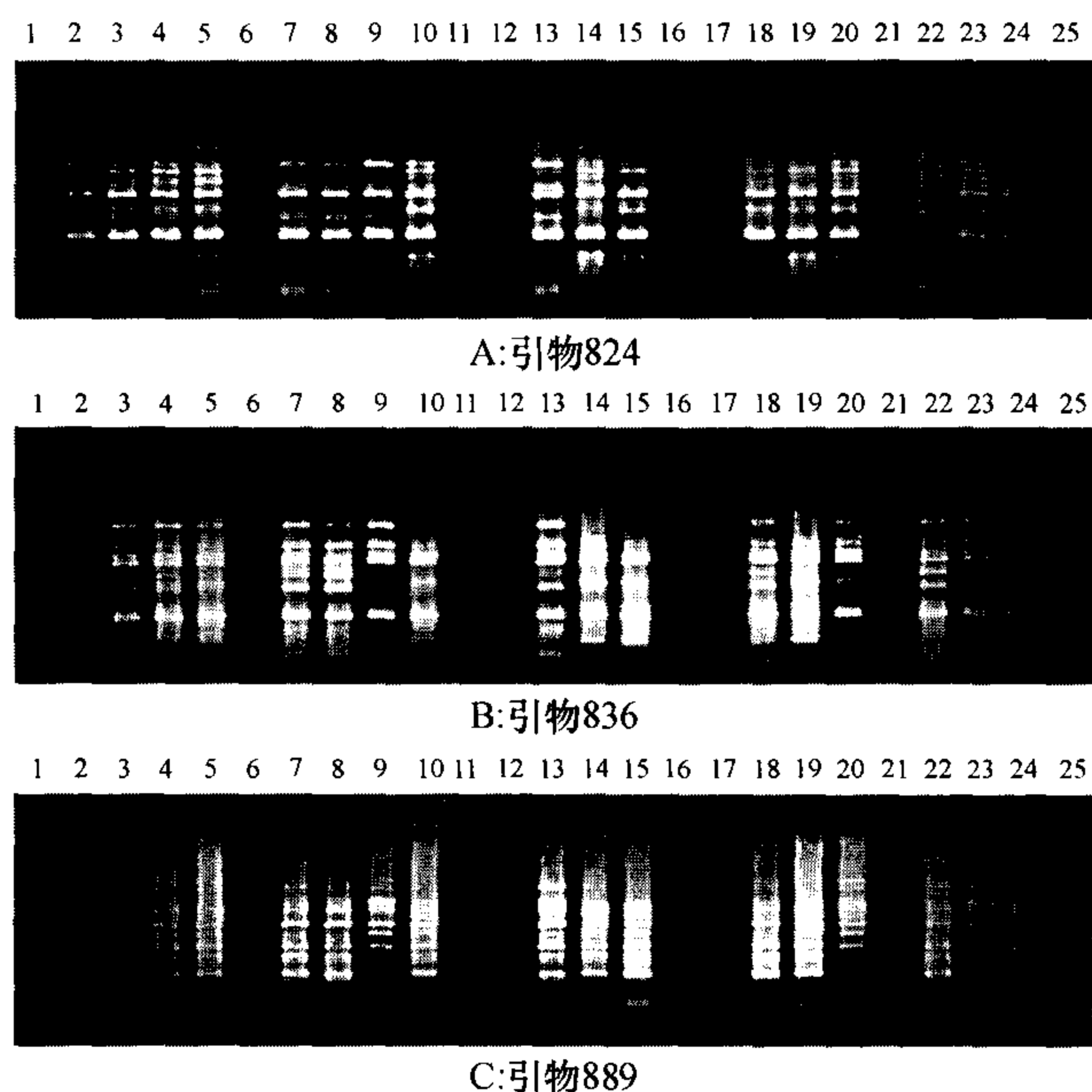


图1 25个组合在引物824, 836和889中正交试验ISSR扩增结果

Fig. 1 Results of ISSR-PCR amplification by orthogonal design with primer 824, 836 and 889

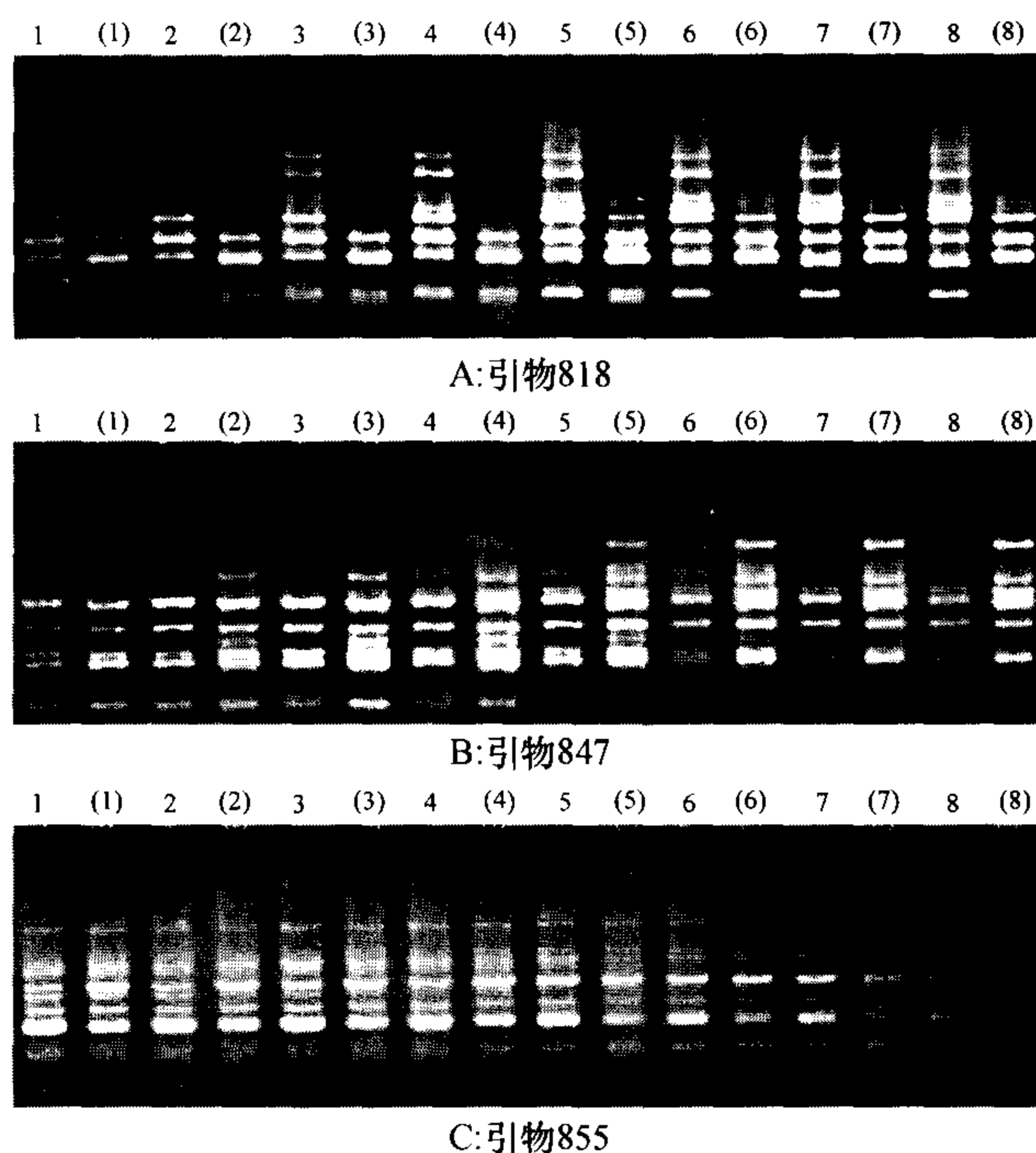
2.2 不同退火温度对ISSR扩增的影响

研究表明, 退火温度对ISSR-PCR扩增谱带有明显的影响^[12], 因此本研究探讨了不同退火温度对香蕉ISSR扩增的影响, 以确定每条引物较佳的退火温度. 图2的结果表明, 在 $48 \sim 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度范围中, 3条引物对GCTCV-119和巴西这2个香蕉品种的ISSR扩增谱带基本一致, 没有明显的条带差异. 在退火温度较高时, 条带清晰, 但条带相对较少; 在退火温度较低时, 条带较亮, 但有些条带并在一起, 这对后续读带处理工作造成一定困难. 因此我们选择中间条带多且清晰的扩增退火温度, 以求达到最佳的试验效果. 由图2可见, 第4个退火温度, 即 $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 是香蕉ISSR扩增的最佳退火温度, 这与邹喻苹等^[13]研究结果一致.

2.3 香蕉ISSR优化体系的应用

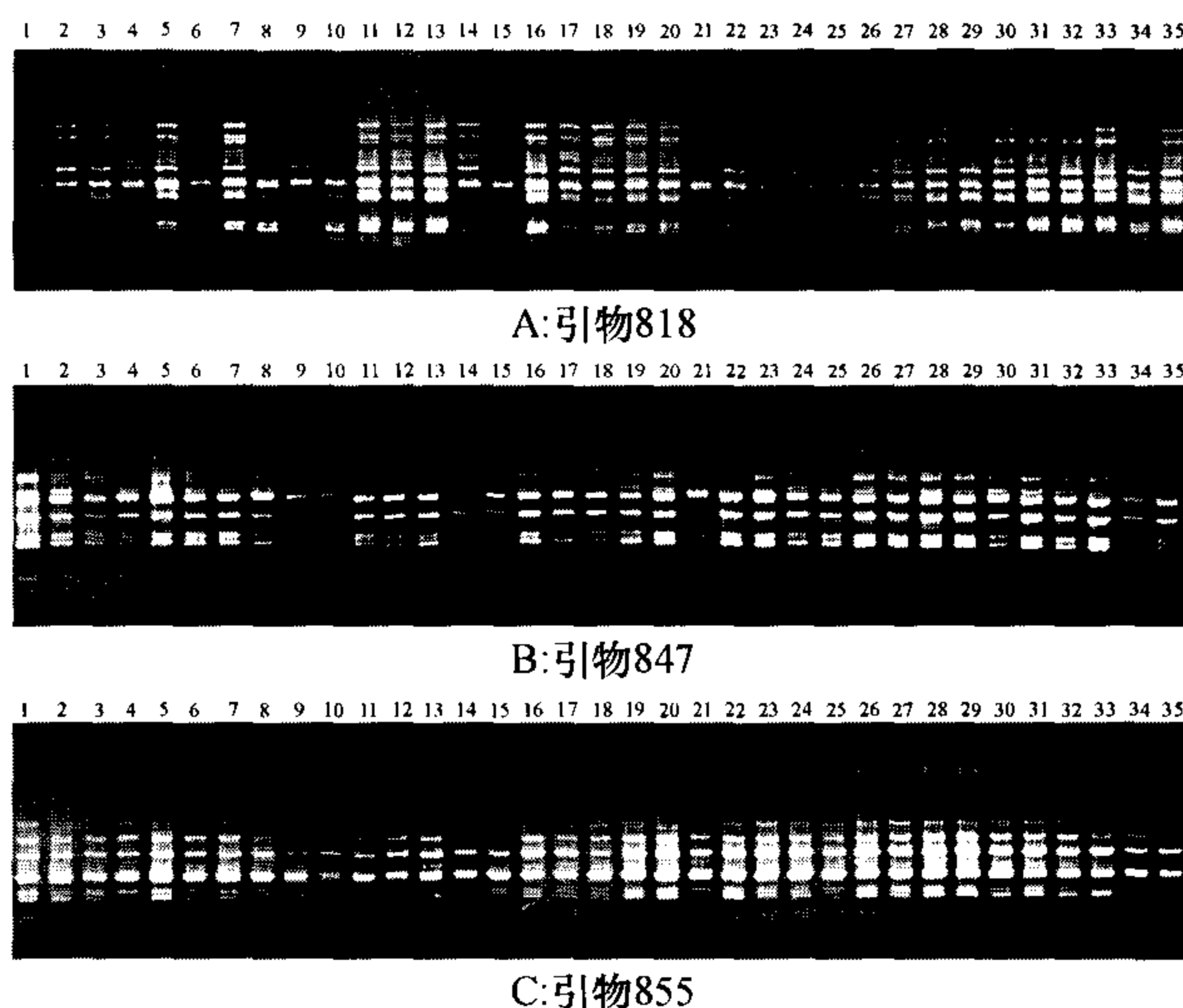
利用引物818、847和855对35份香蕉品种进行PCR扩增, 以检测优化的ISSR体系的扩增效果. 结果如图3所示, 3个引物在35份香蕉品种上均能扩增出清晰、重复性好、条带多的谱带. 表明建立的

香蕉ISSR反应体系稳定可靠, 可以应用于后续的研究.



1, (1): $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 2, (2): $54 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 3, (3): $53 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 4, (4): $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 5, (5): $51 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 6, (6): $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 7, (7): $49 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 8, (8): $48 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 1~8: GCTCV-119; (1)~(8): 巴西

图2 引物818、847和855不同退火温度的ISSR扩增结果
Fig. 2 Results of ISSR amplification by primer 818, 847 and 855 at different annealing temperatures



1: GCTCV-105, 2: GCTCV-247, 3: GCTCV-119, 4: 89-1, 5: 华农甜蕉, 6: 龙州中把, 7: 那龙高把, 8: 天宝矮蕉, 9: 那坡高把, 10: 粗把香芽, 11: 河口高把, 12: 北大矮, 13: 泰国, 14: 大南香蕉, 15: 浦北中把, 16: 巴西, 17: 浦北高把, 18: 东莞中把, 19: 那龙中把, 20: 8818, 21: 矮脚顿地雷, 22: 墨西哥, 23: 天宝988, 24: 高脚顿地雷, 25: 漳选2号, 26: 齐尾, 27: 河口中把, 28: 菲律宾, 29: 红河矮蕉, 30: 广东2号, 31: 天宝高脚, 32: 那龙矮脚, 33: 索马里3号, 34: 浦北矮蕉, 35: 定安高芽

图3 引物818、847和855的ISSR扩增结果
Fig. 3 The result of ISSR amplification by primer 818, 847 and 855

3 讨论

基于 PCR 扩增反应的 ISSR 分子标记技术,具有重复性好、灵敏、检测多态性能力强、所需 DNA 模板的量少等优点^[1].但其扩增结果同样受到模板浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量等因素的影响^[14].ISSR 分子标记技术反应体系中的 *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 和 dNTP 等是相互影响的,聚合酶是依赖于 Mg^{2+} ,而 Mg^{2+} 能定量地与 dNTP 分子中的磷酸基团结合,dNTP 浓度过高则会与聚合酶竞争 Mg^{2+} ,从而影响到聚合酶活性,因此三者的有效浓度相互影响.本试验中,25 μ L 体系中 *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 与 dNTP 最佳组合分别确定为 1.25 U、1.5 mmol/L 和 0.3 mmol/L.研究表明,25 μ L ISSR 扩增体系中,酶的用量在 0.3 ~ 2.5 U 之间,物种之间差异较大,可能也与不同厂家酶的活性不同有关^[3-10,15].*Taq* DNA 聚合酶的浓度过高不仅会导致非特异带的增加,而且会产生弥散现象;过低则会降低扩增效率.本试验所得 *Taq* DNA 聚合酶最佳用量为 1.25 U (25 μ L 体系),既能保证试验结果的可靠性,又能减少试验成本.

引物和模板 DNA 的量同样是影响 ISSR-PCR 扩增效率和稳定性的重要因素^[14].引物浓度过高易导致碱基错配、引物二聚体的形成;过低则会导致扩增效率下降,甚至扩增不出条带.模板 DNA 的浓度过高不利于 PCR 扩增,甚至导致扩增失败;过低则会降低扩增效率.本试验确定引物的最佳浓度为 0.2 μ mol/L, DNA 模板的质量浓度为 0.8 ng/ μ L.最后采用最佳因素水平组合,利用引物 818、847 和 855 对 35 份香蕉品种进行 PCR 扩增,扩增出清晰、重复性好、条带多的谱带,这说明建立的香蕉 ISSR 反应体系稳定可靠,为香蕉品种 ISSR 指纹图谱建立、品种鉴定、新品种选育、数量性状基因定位等工作奠定了基础.

正交试验具有设计均衡分散、综合可比、可伸可缩、效用明显的特点^[16],并得到广泛应用^[17-18].本试验利用正交设计 $L_{25}(5^6)$ 对影响 PCR 反应条件的主要因素进行了研究,较快的找到了最佳组合,建立了稳定的、可重复的香蕉 ISSR 最佳反应体系和 PCR 扩增参数.因此,在对 PCR 反应体系进行优化时,正交试验是一种切实可行的方法.

参考文献:

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

- [2] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [3] 乔玉山, 章镇, 房经贵, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 270-274.
- [4] 宣继萍, 章镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 549-550.
- [5] FANG D Q, ROOSE M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat marker [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(3): 408-417.
- [6] 余爱丽, 张木清, 陈如凯. ISSR 分子标记在甘蔗及其近缘属分类上的应用[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(4): 484-489.
- [7] 何桥, 梁国鲁, 谢江辉. 莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. 果树学报, 2005, 22(2): 186-189.
- [8] 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 杨梅不同品种的 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 343-346.
- [9] SCARANO M T, ABBATE L, FERRANTE S, et al. ISSR-PCR technique: A useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin [J]. Plant Cell Rep, 2002, 20(12): 1162-1166.
- [10] 宣继萍, 章镇, 房经贵, 等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 421-423.
- [11] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624.
- [12] 刘海河, 侯喜林, 张彦萍. 西瓜 ISSR-PCR 体系的正交优化研究[J]. 果树学报, 2004, 21(6): 615-617.
- [13] 邹喻苹, 蔡美琳, 王晓东, 等. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种质资源的 RAPD 分析[J]. 植物学报, 1998, 40(2): 163-168.
- [14] 冯富娟, 王凤友, 刘彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J]. 植物学通报, 2004, 21(3): 326-331.
- [15] JIAN S G, TANG T, ZHONG Y, et al. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia [J]. Aquatic Botany, 2004, 79: 75-86.
- [16] 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.
- [17] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 445-450.
- [18] 林萍, 张含国, 谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 34-37.

【责任编辑 周志红】