

茶树 ISSR- PCR反应体系优化研究

林郑和, 陈荣冰, 陈常颂

(福建省农业科学院茶叶研究所, 福建 福安 355014)

摘要: 通过优化影响茶树 ISSR- PCR的主要参数, 确立适合于茶树的 ISSR反应体系和扩增条件。结果表明, 在 20 μ l 反应体系中模板 DNA 的用量、Taq 酶用量、引物浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度分别为: 模板 DNA 为 40 ng; Taq 酶为 0.5 U; 引物为 0.25 μ mol \cdot L⁻¹; MgCl₂ 为 1.5 mmol \cdot L⁻¹; dNTP 为 0.2 mmol \cdot L⁻¹。适宜退火温度比 T_m 值高 2~ 3 $^{\circ}$ C。

关键词: 茶树; ISSR- PCR; 体系优化

中图分类号: S 571.1

文献标识码: A

Optimization of ISSR- PCR reaction system in tea plant

LIN Zheng-he, CHEN Rong-bing, CHEN Chang-song

(Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fú'ān, Fujian 355014, China)

Abstract The optimal ISSR- PCR reaction conditions in tea was established by studying the main parameters. Results showed that the optimal concentration of DNA, Taq polymerase, primer, Mg²⁺, dNTP in 20 μ l reaction mixture was 40 ng, 0.5 U, 0.25 μ mol \cdot L⁻¹, 1.5 mmol \cdot L⁻¹, 0.2 mmol \cdot L⁻¹. The appropriate annealing temperature was 2~ 3 $^{\circ}$ C higher than T_m of corresponding primer.

Key words tea plant; ISSR- PCR; system optimization

茶树种质资源遗传多样性 亲缘关系方面已有一定的研究报道, 但利用更为稳定的 ISSR 技术研究茶树种质资源遗传多样性的报道却比较少。ISSR 标记, 即锚定简单重复序列是由 Zietkiewicz E Rafalski A Labuda D 提出的, 是一种利用 PCR 扩增进行检测的 DNA 标记, 所用的引物是基于简单序列重复而设计的寡核苷酸引物, 用来检测两个 SSR 之间的一段短 DNA 序列的差异^[1]。结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 具有模板需要量少、多态性丰富、试验成本低、操作简单、试验稳定性高等优点。近年来已迅速应用于品种鉴定、种质资源遗传多样性分析等领域的研究^[2~ 3]。作为一种随机扩增的 PCR 技术, ISSR- PCR 往往受到多种因素的影响, 笔者拟以茶树幼嫩叶片 DNA 为材料, 探讨模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、Mg²⁺ 用量、引物退火温度等因素对 ISSR- PCR 反应的影响, 建立茶树 ISSR- PCR 最佳反应体系, 以期为进一步进行茶树种群间遗传多样性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验主要在福建农林大学分子生物实验室进行。供试验茶树品种 (表 1) 均从福建省农业科学院茶叶研究所的种质资源圃采集。

1.2 仪器与设备

Eppendorf 5804R 冷冻离心机, Eppendorf Mastercycler gradient PCR 扩增仪, DYY- 68 型稳压稳流电泳仪 (北京六一), DYCP- 33A 型电泳槽 (北京六一), Syngene GeneGenius 凝胶成像系统, 电子天平, 高压蒸汽灭菌器, 超净工作台, 低温冰箱, 移液器, 微波炉, pH 酸度计, 快速混匀器, 台式离心机, 超纯水器, 恒温水浴仪。

1.3 试验方法 (DNA 提取)

参照陈亮^[4~ 5]与罗军武^[6]的方法, 采用改进的 SDS 法进行基因组 DNA 提取。

1.4 ISSR 最佳反应体系建立

ISSR 技术操作方便, 快速简单, 但是 PCR 扩增涉及到的反应因素多, 对反应条件敏感, 任何一种

收稿日期: 2006- 02- 14 初稿; 2006- 04- 21 修改稿

作者简介: 林郑和 (1975-), 男, 硕士研究生, 主要从事茶树遗传育种与生物技术研究。

通讯作者: 陈荣冰 (1950-), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事茶树遗传育种 (E-mail: rb-chen@163.com)。

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

反应因子设置不当都会影响整个扩增反应过程。因此对不同研究对象,不同的 PCR 反应仪器,必须摸索其最佳反应条件^[7]。为确保试验的准确性和可重复性,在茶叶上获得稳定的 ISSR 标记,必须对 ISSR 反应条件逐一进行筛选,建立优化反应体系,进行 PCR 扩增的模板 DNA Mg²⁺、dNTP 引物 Taq 酶的用量与退火温度等因素的梯度试验。每次改变 ISSR 扩增体系中的 1 个因素,以确定该因素对 ISSR 结果的影响,同时以等体积的无菌双蒸水代替模板 DNA 作为对照 (优化设计试验见表 2)

表 1 试验材料

Table 1 Materials used in the study

编号	品 种	原产地	编号	品 种	原产地
1	大红袍	福建武夷山	21	慢奇兰	福建安溪
2	福建水仙	福建建阳	22	赤叶奇兰	福建安溪
3	紫阳种	陕西紫阳	23	早奇兰	福建安溪
4	腾冲大叶茶	云南腾冲	24	竹叶奇兰	福建安溪
5	九龙珠	福建武夷山	25	白奇兰	福建安溪
6	铁观音	福建安溪	26	河南信阳种	河南信阳
7	云南大叶种	云南腾冲	27	江华苦茶	湖南江华
8	丹桂	福建福安	28	红佛	福建安溪
9	湄潭苔茶	贵州湄潭	29	春兰	福建福安
10	宁州种	江西修水	30	筍绮	福建安溪
11	早白尖	四川筠连	31	福云六号	福建福安
12	龙井种	浙江杭州	32	凌云白毛茶	广西凌云
13	乐昌白毛茶	广东乐昌	33	英红 1 号	广东英德
14	九龙袍	福建福安	34	崇庆枇杷茶	四川崇庆
15	黄龙	福建武夷山	35	瑞香	福建福安
16	祁门槠叶齐	安徽祁门	36	福鼎大白茶	福建福鼎
17	云台山种	湖南安化	37	福鼎大毫茶	福建福鼎
18	金面奇兰	福建安溪	38	黄旦	福建安溪
19	小叶奇兰	福建安溪	39	肉桂	福建武夷山
20	青心奇兰	福建安溪			

表 2 ISSR反应体系条件优化试验设计

Table 2 Optimization design of ISSR system

模板 DNA(ng)	10	20	30	40	60	80	100	120
Taq 酶 (U)	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0			
dNTP(μ mol ⁻¹ L ⁻¹)	50	100	150	200	250			
RAPD 引物 (nmol L ⁻¹)	100	150	200	250	300			
Mg ²⁺ (mmol ⁻¹ L ⁻¹)	1.0	1.5	2.0	2.5				

1.5 ISSR 标记的引物筛选

本试验将退火温度的优化和引物筛选结合进行,利用合成的 40 条 ISSR 引物,根据其 T_m 值,分别用 50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃ 共 11 个退火温度去筛选引

物,以确定每条引物合适的退火温度。各引物 T_m 值的计算公式如下: $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$, 其中 A G G T 为各碱基的碱基数。用于 ISSR 标记的引物长度一般为 16~ 25 bp 不等,且 GC 含量各不相同,因此各个引物的 T_m 值均有所不同。所以参照引物的 T_m 值来选择合适的引物退火温度是非常必要的。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的用量

一定范围内的模板 DNA 含量对 PCR 结果影响不显著,本试验在 10~ 120 ng 的模板含量条件下均扩增出了基本相同的带型 (图 1), 尽管理论上一个细胞中的 DNA 量就足够作扩增反应的模板,但在实际应用中,一定范围内模板分子数越多则错误扩增越少;模板含量过高则可能使引物或 dNTP 过早被耗尽,出现扩增结果不稳定的假象^[8-9]。本试验中模板 DNA 含量超过 100 ng 以后,扩增出来的带弱,甚至出现弥散现象,致使谱带难以辨认。这可能是由于模板含量过高所致。此外,扩增效果还与模板 DNA 的纯度有关。因此,根据试验结果及上述原理,认为 10~ 100 ng 的模板 DNA 含量范围适合于茶叶的 ISSR 试验分析。

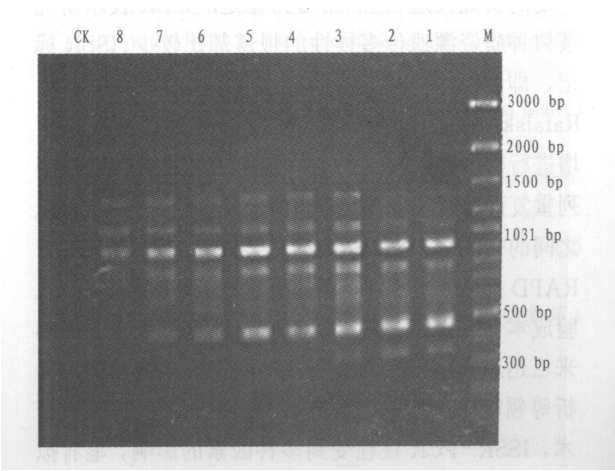


图 1 不同模板含量扩增的 ISSR 带型

Fig. 1 Amplified result at different template concentrations

注: 1~ 8 号泳道的含量分别为: 10 20 30 40 60 80 100 120 ng; M: λ/Eco RI Marker; CK 为空白

由图 1 可看出第 4 泳道即当 DNA 模板为 40 ng 效果最佳;第 7 泳道即 DNA 量为 100 ng 以后条带开始弥散,不如第 4 泳道清晰;1~ 3 号条带没第 4 号亮和多。本试验中选出适合的 DNA 模板用量为 40 ng,即第 4 泳道的模板用量。

2.2 Mg^{2+} 对 PCR 结果的影响

Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, Mg^{2+} 不足, 则 Taq 酶的作用效率低。 Mg^{2+} 同样还会影响引物与模板的结合效率。 本试验设置 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 mmol L^{-1} 与 1 个空白试验 图 2 表明: 1 2 4 5 泳道扩增的条带都不如第 3 泳道样清晰与多。 但 Mg^{2+} 的浓度在 0.5~ 2.5 mmol L^{-1} 时, 都能得到较好条带, 而 1.5 mmol L^{-1} 扩增出的为最佳 在本试验中采用了 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol L^{-1} 。

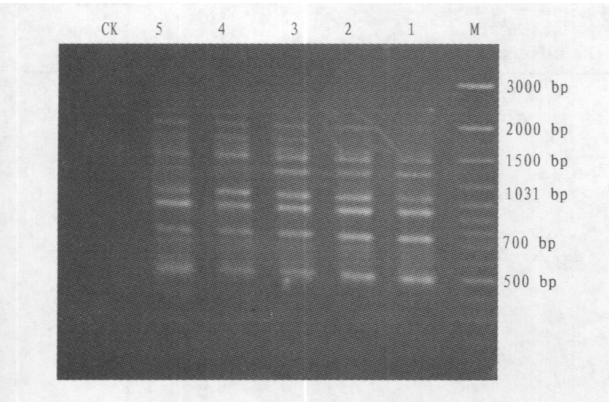


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度扩增的 ISSR 带型

Fig. 2 Amplified result at different Mg^{2+} concentrations

注: 1~ 5 泳道的浓度分别为: 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 mmol L^{-1} ;
M: λ /EcoRI Marker; CK 为空白

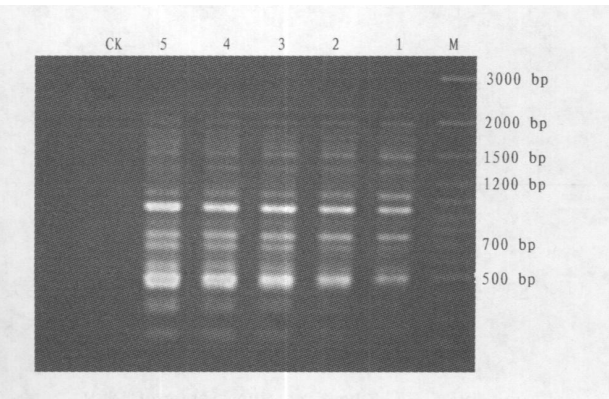


图 3 不同 dNTP 浓度扩增的 ISSR 条带

Fig. 3 Amplified result at different dNTP concentrations

注: 1~ 5 泳道的浓度分别为: 50、 100、 150、 200、 250 μ mol L^{-1} ; M: λ /EcoRI Marker; CK 为空白

2.3 dNTP 用量对 PCR 结果的影响

dNTP 的量对反应的特异性、 扩增产物的量有较大的影响。 浓度过高, 导致 Taq 酶在非靶位置启动与核苷酸的错配, 降低了准确率; 浓度过低, 分子碰撞的几率降低, 导致条带模糊。 图 3 结果表明: 1 2 泳道样由于 dNTP 的浓度较低, 扩增的条带较少; 当浓度加大到 250 μ mol L^{-1} (第 5 泳道样) 时,

出现了非特异性扩增; 3 4 泳道样都能扩增出较清晰的条带, 但是以第 4 泳道样 (200 μ mol L^{-1}) 效果最佳 故本试验选出合适的 dNTP 浓度为 200 μ mol L^{-1} 。

2.4 Taq 酶用量对 PCR 结果的影响

Taq 酶的活性与用量关系到扩增能否正常进行, 是 PCR 反应中最重要的因子。 Taq 酶含量过低会导致扩增产物不足; Taq 酶含量过高会导致产生非特异性扩增, 造成假阳性。 图 4 结果表明: 3 4 泳道样 (0.5~ 1.0 U) 都可得到良好的扩增效果, 继续增加酶的用量, 会出现条带弥散与非特异性扩增。 1 2 泳道样由于酶的量不足, 扩增的条带较少; 3 4 泳道样基本上差不多, 从节约试剂用量, 降低试验成本的角度, 本试验选 Taq 酶的用量为 0.5 U

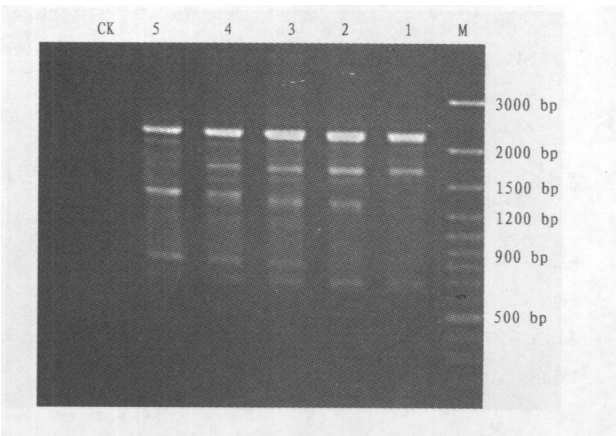


图 4 不同 Taq 酶用量扩增的 ISSR 条带

Fig. 4 Amplified result at different Taq concentrations

注: 1~ 5 泳道样 Taq 酶分别为: 0.1 0.3、 0.5 1.0 2.0 U;
M: λ /EcoRI Marker; CK 为空白

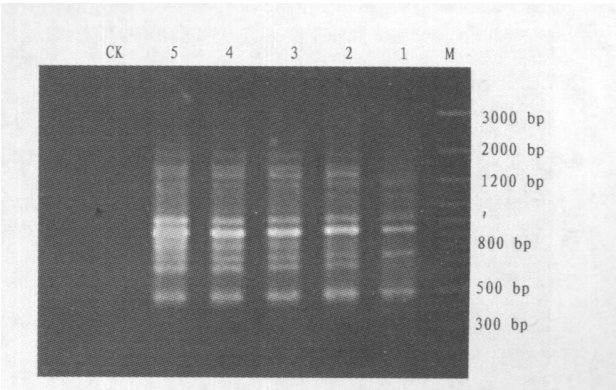


图 5 引物不同浓度扩增的 ISSR 带型

Fig. 5 Amplified result at different primer concentrations

注: 1~ 5 泳道样引物的浓度分别为: 100 150 200 250 300 nmol L^{-1} ; M: λ /EcoRI Marker; CK 为空白

2.5 引物用量对 PCR结果的影响

随机引物浓度的高低也是 PCR反应中影响因素。图 5结果表明: 随着引物浓度升高, 得到扩增的产物的亮度增强, 并出现非特异性扩增; 而低浓度时出现扩增不足。1~2泳道样由于引物浓度低, 扩增出的条带较少; 第 5泳道样则因引物浓度过高, 出现太亮与模糊; 3~4泳道样扩增的出清晰条带; 对比最佳效果, 本试验选用 4泳道, 即 $250\text{ nmol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$

为随机引物的浓度

2.6 ISSR标记的引物筛选结果

本研究共设置了 11个退火温度来筛选引物 (表 3)。从表 3可以看出, 各引物的最佳退火温度一般都高于其 T_{m} 值 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$ 不等, 平均高于其 T_{m} 值 3°C 。这一结论与前人在其他物种上得到的结论基本一致 (54 $^{\circ}\text{C}$ 筛选引物的 PCR结果见图 6)。

表 3 所选 15条引物在各退火温度下的扩增结果													
Table 3 The result of selected primers at the different annealing temperatures													
引物序列	T _m 值 (℃)	各温度 (℃)扩增结果											
		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
834 (AG) ₈ (CT) C	56	+ /- -	-	-	-	+	/-	+	+	+	+	+	-
835 (AG) ₈ (CT) C	58	-	-	-	-	+	+	/-	+	+	+	+	++
836 (AG) ₈ (CT) A	56	-	+ /-	-	-	+	/-	+	+	/-	+	++	+
840 (GA) ₈ (CT) T	56	-	+ /-	-	+	/-	+	+	/-	-	+	+	++
853 (TC) ₈ (AG) T	56	-	-	-	-	+	/-	+	+	+	+	++	+
854 (TC) ₈ (AG) G	58	-	-	-	-	+	/-	+	/-	-	+	+	++
855 (AC) ₈ (CT) T	56	-	-	-	-	+	/-	+	/-	+	+	++	+
873 (GACA) ₄	48	-	-	+	++	+	/-	+	/-	+	/-	-	-
880 (GGAGA) ₃	48	-	-	+	+	+	/-	+	/-	++	-	-	-
881 (GGGGT) ₃	54	-	-	-	+	/-	+	+	+	++	+	/-	-
ISSR2 (AC) ₈ T	52	-	-	+	+	++	+	+	+	/-	+	/-	-
ISSR3 (AC) ₈ C	52	-	-	-	+	++	+	-	+	/-	-	-	-
ISSR5 (CA) ₈ G	52	-	-	-	+	/-	+	/-	+	++	+	/-	+
ISSR7 (GACA) ₄	48	-	-	+	++	+	+	+	/-	+	/-	-	-
ISSR8 (CTGA) ₄	48	-	-	++	+	+	+	/-	+	/-	-	-	-

注: + 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。

2.7 ISSR最佳反应体系与反应程序的确立

根据上述 5个因子对茶叶 ISSR试验结果的影响程度, 确定反应中的基本含量。通过对试验结果各因子交互组合试验, 最终确立 ISSR最佳反应体系 ($20\mu\text{l}$) (表 4)。

ISSR的 PCR循环程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72°C 延伸 90 s, 38 次循环, 72°C 延伸 7 min, 4°C 保存。

2.8 ISSR扩增产物的多态性

利用本研究建立的优化体系和反应条件对 39 份不同茶树种质进行 ISSR扩增, 从 40个引物中筛选出 15个条带清晰、分辨率高、特异性好的引物, 其扩增片段大小 $200\sim 2\,800\text{ bp}$, 多态性平均为 91.6%。表明 ISSR标记具有高水平的遗传多态性, 适用于茶树种质鉴定或遗传分析 (图 7为引物

UBC853扩增的结果)。

表 4 ISSR最佳反应体系		
Table 4 The best reaction system of ISSR		
组分	体积 (μl)	最终浓度 (用量)
DN A	1	40 ng
引物 ($10\mu\text{mol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$)	0.5	$250\text{ nmol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$
Mg Cl ₂ ($25\text{ mmol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$)	1.2	$1.5\text{ mmol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$
dN TP ($2\text{ mmol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$)	2.0	$200\mu\text{mol}^{\circ}\text{ L}^{-1}$
10 \times Buffer	2.0	K Buffer
Taq 酶 ($5\text{ U}^{\circ}\text{ L}^{-1}$)	0.1	0.5U
ddH ₂ O	13.2	
总体积	20	

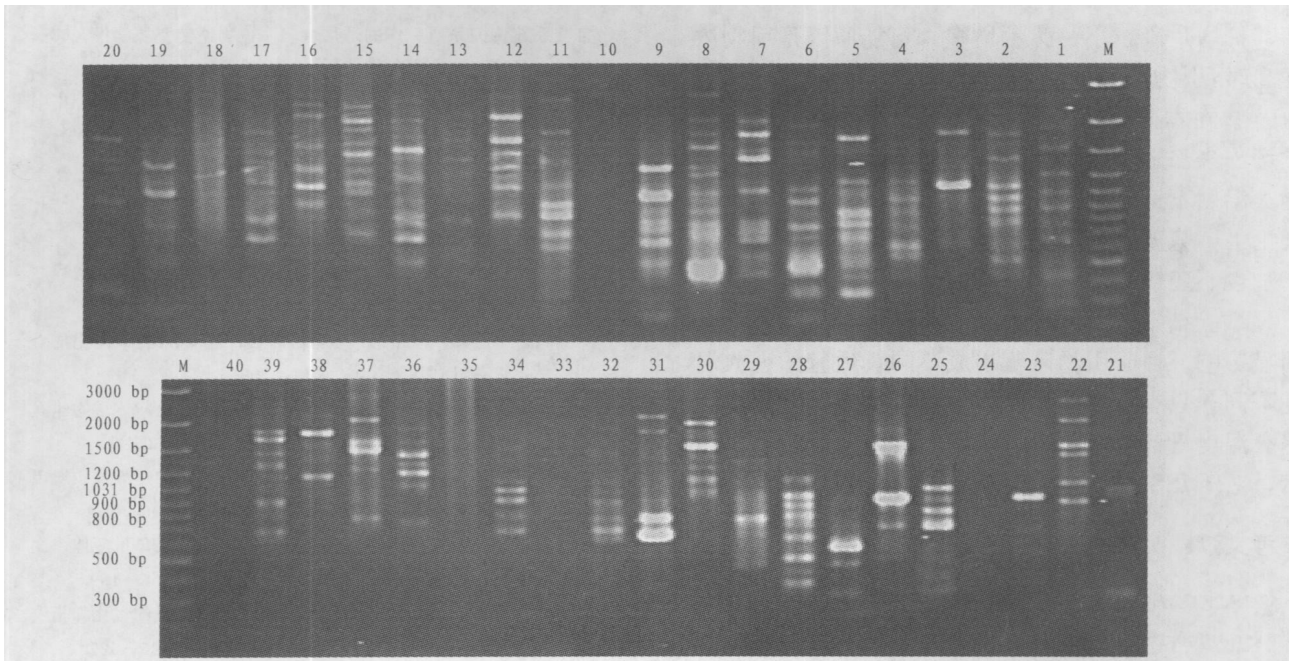


图 6 退火温度为 54℃筛引物

Fig. 6 Selected primers at 54℃ annealing temperature

注：1~ 40为不同的引物；M: λ /Eco RI Marker

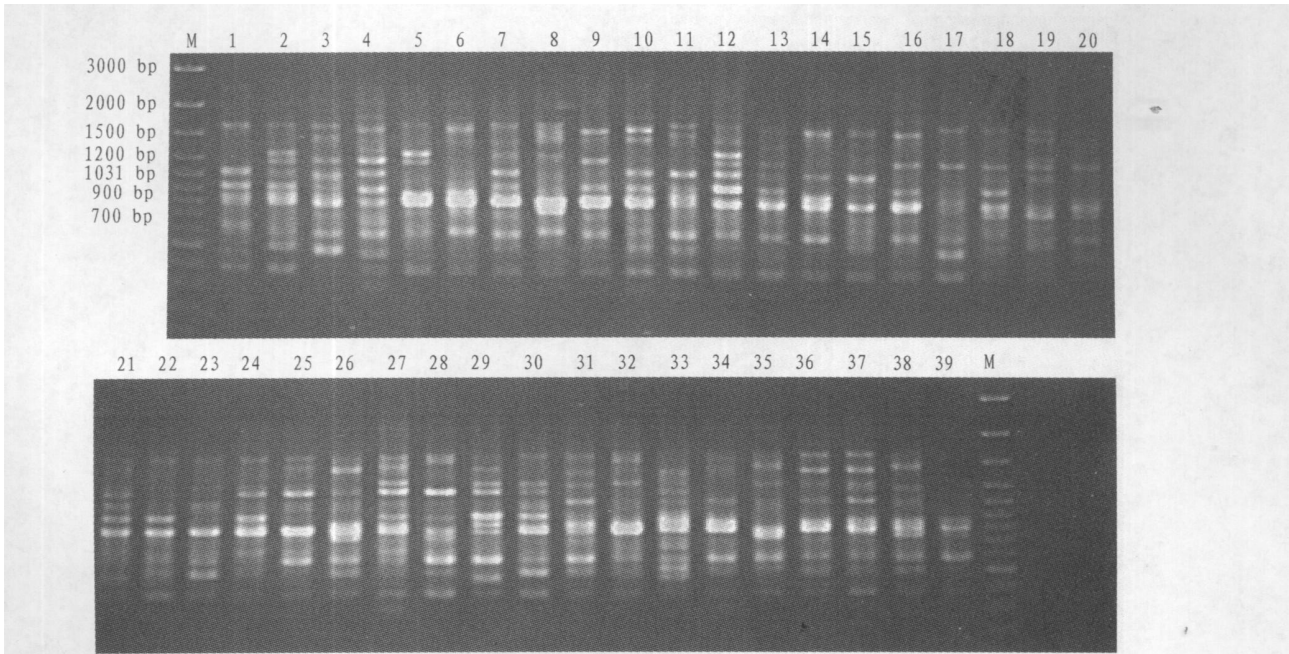


图 7 引物 UBC853在不同茶树品种中的 ISSR图谱

Fig. 7 Electrophoresis diagram of ISSR analysis at various tea varieties by using random primer UBC853

注：1~ 39为茶树品种名（见表 1）；M: λ /EcoRI Marker

3 讨 论

到目前为止，有关茶树 ISSR分析报道比较少。通过优化，在 20μl反应体系中模板 DNA用量、Taq酶用量、引物浓度、Mg²⁺浓度、dNTP浓度：模板

DNA为 40 ng；引物为 0. 25μmol° L⁻¹；Taq酶为 0. 5 U；MgCl₂为 1. 5 mmol° L⁻¹；dNTP为 0. 2 mmol° L⁻¹。

在对茶树 ISSR反应体系的优化试验中，表现引物浓度不同扩增片段大小有很大差异，引物浓度越

高, 扩增片段越小、弥散增多, 可能原因是引物浓度高时, 引物与模板 DNA 结合位点多而导致片段变短^[10]。在本试验中, 引物浓度增加, 小片段也开始扩增出来。随引物浓度增加弥散增多, 可能是因为退火温度不适宜, 片段变短的原因还待进一步试验。理论上, 只要引物够量、退火温度适宜, 引物浓度增加也不应当有带的弥散和带的增减现象出现。

试验结果表明, 退火温度对扩增带清晰程度有明显影响。由于引物碱基构成不同, 适宜的退火温度不同, 只有根据引物序列的碱基构成进行相应的退火温度设计、优化, 才能获得清晰、稳定的扩增带, 对于 ISSR 这样的随机引物标记更是如此。

参考文献:

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [2]. 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米

自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6 (2): 172-177.

- [3]. 杨若林, 孔俊, 吴鑫. ISSR 标记在辣椒资源遗传多态性分析中的初步应用 [J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2005, 11 (4): 235-237.
- [4] 陈亮, 陈大明, 高其康, 等. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定 [J]. 茶叶科学, 1997, 17 (2): 177-181.
- [5] 陈亮, 高其康, 杨亚军, 等. 茶树 RAPD 反应系统和扩增程序优化 [J]. 茶叶科学, 1998, 18 (1): 16-20.
- [6] 罗军武, 沈程文, 施兆鹏, 等. 茶树基因组 DNA 提取纯化技术研究 [J]. 茶叶通讯, 2002, (4): 20-24.
- [7] 李莹, 文景芝, 刘春来. 大豆疫霉 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36 (2): 56-60.
- [8] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究 [J]. 遗传, 2005, 27 (5): 753-758.
- [9] 佟汉文, 孙群, 吴波, 等. 乌拉尔甘草 ISSR-PCR 反应体系优化研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (4): 156-159.
- [10] 刘威生, 冯晨静, 杨建民, 等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建 [J]. 果树学报, 2005, 22 (6): 626-629.

(责任编辑: 黄爱萍)