

极小种群喙核桃 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化^{*}

史艳财¹, 邹蓉^{1**}, 朱成豪², 熊忠臣¹, 蒋运生¹

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004)

摘要: 本文采用正交和单因素相结合的方法研究 dNTPs、Mg²⁺、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA、循环次数及退火温度对喙核桃 ISSR-PCR 扩增效果的影响, 以期对喙核桃遗传多样性评价、亲缘关系分析等研究奠定基础。结果表明: 喙核桃最佳 ISSR-PCR 扩增体系及程序为 20 μL 的反应体系含 dNTPs 0.5 mmol/L、Mg²⁺ 3.0 mmol/L、引物 0.8 μmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.5 U、模板 DNA 45 ng、10×PCR Buffer 2.0 μL。退火温度为 54.4℃, 循环次数为 40。本研究建立的喙核桃 ISSR-PCR 反应体系稳定、可靠, 可用于该物种遗传多样性分析。

关键词: 极小种群 喙核桃 ISSR-PCR 正交设计 单因素试验

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2020)01-0078-05

0 引言

喙核桃 (*Annamocarya sinensis*) 为胡桃科 (Juglandaceae) 喙核桃属 (*Annamocarya*) 植物, 为第三纪古热带孑遗植物^[1]。喙核桃果实为核果, 球形或卵球形, 顶端具鸟喙状尖头, 该种仅分布于贵州、广西、云南等少数几个省区^[2], 其木材结构均匀, 花纹美观, 是制作军工设备、家具等的优良木材。喙核桃仅有极低比例的种子可萌发成苗。此外, 喙核桃的分布区域多年来破坏严重, 植株数量日趋减少, 已被列为国家二级保护植物^[3]。目前, 对喙核桃的研究仅有群落调查^[4]、木材解剖及其分类位置^[5]、保育遗传^[6]等方面。为准确揭示喙核桃的遗传多样性, 以便于进行

后续资源评价、良种选育及种苗繁育等工作, 亟需建立其特定的多样性检测体系。

Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) 分子标记技术由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出, 具有操作简易、成本低、灵敏度高等特点, 推出后即被广泛应用于植物遗传多样性研究中^[7]。ISSR-PCR 扩增反应条件对检测结果至关重要, 将该技术用于物种遗传多样性检测时需建立其对应的扩增反应体系。本文将正交和单因素试验相结合, 开展 dNTPs、Mg²⁺、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA、循环次数及退火温度对喙核桃 ISSR-PCR 扩增效果影响的研究, 以期建立喙核桃 ISSR-PCR 最佳反应体系, 为其种质资源评价等奠定基础。

^{*} 国家自然科学基金项目(31960276)和广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 19004)资助。

【作者简介】

史艳财(1984—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事珍稀濒危植物保育研究。

【**通信作者】

邹蓉(1982—), 女, 副研究员, 主要从事植物保育研究, E-mail: 568852444@qq.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20200317.011

史艳财, 邹蓉, 朱成豪, 等. 极小种群喙核桃 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(1): 78-82.

SHI Y C, ZOU R, ZHU C H, et al. Establishment and Optimization of the ISSR-PCR Reaction System for *Annamocarya sinensis* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2020, 36(1): 78-82.

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料 2019 年 8 月采于广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所的种质资源圃, 采集生长良好植株的幼嫩叶片 2—3 片, 冰盒(4℃)带回实验室后用液氮(-80℃)冷冻。样品经广西植物研究所韦霄研究员鉴定。

1.2 试剂与仪器

PCR 扩增反应体系中所用 dNTPs、引物、10×PCR Buffer、Taq DNA 聚合酶等试剂全部购自上海生工生物工程技术有限公司。

DNA 质量检测所用分光光度计为 TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计; PCR 扩增采用美国 BIO-RAD 伯乐公司的 PCR 仪; DYCP-34 型电泳槽和 CDYY-6C 型电泳仪为北京市六一仪器厂生产。

1.3 方法

1.3.1 喙核桃基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法提取喙核桃叶片总 DNA。DNA 质量检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度计检测法。

1.3.2 ISSR-PCR 反应体系正交试验

用 2×unique™Taq Plus Master Mix (with Dye) 试剂盒对 100 条通用引物进行初步筛选, 选用引物 826 (5'-ACA CAC ACA CAC ACA CC-3') 进行正交试验 ($L_{16}(4^5)$), 设置的因素为 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、引物、DNA 模板, 每因素设置 4 个梯度(表 1 和表 2)。此外, 每个体系中添加 2.0 μ L 的 10×PCR Buffer, 最后用 ddH₂O 补至 20 μ L, 每个组合重复 3 次。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors				
	dNTPs (mmol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Mg^{2+} (mmol/L)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U/20 μ L)	DNA (ng)
1	0.1	0.2	1.0	0.5	30
2	0.2	0.4	1.5	1.0	45
3	0.4	0.6	2.0	1.5	60
4	0.5	0.8	2.5	2.0	75

预扩增程序: 首先 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52.9℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 40 次; 以上循环结束后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物采用

1.5% 的琼脂糖电泳 1.5 h 左右, 然后置 EB 液(0.5 μ g/mL)中染色 20 min, 最后置 UVP 凝胶成像系统中拍照。

表 2 ISSR-PCR 正交试验 $L_{16}(4^5)$

Table 2 Orthogonal test for ISSR-PCR $L_{16}(4^5)$

编号 Number	因素 Factors				
	dNTPs (mmol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Mg^{2+} (mmol/L)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U/20 μ L)	DNA (ng)
1	0.1	0.2	1.0	0.5	30
2	0.1	0.4	1.5	1.0	45
3	0.1	0.6	2.0	1.5	60
4	0.1	0.8	2.5	2.0	75
5	0.2	0.2	1.5	1.5	75
6	0.2	0.4	1.0	2.0	60
7	0.2	0.6	2.5	0.5	45
8	0.2	0.8	2.0	1.0	30
9	0.4	0.2	2.0	2.0	45
10	0.4	0.4	2.5	1.5	30
11	0.4	0.6	1.0	1.0	75
12	0.4	0.8	1.5	0.5	60
13	0.5	0.2	2.5	1.0	60
14	0.5	0.4	2.0	0.5	75
15	0.5	0.6	1.5	2.0	30
16	0.5	0.8	1.0	1.5	45

1.3.3 喙核桃 ISSR-PCR 扩增单因素试验

以优选出的正交组合为基础进行单因素试验, 设置水平分别为 Mg^{2+} 浓度 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L; Taq DNA 聚合酶浓度 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 U/20 μ L; 引物浓度 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ mol/L; 模板 DNA 15, 30, 45, 60, 75, 90 ng; dNTPs 浓度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L。

1.3.4 ISSR-PCR 反应程序优化

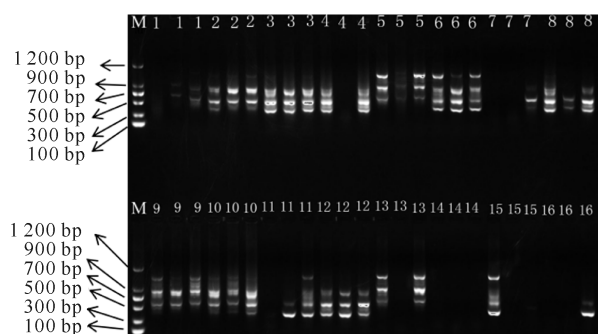
退火温度设置为理论退火温度 $T_m \pm 5^\circ C$, 共 12 个梯度。循环次数设 20, 25, 30, 35, 40, 45 次。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

5 因素 4 水平正交试验的结果如图 1 所示, 组合 1, 7, 14, 15, 16 的扩增效果最差, 基本无条带扩出。组合 2, 4, 5 条带强度弱且背景模糊。组合 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 扩增效果虽稍好, 但仅能扩增出 3 条条

带。组合 6 条带多且背景也较为清晰。综合以上分析结果可知,组合 6 多态性丰富、条带清晰,可用于后续研究。



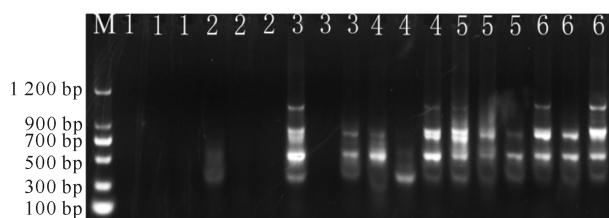
M:DL1200 DNA marker; 1—16 represent 16 groups of orthogonal test

图 1 ISSR-PCR 正交试验结果

Fig. 1 Orthogonal test results of ISSR-PCR

2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

由图 2 可知, Mg^{2+} 浓度低时扩增效果较差。提高 Mg^{2+} 浓度,其条带数目增加且清晰度也有较大提高。当浓度为 3.0 mmol/L 时多态性和清晰度最好,故该浓度为最佳 Mg^{2+} 浓度。



M:DL1200 DNA marker; 1—6 represent Mg^{2+} concentrations of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

图 2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

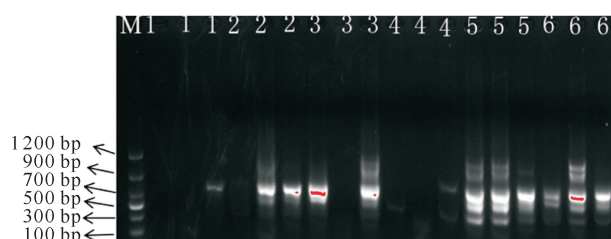
Fig. 2 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR-PCR amplification

2.3 dNTPs 对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

dNTPs 对 ISSR-PCR 扩增结果的影响如图 3 所示。当 dNTPs 浓度较低时(0.1 mmol/L),扩增条带数较少;提高 dNTPs 浓度,扩增条带数与清晰度增强,因此 dNTPs 浓度为 0.5 mmol/L 时效果最好。

2.4 Taq DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

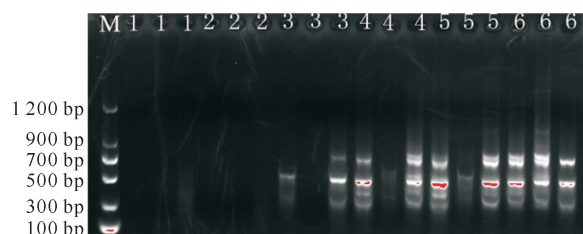
不同浓度的 Taq DNA 聚合酶扩增结果如图 4 所示,低浓度的 Taq DNA 聚合酶基本扩增不出条带。提高 Taq DNA 聚合酶浓度后,扩增条带数目和清晰度明显改善,且 Taq DNA 聚合酶浓度为 2.5 U/20 μ L 时扩增效果最好。



M:DL1200 DNA marker; 1—6 represent dNTPs concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L

图 3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 3 Effect of dNTPs concentration on ISSR-PCR amplification



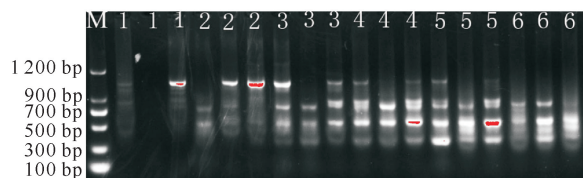
M:DL1200 DNA marker; 1—6 represent Taq polymerase concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 U/20 μ L

图 4 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 4 Effect of Taq DNA polymerase concentration on ISSR-PCR amplification

2.5 引物对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

不同浓度引物对 ISSR-PCR 结果的影响如图 5 所示,不同浓度的引物扩增出的条带数基本相同,且以引物浓度为 0.8 μ mol/L 时扩增的条带最为清晰,可确定引物的最佳浓度为 0.8 μ mol/L。



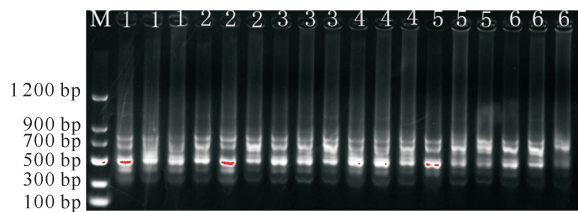
M:DL1200 DNA marker; 1—6 represent primer concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ mol/L

图 5 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 5 Effect of primer concentration on ISSR-PCR amplification

2.6 喙核桃模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

喙核桃模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 的影响如图 6 所示,DNA 浓度为 15—90 ng 时扩增出的带型基本相同,且以 45 ng 时扩增出的条带强度较高,故该浓度为模板 DNA 最佳浓度。



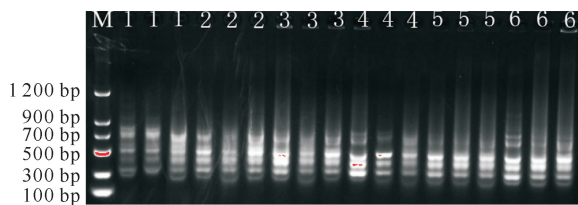
M: DL1200 DNA marker; 1—6 represent DNA concentrations of 15, 30, 45, 60, 75, 90 ng

图6 模板DNA浓度对ISSR-PCR扩增效果的影响

Fig. 6 Effect of template DNA concentration on ISSR-PCR amplification

2.7 PCR循环次数对ISSR-PCR扩增效果的影响

PCR循环次数对ISSR-PCR的影响如图7所示,随着循环次数的增加,条带数目及条带强度逐渐增强。循环次数为40时即可得到清晰的条带,再增加循环次数条带清晰度变化不大。



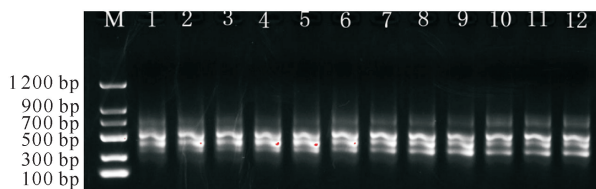
M: DL1200 DNA marker; 1—6 represent cycles of 20, 25, 30, 35, 40, 45

图7 循环次数对ISSR-PCR扩增效果的影响

Fig. 7 Effect of cycle times on ISSR-PCR amplification

2.8 退火温度对ISSR-PCR扩增效果的影响

退火温度对PCR扩增结果的影响如图8所示,退火温度升高,扩增出的条带数目呈降低趋势。综合考量条带数和清晰度,本文确定54.4℃为最适退火温度。



M: DL1200 DNA marker; 1—6 represent annealing temperature of 47.0, 47.2, 47.7, 48.5, 49.6, 51.1, 52.9, 54.4, 55.5, 56.3, 56.8, 57.0°C

图8 退火温度对ISSR-PCR扩增效果的影响

Fig. 8 Effect of annealing temperature on ISSR-PCR amplification

3 讨论

建立稳定、可靠的ISSR-PCR反应体系对于后续

的遗传多样性分析至关重要。单独采用单因素试验优化组合时仅考量了各因素不同水平对试验结果的影响,忽略了各因素间的交互作用,很大程度上降低了最佳反应水平的可靠程度^[8-9]。正交试验设计既考虑了多因素各水平的相互作用,且能利用最少的组合数考察因素和水平对结果的影响程度,得出最佳组合,故而越来越多的研究者将该方法用于试验体系建立的研究中^[10]。本试验先用正交试验进行初步筛选,再用单因素试验优化,极大地减少了试验次数和时间,快速建立了喙核桃的ISSR-PCR反应体系。

ISSR扩增结果受Taq DNA聚合酶、dNTPs、模板DNA、引物等诸多因素影响,这些因素间也存在较为复杂的相互作用。例如:dNTPs分子含有的磷酸基团可与Mg²⁺结合,从而降低反应体系中的Mg²⁺浓度^[10],故在试验前需对各因素的比例进行优化组合。试验结果显示,喙核桃的ISSR-PCR反应体系对Mg²⁺浓度要求严格,浓度低时无法扩增出条带,对其他因素(Taq DNA聚合酶、dNTPs、模板DNA、引物)则要求不太严格。这可能是由于反应体系中其他组分对Mg²⁺都较为敏感,如Taq DNA聚合酶对Mg²⁺浓度极为敏感,是Mg²⁺依赖性酶,故Mg²⁺可与其他组分结合,最终影响PCR扩增的效率和特异性。

除反应体系中各组分会对ISSR-PCR扩增结果产生重要影响外,扩增程序对扩增结果同样至关重要,尤其是引物退火温度^[11]。每条引物虽会提供其理论退火温度,但实际温度与理论值不符的现象也时有发生,故试验前需对引物退火温度值进行筛选。本试验中发现退火温度对扩增结果影响显著,当温度为51.1—57℃,扩增效果好,条带较为清晰。该结果与其他研究结果相一致,即较高的退火温度可提高反应的特异性及清晰度^[12]。

4 结论

喙核桃的ISSR-PCR反应体系对Mg²⁺浓度要求严格,其最佳ISSR-PCR扩增体系及程序为20 μL的反应体系含dNTPs 0.5 mmol/L、Mg²⁺ 3.0 mmol/L、引物0.8 μmol/L、Taq DNA聚合酶2.5 U、模板DNA 45 ng、10×PCR Buffer 2.0 μL。退火温度为54.4℃,循环次数为40次。

参考文献

- [1] 覃海宁,刘演. 广西植物名录[M]. 北京:科学出版社, 2010.

- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 21 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [3] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录: 第一册 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] 杨金华, 宋宗强, 粟远和, 等. 通道县南部喙核桃群落调查 [J]. 绿色科技, 2016(24): 89-93.
- [5] 喻诚鸿, 李沛. 喙核桃的木材解剖及其在分类学上的位置 [J]. 植物学报, 1954, 3(3): 321-332.
- [6] ZHANG Z Y, PANG X M, HAN J W, et al. Conservation genetics of *Annamocarya sinensis* (Dode) Leroy, an endangered endemic species [J]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12 (3): 3965-3974.
- [7] 周武, 王驰, 胡娜, 等. 中国沙棘 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 分子植物育种, 2019, 17 (16): 5357-5367.
- [8] 彭昕, 吉庆勇, 李玉兰, 等. 濒危药用植物三叶青 ISSR 分子标记的建立 [J]. 中成药, 2015, 37(7): 1507-1514.
- [9] 崔洁, 王丹丹, 王倩玉, 等. 山西与内蒙产蒙古黄芪的 ISSR 体系优化及遗传多样性分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(11): 1941-1948.
- [10] 高慧新, 严炯艺, 王明杰, 等. 白花蛇舌草 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 72-74.
- [11] 余伟军, 姚红, 孙瑞琦, 等. 铁线莲属植物 ISSR-PCR 反应体系优化及遗传多样性分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(2): 42-48.
- [12] 赵琬玥, 冷秋思, 熊健, 等. 全缘叶绿绒蒿 ISSR 体系的建立与优化 [J]. 北方园艺 2018(13): 80-86.

Establishment and Optimization of the ISSR-PCR Reaction System for *Annamocarya sinensis*

SHI Yancai¹, ZOU Rong¹, ZHU Chenghao², XIONG Zhongchen¹, JIANG Yunsheng¹

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

Abstract: This article used a combination of orthogonal and single-factor methods to study the effects of dNTPs, Mg^{2+} , primers, Taq DNA polymerase, template DNA, number of cycles, and annealing temperature on the ISSR-PCR amplification effect of *Annamocarya sinensis*. It is hoped to lay the foundation for the research on genetic diversity evaluation and genetic relationship analysis of *Annamocarya sinensis*. The results showed that the optimal ISSR-PCR amplification system and procedure for *Annamocarya sinensis* was a 20 μ L reaction system, which contained dNTPs 0.5 mmol/L, Mg^{2+} 3.0 mmol / L, primers 0.8 μ mol/L, Taq DNA polymerase 2.5 U, template DNA 45 ng, and 10 \times PCR buffer 2.0 μ L. The annealing temperature was 54.4 $^{\circ}$ C, and the number of cycles was 40. The ISSR-PCR reaction system established in this study is stable and reliable, which can be used for genetic diversity analysis of *A. sinensis*.

Key words: minimal population, *Annamocarya sinensis*, ISSR-PCR, orthogonal design, single factor test

责任编辑: 陆 雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>