

简单重复序列区间 (ISSR)引物反应条件优化与筛选

余艳 陈海山 葛学军*

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要:以豆科沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)的基因组 DNA 制备 ISSR-PCR 模板。通过对聚合酶链式反应(PCR)体系中模板 DNA 浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 的用量、Taq 酶的含量以及退火温度梯度进行试验, 探讨筛选出清晰、多态性高、可重复性好的 ISSR 引物的 PCR 反应条件。用 100 个 ISSR 引物进行了 PCR 扩增, 筛选出效果较好的 15 个引物, 得到 121 个位点, 其中 43 个多态位点, 多态位点比例为 36%。

关键词: ISSR; 引物筛选; 沙冬青

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0015-05

Optimization of Experiment Conditions and Primer Screening with ISSR Markers

YU Yan CHEN Hai-shan GE Xue-jun*

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: *Ammopiptanthus mongolicus* (Leguminosae) were subjected to ISSR (Inter-simple sequence repeat)-PCR analysis in order to investigate the genetic diversity within and among populations. Genomic DNA of *A. mongolicus* was extracted as the ISSR template, and the influencing factors of ISSR were studied and the experiment parameters were optimized. By adjusting template DNA concentration, Mg²⁺ concentration, dNTP and Taq polymerase contents, and annealing temperature, the PCR amplification conditions were optimized. The optimal experiment conditions were as follow: 20 μ l system containing 20 ng μ l⁻¹ template, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton \times 100, 2.75 mmol/L MgCl₂, 0.15 mmol/L dNTP, 2% formamide, 200 nmol/L primer, 1.5 U Taq polymerase. With a MJ thermal cycle, optimal amplification program was 1 cycle of 5 min at 94°C; 35 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 46-56°C, and 1.5 min at 72°C; 1 cycle of 7 min at 72°C; 30 min at 4°C, using block control style. One hundred ISSR primers were used to screen the suitable primers for assessing the genetic diversity of *A. mongolicus*, of which 15 ISSR primers with high resolution and multiple polymorphic bands were screened. The total 121 ISSR bands were amplified with 15 primers, and produced 43 polymorphic bands.

Key words: ISSR; Primer screening; *Ammopiptanthus mongolicus*

广泛存在的真核生物的简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 指纹, 分散分布于整个基因组。SSR DNA 是短的、串联的简单重复序列, 它的组成基元是 1-6 个核苷酸, 其串联重复的数目是可变的而且呈现高度多态性, 例如 (CA)_n、(GAG)_n、(GACA)_n 等^[1]。Zietkiewicz 等^[2]提出了锚定 SSR 的新策略, 在 SSR 的 3' 端或 5' 端锚定 1-4 个简并碱基, 避免了 SSR 在基因组上的滑动, 大大提高了

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增的专一性。这种 SSR 指纹是用 SSR 为引物来扩增重复序列之间的区域, 被称为简单重复序列区间, 又称为 Inter-SSR, 简称 ISSR。

ISSR 分析技术操作简单, 只需微量的 DNA 模板就可进行分析。目前 DNA 直接测序在尚未能大规模开展的情况下, ISSR 分析可为研究者快速高效地提供基因组位点的多态性资料。ISSR 标记技术和 RAPD 原理比较相似, 不同之处在于 ISSR 所用引物序列来源于简单重复序列区域, 比随机扩增的多

收稿日期: 2002-07-02 接受日期: 2002-11-27

* 通讯作者 Corresponding author

态 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)引物序列长,退火温度较高^[3-5]。Qian 等人^[6]用 RAPD 和 ISSR 标记检测了疣粒野生稻(*Oryza granulata*)的居群遗传结构,发现 ISSR 标记比 RAPD 检测多态性更为灵敏,反应系统更为稳定。ISSR 技术以其操作简单、成本低、快速、灵敏、检测多态性能力强、所需 DNA 模板的量少而倍受青睐,已成功地运用于居群生物学的研究^[7-10],品种鉴定^[11,12],物种的分类系统学比较^[13-16],并作为构建遗传图谱的工具^[17-20]。

运用 ISSR 标记技术时,由于每个引物并不适合于所有物种,而且,不同引物所要求的反应条件也不同,因此对引物的筛选和反应条件的优化是非常必要的。筛选出多态性强、可重复性好的引物是整个实验成功的关键。本文以珍稀濒危植物沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)的 DNA 为模板,探讨 ISSR 引物的筛选和反应条件的优化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

在内蒙古、宁夏地区采集沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)嫩叶,置变色硅胶中干燥保存。采用改进后的 CTAB 微量法^[21],提取总 DNA。选取具有地理代表性的 6 个居群(内蒙古地区 4 个居群,宁夏地区 2 个居群),每个居群取 2 个个体,共 12 个个体的基因组 DNA 作为模板,筛选具有多态位点的引物。100 个 ISSR 引物购自加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, Set No. 9, No.801-900.)。

1.2 PCR 反应及其电泳

PCR 反应在 PTC-200 (MJ Research) PCR 仪上进行。ISSR-PCR 反应程序:94℃ 5 min,1 个循环;94℃ 30 s,50℃ (46℃ -56℃ 不定) 45 s,72℃ 1.5 min,35 个循环;72℃ 7 min,1 个循环;4℃ 30 min 终止反应。

Taq polymerase 选用威佳科技有限公司产品。PCR 扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳分离,以上海生工生物工程有限公司 100 bp DNA ladder (100-1 000 bp)为分子标记,溴化乙锭 (EB) 染色显带。DNA 片段通过计算机凝胶成像系统(LabWorks Software Version 3.0; UVP, Upland, CA 91786, USA)观察、记录。

1.3 实验设计

参照 Ge & Sun^[9]的 ISSR-PCR 反应中各成份的含量,对可能影响引物清晰度和多态性的因子:DNA

模板的含量, Mg²⁺ 浓度, dNTP 和 Taq 酶含量, 退火温度, 可重复性等以 3 个较为通用引物(809, 825, 842)为代表,进行了交叉实验。对 PCR 反应体系进行优化。以 100 个 ISSR 引物进行筛选并进行可重复性试验,筛选能扩增出清晰的、可重复的且可产生 4-15 个多态性位点的引物。具体方法见结果部分。

2 结果和分析

2.1 DNA 模板浓度优化

DNA 模板的含量是制约扩增产物得率及特异性的一个重要因子,模板含量过低,分子碰撞的几率低,偶然性大,扩增产物无或不稳定;模板含量过高,又会相应增加非特异性产物的扩增。本实验在 0.5-100 ng μl^{-1} 之间设置了 DNA 模板含量梯度,参照 Ge & Sun^[9]的 ISSR-PCR 反应中各成份的含量 (Primer 200 nmol/L, Taq 1.5 U, dNTP 0.1 mmol/L, Mg²⁺ 2 mmol/L), 退火温度为 50℃, 用 3 个引物 (809, 825, 842)进行扩增实验,结果见表 1。

表 1 模板浓度对 PCR 结果的影响
Table 1 Effect of template concentration on PCR results

引物 Primer	模板浓度 Template concentration (ng μl^{-1})						
	0.5	3	6	10	20	60	100
809	-	+	+	++	++	+	+/-
825	-	-	-	-	-	-	-
842	-	+	+	++	++	+	+/-

+: 表示有扩增产物 Having amplified products; ++: 表示扩增效率高 High efficiency of amplification; +/-: 表示扩增产物不稳定 Unsteady amplification; -: 表示无扩增产物 No amplification.

实验发现,沙冬青 ISSR 反应对 DNA 模板含量的许可范围较大,3-60 ng μl^{-1} 的模板含量均扩增出了基本相同的带型。当模板含量低于 3 ng μl^{-1} 时无扩增反应,高于 100 ng μl^{-1} 时扩增反应不稳定。

2.2 Mg²⁺ 浓度

Mg²⁺ 浓度是影响 PCR 结果的重要变量之一。Taq DNA 聚合酶是 Mg²⁺ 依赖性酶,对 Mg²⁺ 浓度非常敏感。选择合适的 Mg²⁺ 浓度,对 PCR 反应至关重要。引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响,特别是其中的 Mg²⁺ 浓度能影响反应的特异性和扩增片段的产率^[22]。在一般的 PCR 反应中,1.5-2.0 mmol/L Mg²⁺ 是比较合适的^[22]。我们参照 Ge & Sun^[9]的 ISSR-PCR 反应中各成份的含量 (Primer 200 nmol/L, template 20 ng μl^{-1} , Taq 1.5 U,

dNTP 0.1 mmol/L), 设计了 Mg^{2+} 浓度梯度, 反应中 Mg^{2+} 浓度及实验结果见表 2。

表 2 Mg^{2+} 浓度对 PCR 结果的影响
Table 2 Effect of Mg^{2+} concentration on PCR results

引物 Primer	Mg^{2+} (mmol/L)						
	1.5	2	2.375	2.75	3.125	3.5	4.5
809	-	+/-	+	++	-	-	-
825	-	-	-	-	-	-	-
842	-	+/-	+	++	-	-	-

Symbols are as in Table 1.

不同的引物, 不同的物种, 对反应体系中 Mg^{2+} 浓度要求皆有可能不同。本实验发现 2–2.75 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度都扩增出了清晰的带, 但 2 mmol/L 条件下扩增带的产率不及 2.375 和 2.75 mmol/L。而 2.375 mmol/L 重复性不及 2.75 mmol/L, 但可作为一个候选梯度。低于 2 mmol/L 或高于 3.125 mmol/L 时无扩增产物。

2.3 dNTP 和 Taq 酶含量

底物 dNTP 浓度过高, 会导致聚合酶错误的掺入, 浓度过低, 又会影响合成效率, 甚至会因 dNTP 过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果。在 PCR 反应中, dNTP 浓度应在 0.02–0.2 mmol/L^[22]。本研究设置了 0.1、0.15、0.2 mmol/L 3 个浓度梯度, 结果表明, 0.1–0.15 mmol/L 的 dNTP 含量均有扩增产物。在 0.1 mmol/L 时, PCR 反应的稳定性不及 0.15 mmol/L。引物 809, 842 在 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L 时扩增产物效率最高, 而 825 无扩增。

在 PCR 反应中, Taq 酶的使用量也是影响实验的一个重要因素。使用高浓度的 Taq 酶不仅成本过高, 而且容易产生非特异性扩增产物; Taq 酶浓度过低则会导致产物的合成效率下降。一般随机扩增反应中, Taq 酶的用量在 0.5–5 U 之间^[22]。本实验设置了 1 U、1.5 U、2 U、3 U 4 个 Taq 酶含量梯度。结果表明在 20 μ l 的反应体系中使用 1–3 U Taq 酶含量均有扩增产物出现, 但高于 2 个单位时, 非特异性扩增增强, 1.5 U 时扩增反应最佳。

2.4 退火温度

根据上述 4 个单位因子对沙冬青 ISSR 实验结果的影响程度, 确定了 PCR 反应中各成份的基本含量(Primer 200 nmol/L; template 20 ng μ l⁻¹; Taq 1.5 U; dNTP 0.15 mmol/L; Mg^{2+} 2.75 mmol/L)。但是引物 809, 842 的 PCR 扩增还存在着弱带、弥散背景较为严重等问题。这种现象可能是由于退火温度均取

50°C 造成的。引物碱基序列长短的不同使得引物的退火温度也不尽相同。本研究根据前人的经验以及 $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$ ^[22] 引物退火温度的计算公式设计了退火温度梯度反应, 结果见表 3。

表 3 退火温度对 PCR 结果的影响
Table 3 Effect of annealing temperature on PCR results

引物 Primer	退火温度 Annealing temperature (°C)						
	46	48	50	51	52	53	56
809	-	++	+	-	-	-	-
825	-	-	-	-	-	-	-
842	-	+	++	-	-	-	-

Symbols are as in Table 1.

根据 $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$ 公式计算出了引物 809, 825, 842 的退火温度分别为 52°C、50°C、56°C, 但是 PCR 反应的效果并不理想。在本实验中引物 809 的退火温度为 48°C 时扩增产物清晰, 多态性强; 在 46、51、52、53、56°C 时无扩增; 在 50°C 时稳定性不如 48°C。而 842 的最佳退火温度则是 50°C, 在 48°C 时亦有较强的扩增。

2.5 对沙冬青的扩增

至此, PCR 反应的条件已基本优化完全并固定下来。其 20 μ l 的反应体系为: DNA 模板 20 ng μ l⁻¹, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton \times 100, 2.75 mmol/L $MgCl_2$, 0.15 mmol/L dNTP, 2% formamide, 200 nmol/L primer, 1.5 个单位 Taq 酶。由此反应体系筛选加拿大哥伦比亚大学提供的 100 个引物, 经最佳退火温度的调试, 可重复性试验, 共筛选出 15 个扩增带数大于 4、条带清晰、多态性强、可重复性好的沙冬青 ISSR 引物, 从中得到 121 个 ISSR 标记位点, 其中 43 个多态位点, 多态位点比例为 36%。平均每个引物扩增 8.07 条带。15 个引物检测沙冬青的遗传多样性研究中, 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。可用于沙冬青的正式 ISSR 扩增(表 4)。图 1、2 分别是引物 809、842 对居群内蒙古杭锦旗磨石沟和居群宁夏中卫沙坡头沙冬青的 ISSR 扩增带型。

3 讨论

PCR 扩增容易受到诸多因素的影响: 如 DNA 模板的浓度与纯度, 引物与 dNTP 的用量、 Mg^{2+} 的浓度、扩增程序与循环周期等^[1], 所以需要优化固定 PCR 反应的各种条件, 以期实验得到较好的重复。对于给定的引物和模板, PCR 扩增的条带数在一定程度上可以通过控制反应条件而得到调控。

表 4 筛选出沙冬青引物的扩增带纹数及反应条件
Table 4 Bands and reaction conditions of 15 primers screened

引物 Primer	序列 Sequence	带纹总数 Number of bands scored	多态性带纹数 Number of polymorphic bands	反应体系 Mg ²⁺ 的终浓度 Mg ²⁺ concentration (mmol/L)	退火温度 (°C) Annealing temperature
808	AGAGAGAGAGAGAGAC	12	1	2.75	50
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	10	3	2.75	48
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	10	2	2.375	50
813	CTCTCTCTCTCTCTT	5	2	2.75	50
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	9	4	2.75	50
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	8	2	2.75	48
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	11	5	2.75	50
855	ACACACACACACACACYT	7	2	2.75	52
859	TGTGTGTGTGTGTGRC	6	3	2.75	52
876	GATAGATAGACAGACA	4	2	2.75	50
880	GGAGAGGAGAGGAGA	10	3	2.75	52
881	GGGTGGGGTGGGGTG	10	4	2.75	50
886	VDVCTCTCTCTCTCT	9	5	2.75	52
888	BDBCACACACACACA	5	2	2.75	52
889	DBDACACACACACAC	5	3	2.75	50
Total		121	43		



图 1 引物 809 对内蒙古杭锦旗磨石沟 21 个沙冬青个体扩增的 ISSR 带型
Fig. 1 ISSR profiles generated by primer 809 from population in Moshigou, Hangjinqi, Inner Mongolia
M: 100 bp ladder DNA marker

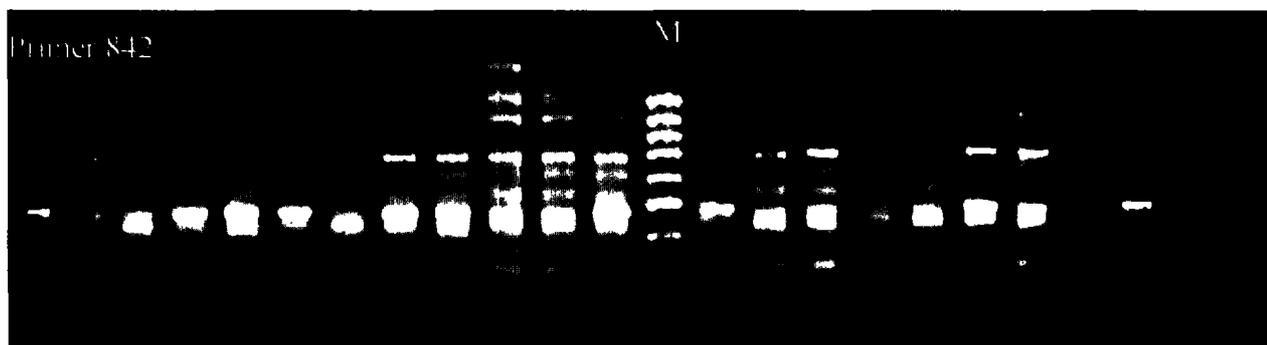


图 2 引物 842 对宁夏中卫沙坡头 21 个沙冬青个体扩增的 ISSR 带型
Fig. 2 ISSR profiles generated by primer 842 from population in Shapotou, Zhongwei, Ningxia
M: 100 bp ladder DNA marker

同一引物，对于不同的物种，退火温度可能不同，如 Huang and Sun^[23]用 ISSR 技术检测番薯时引物 811 和 888 的退火温度分别为：53°C 和 52°C；而 Herrera R^[24]等在运用 ISSR 技术检测葡萄时这两个引物所采用的退火温度均为 55°C。退火温度不同，产生错配的程度也不相同。较低的退火温度在保证

引物与模板结合的稳定性的同时，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 T_m 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^[23]。由引物自身特点导致的错误配对可以通过重复实验和在分析时

只分析那些扩增效率高、稳定性强的片段来减少这种误差。

一般说来,如果在大部分样品中不能产生 DNA 扩增带的引物,说明引物序列与该物种基因组 DNA 的同源性较低,就不宜用作该物种的 ISSR-PCR 扩增的引物。

致谢: 承蒙郝刚博士、孙晔助理研究员、易润华博士在实验过程中给予热情指导与帮助,谨致以衷心的感谢。

参考文献

- [1] Zhou Y P (邹喻苹), Ge S (葛颂), Wang X D (王晓东). Molecular Markers of Systematic & Evolutionary Botany [M]. Beijing: Science Press, 2001. 36-97. (in Chinese)
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [3] Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89:998-1006.
- [4] Nagaoka T, Oghihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:597-602.
- [5] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:40-45.
- [6] Qian W, Ge S, Hong D-Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:440-449.
- [7] Li A, Ge S. Genetic variation and clonal diversity of *Pennisetum villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers [J]. Ann Bot, 2001, 87: 585-590.
- [8] Esselman E J, Li J Q, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Mol Ecol, 1999, 8:443-451.
- [9] Ge X J, Sun M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis [J]. Mol Ecol, 1999, 8:2061-2069.
- [10] Meekins J F, Ballard H E Jr. Genetic variation and molecular biogeography of a north American invasive plant species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) [J]. Int J Plant Sci, 2001, 162:161-169.
- [11] 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.
- [12] Wolfe A D, Xiang Q-Y, Kephart S R. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:5112-5115.
- [13] Hao G, Lee D H, Lee J S, et al. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Bot Bull Acad Sin, 2002, 43:63-68.
- [14] Iruela M, Rubio J, Cubero J I, et al. Phylogenetic analysis in genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104:643-651.
- [15] Martin J P, Sanchez-Yelamo M D. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101:1234-1241.
- [16] Ajibade S R, Weeden N F, Chite S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna* [J]. Euphytica, 2000, 111:47-55.
- [17] Arcade F A, Anselin P, Rampant F, et al. Application of AFLP, RAPD, and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:299-307.
- [18] Sanker A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:206-214.
- [19] Cekic C, Battey N H, Wilkinson M J. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103:540-546.
- [20] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97:515-519.
- [21] Doyle J. DNA protocols for plants -CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt G M, Johnston A. Molecular Techniques in Taxonomy [M]. Berlin: Springer, 1991. 283-293.
- [22] Lu S D (卢盛栋). Current Protocols for Molecular Biology [M]. Second edition. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999. 458-463. (in Chinese)
- [23] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relative in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:1050-1060.
- [24] Herrera R, Cares V, Wilkinson M J, et al. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and inter simple sequence repeat markers [J]. Euphytica, 2002, 124:139-145.