

# 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化

孙清信<sup>1,2,3</sup>, 陈 坚<sup>1</sup>, 张 辉<sup>1</sup>, 祁建民<sup>2</sup>, 林忠平<sup>3</sup>, 胡鸯雷<sup>3</sup>, 林新坚<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福建省农业科学院, 福州 350003; <sup>2</sup>福建农林大学生命科学院, 福州 350002; <sup>3</sup>北京大学生命科学院, 北京 100871)

**摘要:**以紫云英为研究材料, 用哥伦比亚大学(UBC)公布的 100 条 ISSR 引物和 11 种株系紫云英品种的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 筛选出 33 条扩增条带较好的 ISSR 引物, 对其中的 ISSR 引物进行梯度 PCR, 筛选出最佳的退火温度。再采用正交试验和单因素试验相结合的方法对紫云英 ISSR-PCR 反应体系的 5 种因素(模板、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 及引物)进行优化浓度。确立了适合紫云英的 ISSR 分析的反应体系。在 25  $\mu$ l 反应体系中, 其反应浓度为: DNA 模版 50.00ng,  $Mg^{2+}$  2.00mol/L, *Taq* 聚合酶 1.0 U, dNTP 0.25mmol/L, 引物 0.20  $\mu$ mol/L, 2.5  $\mu$ l 10  $\times$  buffer。本试验为以后利用 ISSR 技术进行紫云英遗传多样性分析和物种保护奠定了技术基础。

**关键词:** 紫云英; 退火温度; ISSR 引物; 正交试验; 体系优化

## Optimization of ISSR's Primer and PCR Reaction System for *Astragalus sinicus* L.

SUN Qing-xin<sup>1,2,3</sup>, CHEN Jian<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, QI Jian-min<sup>2</sup>, LIN Zhong-ping<sup>3</sup>, HU Yuan-lei<sup>3</sup>, LIN Xin-jian<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, <sup>2</sup>College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, <sup>3</sup>College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract:** The factors that affecting the ISSR (inter-simple sequence repeat) result of *Astragalus sinicus* L. were researched. We studied and selected 33 ISSR primers which can amplify bands from the DNA of *Astragalus sinicus* L. and the 33 ISSR primers all from the ISSR primers published by Columbia University. By setting the temperature gradient, the available primers' best annealing temperature were explored. The effect of the five main reaction elements ( $Mg^{2+}$ , *Taq* DNA polymerase, dNTP, template and primer) on ISSR-PCR were all optimized by combining single factor experiments and orthogonal test method. Then we established the best ISSR-PCR reaction system. The best ISSR-PCR reaction system of *Astragalus sinicus* L. is 25  $\mu$ l reaction system concentration: the DNA template 50.00ng,  $Mg^{2+}$  concentration 2.00mmol/L, *Taq* enzyme dosages 1.0U, dNTP 0.25mmol/L, primers 0.20  $\mu$ mol/L, 2.5  $\mu$ l 10  $\times$  buffer. The selected ISSR primers and annealing temperature were widespread and representative in *Astragalus sinicus* L. ISSR-PCR marker research and the result could provide the basis for the analysis of diversity, protection, and exploitation of SSR primers of *Astragalus sinicus* L..

**Key words:** *Astragalus sinicus* L.; Annealing temperature; Primers of ISSR; Orthogonal design; System optimization

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 属于豆科黄芪属越年生草本植物, 又称翘摇、红花草、草子等。在长江中下游和华南地区广泛种植, 由于其有很强的固碳和固氮能力, 依靠紫云英与其共生的根瘤菌, 在改

良土壤、提高土壤肥力、减少化肥使用量, 以及对环境保护起到一定的作用, 也是很好的蜜源植物和饲料。日本、越南、朝鲜半岛等国家和地区也有种植。部分品种可以入药, 对急性结膜炎、神经痛、带状疱疹

疹、疮疖痈肿、痔疮有一定的疗效<sup>[1-6]</sup>。但是到目前为止国内外学者主要是在其固氮机理方面做了大量研究。陈坚等<sup>[7]</sup>开发了 SSR 分子标记用于紫云英品种的指纹鉴别。但用 ISSR 分子标记技术对紫云英品种的多态性和品种保护鉴定研究尚未见报道<sup>[8-9]</sup>。

分子标记 (molecular marker) 是以生物大分子的多态性为基础的一种遗传标记,广义的分子标记是指可遗传的并可以检测的 DNA 序列和蛋白质<sup>[10-12]</sup>。DNA 分子标记技术在分子生物学的发展过程中诞生和发展,1974 年,Grozdiccker 等<sup>[13]</sup>在鉴定温度敏感表型的腺病毒 DNA 突变体时利用经限制性内切酶解后得到的 DNA 片段的差异,开创了第 1 代 DNA 分子标记限制性片段长度多态性标记 (restriction fragment length polymorphism, RLFP)。1980 年,Bostein 等<sup>[14]</sup>发现 RFLP 标记技术是构建遗传图谱的好方法。从此以后,RLFP 技术应用于品种的鉴定和品系纯度的鉴定。1982 年,Hamada<sup>[15]</sup>发现了第 2 代 DNA 分子标记技术简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)。1994 年,加拿大蒙特利尔大学建立了 ISSR (inter-simple sequence repeats) 分子标记技术,与 RFLP 和 RAPD 技术相比有更高的重复性和稳定性<sup>[16]</sup>。另一方面,ISSR 分子标技术具有操作简单、快捷、DNA 用量少、技术要求低、成本低等特点,引物设计无需知道基因组序列,只要目标区域的长度在可扩增范围内,就能扩增出微卫星重复间的 DNA 片段。因此,当前 ISSR 分子标记技术广泛用于遗传多样性的分析、遗传作图、系统进化、系统进化关系等领域。但是 ISSR 这种技术也存在缺陷,稳定性易受到 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、引物、退火温度、dNTP 等条件的影响,扩增出来的条带随机性较大。

因此,在利用 ISSR 技术进行遗传性分析时,为保证结果的清晰、可靠和准确,必须对反应体系进行优化,另外 ISSR 具有不能区分纯合子和杂合子的弊端<sup>[17-23]</sup>。因此,本研究进一步设计了一种从 ISSR 开发紫云英 SSR 引物进行分子标记的试验方法。这种方法需要开发 SSR 正向引物和反向引物。正向引物的开发是从 ISSR 扩增片段中的特异性高,亮度较强的条带回收测序来进行设计的,反向引物的开发稍微复杂,它是在一定的测序基础上,设计正向引物 (引物 1) 和正向巢式引物 (引物 2) 进行染色体步移,回收目的条带测序分析完成的<sup>[24-27]</sup>。对于开发紫云英 SSR 引物,用 ISSR 引物扩增出条带亮度较强的特异性条带是重要的一步,因此,本试验对紫云 ISSR 引物进行筛选和 ISSR-PCR 反应体系进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

参试的紫云英品种有:余江大叶、841044、8487771、闽紫 7 号、闽紫 6 号、宁波大桥、信阳种、弋江籽、闽紫 1 号、闽紫 2 号、皖江大叶青共 11 个品种,编号分别为 1~11。

Tans DNA Marker 2 由全式金公司提供;核酸染料购自 TaKaRa; *Taq* DNA Polymerase  $Mg^{2+}$  和 dNTP 购于北京艾德莱生物科技有限公司;PCR 仪由 Biometra 公司生产;电泳仪 Bio-rad;凝胶成像系统 Tannon1600;Eppendorf 离心机;UNIC VN-2012 PC 型紫外可见光分光光度计。

本试验 100 条 ISSR 引物是参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC)<sup>[19]</sup> 所设计的引物序列,并交由上海生工合成,引物序列如表 1。

表 1 加拿大哥伦比亚学 (UBC) 提供的 100 个引物序列

Table 1 Sequences of 100 primers by UBC, Canada

引物序列 (5'-3')		Sequences of primers		
801 (AT) <sub>8</sub> T	802 (AT) <sub>8</sub> G	803 (AT) <sub>8</sub> C	804 (TA) <sub>8</sub> A	805 (TA) <sub>8</sub> C
806 (TA) <sub>8</sub> A	807 (AG) <sub>8</sub> T	808 (AG) <sub>8</sub> C	809 (AC) <sub>8</sub> G	810 (GA) <sub>8</sub> T
811 (GA) <sub>8</sub> C	812 (GA) <sub>8</sub> A	813 (CT) <sub>8</sub> T	814 (CT) <sub>8</sub> A	815 (CT) <sub>8</sub> G
816 (CA) <sub>8</sub> T	817 (CA) <sub>8</sub> A	818 (CA) <sub>8</sub> G	819 (CT) <sub>8</sub> A	820 (GT) <sub>8</sub> C
821 (GT) <sub>8</sub> T	822 (TC) <sub>8</sub> A	823 (TC) <sub>8</sub> C	824 (TC) <sub>8</sub> G	825 (AC) <sub>8</sub> T
826 (AC) <sub>8</sub> C	827 (AC) <sub>8</sub> G	828 (TG) <sub>8</sub> A	829 (TG) <sub>8</sub> C	830 (TG) <sub>8</sub> G
831 (AT) <sub>8</sub> YA	832 (AT) <sub>8</sub> YC	833 (AT) <sub>8</sub> YG	834 (AG) <sub>8</sub> YT	835 (AG) <sub>8</sub> YC
836 (AG) <sub>8</sub> YA	837 (TA) <sub>8</sub> RT	838 (TA) <sub>8</sub> RC	839 (TA) <sub>8</sub> RG	840 (GA) <sub>8</sub> YT

续表

	引物序列 (5'- 3')	Sequences of primers		
841 ( GA ) <sub>8</sub> YC	842 ( GA ) <sub>8</sub> YG	843 ( CT ) <sub>8</sub> RA	844 ( CT ) <sub>8</sub> RC	845 ( CT ) <sub>8</sub> RG
846 ( CA ) <sub>8</sub> RT	847 ( CA ) <sub>8</sub> RC	848 ( CA ) <sub>8</sub> RG	849 ( GT ) <sub>8</sub> YA	850 ( GT ) <sub>8</sub> YC
851 ( GT ) <sub>8</sub> YG	852 ( TC ) <sub>8</sub> RA	853 ( TC ) <sub>8</sub> RT	854 ( TC ) <sub>8</sub> RG	855 ( AC ) <sub>8</sub> YT
856 ( AC ) <sub>8</sub> YA	857 ( AC ) <sub>8</sub> YG	858 ( TG ) <sub>8</sub> RT	859 ( TG ) <sub>8</sub> RC	860 ( TG ) <sub>8</sub> RA
861 ( ACC ) <sub>6</sub>	862 ( AGC ) <sub>6</sub>	863 ( AGT ) <sub>6</sub>	864 ( ATG ) <sub>6</sub>	865 ( CCG ) <sub>6</sub>
866 ( CTC ) <sub>6</sub>	867 ( GGC ) <sub>6</sub>	868 ( GAA ) <sub>6</sub>	869 ( AGT ) <sub>6</sub>	870 ( TGC ) <sub>6</sub>
871 ( TAT ) <sub>6</sub>	872 ( GATA ) <sub>4</sub>	873 ( GACA ) <sub>4</sub>	874 ( CCCT ) <sub>4</sub>	875 ( CTAG ) <sub>4</sub>
876 ( GACA ) <sub>2</sub> ( GACA ) <sub>2</sub>	877 ( TGCA ) <sub>4</sub>	878 ( GGAT ) <sub>6</sub>	879 ( CTTCA ) <sub>3</sub>	880 ( GGAGA ) <sub>3</sub>
881 ( GGGTG ) <sub>3</sub>	882VBV ( AT ) <sub>7</sub>	883BVB ( TA ) <sub>7</sub>	884HBH ( AG ) <sub>7</sub>	885HBH ( GA ) <sub>7</sub>
886VDV ( CT ) <sub>7</sub>	887DVD ( TC ) <sub>7</sub>	888BDB ( CA ) <sub>7</sub>	889DBD ( AC ) <sub>7</sub>	890VHV ( GT ) <sub>7</sub>
891HVV ( TG ) <sub>7</sub>	892AGATCTGATATCTGAATTCCC		893NNNNNNNNNNNNNNNN	
894TGGTAGCTCTTGATCA ( N ) <sub>5</sub>	895AGAGTTGCTAGCTCTTGATC		896AGGTCGCGGCCGCNNNNNNATG	
897CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	898GATCAAGCTTNNNNNNATGTGG		899CATGCTGTTGGTCATTGTTCCA	
900ACTTCCCCACAGGTTAACACA				

N = (A,G,C,T), Y = (C,G,T), D = (A,G,T), H = (A,C,T), V = (A,C,G), K = (G,T), M = (A,C)

1.2 紫云英基因组 DNA 的提取与检测

采用改良的 CTAB 法<sup>[28-29]</sup>和用博迈德生物技术公司生产的广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒两种方法提取紫云英幼苗的 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳初步检测其质量,通过紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>,检测 DNA 的质量和浓度。把提取的紫云英 DNA 原液放置在 -20℃ 的冰箱保存。用于梯度 PCR 和 ISSR-PCR 反应的工作液稀释至 25ng/μl 备用。

1.3 紫云英 ISSR 引物筛选与梯度 PCR 反应程序

梯度 PCR 扩增的程序为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 40 ~ 62℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 72℃ 延伸 5min, 10℃ 终止反应, 30 个循环, 在退火梯度(40 ~ 62℃)有 12 个 PCR 槽;反应总体积为 25μl (PCR 反应组成成份见表 2)。梯度 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,紫外光下 UV 凝胶成像系统观察结果。筛选出最佳的退火温度值。

1.4 ISSR-PCR 反应体系和条件

反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 1min, 50℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环; 72℃ 延伸 7min。

表 2 PCR 反应组成成份

Table 2 Components of ISSR-PCR reaction		
成分	终浓度	加入量
Composition	Final concentration	Addition
10 × PCR 缓冲液	1 ×	2.5 μl
(含 Mg <sup>2+</sup> )		
2.5mmol/L dNTP 混合液	0.1mmol/L	1 μl
引物 1 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	1 μl
引物 2 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	1 μl
模板 DNA	12.5 ~ 100ng	适量
Taq DNA 聚合酶	0.5U	0.2 μl
ddH <sub>2</sub> O	-	加至 25 μl

1.5 正交试验优化 PCR 反应体系用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验设计<sup>[30-31]</sup>

对影响紫云英 ISSR-PCR 反应体系的 TaqDNA 聚合酶、引物、dNTP、Mg<sup>2+</sup>、模板浓度进行优化筛选,选出最佳的组合,本试验设计 16 个处理,每个处理 3 个重复,用 quantity one 分析软件对实验结果按照特异性条带强弱进行标记处理,特异最弱的记分为 1,其他的与其相比取整数值。紫云英 ISSR-PCR 各个反应体系的成分组成及正交试验设计见表 3。

表 3 ISSR-PCR 反应 5 因素 4 水平  $L_{16}(4^5)$  正交设计

Table 3  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design for the factors and levels of ISSR-PCR reaction

序号 No.	dNTP( mmol/L)	引物( $\mu$ mol/L)Primer	DNA 模板( ng/25 $\mu$ l)	$Mg^{2+}$ ( mmol/L)	Taq 酶( U/25 $\mu$ l)
			DNA template		
1	0.10	0.20	12.50	1.50	0.5
2	0.10	0.30	25.00	2.50	1.0
3	0.10	0.40	37.50	3.50	1.5
4	0.10	0.50	50.00	4.50	2.0
5	0.15	0.20	25.00	3.50	2.0
6	0.15	0.30	12.50	4.50	1.5
7	0.15	0.40	50.00	1.50	1.0
8	0.15	0.50	37.50	2.50	0.5
9	0.20	0.20	37.50	4.50	1.0
10	0.20	0.30	50.00	3.50	0.5
11	0.20	0.40	12.50	2.50	2.0
12	0.20	0.50	25.00	1.50	1.5
13	0.25	0.20	50.00	2.50	1.5
14	0.25	0.30	37.50	1.50	2.0
15	0.25	0.40	25.00	4.50	0.5
16	0.25	0.50	12.50	3.50	1.0

根据以上的正交试验选出最佳的反应体系,在其他因子保持不变的情况下,参照以前的试验结果,按照一定梯度适当变化单因子的浓度,逐个筛选单个因子最佳的扩增条件,找出适合紫云英的 ISSR-PCR 反应体系。5 因子,每个因子设 4 个浓度梯度,处理见表 4。

表 4 细调性 ISSR-PCR 反应体系的因素与水平

Table 4 Optimization of factors and levels for ISSR-PCR reaction

影响因素	1	2	3	4
Influencing factors				
dNTP( mmol/L)	0.15	0.25	0.35	0.45
引物( $\mu$ mol/L)	0.20	0.40	0.60	0.80
$Mg^{2+}$ ( mmol/L)	2.00	3.00	4.00	5.00
Taq 酶( U/25 $\mu$ l)	0.5	0.7	0.9	1.1
模板( mmol/L)	25.00	45.00	65.00	85.00

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组提取与检测

检测了同一批提取的 DNA 样品(图 1),结果表

明条带清晰,无降解和拖尾现象,说明提取的紫云英 DNA 样品纯度较高,杂质含量较少,用紫外分光光度计检测并把样品 DNA 稀释到 25ng/ $\mu$ l 进行下游的 ISSR-PCR 试验。

### 2.2 ISSR-PCR 引物的筛选

用弋江籽基因组 DNA 为模板分别对加拿大哥伦比亚大学(UBC)所设计的 100 条引物按照上述的反应条件和体系进行 PCR 扩增,筛选出有条带的引物如下:805 (TA)<sub>8</sub>C;807 (AG)<sub>8</sub>T;808 (AG)<sub>8</sub>C;810 (GA)<sub>8</sub>T;811 (GA)<sub>8</sub>C;812 (GA)<sub>8</sub>A;813 (CT)<sub>8</sub>T;817 (CA)<sub>8</sub>A;818 (CA)<sub>8</sub>G;819 (GT)<sub>8</sub>A;821 (GT)<sub>8</sub>T;822 (TC)<sub>8</sub>A;825 (AC)<sub>8</sub>T;826 (AC)<sub>8</sub>C;827 (AC)<sub>8</sub>G;828 (TG)<sub>8</sub>A;829 (TG)<sub>8</sub>C;830 (TG)<sub>8</sub>G;831 (AT)<sub>8</sub>YA;834 (AG)<sub>8</sub>YT;835 (AG)<sub>8</sub>YC;836 (AG)<sub>8</sub>YA;840 (GA)<sub>8</sub>YT;842 (GA)<sub>8</sub>YG;849 (GT)<sub>8</sub>YA;851 (GT)<sub>8</sub>YG;855 (AC)<sub>8</sub>YT;856 (AC)<sub>8</sub>YA;857 (AC)<sub>8</sub>YG;862 (AGC)<sub>6</sub>;864 (ATG)<sub>6</sub>;869 (GTT)<sub>6</sub>;884HBH (AG)<sub>7</sub>。试验表明上述筛选出的引物,在紫云英的 PCR 扩增中有很好的效果。

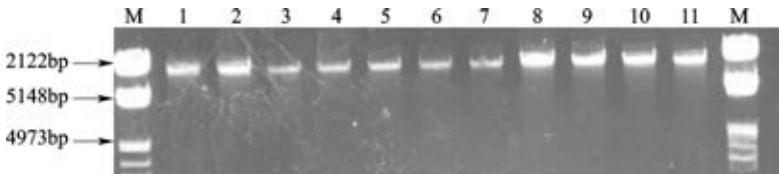


图 1 紫云英 11 个品种的 DNA 质量检测

Fig.1 Quality detection of *Astragalus sinicus* DNA template

2.3 引物退火温度的确定

ISSR-PCR 反应中的退火温度与合成报告单上的  $T_m$  有关,但不一致。本研究对引物退火温度设了 12 个温度梯度,筛选引物用以 840(GA)<sub>8</sub>YT;以弋江籽基因组 DNA 为模板,在 25 $\mu$ l 反应体系里进行 PCR 扩增,然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 2)。从温度梯度来看低的退火温度产生的条带

较多,产生的非特异性条带较多,高的退火温度产生的条带较少,非特异性条带明显减少。从图 2 中可以清晰地看到随着退火温度的提高,1000bp 处的条带有减弱的趋势,800bp 处的条带逐渐增强,当退火温度在 56 $^{\circ}$ C 时,对应的 9 泳道条带数目和亮度合适,弱带较少,较为适合结果分析。

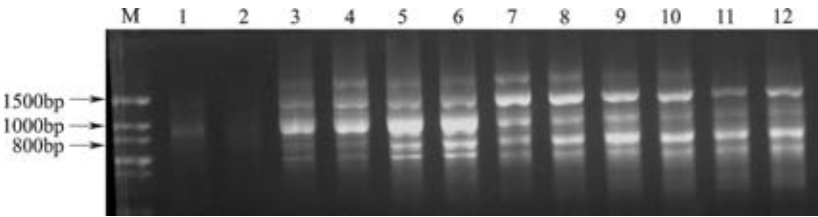


图 2 退火温度对 PCR 扩增结果的影响[840(GA)<sub>8</sub>YT]

Fig. 2 Optimizing the annealing temperature of primer [840(GA)<sub>8</sub>YT]

M: Marker; 1 ~ 12 对应的退火温度依次为 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 $^{\circ}$ C

M: Marker, The annealing temperature is 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 $^{\circ}$ C

2.4 正交结果直观分析

参照何正文等<sup>[33]</sup>方法,选用弋江籽为模板,[840(GA)<sub>8</sub>YT]为引物;按照正交试验表进行扩增处理, $L_{16}(4^5)$ 正交试验 PCR 产物电泳结果(图 3 ~ 图 6),按照遗传多样性分析的要求,将 16 个处理,

根据特异性条带强弱,从高到低依次记分,分数越高,表示敏感性及特异性较好。16 个处理 3 次重复的分数分别记为:3, 2, 4, 12, 6, 5, 7, 9, 11, 3, 4, 8, 9, 3, 16, 12; 2, 2, 3, 13, 4, 3, 8, 7, 12, 3, 5, 9, 11, 5, 14, 13; 1, 4, 2, 11, 5, 7, 8, 10, 10, 2, 6, 7, 10, 4, 15, 11。

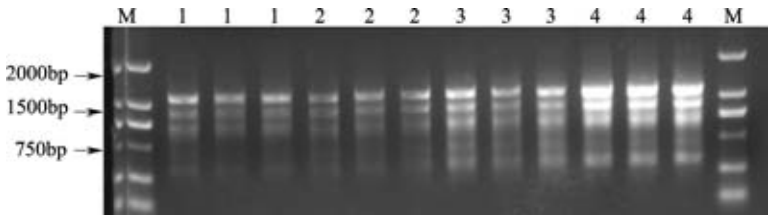


图 3 ISSR-PCR 正交试验结果

Fig. 3 Result of ISSR-PCR orthogonal design

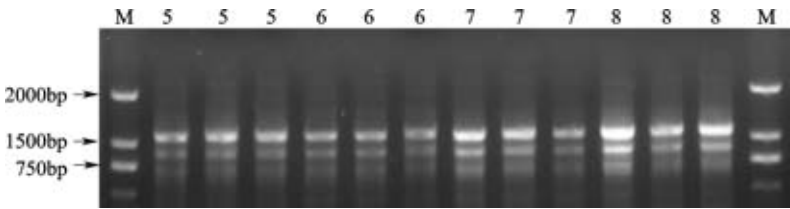


图 4 ISSR-PCR 正交试验结果

Fig. 4 Result of ISSR-PCR orthogonal design

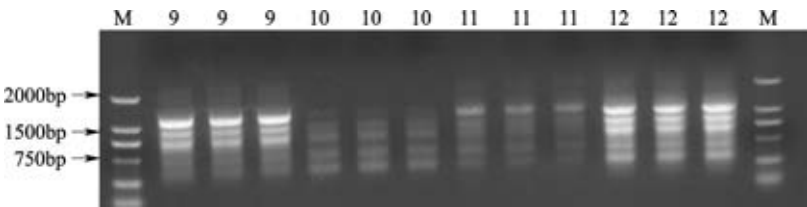


图 5 ISSR-PCR 正交试验结果

Fig. 5 Result of ISSR-PCR orthogonal design



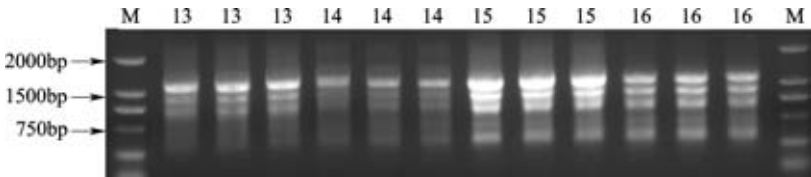


图 6 ISSR-PCR 正交试验结果

Fig. 6 Result of ISSR-PCR orthogonal design

图(3~6)中 1~16 指正交试验的处理代号,参照表 3;M:Marker

Fig. (3-6);Result of orthogonal design,1-16;deal with cod,refer to table 3;M:Marker

2.5 正交结果方差分析

利用 SPSS19.0 将上述记分结果进行方差分析(表 6),由 F 值可知,在本试验设置的因素水平范围内,Mg<sup>2+</sup> 对反应的结果影响最大,模板影响最小,5

个因子影响大小的顺序依次是 Mg<sup>2+</sup>,dNTP,引物,Taq 聚合酶,模板。由 F 值可知,5 个因素的观察效能较高,各水平间的差异显著,可以进行下游试验,进一步细调各因素内水平。

表 6 紫云英 ISSR-PCR 各因素间的方差分析

Table 6 Analysis of *Astragalus sinicus* L. ISSR-PCR

变异来源	III 型平方和		均方			偏 Eta 方	非中心参数	观测到的幂 <sup>b</sup>
Source of variation	Type sum of squares	df	Mean square	F	Sig	Partial Eta square	Non-centrality parameter	Observed a power of b
校正模型	727.813 <sup>a</sup>	15	48.521	40.155	0	0.950	602.328	1.000
Correction model								
截距 Intercept	2422.521	1	2422.521	2004.845	0	0.984	2004.845	1.000
模板 Template	32.229	3	10.743	0.891	1.563	0.455	26.672	0.990
引物 Primer	265.229	3	88.410	43.167	0.041	0.873	219.500	1.000
dNTP	181.729	3	60.576	50.132	0.034	0.825	150.397	1.000
Taq 酶 Taq enzyme	26.896	3	8.965	7.420	0.001	0.410	22.259	0.973
镁离子 Mg <sup>2+</sup>	221.729	3	73.910	61.167	0.000	0.852	183.500	1.000
误差 Inaccuracy	38.667	32	1.208					
总计 Total	3189.000	48						
校正的总计	766.479	47						
Corrected total								

a: R<sup>2</sup> = 0.950 (调整 R<sup>2</sup> = 0.926); b: 使用 alpha 的计算结果 (R = 0.05)

a: R<sup>2</sup> = 0.950 (Adjusted R<sup>2</sup> = 0.926); b: Calculations using alpha (R = 0.05)

2.6 单因素水平对 ISSR-PCR 的影响

2.6.1 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 结果的影响 Taq 酶是 ISSR-PCR 反应中的一个重要的因素,从图 7 中可以清晰地看出随着 Taq 酶浓度的提高条带的亮度有低到高,Taq 酶 0.5U 条带相对较暗,0.7U 与

0.9U 差异不是很显著,1.1U 时条带开始弥散,亮度降低。总之酶量过低 PCR 反应敏感性较差,所能提供的信息少,酶量过高非特异性条带会出现,结合上述正交试验和经济角度用 1U/25μl 为适宜 TaqDNA 聚合酶浓度。

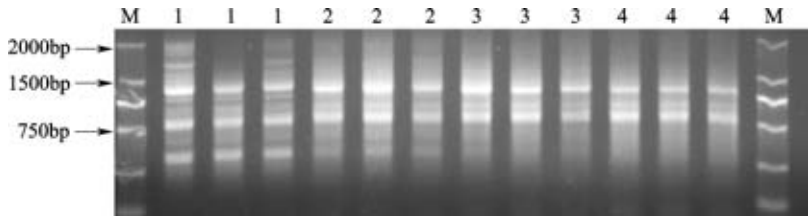


图 7 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响[引物 840(GA)<sub>8</sub>YT,模板弋江籽]

Fig. 7 Optimizing the concentration of Taq polymerase[primer 840(GA)<sub>8</sub>YT,template Yijiangzi]

1:0.5 U/25μl,2:0.7 U/25μl,3:0.9 U/25μl,4:1.1U/25μl

**2.6.2 引物对 ISSR-PCR 结果的影响** 从图 8 中可以看出引物 0. 20 $\mu$ mol/L,0. 40 $\mu$ mol/L,0. 60  $\mu$ mol/L 条带亮度和条带的多态性差异不大,但是到

0. 80 $\mu$ mol/L 条带亮度减弱,有可能是引物的加入形成引物二聚体,影响了 PCR 的扩增。综合以上的正交试验选 0. 20 $\mu$ mol/L 浓度为引物浓度。

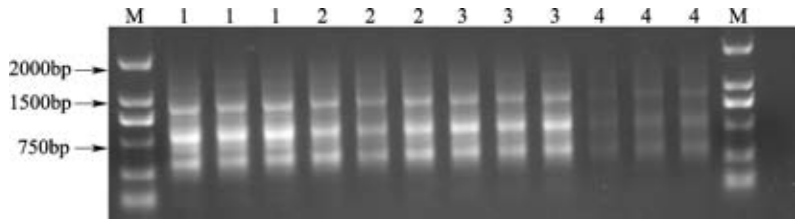


图 8 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响[引物 840 (GA)<sub>8</sub>YT,模板弋江籽]  
Fig.8 Optimizing the concentration of template [primer 840 (GA)<sub>8</sub>YT,template Yijiangzi]  
1:0. 20 $\mu$ mol/L,2:0. 40 $\mu$ mol/L,3:0. 60 $\mu$ mol/L,4:0. 80 $\mu$ mol/L

**2.6.3 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响** dNTP 是 ISSR-PCR 反应中扩增合成新核苷酸的原料和提供能量的来源,因此 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 反应结果影响很大。浓度过低则产率下降,浓度过高错配的

概率加大,并与 Mg<sup>2+</sup> 竞争酶的活性中心。从图 9 中可以看出 dNTP 浓度为 0. 45mmol/L 时,条带逐渐变暗。结合正交试验的结果,dNTP 浓度为 0. 25mmol/L 时较为合适。

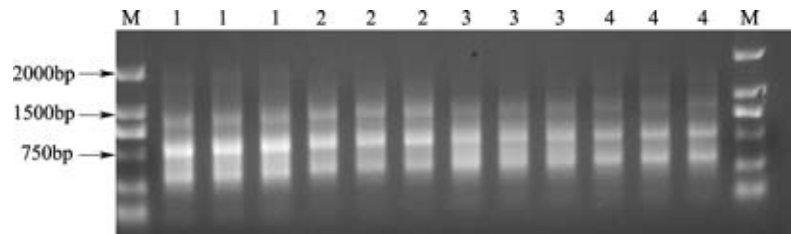


图 9 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响[引物 840 (GA)<sub>8</sub>YT,模板弋江籽]  
Fig.9 Optimizing the concentration of dNTP [primer 840 (GA)<sub>8</sub>YT,template Yijiangzi]  
1:0. 15mmol/L,2:0. 25mmol/L,3:0. 35mmol/L,4:0. 45mmol/L

**2.6.4 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR-PCR 的影响** Mg<sup>2+</sup> 的浓度不仅影响酶的活性,还能与反应中的 dNTP、引物、模板结合,影响模板与引物的结合率,产生非特异性<sup>[32]</sup>。从图 10 可以看出,Mg<sup>2+</sup> 浓度为2. 00mmol/L 时,条带亮度较好,特异性较强。在 3. 00mmol/L,

4. 00mmol/L,5. 00mmol/L 泳道中出现弥散现象,甚至扩增产物消失。结合正交试验的结论确定 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2. 00mmol/L 时能保证 Taq 酶的适当活力,条带特异性较好。

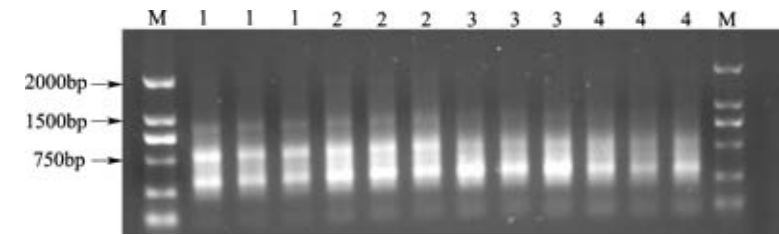


图 10 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响[引物 840 (GA)<sub>8</sub>YT,模板弋江籽]  
Fig.10 Optimizing the concentration of Mg<sup>2+</sup> [primer 840 (GA)<sub>8</sub>YT,template Yijiangzi]  
1:2. 00mmol/L,2:3. 00mmol/L,3:4. 00mmol/L,4:5. 00mmol/L

**2.6.5 模板浓度对 ISSR-PCR 的影响** 模板 DNA 量对 ISSR-PCR 反应影响不大,从图 11 中可知模板 DNA 浓度为 25. 00ng/25 $\mu$ l,45. 00ng/25 $\mu$ l,65. 00ng/25 $\mu$ l,85. 00ng/25 $\mu$ l 时条带亮度和多态性差异不

大。因此,可以得出在紫云英 ISSR-PCR 反应体系中模板对其影响不大,结合上述正交试验模板量 50. 00ng 较为合适。

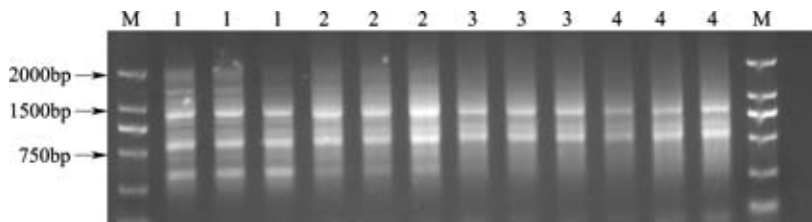


图 11 模板浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响[引物 840( GA)<sub>8</sub>YT,模板弋江籽]

Fig. 11 Optimizing the concentration of template [ primer 840( GA)<sub>8</sub>YT, template Yijiangzi]

1:25. 00mmol/L,2:45. 00mmol/L,3:65. 00mmol/L,4:85. 00mmol/L

2. 6. 6 紫云英 ISSR-PCR 反应体系稳定性的验证

通过对以上 ISSR-PCR 反应体系各因素的优化,确定了紫云英 ISSR-PCR 25μl 的反应体系:模板 DNA 50ng, Mg<sup>2+</sup> 2. 00mmol/L, Taq 聚合酶 1. 0U, dNTP 0. 25mmol/L, 引物 0. 20μmol/L, 加 ddH<sub>2</sub> O 至 25μl. 扩增程序:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 1min,56℃ 退

火 1min,72℃ 延伸 1min,进行 30 个循环,72℃ 延伸 7min. 扩增后 PCR 产物在 4℃ 保存. 图 12 是同一引物[ primer U<sub>840</sub>( GA)<sub>8</sub>YT]对不同材料在该条件体系下的扩增结果. 从电泳图谱可以看出,11 个样品的紫云英模板都能扩增出清晰,重复性好的图谱,表明优化的紫云英 ISSR-PCR 体系是稳定、可靠的.

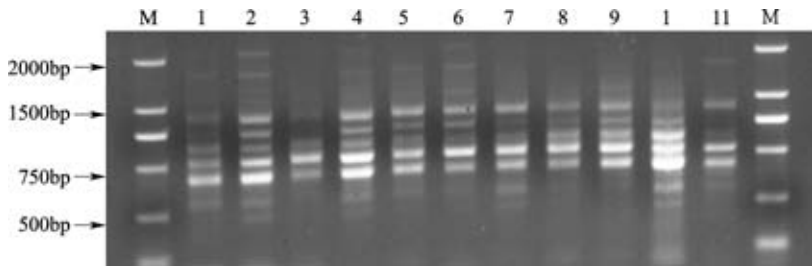


图 12 引物 840( GA)<sub>8</sub>YT 的扩增电泳图谱

Fig. 12 The ISSR amplified diagram by using primer 840( GA)<sub>8</sub>YT

1 ~ 11:8410441;余江大叶;8487771;闽紫 7 号;宁波大桥;信阳种;弋江籽;

闽紫 6 号;闽紫 1 号;闽紫 2 号;皖江大叶青

1-11:8410441, Yujiangdaye, 8487771, Minzi No. 7, Ningbodaqiao, Xinyangzhong,

Yijiangzi, Minzi No. 6; Minzi No. 1; Minzi No. 2, Wanjiangdayeqing

3 讨论

紫云英 ISSR 分子标记受多种因素的影响,虽然 ISSR 较 RAPD 标记稳定,但是试验的可靠性和稳定性与 PCR 反应条件有很大关系<sup>[ 34]</sup>. 不同样本的最佳 ISSR 反应体系的条件是不同的,同时由于每个人的设计的因素水平和方法的不同,使各水平因素影响也有差异. 因此,优化 ISSR-PCR 的反应条件是下游试验成败的关键. 正交试验能快速得到 ISSR-PCR 反应的最佳条件的组合,但是对试验优劣的判断有很大的主观性,对试验可能造成误差,单因子试验可较为直观地看出单因子对试验的影响,但忽视了各因子间的互作效应,很难找到合适的反应体系. 因此,本试验结合正交和单因子两种试验的优缺点和试验中实际筛选出的最佳反应体系,最终试验结果表明,这两种试验方法相结合有效地减少了试验

误差,保证了试验的稳定性和可靠性. 本研究筛选了加拿大哥伦比亚大学( UBC) 公布的 100 条引物,从中筛出了 33 条能扩增出较亮条带的引物. 以引物 840( GA)<sub>8</sub>YT 为例,用梯度 PCR 对引物退火温度设计了 12 个温度梯度进行筛选;以弋江籽为模板,引物 840( GA)<sub>8</sub>YT 在 25μl 反应体系中进行 PCR 扩增,筛选出其最佳退火温度为 56℃,随后对其他能扩增出条带的引物进行了退火温度的筛选,得出以下结论. 一般它们的退火温度要比 T<sub>m</sub> 值高 2 ~ 5℃. 利用正交试验 L<sub>16</sub>( 4<sup>5</sup>) 和单因子试验相结合的方法,对影响 ISSR-PCR 反应的主要因素进行优化. 紫云英 ISSR-PCR 扩增引物 840( GA)<sub>8</sub>YT 优化后理想的反应体系为:25μl 反应体系中,模板 DNA 50. 00ng、Mg<sup>2+</sup> 2. 00mmol/L、Taq 聚合酶 1. 0U、dNTP 0. 25mmol/L、引物 0. 20μmol/L、2. 5μl 10 × buffer. 试验表明优化后的反应体系



适用于不同品种的紫云英 ISSR-PCR 扩增,本试验为开发 SSR 引物和遗传分析提供了技术条件和理论基础。

## 参考文献

- [1] Chen H K, Shu M K. Notes on the root nodule bacteria of *Asragalus siniaus* L. [J]. Soil Sci, 1944, 58, 291-293
- [2] Chen H K, Li F D, Cao Y Z. Characteristic, distribution, ecology, and utilization of *Asragalus sinicus* L. rhizobia symbiosis [M]// Hong K F. Nitrogen fixation research in China. New York: Springer Verlag, 1992, 39-45
- [3] 张学贤, 李阜棣, 曹燕珍, 等. 紫云英根瘤菌分子遗传学研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(2): 77-83
- [4] 林新坚, 曹卫东, 吴一群, 等. 紫云英研究进展[J]. 草业科学, 2011, 28(1): 135-140
- [5] 王璐, 吴建富, 潘晓华, 等. 紫云英和稻草还田免耕抛栽对水稻产量和土肥力的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(2): 299-303
- [6] 张晓霞, 王平, 冯新梅, 等. 外源基因标记的紫云英根瘤菌在水稻根部的定殖研究[J]. 生态学报, 2003, 23(4): 773-776
- [7] 陈坚, 张辉, 林新坚, 等. 紫云英 SSR 分子标记的开发及在品种中的应用[J]. 作物学报, 2011, 37(9): 1592-1596
- [8] 张晓霞, 王平, 冯新梅, 等. 对水稻有促生作用的紫云英根瘤菌筛选初报[J]. 土壤肥料, 2001, 9(6): 30-33, 45
- [9] 姚振华, 田哲贤, 戴小密, 等. 异源 *nifA* 基因对苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体的互补分析[J]. 科学通报, 2006, 19(10): 2258-2264
- [10] 周延清. 遗传标记的发展[J]. 生物学通报, 2000, 35(5): 17-18
- [11] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999(4): 19-22
- [12] 林忠平. 走向 21 世纪的植物分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-200
- [13] Grodzicker T, Williams J, Sharp P. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1974, 39: 439-446
- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331
- [15] Hamada H, Petrino M G, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982, 79: 646-649
- [16] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger-printing [J]. Nucl Acide Res, 1995, 23(21): 4407-4414
- [17] Blar M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of micro-satellite motif frequency and fingerprinting in rice [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 780-792
- [18] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传学报, 2002, 24(5): 613-616
- [19] 张青林, 罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报, 2004, 21(1): 54-58
- [20] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of genetic linkage map[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 206-214
- [21] 孙洪, 程静, 张相武, 等. ISSR 分子标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 123-127
- [22] Cui X M, Dong Y X, Hou X L, et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Brassica-rapasp. chinensis* and transferability among related species[J]. Agric Sci China, 2008, 7(1): 19-31
- [23] 牛泽如, 杨文柱, 庞磊, 等. 基于 ISSR 和 AFLP 标记开发甜菜 SSR 引物[J]. 中国农学通报, 2010, 26(21): 147-151
- [24] Lian C, Zhou Z H, Hogetsu T. A simple method for developing micro-satellite mark using amplified fragment of Inter-simple sequence repeat [J]. J Plant Res, 2001, 4(11): 381-385
- [25] Lian C, Miwa M, Hogetsu T. Isolation and characterization of micro-satellite loci from the Japanese red pin (*Pinus densiflora*) [J]. Mol Ecol Note, 2000, 11(9): 1186-1188
- [26] Lian C, Hogetsu T, Matsushita N, et al. Development of micro-satellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma Matsutake*, by an ISSR-suppression-PCR method [J]. Mycorrhiza, 2003, 3(1): 27-31
- [27] 郭大龙, 罗正荣. 一种利用 ISSR 开发 SSR 引物的方法[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 268-270
- [28] Dolye J J, Dolye J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bul, 1987, 9(1): 11-15
- [29] Wang X D, Wang Z P, Zou Y P. An improved procedure the isolation of nuclear DNA isolation from leaves of wild grapevine dried with Silica gel [J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14(4): 369-373
- [30] 赵丽华. 石榴 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化[J]. 北方园艺, 2010, 19(2): 148-152
- [31] 李开拓, 赵依杰, 钟凤林, 等. 黄皮 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 37-41
- [32] 王佳, 梁国华, 陈学好, 等. 正交优化黄瓜 ISSR 体系[J]. 分子植物育种, 2006, 3(4): 439-442
- [33] 何正文, 刘云生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学报, 1998, 23(4): 403-404
- [34] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001