

# 高原鼠兔 ISSR 引物反应体系的优化与筛选

葛艳丽<sup>1,2</sup>, 慈海鑫<sup>1,2</sup>, 唐利洲<sup>1,2</sup>, 林恭华<sup>1,2</sup>, 苏建平<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** [目的]筛选和优化高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 适宜的 ISSR 反应体系, 以在对高原鼠兔进行 ISSR 分析时获得清晰和多态性好的扩增结果。[方法]以高原鼠兔基因组 DNA 为模板, 通过单因素试验, 对体系中的模板浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶用量、引物用量、退火温度进行探讨。[结果]结果表明, 高原鼠兔 ISSR-PCR 扩增的最佳条件为: 25 μl PCR 反应体系, 其中 4 μl DNA 模板, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.25 U Taq 聚合酶, 1.5 μmol/L 引物, 复性温度 4560 (退火温度随引物不同而确定)。用 11 条引物进行了 PCR 扩增, 筛选出效果较好的 6 条引物。[结论]该反应体系的建立为鼠兔遗传多样性和分子系统学研究提供技术支持。

**关键词** 高原鼠兔; ISSR; 优化 PCR

中图分类号 S813.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14422-03

## Optimization and Screening of ISSR Primer Reaction System for *Ochotona curzoniae*

GE Yan-li et al (Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the suitable ISSR reaction system for *Ochotona curzoniae*, to obtain high resolution and multiple polymorphic bands. [Method] Based on the genomic DNA extracted from *Ochotona curzoniae*, the effects of the main reaction system elements such as Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, primer, template DNA, Taq DNA polymerase and annealing temperature were presented by single factor experiment. [Result] The results showed that the optimum conditions of ISSR-PCR amplification were as follow: The total volume of the reaction system was 25 μl, consisted of 4 μl DNA template, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.25 U Taq DNA polymerase, 1.5 μmol/L primer and annealing temperature of 45-60. The 11 ISSR primers were used to screen the suitable primers, of which 6 ISSR primers were screened. [Conclusion] This optimal system offered a technical system of ISSR analysis suitable to *Ochotona curzoniae*.

**Key words** *Ochotona curzoniae*; ISSR; Optimizing PCR

ISSR 是 Zietkiewicz 等<sup>[1]</sup>于 1994 年在 SSR 基础上创建、基于 PCR 扩增的一种新型分子标记技术。ISSR 具有操作技术简单, 试验成本低, 模板需要量少, 多态性丰富, 试验稳定性高等优点。因此, ISSR 技术已广泛应用于品种鉴定, 物种的分类、系统学和居群生物学的研究中<sup>[2-4]</sup>。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 隶属于兔形目 (Lagomorpha) 鼠兔科 (Ochotonidae) 鼠兔属 (*Ochotona*), 是青藏高原的特有物种, 也是青藏高原及其毗邻地区主要的草原害鼠之一。关于高原鼠兔的研究主要集中在形态、生态、生理生化、行为等领域<sup>[5-8]</sup>。笔者以高原鼠兔为研究材料, 对 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 的用量等因素的最佳反应条件进行了筛选, 旨在为进一步进行高原鼠兔的遗传多样性和分子系统地理学的研究奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 高原鼠兔样本采自西藏雅鲁藏布江南岸的江孜热龙、浪卡子白地和北岸的尼木续迈、当雄纳木错 4 个地区。取鼠兔腿部肌肉组织保存在 95% 的乙醇中。

**1.2 ISSR 引物** 从加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 提供的 100 条 ISSR 引物序列中选取 11 条, 编号分别为 UBC809, UBC827, UBC813, UBC812, UBC829, UBC816, UBC823, UBC872, UBC855, UBC884, UBC819, 由 TaKaRa 公司合成。

**1.3 DNA 的提取及检测** 参照 Sambrook 等用蛋白酶 K 苯酚/氯仿法<sup>[9]</sup>提取基因组总 DNA。用 0.8% 的琼脂糖凝胶对 DNA 质量进行电泳检测, -20℃ 保存 DNA。

**1.4 PCR 反应体系与引物筛选** 对参与 ISSR 反应的 DNA 模板、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 和 Taq DNA 酶用量以及退火温度进行了

优化试验, 各参数优化设计梯度见表 1。采用随机筛选的引物 UBC809 进行优化, 初始反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 47~61℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 37 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 g/ml 溴化乙锭) 中电泳, 电压不超过 5 V/cm, 电泳缓冲液为 1×TAE, 用一定的 DNA 梯度作分子量标记 (以 M 表示, 分子量从大到小依次为: 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 800, 1 600, 1 400, 1 200, 1 000, 800, 600, 400, 200 bp), 紫外凝胶自动成像仪照相。

表 1 ISSR PCR 反应体系的优化试验设计

Table 1 The optimization design of ISSR-PCR reaction system

反应成分 Reaction component	浓度梯度 Concentration gradients						
	1	2	3	4	5	6	7
模板 DNA 浓度 μl Template DNA concentration	0.5	1.0	2.5	4.0	5.0	7.5	15.0
Mg <sup>2+</sup> 浓度 mmol/L Mg <sup>2+</sup> concentration	1.0	1.5	2.0	2.5			
引物浓度 μmol/L Primer concentration	0.5	1.0	1.5	2.0			
dNTPs 浓度 mmol/L dNTPs concentration	0.10	0.15	0.20	0.25			
Taq 酶浓度 U Taq enzyme concentration	0.50	1.00	1.25	1.50	2.00		
退火温度 Annealing temperature	47	49	51	53	57	59	

### 2 结果与分析

**2.1 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响** 该试验提取到了较好的总 DNA, 电泳图显示 DNA 带型完整, 清晰一致, 没有拖尾现象, 说明其中蛋白质和 RNA 的量少或没有, 无明显降解 (图 1)。该试验没有测量 DNA 模板的具体浓度, 只是以加模板的体积来作比较, 模板浓度从 1 个单位 (在 25 μl 反应体系中, 设置了 0.5、1.0、2.5、4.0、5.0、7.5、15.0 μl 的体积变化) 到 30 倍单位变化时, 所得产物的条带数和位点数基本

**基金项目** 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (CXLY-2002-3)。  
**作者简介** 葛艳丽 (1984-), 女, 安徽淮北市人, 硕士研究生, 研究方向: 进化生态学和分子生态学。\* 通讯作者, E-mail: jpsu@nwipb.ac.cn。  
**收稿日期** 2008-09-22

没有变化,只是在模板浓度低时产物浓度会变低,条带变弱(图2)。由图2还可知,模板DNA浓度对PCR产物的特异性和稳定性影响不大。当模板DNA的量为2.50~15.0 μl时,扩增产物条带均比较清晰明亮。考虑到模板过少,分子碰撞的几率低,偶然性大,影响试验的稳定性;模板过多又会降低特异性扩增效率,增加非特异性产物,使电泳图谱背景呈弥散状。因此,该试验选用4 μl作为PCR反应的用量。

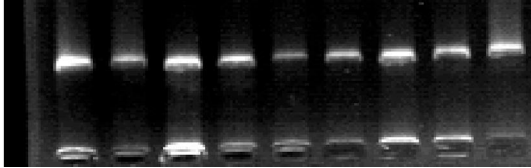


图1 鼠兔 DNA 电泳图

Fig.1 The electrophoretogram of DNA in *Ochotona curzoniae*

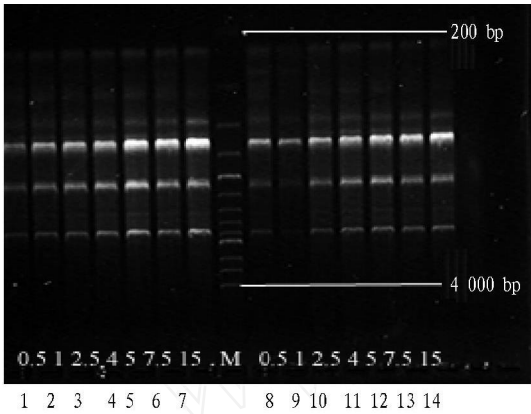


图2 模板DNA浓度对扩增结果的影响

Fig.2 Effects of template DNA concentration on the amplification results

**2.2 Mg<sup>2+</sup>浓度对ISSR-PCR反应的影响** Mg<sup>2+</sup>浓度对ISSR的特异性和扩增效率影响很大。在一定的浓度范围内,随着Mg<sup>2+</sup>浓度的增高,扩增的特异性减弱,但扩增片段的产率增加。该试验中,不同的Mg<sup>2+</sup>浓度下均有扩增产物,当Mg<sup>2+</sup>在1.0~1.5 mmol/L时,条带清晰可见,但在1.0 mmol/L时,条带较弱;当Mg<sup>2+</sup>增加至2.0、2.5 mmol/L时,谱带亮度明显增加,但背景模糊难辨(图3)。因此,选择1.5 mmol/L的Mg<sup>2+</sup>浓度作为高原鼠兔ISSR分析的最佳浓度。

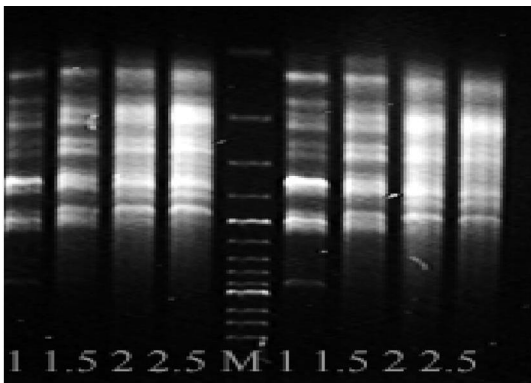


图3 Mg<sup>2+</sup>浓度对扩增结果的影响

Fig.3 Effects of Mg<sup>2+</sup> concentration on the amplification results

**2.3 Taq DNA聚合酶浓度对ISSR-PCR反应的影响** TaqDNA聚合酶是扩增反应的关键因素。从图4可以看出,在25 μl反应体系中使用0.50~2.00 U的Taq均有扩增产

物。在1.5、2.0 U时背景较深,在0.50~1.25 U时带型和强度较好,考虑到酶量过少,其催化能力不够强且影响扩增的稳定性。因此,选用1.25 U为最佳Taq酶用量。

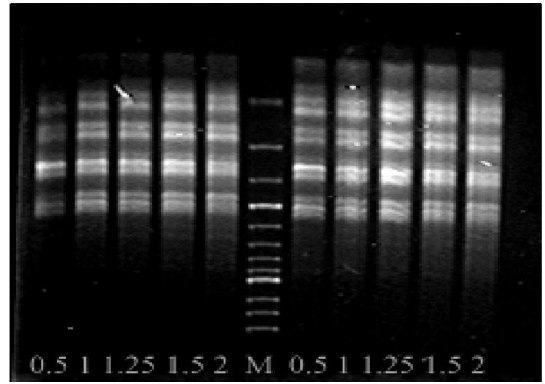


图4 TaqDNA聚合酶浓度对扩增结果的影响

Fig.4 Effects of Taq DNA polymerase concentration on the amplification results

**2.4 dNTPs浓度对ISSR-PCR反应的影响** dNTPs是PCR反应的原料,该试验设计了4个浓度梯度,扩增结果见图5。从图5可以看出,在0.10~0.25 mmol/L的dNTPs浓度范围内均有扩增产物,但dNTPs浓度为0.10和0.15 mmol/L时条带相对较弱(尤其是1800 bp处条带);dNTPs浓度为0.20和0.25 mmol/L时扩增产率较高,条带较亮。由于在0.25 mmol/L时条带相对弥散(尤其是500、550 bp处条带),所以最适dNTPs浓度选为0.20 mmol/L。

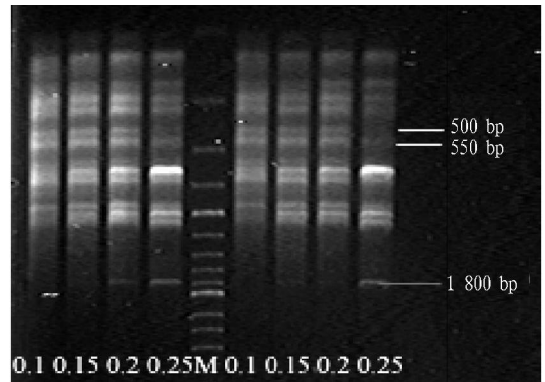


图5 dNTP浓度对扩增结果的影响

Fig.5 Effects of dNTP concentration on the amplification results

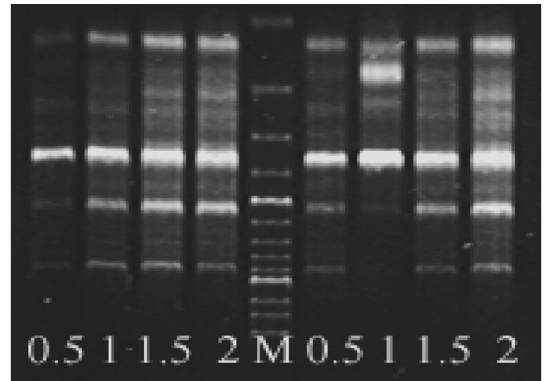


图6 引物浓度对扩增结果的影响

Fig.6 Effects of primer concentration on the amplification results

**2.5 引物浓度对ISSR-PCR反应的影响** 引物浓度也是影响ISSR扩增的一个重要因素。该试验共设置了4个引物梯

度,结果如图6所示。从图6可以看出,引物浓度为0.5、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增条带弱;引物浓度为1.5、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 时条带较亮,但在2.0  $\mu\text{mol/L}$ 时非特异性扩增产物增多,背景模糊,相对而言,在引物浓度为1.5  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增产物清晰,亮度适宜,是较为理想的浓度。

**2.6 退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响** 退火温度与 ISSR 指纹的稳定性也至关重要。引物 809 理论退火温度为 52 $^{\circ}\text{C}$ ,以开始低于  $T_m$  值 5 $^{\circ}\text{C}$ ,再以 2 $^{\circ}\text{C}$ 为增量的原则,对 809 进行退火温度的筛选,结果如图 7 所示。从图 7 可以看出,在 47~55 $^{\circ}\text{C}$ 时,温度低,产生非特异扩增,出现片状拖带现象;当温度升高到 61 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增的条带数明显减少。在 57、59 $^{\circ}\text{C}$ 时扩

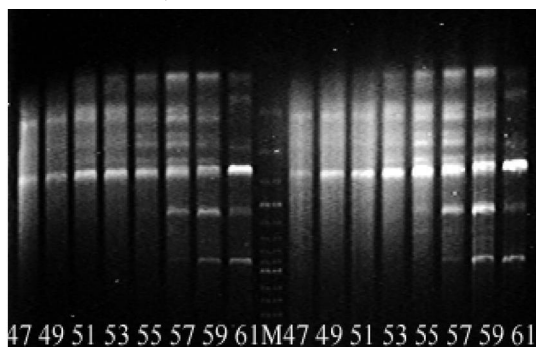
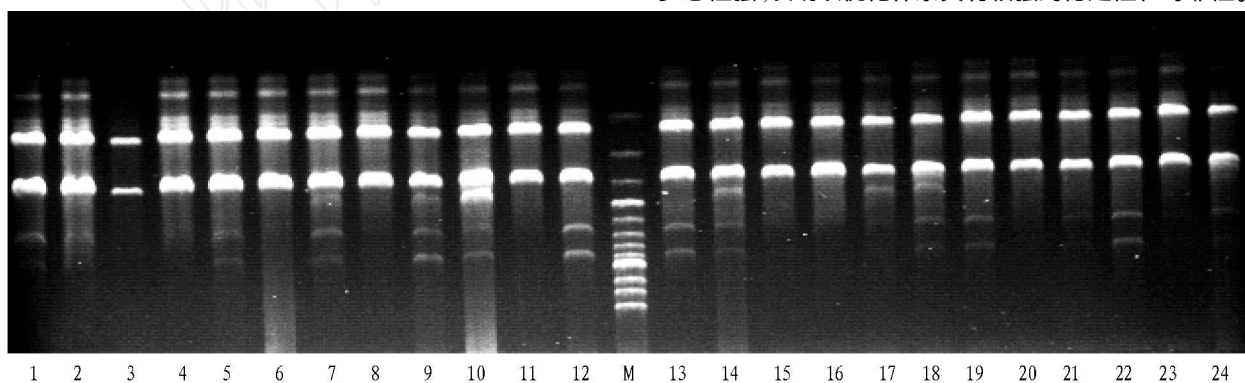


图7 退火温度对扩增结果的影响

Fig.7 Effects of annealing temperature on the amplification results



注:1~17的个体为浪卡子白地种群;18~24为江孜热龙种群。

Note:1-17 stand for populations from Baidi Town of Langkazi County;18-24 stand for populations from Relong Town of Jiangzi County.

图8 引物 UBC872 在 24 份鼠兔样品中的 ISSR 扩增结果

Fig.8 ISSR amplification results of 24 samples of *O. curzoniae* with primer UBC872

### 3 结论与讨论

虽然 ISSR 具有多态性高、稳定性强的优点,但它的稳定性仍然受到 DNA 模板浓度、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、引物浓度、退火温度等因素的影响,因此试验条件的优化是必要的。

在影响 ISSR-PCR 扩增结果的因素中,酶是最主要的影响因素。在其他反应条件一致的情况下,对同一样品使用不同厂家、不同商标的 DNA 聚合酶,常常会有不同的 PCR 扩增结果,因此在试验过程中要尽量选用同一厂家同一批次的 *Taq* 酶。此外, *Taq* 酶的用量对 PCR 扩增也有很大影响。 *Taq* 酶浓度过高不仅提高了试验成本,而且也容易产生非特异性扩增产物,扩增条带的背景模糊,不易辨认;而 *Taq* 酶浓度过低时,聚合酶的催化能力不够强,导致产物的合成效率

下降。

为了提高反应的特异性,选择稍高的温度,以 59 $^{\circ}\text{C}$  为最佳退火温度。

**2.7 优化反应体系的确定** 根据上述试验结果,最终确定在 25  $\mu\text{l}$  的反应体系中模板为 4  $\mu\text{l}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L, *Taq* 酶用量为 1.25 U,引物浓度为 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,退火温度为 59 $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.8 引物筛选和体系验证** 按照上述优化体系筛选 TaKaRa 公司合成的 11 条引物,经过最佳温度调试,可重复性试验,共筛选出 6 条扩增条带数多、条带清晰、可重复性好、多态性丰富的高原鼠兔 ISSR 引物,见表 2。

表2 6条 ISSR 引物序列和最佳退火温度

Table 2 Sequences of 6 ISSR primers and the optimum annealing temperature

引物序号	退火温度	理论温度
Primer No.	Annealing temperature	Theoretical temperature
UBC823	57	52
UBC812	56	50
UBC829	59	52
UBC872	45	40
UBC855	60	51
UBC813	58	50

采用上述确定的优化体系,用引物 UBC872 在 24 鼠兔资源中进行了扩增,见图 8。从图 8 可以看出,扩增谱带清晰,多态性强,表明该优化体系具有较强的稳定性和可靠性。

(下转第 14430 页)

究结果表明,1株凝结芽孢杆菌经90、60 min 湿热处理和120、60 min 干热处理后其活菌数只下降了一个数量级,显示了凝结芽孢杆菌较强的抗热性<sup>[18]</sup>。对Y-1菌株进行了热耐受试验,结果显示,Y-1菌株具有很强的耐高温特性,芽孢的这种耐高温特性使得芽孢在饲料生产过程中可以保持良好的活性,使它用于饲料生产成为可能。

表8 Y-1菌对抗生素的抑菌圈大小

Table 8 The bacteriostatic circle of strain Y-1 against antibiotics

浓度 Concentration	SMZ	抑菌圈 Bacteriostatic circle	
		泰洛菌素 Tylosin	呋喃唑酮 Furazolidone
10 mg/ml	2.85	3.95	2.90
5 mg/ml	2.82	3.60	2.75
2.5 mg/ml	2.80	3.44	2.61
1.25 mg/ml	2.73	3.30	2.82
0.625 mg/ml	2.65	2.90	2.41
312.5 µg/ml	2.60	2.80	2.25
156.25 µg/ml	2.49	2.90	1.95
78.125 µg/ml	2.40	2.40	1.89
39 µg/ml	1.60	2.20	1.68
19.5 µg/ml	1.31	1.85	1.45
9.8 µg/ml	1.25	1.50	1.35
4.9 µg/ml	1.25	1.30	1.35
2.5 µg/ml	1.15	1.30	1.30
1.25 µg/ml	1.00	1.20	1.20

## 参考文献

- [1] FULLER R. Probiotics in man and animals[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66(5): 365 - 378.
- [2] SALMINEN S, BOULEY C, BOUTRON-ROUALT M C, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function[J]. Br J Nutr, 1998, 80(S1): 147 - 171.
- [3] SHORTT C, O BRIEN J. Handbook of functional dairy products[M]. New York: CRC Press LLC, 2004: 1 - 29.
- [4] TANNOCK G W. Probiotics: A critical review[M]. Norfolk, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 1999.
- [5] FULLER R. Probiotics 2: applications and practical aspects[M]. London: Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [6] YUAN JUN LEE. Handbook of probiotics[M]. New York: John Wiley & Son, Inc, 1999.
- [7] RIAL D R. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. J Nutrition, 2000, 130: 396 - 402.
- [8] 河南农业大学. 动物微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [9] 杜连祥, 路福平. 微生物实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 9.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62 - 65.
- [11] 李阜隶, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 157 - 158.
- [12] 孟军, 刘淑英. 动物微生态制剂鸡肠源菌的分离与鉴定[J]. 宁夏大学学报, 2005(12): 365 - 368.
- [13] 谢晶, 葛绍荣. 多粘类芽孢杆菌拮抗成分分离及其特性[J]. 化学研究与应用, 2004, 16(6): 775.
- [14] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验手册[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [15] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [16] HOOD S K, ZOTIOLA E A. Effect of low pH on the ability of lactobacillus acidophilus to survive and adhere to human intestinal cells[J]. J Food Sci, 1988, 53(5): 1514 - 1516.
- [17] EWING W N. The living gut [M]. Nottingham: University Nottingham, 1994.
- [18] 王艳萍, 陈莹, 赵虎山, 等. 一株芽孢乳酸杆菌 TQ33 产芽孢特性及抗性的研究[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(3): 9 - 12.
- [19] ZHANG T, QU L Y, ZHU Q. Preliminary identification of a marine bacterial strain HZBN43[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 34 - 36.
- [20] 刘燕. 猪益生性芽孢杆菌的筛选与特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [21] DENG C P, LIU H X, YAN X Z, et al. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of a strain isolated from diseased larva of *Anoplophora glabripennis* (Mtsch.) [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 67 - 69, 89.

(上接第 14424 页)

dNTP 作为 PCR 反应的原料之一, 合适浓度的优化也是十分重要的。浓度太高容易产生错配, 从而出现非特异性扩增; 浓度太低则扩增效率低, 甚至会因为 dNTPs 的过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果<sup>[11]</sup>。

对于引物浓度而言, 浓度不宜偏高也不能偏低。浓度偏高时, 易引起碱基错配和产生非特异性扩增, 还易形成引物二聚体; 浓度偏低时, 则与 DNA 模板结合位点少, 扩增产量下降, 并有可能出现涂抹现象<sup>[12]</sup>。

在 ISSR-PCR 扩增中, 退火温度明显影响了扩增结果。退火温度不仅与引物(碱基种类, 序列长短)有关, 还与物种 DNA 的序列有关, 同一引物对不同物种退火温度往往不同。退火温度不同, 产生错配的程度也不同, 通常较低的温度在保证引物与模板结合稳定性的同时, 也会使引物与模板之间未完全配对的一些位点得到扩增, 即产生一定的错误扩增。因此, 在允许的范围内, 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<sup>[13]</sup>。

高原鼠兔分子标记的研究国内外报道不多。该试验稳定的 ISSR 体系可以为鼠兔 ISSR 试验的后续工作提供参考, 特别是可为应用 ISSR 技术进行鼠兔遗传多样性研究奠定一定的基础, 并对探讨 ISSR 反应的影响具有一定的参考价值。

## 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(2): 176 - 183.
- [2] BARTH S, MEICHINGER A E, LUBBERSTEDT T H. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified Polymorphic sequence (CAP) and inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. Makers Molecular Ecology, 2002, 11: 494 - 505.
- [3] BORNET B, BRANCHARD M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 209 - 215.
- [4] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 等. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 159 - 164.
- [5] SMITH A T, FOGGIN J M. The plateau pika (*Ochotona curzoniae*) is a keystone species for biodiversity on the Tibetan plateau[J]. Animal Conservation, 1999, 2: 235 - 240.
- [6] 杜继增, 李庆芬. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响[J]. 兽类学报, 1982, 2(1): 35 - 42.
- [7] 周乐, 殷宝法, 杨生妹, 等. 青藏公路对高原鼠兔种内遗传分化的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(11): 3572 - 3577.
- [8] 杨洁, 赵新全, 郭松长, 等. 高原鼠兔 ob 基因的组织表达特征[J]. 兽类学报, 2007, 27(1): 33 - 38.
- [9] JOE SAMBROOK, DAVID W RUSSELL. Molecular cloning. A laboratory manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 463 - 470.
- [10] 林万明. PCR 操作技术与应用指南[M]. 北京: 人民医学出版社, 1993.
- [11] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15 - 19.
- [12] BRUNO W S. High output genetic mapping of polyploids using PCR—Generated markers[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 105 - 112.
- [13] LUSD. Current protocols for molecular biology[M]. 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 458 - 463.