

研究报告

Research Report

黑果枸杞 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化

钱前^{1,2} 王钧^{1,2} 王莉¹ 李毅¹ 胡延萍^{1*}

1 中国科学院西北高原生物研究所,青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室,西宁,810008; 2 中国科学院大学,北京,100049

* 通讯作者, yphu@nwipb.cas.cn

摘要 黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)为茄科枸杞属小灌木。果实为黑紫色球形浆果,具有较高的药用价值、营养价值、生态价值和经济价值。该研究以青海省野生黑果枸杞为材料,将对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应产生主要影响的五种因子(*Taq* DNA 聚合酶, dNTP, Mg²⁺, 引物和模板 DNA)进行 L₁₆(4⁵)的正交试验,以建立黑果枸杞 ISSR-PCR 最佳反应体系,并对反应体系进行验证。在此基础上筛选出适宜的 ISSR 引物,用梯度法优化各引物的最佳退火温度。结果表明:黑果枸杞 20 μL ISSR-PCR 反应体系中包括 *Taq* DNA 聚合酶 0.02 U/20 μL, Mg²⁺ 1.65 mmol/L, dNTP 0.15 mmol/L, 引物 0.60 μmol/L 和模板 DNA 50 ng;在 100 条 ISSR 引物中筛选出 16 条最适引物,并确定了各引物的最适退火温度为 44℃~54.5℃,最佳扩增程序设定为 94℃预变性 5 min;然后 94℃变性 20 s, 44℃~54.5℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min 20 s,共进行 38 个循环;最后 72℃延伸 6 min, 4℃保存。该体系在黑果枸杞不同样品中所得条带清晰且多态性丰富,有助于后续青海省黑果枸杞种质资源筛选和遗传多样性分析研究。

关键词 黑果枸杞, 枸杞属, ISSR-PCR, 正交试验设计, 反应体系

Optimization of ISSR-PCR Reaction System in *Lycium ruthenicum* with Orthogonal Design

Qian Qian^{1,2} Wang Jun^{1,2} Wang Li¹ Li Yi¹ Hu Yanping^{1*}

1 Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resource, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

* Corresponding author, yphu@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.016.006398

Abstract *Lycium ruthenicum* is an undershrub belonging to *Lycium* genus and Solanaceae family. Its fruit is purple-black and globose berry with rather high medicinal, nutritive, ecological and economic values. In this study, wild *L. ruthenicum* from Qinghai province was chosen as the research object, and the L₁₆(4⁵) orthogonal test of the five factors affecting the ISSR-PCR reaction of *L. ruthenicum* was carried out to establish the optimal ISSR-PCR reaction system of *L. ruthenicum* and the system obtained was verified. Based on this, suitable ISSR primers were screened out, and the optimal annealing temperature of selected primers were optimized by gradient method. The results showed that 20 μL ISSR-PCR reaction system contained 0.02 U/20 μL *Taq* DNA polymerase, 1.65 mmol/L Mg²⁺, 0.15 mmol/L dNTP, 0.6 μmol/L primer and 50 ng template DNA. 16 optimum primers were selected from 100 ISSR primers screened, and the suitable annealing temperature of each primer was 44℃~54.5℃. The appropriate program of ISSR-PCR for *L. ruthenicum* was as follows: an initial step of 5 min at 94℃, followed by 38 cycles of denaturing at 94℃ for 20 s, annealing at appropriate annealing temperature 44℃~54.5℃ for 1 min and ex-

基金项目 本研究由青海省“高端创新人才千人计划”(培养拔尖人才)项目、中国科学院青年创新促进会项目(2014386)和柴达木盆地盐碱地综合治理技术与示范项目(2014-NK-A4-2-1)共同资助

引用格式 Qian Q., Wang J., Wang L., Li Y., and Hu Y.P., 2018, Optimization of ISSR-PCR reaction system in *Lycium ruthenicum* with orthogonal design, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 16(19): 6398-6406 (钱前, 王钧, 王莉, 李毅, 胡延萍, 2018, 黑果枸杞 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化, 分子植物育种, 16(19): 6398-6406)

tending at 72°C for 80 s, ending with a final extension of 6 min at 72°C, and preserving at 4°C. Clear and rich polymorphism bands were obtained in different individuals of *L. ruthenicum* by this reaction system, which was beneficial to the germplasm resources screening and genetic diversity analysis of *L. ruthenicum* in Qinghai province.

Keywords *Lycium ruthenicum*, *Lycium*, ISSR-PCR, Orthogonal design, Reaction system

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)是一种多年生小灌木,属茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)。株高15~40 cm,枝斜生,皮白色,小枝先端刺状,叶肉质,线状圆柱形或线状披针形,簇生于短枝上,花1~2朵生于短枝上,浆果球形,完全成熟后黑紫色,种子肾形褐色,花果期为6~8月;生于海拔2 780~2 960 m的田边、沙地、河滩,分布于西藏、新疆、甘肃、宁夏、陕西、内蒙古、欧洲、高加索和中亚地区也有分布(刘尚武, 1996)。黑果枸杞成熟浆果在中国传统医药中占重要地位,味甘,性平,清心热,用于治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等疾病(甘青梅等, 1997),其中含有大量花色苷类色素,浸染能力强,有抗氧化、延缓衰老等作用(余江琴和陈朋, 2014, 现代中药研究与实践, 28(2): 70-72)。黑果枸杞的光合效率较高,抗逆性强,根蘖性强,具有抗旱抗寒、耐盐碱、贫瘠等优势,可以在盐碱地区和水土流失严重的干旱地区用作生态修复工程的先锋树种,对于改善当地生态环境起着非常重要的作用。目前,黑果枸杞的研究主要集中在组培快繁、抗逆性、营养成分及药用价值、功能基因克隆以及与近缘种的遗传关系等方面(薛定磊等, 2015; 马彦军等, 2017; Wang et al., 2018),但黑果枸杞的遗传多样性和居群遗传结构的研究甚少,这方面的研究还不够深入和系统,仅局限在个别地区(新疆和甘肃)的种源(阿力同其米克等, 2013; Chen and Zhong, 2014),尚未见 ISSR 分子标记在青海省黑果枸杞遗传多样性方面的报道。

ISSR (inter-simple sequence repeat, ISSR)标记是一种 DNA 指纹技术,其快速、可靠、可提供丰富的基因组信息,现已在生物遗传多样性分析、种质资源评价与筛选、进化及分子生态学研究等方向有广泛应用(王建波, 2002)。ISSR 标记是一种基于 PCR 的二代分子标记技术, *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物和模板 DNA 的用量等多种因素均易影响其扩增结果。对于不同的植物来说,ISSR 反应体系的最佳条件不同,且不同的人设计的因素水平和方法不同,各水平因素的影响也有差异(胡延萍等, 2014; 王建科等, 2017)。因此,优化影响 ISSR 反应的主要因素,以筛选最佳 ISSR 扩增条件是极为必要的。本研究以青海省黑果枸杞为研究对象,使用正交试验设计的方法,对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应涉及到的五个主要影

响因素(*Taq* DNA 聚合酶, Mg^{2+} , dNTP, 引物和模板 DNA)进行优化筛选,以建立适用于青海黑果枸杞稳定性、重复性好和多态性高的 ISSR 分子标记的反应体系,有助于后续青海省黑果枸杞种质资源和遗传多样性研究。

1 结果与分析

1.1 黑果枸杞基因组 DNA 提取结果

黑果枸杞基因组 DNA 用改良 CTAB 法提取,经过微量紫外分光光度计测得样品 DNA 的浓度为 42.0~950.7 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 比值介于 1.8~2.15 之间,琼脂糖凝胶电泳(图 1)检测所得 DNA 的质量可知,条带清晰明亮,表明 DNA 样品完整性较好,纯度较高,质量较高,可满足后续试验要求。

1.2 黑果枸杞正交设计数据分析

黑果枸杞 ISSR-PCR 正交试验电泳中,处理 4 的扩增片段条带明亮清晰(图 2),多态性位点多,重复性好。根据条带的数量、清晰度等标准对 16 个处理进行主观评分(表 1)。

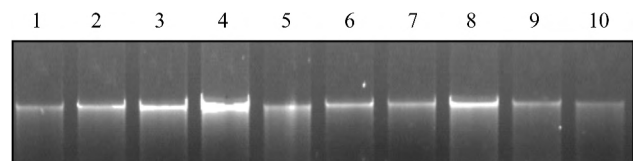


图 1 黑果枸杞基因组 DNA 电泳

Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA of *L. ruthenicum*

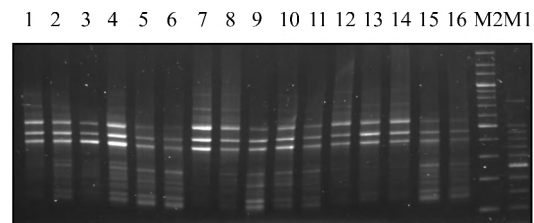


图 2 黑果枸杞 ISSR-PCR 正交试验电泳

注: M1: 100 bp DNA ladder; M2: 200 bp DNA ladder; 1~16: 处理编号(表 1)

Figure 2 Results of electrophoresis for ISSR-PCR orthogonal design in *L. ruthenicum*

Note: M1: 100 bp DNA ladder; M2: 200 bp DNA ladder; 1~16: Numbers were shown in Table 1

表 1 ISSR-PCR 反应的因素水平 $L_{16}(4^5)$ 正交设计

Table 1 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for the factor levels of ISSR-PCR reaction

编号 No.	因素 Factors					结果 Results		
	<i>Taq</i> DNA polymerase (U/20 μ L)	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	Primer (μ mol/L)	DNA (ng)	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
1	0.02	1.20	0.075	0.30	20	2	3	4
2	0.02	1.35	0.100	0.40	30	9	9	9
3	0.02	1.50	0.125	0.50	40	15	10	11
4	0.02	1.65	0.150	0.60	50	16	16	16
5	0.03	1.20	0.100	0.50	50	12	12	15
6	0.03	1.35	0.075	0.60	40	11	11	8
7	0.03	1.50	0.150	0.30	30	8	6	7
8	0.03	1.65	0.125	0.40	20	7	8	10
9	0.04	1.20	0.125	0.60	30	14	15	12
10	0.04	1.35	0.150	0.50	20	13	14	13
11	0.04	1.50	0.075	0.40	50	10	13	14
12	0.04	1.65	0.100	0.30	40	3	1	1
13	0.05	1.20	0.150	0.40	40	1	5	6
14	0.05	1.35	0.125	0.30	50	4	4	2
15	0.05	1.50	0.100	0.60	20	6	7	5
16	0.05	1.65	0.075	0.50	30	5	2	4

根据评分结果计算相同因素不同水平的平均值 X、极差 R (表 2)。极差 R 值越大,说明该因素对青海黑果枸杞 ISSR-PCR 反应的影响程度越大,各因素影响青海黑果枸杞 ISSR-PCR 反应结果的程度的由强到弱依次为引物>*Taq* DNA 聚合酶>DNA>dNTP> Mg^{2+} ;平均值 X 最大的因素水平为该因素最适浓度, dNTP、引物和 DNA 在水平 4 结果较好, *Taq* DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 的水平 3 结果较好,即 0.04 U/20 μ L *Taq*

DNA 聚合酶、1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.15 mmol/L dNTP、0.60 μ mol/L 引物及 50 ng DNA 模板。在正交表中并未出现与 5 个因素的最佳组合相对应的组合,但与扩增结果最好的处理 4 最接近。

对评分结果进行方差分析统计(表 3) 根据 F 值对各因素对青海黑果枸杞 ISSR-PCR 结果的影响程度进行排序,从强到弱依次为:引物>*Taq* DNA 聚合酶>DNA>dNTP> Mg^{2+} ,与极差法分析结果完全一致。

表 2 正交试验设计直观分析

Table 2 Intuitive analysis of orthogonal design

计算结果 Result	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase	镁离子 Mg^{2+}	dNTP	引物 Primer	模板 DNA Template DNA
T1	120.000	101.000	87.000	45.000	92.000
T2	115.000	107.000	89.000	101.000	100.000
T3	123.000	112.000	112.000	126.000	83.000
T4	51.000	89.000	121.000	137.000	134.000
X1	10.000	8.417	7.250	3.750	7.667
X2	9.583	8.917	7.417	8.417	8.333
X3	10.250	9.333	9.333	10.500	6.917
X4	4.250	7.417	10.083	11.417	11.167
R	6.000	1.917	2.833	7.667	4.250

注: T1~T4: 每一因素同一水平下的试验值之和; X1~X4: 每一因素同一水平下的平均值; R: 极差

Note: T1~T4: Sum of every factor under the same level; X1~X4: Mean of every factor under the same level; R: Range

其中 Mg^{2+} 的影响达到了显著水平($p < 0.05$) Taq DNA 聚合酶、dNTP、引物和模板 DNA 的影响达到了极显著水平($p < 0.01$)。为找出每个因素的最佳水平,这 5 个因素需要进行水平间多重比较(表 4)。

极差分析(表 2)和方差分析(表 3)的结果均表明,引物浓度对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应的影响最明显。其评分结果均值随引物浓度的增大而升高(图 3),Duncan 多重比较显示,引物浓度水平 3 和水平 4 之间差异不显著(表 4),其余水平间差异显著。当引物浓度为 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 时评分结果均值最大,因此,选 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 为引物的最佳浓度。

在黑果枸杞 ISSR-PCR 正交试验中, Taq DNA 聚合酶对试验结果的影响仅次于引物。由 Duncan 多重比较(表 4)结果显示,在水平 1、水平 2 和水平 3 之间 Taq DNA 聚合酶的影响不显著,水平 4 与其余水平间 Taq DNA 聚合酶差异显著。 Taq DNA 聚合酶水平 3 时所得评分均值最高,当为水平 4 时,评分均值反而降低(图 4),同时从经济因素考虑,选水平 1 为 Taq DNA 聚合酶的最佳用量,因此,选用 $0.02 \text{ U}/20 \mu\text{L}$ 为 Taq DNA 聚合酶的最佳浓度。

模板 DNA 对黑果枸杞 ISSR-PCR 正交试验结

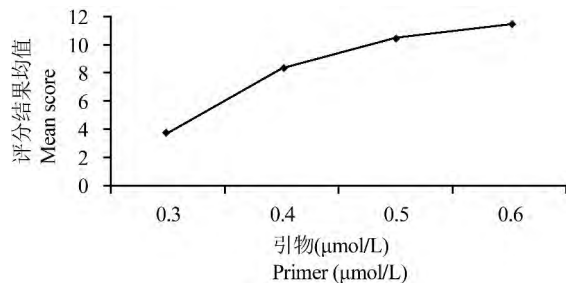


图 3 引物浓度与评分结果均值的关系

Figure 3 Relationship between primer concentration and mean score

表 3 ISSR-PCR 反应各因素间的方差分析

Table 3 Variance analysis of the factors of ISSR-PCR reaction

变异来源 Sources	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
Taq DNA polymerase	294.562 5	3	98.187 50	42.080 4	0.000 1**
Mg^{2+}	24.562 5	3	8.187 50	3.508 9	0.026 3*
dNTP	71.229 2	3	23.743 10	10.175 6	0.000 1**
Primer	420.895 8	3	140.298 60	60.128 0	0.000 1**
DNA	124.062 5	3	41.354 20	17.723 2	0.000 1**
误差 Deviation	74.666 7	32	2.333 30	-	-

注: **: 0.01 水平差异显著; *: 0.05 水平差异显著

Note: **: Significant difference at 0.01 level; *: Significant difference at 0.05 level

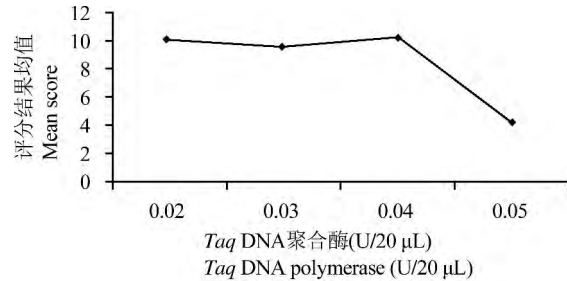


图 4 Taq DNA 聚合酶浓度与评分结果均值的关系

Figure 4 Relationship between the concentration of Taq DNA polymerase and mean score

果的影响程度紧随 Taq DNA 聚合酶之后,当模板 DNA 含量为 50 ng 时,评分结果均值最大(图 5),水平 1、2、3 分别与水平 4 之间具有显著的差异,因此,模板 DNA 的最佳用量为 50 ng 。

dNTP 作为 PCR 反应的重要原料,其浓度过低会使扩增条带产率低,条带较暗(图 2)。Duncan 多重比较显示,水平 1 和水平 2、水平 3 和水平 4 差异不显著,水平 1、2 与水平 3、4 差异显著。随着 dNTP 浓度的增加,评分结果均值逐渐增大,当 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L 时,扩增效果最好,评分均值最大(图 6),因此选取水平 4 为 dNTP 的最佳浓度。

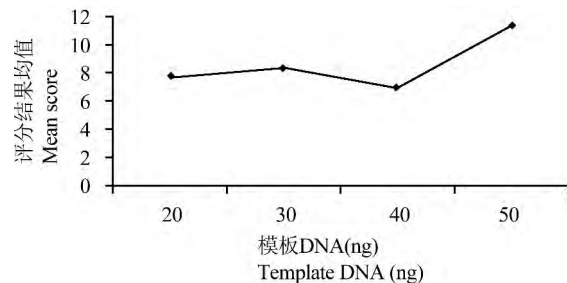


图 5 模板 DNA 浓度与评分结果均值的关系

Figure 5 Relationship between the concentration of template DNA and mean score

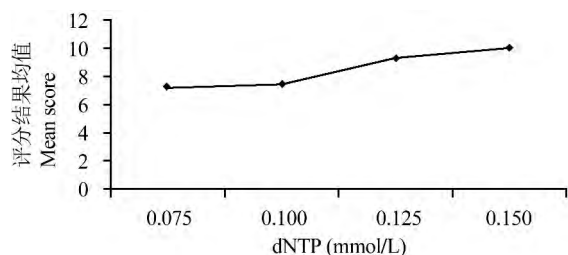


图 6 dNTP 浓度与评分结果均值的关系

Figure 6 Relationship between the concentration of dNTP and mean score

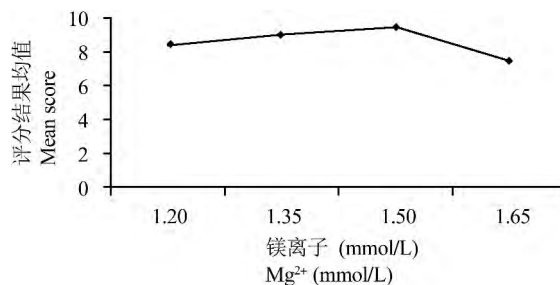


图 7 Mg²⁺浓度与评分结果均值的关系

Figure 7 Relationship between the concentration of Mg²⁺ and mean score

Mg²⁺ 对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应的影响最小。水平 1、2、3 之间差异不显著；水平 4 与水平 2、3 差异显著，与水平 1 差异不显著，各因素对评分结果的影响波动较小(图 7)。综合各种因素考虑，Mg²⁺ 的最适浓度为 1.65 mmol/L。

由上述不同数据分析方法的处理可知，本研究中黑果枸杞 ISSR-PCR 反应各个因素最适浓度组合是处理 4，即 20 μL 反应体系中含有 0.02 U/20 μL *Taq* DNA 聚合酶，1.65 mmol/L Mg²⁺，0.15 mmol/L dNTP，0.60 μmol/L 引物和 50 ng DNA。

1.3 引物及其最佳退火温度

从引物 UBC812 退火温度梯度试验结果可以看出(图 8)，不同的退火温度对黑果枸杞 ISSR 扩增结果影响显著。随着退火温度的升高，扩增条带先增加后减少。当退火温度低于 50.7℃时，大于 1 200 bp 的条带不清晰；当退火温度为 52.5℃时扩增条带多且明亮清晰；当退火温度高于 53.5℃时，大片段的条带清晰增多，但小于 600 bp 的条带减少且不清晰。故选取 52.5℃作为引物 UBC812 的最适退火温度。据此方法，筛选出 16 条理想引物及其最适退火温度(表 5)。

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 1' 2' 3' 4' 5' 6' 7' 8' M2

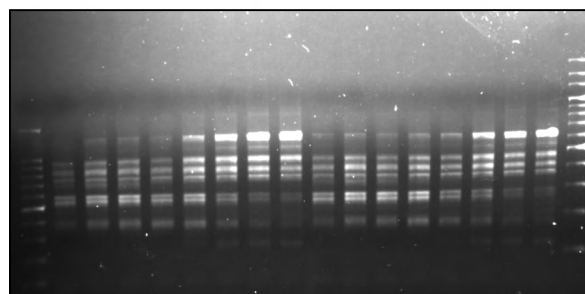


图 8 引物(UBC812)退火温度试验

注：1~8 泳道的退火温度分别为 45℃，45.6℃，46.8℃，48.5℃，50.7℃，52.5℃，53.5℃，54℃；M1：100 bp DNA ladder；M2：200 bp DNA ladder

Figure 8 Annealing temperature experiment of primer UBC812

Note: Annealing temperatures of lane 1~8 were 45℃，45.6℃，46.8℃，48.5℃，50.7℃，52.5℃，53.5℃，54℃，respectively; M1: 100 bp DNA ladder; M2: 200 bp DNA ladder

1.4 ISSR-PCR 优化体系验证

基于最佳反应体系和退火温度，UBC812 引物对青海省不同区域的黑果枸杞样品进行 ISSR-PCR 扩增，扩增出的电泳谱带清晰且重复性好(图 9)，表明筛选的优化体系可用于黑果枸杞种质资源遗传

表 4 ISSR-PCR 各因素水平间的 Duncan 多重比较

Table 4 Duncan multiple comparison of factors at different levels of ISSR-PCR

<i>Taq</i> DNA polymerase (U/20 μL)	均值 Average	Mg ²⁺ (mmol/L)	均值 Average	dNTP (mmol/L)	均值 Average	Primer (μmol/L)	均值 Average	DNA (ng)	均值 Average
0.04	10.250 0 a	1.50	9.333 3 a	0.150	10.083 3 a	0.6	11.416 7 a	50	11.166 7 a
0.02	10.000 0 a	1.35	8.916 7 a	0.125	9.333 3 a	0.5	10.500 0 a	30	8.333 3 b
0.03	9.583 3 a	1.20	8.416 7 ab	0.100	7.416 7 b	0.4	8.416 7 b	20	7.666 7 bc
0.05	4.250 0 b	1.65	7.416 7 b	0.075	7.250 0 b	0.3	3.750 0 c	40	6.916 7 c

注：不同字母间差异显著($p < 0.05$)

Note: Different letters meant significant difference ($p < 0.05$)

表 5 筛选出的引物序列和最适退火温度

Table 5 Sequences and optimum annealing temperatures of selected primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)
807	AGAGAGAGAGAG GAGT	48.0
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50.0
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.8
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52.5
813	CTCTCTCTCTCTCTT	45.0
818	CACACACACACACAG	50.0
830	TGTGTGTGTGTGTGG	55.0
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	49.6
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	47.0
856	ACACACACACACACACYA	48.0
857	ACACACACACACACACYG	54.5
868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	46.5
873	GACAGACAGACAGACA	46.5
876	GATAGATAGACAGACA	44.0
884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	51.0
887	DVDTCTCTCTCTCTCTC	51.0

注: Y=(C, T); B=(C, G, T); D=(A, G, T); H=(A, C, T); V=(A, C, G)

Note: Y=(C, T); B=(C, G, T); D=(A, G, T); H=(A, C, T); V=(A, C, G)

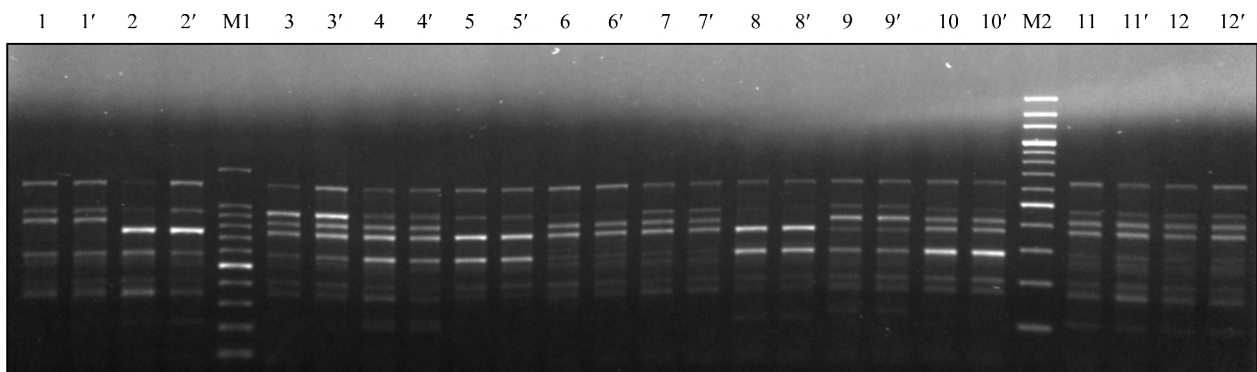


图 9 引物 UBC812 对黑果枸杞不同个体进行 ISSR-PCR 扩增

注: M1: 100 bp DNA ladder; M2: 200 bp DNA ladder

Figure 9 The ISSR-PCR amplification results of *L. ruthenicum* by UBC812

Note: M1: 100 bp DNA ladder; M2: 200 bp DNA ladder

多样性研究。

2 讨论

ISSR 分子标记是一种显性遗传标记,具有操作简单、多态性较好且成本低等优点,但易受到反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度、引物、dNTP、模板 DNA、以及其它反应条件的影响,且不同物种间的影响差异显著(胡延萍等, 2016; 王钧等, 2016, 时珍国医国药, 27(8): 1903-1906)。在本研究中,极差和方差分析结果均表明,各因素对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应

的影响程度由强至弱为:引物>*Taq* DNA 聚合酶>DNA>dNTP> Mg^{2+} ,这与张盾等(2017)对濒危藏药桃儿七 ISSR-PCR 体系优化的研究结果一致,引物浓度对扩增结果的影响最大, Mg^{2+} 浓度影响程度最小。引物浓度高会引起错配,降低扩增的特异性,且易形成引物二聚体,浓度低则会导致扩增效率低,条带少,这与引物浓度对云生毛茛 ISSR 扩增的影响结果一致(石琳等, 2016)。*Taq* DNA 聚合酶也是影响黑果枸杞 ISSR-PCR 反应的重要因素,其浓度过低会导致不完全扩增,降低扩增效率,浓度过高则会导致非特异

性条带的产生和增加经济成本。模板 DNA 是本试验中的研究对象, DNA 含量过高会降低扩增产物特异性, 含量过低会降低与引物的结合几率, 扩增结果不稳定或没有产物(胡延萍等, 2010)。dNTP 是 ISSR-PCR 反应的重要原料, 其浓度高低对反应产物的量和特异性有直接影响(钱志瑶等, 2015), 过低的 dNTP 浓度会降低底物与引物的酶促反应速率, 进而导致扩增条带数量少, 不清晰, dNTP 浓度过高会降低 Mg^{2+} 浓度, 从而抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 导致扩增条带不清晰(瞿印权等, 2017)。 Mg^{2+} 是对黑果枸杞 ISSR-PCR 反应结果影响最小的因子, 最适浓度为 1.65 mmol/L, 该结论与水母雪莲(王钧等, 2016, 时珍国医国药, 27(8): 1903-1906)和水葫芦苗(王建科等, 2017)的体系优化的结论一致。

另外, 退火温度也会对黑果枸杞 ISSR 扩增产生重要影响。不同的引物有不同的退火温度。退火温度的不同会对引物与模板 DNA 结合的特异性产生直接影响(谢运海等, 2005), 如果退火温度低于最适温度, 错配的可能性会增加, 并且出现非特异性条带, 提高退火温度可增强特异性, 但降低了引物与模板结合的几率, 扩增效率低(王建科等, 2017)。在本试验中, 引物 UBC807 的最适退火温度为 48℃, 而在华扁穗草中其最适退火温度为 52℃(包蕊等, 2014)。由此可知, 即使是同一引物, 其不同物种中的最适退火温度也不同。因此, 为使实验结果稳定可靠, 需逐一筛选 ISSR 引物的最佳退火温度。

本研究采用 $L_{16}(4_3)$ 正交试验设计, 对影响黑果枸杞 ISSR-PCR 反应的主要因子进行优化并筛选, 经极差分析和方差分析对比, 最终确定黑果枸杞 ISSR-PCR 的最佳反应体系, 即反应体系总体积 20 μ L, 其中包括 *Taq* DNA 聚合酶 0.02 U/20 μ L, Mg^{2+} 1.65 mmol/L, dNTP 0.15 mmol/L, 引物 0.60 μ mol/L 和模板 DNA 50 ng。同时, 从 100 条引物中筛选得到 16 条最适引物, 其扩增结果清晰, 多态性高, 重复性好, 各引物的最适退火温度范围在 44℃~54.5℃之间。利用优化的体系对黑果枸杞不同个体进行 ISSR-PCR 扩增, 所得条带清晰重复性好, 这表明筛选到的优化体系适用于后续青海省黑果枸杞优质种源筛选, 遗传多样性及遗传结构的研究。

3 材料与方法

3.1 材料

样品采自青海省海西蒙古族藏族自治州, 每个样品植株采集新鲜叶片, 装入自封袋中用硅胶干燥保

存。本试验使用的引物是加拿大哥伦比亚大学(UBC)的 Set#9 引物序列, 由上海生工生物工程股份有限公司合成。实验使用的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA ladder、200 bp DNA ladder 均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

3.2 黑果枸杞 DNA 提取与质量检测

采用改良 CTAB 法提取黑果枸杞 DNA。分别取 2 μ L 样品 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 根据成像结果检测其纯度。使用 NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计(Thermo Scientific)来检测所提取的基因组 DNA 的纯度和浓度。根据 A_{260}/A_{280} 比值评估 DNA 纯度。

3.3 黑果枸杞 ISSR-PCR 反应体系优化

本试验采用五因素四水平的正交试验方法, 以五个主要影响因子(*Taq* DNA 聚合酶, dNTP, Mg^{2+} , 引物, 模板 DNA)的浓度为变量进行优化筛选。共 16 个处理, 每个处理重复 3 次。实验选用 UBC818 引物(序列为 5'-CACACACACACACACAG-3'), 每个反应体系用超纯水补充至 20 μ L 后进行 PCR, 扩增程序设定为: 首先 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 20 s, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min 20 s, 共进行 38 个循环, 最后 72℃ 延伸 6 min, 4℃ 保存备用。分别取 10 μ L 反应产物, 进行水平板琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)电泳, 用凝胶成像系统(Chemidoc™ MP, Bio-Rad)拍照记录实验结果。

采用正交设计直观分析方法对 16 个处理进行评分, 按照扩增条带数量丰富度、清晰度及背景深浅等标准进行打分, 条带数量丰富、清晰且背景低的为 16 分, 最差的为 1 分。用 DPS 7.05 软件进行数据统计分析(唐启义和冯明光, 2006)。

3.4 黑果枸杞 ISSR 引物及其最佳退火温度筛选

在优化后的体系基础上, 反应程序不变, 选一个模板 DNA, 在 100 条引物中选出最佳引物。在引物理论 T_m 值上下浮动 4℃~5℃, 设置八个梯度, 如引物 UBC812 ($T_m=50^\circ\text{C}$), 温度梯度为(45℃, 45.6℃, 46.8℃, 48.5℃, 50.7℃, 52.5℃, 53.5℃, 54℃)。扩增程序同正交试验程序。

3.5 黑果枸杞 ISSR-PCR 优化体系验证

使用青海省不同区域的黑果枸杞样品为 DNA 模板, 用引物 UBC812 进行 ISSR-PCR 扩增, 以验证 ISSR-PCR 优化体系的稳定性, 每个样品重复两次。

作者贡献

钱前是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,并负责数据分析与论文的撰写;王钧参与实验设计与数据分析;王莉和李毅负责实验材料的野外采集工作;胡延萍是项目的负责人,指导实验设计,数据分析与论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省“高端创新人才千人计划”(培养拔尖人才)项目、中国科学院青年创新促进会项目(2014-386)和柴达木盆地盐碱地综合治理技术与示范项目(2014-NK-A4-2-1)共同资助。

参考文献

- Alitong Q.M.K., Wang Q.F., Yang C.F., and Chen J.M., 2013, ISSR analysis on genetic diversity of medically important *Lycium ruthenicum* Murr. in Xinjiang, *Zhiwu Kexue Xuebao* (Plant Science Journal), 31(5): 517-524 (阿力同其米克, 王青锋, 杨春锋, 陈进明, 2013, 新疆产药用植物黑果枸杞遗传多样性的 ISSR 分析, *植物科学学报*, 31(5): 517-524)
- Bao R., Hu Y.P., Wang L., Xu R.H., and Li Y., 2014, Optimization of ISSR-PCR system and primer screening for *Blysmus sinocompressus*, *Zhongguo Caodi Xuebao* (Chinese Journal of Grassland), 36(6): 46-52 (包蕊, 胡延萍, 王莉, 旭荣花, 李毅, 2014, 华扁穗草 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选, *中国草地学报*, 36(6): 46-52)
- Can Q.M., Luo G.F., Li P.Y., Zhuoma D.Z., Chen Y.R., and Zuo Z.C., 1997, The study of Tibetan drug *Lycium ruthenicum* Murr. in development and utilization, *Qinghai Keji* (Qinghai Science and Technology), 4(1): 17-19 (甘青梅, 骆桂法, 李普衍, 卓玛东珠, 陈岳蓉, 左振常, 1997, 藏药黑果枸杞开发利用的研究, *青海科技*, 4(1): 17-19)
- Chen H.K., and Zhong Y., 2014, Microsatellite markers for *Lycium ruthenicum* (Solanaceae), *Molecular Biology Reports*, 41: 5545-5548
- Hu Y.P., Bao R., Wang L., Shi L., and Li Y., 2016, Optimization of ISSR-PCR system on *Kobresia tibetica*, *Guangxi Zhiwu* (Guihaia), 36(8): 915-922 (胡延萍, 包蕊, 王莉, 石琳, 李毅, 2016, 西藏高草 ISSR-PCR 反应体系优化研究, *广西植物*, 36(8): 915-922)
- Hu Y.P., Wang L., Bao R., Shi L., Xu R.H., and Li Y., 2014, Optimizing ISSR-PCR system of *Carex atrofusca* using orthogonal design, *Caodi Xuebao* (Acta Agrestia Sinica), 22(4): 911-914, 918 (胡延萍, 王莉, 包蕊, 石琳, 旭荣花, 李毅, 2014, 正交设计优化黑褐苔草 ISSR-PCR 反应体系, *草地学报*, 22(4): 911-914, 918)
- Hu Y.P., Xie X.L., Wang L., Yang J., and Li Y., 2010, Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum*, *Guangxi Zhiwu* (Guihaia), 30(1): 112-116 (胡延萍, 谢小龙, 王莉, 杨建, 李毅, 2010, 唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化, *广西植物*, 30(1): 112-116)
- Liu S.W., ed., 1996, *Flora of Qinghai*, Qinghai People's Publishing House, Xining, China, pp.176 (刘尚武, 编著, 1996, *青海植物志*, 青海人民出版社, 中国, 西宁, pp.176)
- Ma Y.J., Zhang R.M., and Su Y.D., 2017, Research progress of basic theory of *Lycium ruthenicum* Murr., *Zhongguo Shuitu Baochi* (Soil and Water Conservation in China), (2): 46-50 (马彦军, 张荣梅, 苏永德, 2017, 黑果枸杞基础理论研究进展, *中国水土保持*, (2): 46-50)
- Qian Z.Y., Zhou D.T., Huang X.P., Zhou M., Chen Z.Y., and Qin R.G., 2015, Establishment and optimization of ISSR reaction system for *Valeriana officinalis* L. var. *latifolia* Miq of Guizhou province, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 31(7): 69-75 (钱志瑶, 周道堂, 黄秀平, 周镁, 陈祖云, 覃容贵, 2015, 黔产宽叶缙草 ISSR 反应体系的建立与优化, *生物技术通报*, 31(7): 69-75)
- Qu Y.N., Xu W., Shen L., Chen J.C., He T.Y., Wei J.W., Rong J.D., and Zheng Y.S., 2017, Optimization of ISSR-PCR system of *Dendrocala musminor* var. *amoenus* based on orthogonal design method, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 15(6): 2278-2285 (瞿印权, 徐雯, 沈露, 陈剑成, 何天友, 魏建文, 荣俊冬, 郑郁善, 2017, 花吊丝竹 ISSR-PCR 反应体系的正交优化, *分子植物育种*, 15(6): 2278-2285)
- Shi L., Hu Y.P., Wang J.K., W J., Xu X.N., Li Y., and Wang L., 2016, Optimization of ISSR-PCR reaction system on *Ranunculus nephelogenes* var. *nephelogenes* and primer selection, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 32(9): 65-71 (石琳, 胡延萍, 王建科, 王钧, 许小宁, 李毅, 王莉, 2016, 云生毛茛 ISSR-PCR 体系优化与引物筛选, *生物技术通报*, 32(9): 65-71)
- Tang Q.Y., and Feng M.G., eds, 2006, *DPS data processing system experimental design, statistical analysis and modeling*, Science Press, Beijing, China, pp.1-46 (唐启义, 冯明光, 编著, 2006, *DPS 数据处理系统 - 实验设计、统计分析及模型优化*, 科学出版社, 中国, 北京, pp.1-46)
- Wang H.Q., Li J.N., Tao W.W., Zhang X., Gao X.J., Yong J.J., Zhao J.J., Zhang L.M., Li Y.Z., and Duan J.A., 2018, *Lycium ruthenicum* studies: molecular biology, phytochemistry and pharmacology, *Food Chemistry*, 240: 759-766
- Wang J.B., 2002, ISSR markers and their applications in plant genetics, *Yichuan* (Hereditas), 24(5): 613-616 (王建波, 2002, ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用, *遗传*, 24(5): 613-616)

- Wang J.K., Li Y., Hu Y.P., Shi L., Wang J., and Wang L., 2017, Optimization of ISSR-PCR reaction system and primer screening of *Halorpestes cymbalaris*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 15(8): 3145-3152 (王建科, 李毅, 胡延萍, 石琳, 王钧, 王莉, 2017, 水葫芦苗 ISSR-PCR 体系的优化与引物筛选, 分子植物育种, 15(8): 3145-3152)
- Xie Y.H., Xia D.A., Jiang J., and Lin P., 2005, Optimization for ISSR-PCR system of *Fraxinus mandshurica* Rupr. using orthogonal design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 3(3): 445-450 (谢运海, 夏德安, 姜静, 林萍, 2005, 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系, 分子植物育种, 3(3): 445-450)
- Xue D.L., Zeng S.H., and Wang Y., 2015, Molecular cloning and expression analysis of *Flowering Locus T* in *Lycium ruthenicum* Murr. and *L. barbarum* L., *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 34(3): 565-570 (薛定磊, 曾少华, 王瑛, 2015, 黑果枸杞和宁夏枸杞 *FT* (*Flowering Locus T*) 基因的克隆及表达分析, 基因组学与应用生物学, 34(3): 565-570)
- Zhang D., Ren M.Y., Guan X., and Zhang Y.D., 2017, Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 15(4): 1408-1416 (张盾, 任梦云, 关潇, 张银东, 2017, 濒危藏药桃儿七 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化, 分子植物育种, 15(4): 1408-1416)

《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的月刊科学期刊。《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学和应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶和发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表和引用文献等均实行中英文对照。

《基因组学与应用生物学》前身是原《广西农业大学学报》,创刊于 1982 年。《基因组学与应用生物学》(原名《广西农业生物科学》)入编了 2011 年版北大图书馆《中文核心期刊要目总览》核心期刊,是中国科学引文数据“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA: JYYSAZ)、美国《剑桥科学文摘: 自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。2013 年度《基因组学与应用生物学》影响因子为 1.110。

《基因组学与应用生物学》(Genomics and Applied Biology) ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 邮发代号: 48-213; 月刊, 每月 25 日出版, 国内定价: ¥40.00/期, ¥480.00/年; 国际定价: \$40.00/期, \$480.00/年。

订户可到当地邮局订阅或直接通过邮局汇款至编辑部。

邮局汇款:

地址: 广西南宁市大学东路 100 号广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部 1 楼 111 室
邮编: 530004

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部

联系电话: 0771-3239102, 0771-3232621

传真: 0771-3232621 E-mail: gab@gabcn.org 网址: www.gabcn.org