

文章编号 :1003-8701(2013)06-0068-03

# 苹果 ISSR-PCR 影响因素研究及引物筛选

卢明艳<sup>1</sup>, 赵晨辉<sup>1</sup>, 苏斯瑶<sup>2</sup>, 梁英海<sup>1</sup>,  
宋洪伟<sup>1\*</sup>, 张冰冰<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院果树研究所 / 农业部东北地区(吉林)果树科学观测试验站,  
吉林 公主岭 136100; 2. 吉林省农业科学院财务处, 长春 130033)

**摘要:** 本文以苹果为试材, 研究了影响苹果 ISSR-PCR 反应的相关因素, 并筛选了苹果 ISSR-PCR 引物。结果表明, 在 25 $\mu$ L ISSR-PCR 反应体系中, 适宜的引物和模板浓度分别为 0.8 $\mu$ mol/L 和 20 ng。适宜的退火温度可减少非特异扩增, 提高 PCR 产物的多态性和差异性, 退火温度大部分比  $T_m$  值低 2~4 $^{\circ}$ C。从 112 个引物中筛选出 17 个多态性较好的引物, 共扩增出 113 个位点, 其中多态性位点 74 个, 所占比例为 65.5%。

**关键词:** 苹果; ISSR 反应体系; 退火温度

中图分类号: S661.1

文献标识码: A

## Studies on Influencing Factors of ISSR-PCR in Apple and Selection of Primers

LU Ming-yan<sup>1</sup>, ZHAO Chen-hui<sup>1</sup>, SU Si-yao<sup>2</sup>, LIANG Ying-hai<sup>1</sup>,  
SONG Hong-wei<sup>1\*</sup>, ZHANG Bing-bing<sup>1\*</sup>

(1. *Pomology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences / Scientific Observing and Experimental Station of Pomology (Jilin, Northeast Region), Ministry of Agriculture, Gongzhuling 136100; 2. The Financial Department, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China*)

**Abstract:** Influencing factors which affected ISSR-PCR in apple were studied and primers selected in this study. The results showed that 25  $\mu$  l reaction volume including 0.8  $\mu$  mol/L primer and 20ng DNA was proper in ISSR-PCR of apple. The suitable annealing temperature could reduce non-specific amplification and improve polymorphism and differences in PCR product. Most of the annealing temperature was 2-4 $^{\circ}$ C lower than  $T_m$ . 17 primers were selected from 112 ISSR primers, and a total of 113 DNA bands were amplified, 74 of which (65.5%) were polymorphic.

**Keywords:** Apple; ISSR-PCR; Annealing temperature

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) 是一种基于微卫星序列 SSR (Simple Sequence Repeat) 和 PCR 技术的分子标记, 由于它不需要预先知道基因组序列, 且具有所需 DNA 量少、操作

简单、产物多态性丰富等特征<sup>[1]</sup>, 已经广泛应用于植物遗传图谱构建、品种鉴定及遗传多样性分析。果树上目前在苹果<sup>[2]</sup>、梨<sup>[3]</sup>、杏<sup>[4]</sup>、莲雾<sup>[5]</sup>、菠萝<sup>[6]</sup>上都有应用。但对于不同的材料和试验条件, 在进行大规模 ISSR-PCR 反应前, 有必要对 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序中诸多影响因素进行摸索和优化。

本文以苹果 DNA 为模板, 对 ISSR 反应体系的引物浓度、模板浓度、退火温度进行研究, 并筛选了苹果 ISSR 引物, 为相关研究提供参考。

收稿日期: 2013-08-30

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20080239)

作者简介: 卢明艳(1978-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事果树种质资源研究。

通讯作者: 宋洪伟, 男, 硕士, 研究员, E-mail: Songhw63@163.com

张冰冰, 女, 博士, 研究员, E-mail: zbb4005@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

材料采自国家果树种质公主岭寒地果树圃。DNA 提取试剂盒与 2×Es TaqMasterMix 均购自北京康为世纪生物科技有限公司。引物参照加拿大哥伦比亚大学公布的 100 个引物序列及苹果、山荆子的引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成。

### 1.2 DNA 提取

基因组 DNA 的提取参照北京康为世纪生物科技有限公司植物基因组提取试剂盒说明书进行。提取后用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并稀释为 20 ng/ $\mu$ L,分装后于 -20℃保存备用。

### 1.3 方法

对影响 ISSR-PCR 体系的模板浓度、引物浓度及循环次数分别进行试验。模板为山楂海棠总 DNA,引物为 I55。体系为 25 $\mu$ L,2×Es TaqMasterMix 为 12.5 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补平至 25 $\mu$ L,模板浓度设 5、10、15、20、25、30、40 ng/ $\mu$ L 共 7 个梯度,引物浓度设 0.2、0.4、0.6、0.8 $\mu$ mol/L 4 个梯度。反应程序为:94℃预变性 5min,94℃变性 45s,退火 40s,72℃延伸 70s,72℃补平 7min,产物于 4℃保存。引物退火温度范围为 (T<sub>m</sub>±2)℃共 5 个梯度。PCR 扩增在英国产 TECHNE TC-5000 梯度 PCR 仪上进行,PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,UVP 凝胶成像系统照相保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 模板浓度对 ISSR-PCR 反应影响



图 1 模板浓度对 ISSR-PCR 的影响

从左至右 :M:marker;1~7 泳道依次为 :5ng,10ng,15ng,20ng,25ng,30ng,40ng

由图 1 可知,模板 DNA 浓度大小对 ISSR-PCR 扩增结果有影响,模板 5~40 ng 时主带

都较清晰,但 5~15 ng 时,扩增条带少,不清晰,DNA 量 20~40 ng 时,扩增条带清晰,扩增效果没有差异,从经济角度考虑,确定模板浓度为 20 ng。

### 2.2 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

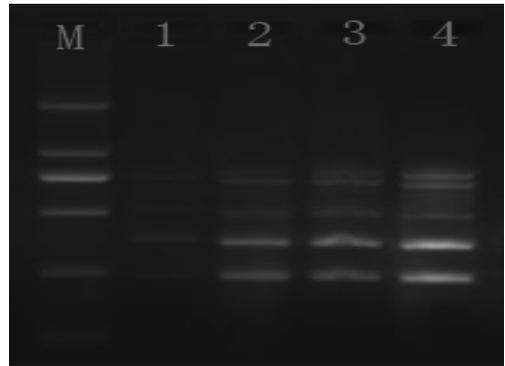


图 2 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响

从左至右 :M:marker;1~4 泳道依次为 :0.2、0.4、0.6、0.8  $\mu$ mol/L

由图 2 所示,引物浓度低,不足以完成 PCR 扩增反应,影响扩增的产率。随着引物浓度的增加,条带逐渐清晰,多态性也较好。当引物浓度为 0.8  $\mu$ mol/L 时,条带清晰,多态性较好,产量较高。在所设梯度内,确定 0.8  $\mu$ mol/L 为适宜引物浓度。

### 2.3 退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响



图 3 退火温度对 ISSR-PCR 的影响(模板山楂海棠)

从左至右 :M:marker;1:50℃;2:52℃;3:54℃;4:56℃;5:58℃

在反应体系其他成分不变的情况下,不同的退火温度对 PCR 扩增结果有较大的影响。大多数引物在 53.3~53.7℃退火温度下有较清晰、稳定的扩增片段,个别引物如 I55 在 54℃,I100 在 46.5℃时扩增效果好(表 1)。图 3 表明引物 I55 在不同退火温度下的扩增效果。随着退火温度的增加,不利于大片段的扩增,在 1~5 泳道中,3 泳道扩增产物较多,效果较好。

表 1 引物序列及多态性

引物	扩增带数	多态性位点	多态位点百分比(%)	引物退火温度(°C)	引物 Tm 值(°C)
I9 (AC) <sub>8</sub> CG	7	5	71.4	53.3	57.3
I15 (AG) <sub>8</sub> GC	7	5	71.4	55.3	57.3
I16 (AG) <sub>8</sub> YT	6	3	50.0	50.0	53.9
I20 (DBD)(CA) <sub>7</sub>	6	4	66.7	60.6	60.2
I45 (AC) <sub>8</sub> T	6	3	50.0	54.0	52.2
I55 (AG) <sub>8</sub> YA	7	4	57.1	54.0	53.9
I56 (GA) <sub>8</sub> YT	5	3	60.0	51.4	55.4
I61 (TC) <sub>8</sub> RT	6	4	66.7	50.4	55.4
I74 (AGC) <sub>6</sub>	6	3	50.0	61.5	61.9
I86 (CA) <sub>8</sub> RC	6	4	66.7	53.7	57.6
I88 (GT) <sub>8</sub> YA	9	6	66.7	53.3	55.4
I89 (GT) <sub>8</sub> YC	8	5	62.5	53.7	57.6
I91 (TC) <sub>8</sub> RG	6	4	66.7	53.6	57.6
I93 (AC) <sub>8</sub> YA	5	3	60	53.3	55.4
I94 (AC) <sub>8</sub> YG	9	7	77.8	53.6	57.6
I96 (TG) <sub>8</sub> RC	7	6	85.7	53.6	57.6
I100 (GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>	7	5	71.4	46.5	46.4
总数	113	74	65.5		

## 2.4 苹果 ISSR-PCR 引物筛选

实验从 112 个引物中,筛选出 17 个多态性较好的引物,共扩增出 113 个位点,其中多态性位点 74 个,所占比例为 65.5%(表 1)。扩增片段大小在 250~1 000 bp。

通过对苹果 ISSR-PCR 体系中引物浓度、模板浓度、退火温度的研究,确立了苹果 ISSR-PCR 适宜反应体系,即 25 μL 体系中,2 × Es TaqMasterMix 为 12.5 μL,引物为 0.8 μmol/L,模板 DNA 为 20 ng。

## 3 讨论

### 3.1 退火温度对 PCR 扩增的影响

对于不同材料和反应体系,ISSR 引物的适宜退火温度不同。朱元娣<sup>[7]</sup>公布了 65 个 UBC 引物在苹果上的适宜退火温度,与 Tm 值相比表现出偏低或偏高的现象。张玉星等<sup>[8]</sup>在梨上也发现引物退火温度有偏低或偏高现象。在本实验中,引物退火温度与 Tm 值相比,也表现出偏低或偏高的现象,但大部分引物退火温度比 Tm 值低 2~4°C。所以应对不同材料和反应体系进行引物筛选,以达到最佳的 ISSR-PCR 扩增效果。

### 3.2 引物序列对 PCR 扩增的影响

ISSR 引物正是根据随机分布在真核生物基因组中的微卫星设计的,所以 ISSR 分子标记在植

物中有较强的检测能力,被应用于不同植物中。在苹果基因组中,利用分子杂交技术筛选 Florida 的基因组文库中有丰富的(AG)/(CT)重复,由此发展的微卫星标记,富含(AG)n、(GT)n 和(AC)n 等,具有高水平的遗传多态性,可用于品种鉴定和遗传作图<sup>[9-10]</sup>。

目前公布的 100 个 ISSR 引物中,2 核苷酸重复序列被应用居多,少数是 3 核苷酸重复序列,4 和 5 核苷酸重复序列及 5'端锚定序列。如山楂<sup>[11]</sup>所筛选的 10 个引物中有 8 个是基于(GA/CT)n 或(AG/TC)n 2 核苷酸重复序列。山荆子<sup>[12]</sup>11 个引物中有 8 个是(AG)n 或(AC)n 2 核苷酸重复序列。樱桃<sup>[13]</sup>17 个引物中有 16 个是 2 核苷酸重复序列。本实验所筛选的 17 个引物中,基于(AG/TC)n、(GT/CA)n、(AC/TG)n 的 2 核苷酸重复序列的引物有 14 个,占 82.4%(表 1),而以(AT)n 重复序列为主的引物均没有得到扩增产物,这与朱元娣<sup>[7]</sup>的研究一致。同样在山楂、山荆子和樱桃上有效扩增的引物序列中也没有(AT)n 重复序列,体现了这些物种基因组序列中(AT)n 重复序列分布较少,在引物筛选中可优先考虑其他引物序列组合。

参考文献:

- [1] 朴红梅,李万良,穆楠,等. ISSR 标记的研究与应用[J]. 吉林农业科学, 2007, 32(5): 28-30.
- [2] 宣继苹,章镇,房经贵,等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 421-423. (下转第 89 页)

表 2 冷水可溶性玉米淀粉制备工艺正交试验结果

试验号	因素				溶解度(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	48.7
2	1	2	2	2	47.2
3	1	3	3	3	47.9
4	2	1	2	3	50.3
5	2	2	3	1	51.4
6	2	3	1	2	52.5
7	3	1	3	2	51.7
8	3	2	1	3	54.8
9	3	3	2	1	53.2
K1	143.8	150.7	156.0	153.3	
K2	154.2	153.4	150.7	151.4	
K3	159.7	153.6	151.0	153.0	
k1	49.7	50.2	52.0	51.1	
k2	51.4	51.1	50.2	50.5	
k3	53.2	51.2	50.3	51.0	
R	3.5	1.0	0.1	0.6	

### 3 结 论

利用乙醇 - 碱液为溶剂,微波法制备冷水可溶性玉米淀粉,产物溶解度可以达到 59.12%,适宜的工艺条件是:料液比 1:1,乙醇体积分数为 80%,碱液加入量为 11 g/100 mL,微波功率为 400W,微波处理时间 3 min。

微波法制备冷水可溶性玉米淀粉工艺简单,生产设备投资少,容易普及。该方法主要应用淀粉物理性质,因此对冷水可溶性玉米淀粉的性质保存完好,便于其在工业生产中应用。但使用酒精 - 碱液直接排放也会造成环境污染,可以参考梅仕峰<sup>[11]</sup>在小麦颗粒状冷水可溶性淀粉制备中的处理方法,达到排放标准且使乙醇得到很好回收。

参考文献:

- [1] 秦海丽,顾正彪.酒精碱法制备颗粒状冷水可溶淀粉的研究进展[J].粮食与饲料工业,2005(1):18-19.
- [2] 吴玉凯.颗粒状冷水可溶淀粉的综述[J].食品科技,1998
- [3] 单江华,李疆,罗淑萍,等.新疆梨种质资源亲缘关系的 ISSR 和 RAPD 分析[J].新疆农业科学,2010,47(9):1714-1721.
- [4] 刘威生,冯晨静,杨建民,等.杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建[J].果树学报,2005,22(6):626-629.
- [5] 何桥,梁国鲁,谢江辉,等.莲雾种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].园艺学报,2006,33(2):392-394.
- [6] 张如莲,傅小霞,漆智平,等.菠萝 17 份种质的 ISSR 分析[J].热带农业科学,2006,22(6):428-431.
- [7] 朱元娣,李光晨,李春雨,等.苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究[J].园艺学报,2003,30(5):505-510.
- [8] 张玉星,马艳芝,赵国芳.梨属植物 ISSR 技术体系的建立与

(5):25-26.

- [3] 顾正彪.冷水可溶性淀粉制备的新工艺[J].粮食与油脂,1996(1):10.
- [4] Rajagopalan S, Seib P A. Properties of granular cold-water-soluble starches prepared at atmospheric pressure [J]. Journal of Cereal Science, 1992, 16(1): 13-28.
- [5] 王春平,荆晓艳,杨留枝,等.冷水可溶多孔玉米淀粉的制备及性能[J].农产品加工,2013(3):35-40.
- [6] 高群玉,蔡丽明,陈惠音,等.颗粒状冷水可溶木薯淀粉的制备及性质研究[J].武汉工业学院学报,2006(4):1-5.
- [7] 刘婷婷,宋春春,王大为.微波辅助提取马铃薯淀粉及其特性研究[J].食品科学,2013,134(6):106-111.
- [8] 罗志刚.微波对淀粉性质的影响[J].食品与发酵工业,2007,33(6):50-52.
- [9] 周志,罗祖友,吴承金,等.微波-丙二醇处理制备冷水可溶性马铃薯淀粉的工艺研究[J].食品科学,2008,29(10):251-253.
- [10] 张燕萍.变性淀粉制造与应用[M].北京:化学工业出版社,2007:64-76.
- [11] 梅仕峰,张国权,罗勤贵.小麦颗粒状冷水可溶淀粉的制备工艺条件优化[J].粮食与饲料工业,2008(7):20-22.
- [9] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998(96): 1069-1076.
- [10] Guilford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellites in Malus × domestica (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997(94): 249-254.
- [11] 代红艳,张志宏,周传生,等.山楂 ISSR 分析体系的建立和优化[J].果树学报,2007,24(3):313-318.
- [12] 王雷宏,郝玉红,汤庚国.8 个山荆子居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].西北植物学报,2010,30(7):1337-1343.
- [13] 艾呈祥,张力思,李国田,等. ISSR 标记对 34 份樱桃种质资源的遗传分析[J].中国农学通报,2008,24(4):47-51.

(上接第 70 页)