

甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系的优化

沈万宽¹, 习平根², 姜子德²

(1. 广州甘蔗糖业研究所/广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广东 广州 510316; 2. 华南农业大学 植物病理系, 广东 广州 510642)

摘要: 以甘蔗鞭黑粉菌交配型分离物为试验材料, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 并对影响甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系中的一些重要参数进行摸索和优化试验, 建立起适合甘蔗鞭黑粉菌基因组 DNA 的 ISSR-PCR 反应体系。优化的反应体系为: 在 25 μL 体系中, *rTaq* DNA 聚合酶 1.5 U、 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L、dNTP 浓度为 0.2 mmol/L、引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、DNA 模板 10~20 ng、 $10\times$ PCR buffer 1 μL 、用重蒸水补足 25 μL 。

关键词: 甘蔗鞭黑粉菌; ISSR; 体系优化

中图分类号: S435.661 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0712-06

Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Ustilago scitaminea* Syd.

SHEN Wan-kuan¹, XI Ping-gen², JIANG Zi-de²

(1. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute / Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou 510316, China; 2. Department of Plant Pathology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using mating-type isolation of *Ustilago scitaminea* as material, genomic DNA of *Ustilago scitaminea* was extracted by CTAB method. At the same time several factors which might affect ISSR-PCR amplification in *Ustilago scitaminea* genomic DNA were analyzed and a better system was established. In the total volume of 25 μL , there were 1.5 U *rTaq* DNA polymerase, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ arbitrary primer, 10-20 ng template DNA and 1 μL $10\times$ PCR buffer.

Key words: *Ustilago scitaminea* Syd.; ISSR; system optimization

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) 是我国主要糖料作物, 由甘蔗鞭黑粉菌(*Ustilago scitaminea* Syd.) 引起的甘蔗黑穗病是一种世界性重要甘蔗病害, 也是我国经济危害最严重的甘蔗病害^[1-2]。抗病育种是防治甘蔗黑穗病最经济最有效的措施, 但抗病育种需明确蔗区甘蔗鞭黑粉菌生理小种的发生情况。我国大陆蔗区甘蔗黑穗病生理小种没有进行过系统研究, 蔗区生理小种的种类、分布及优势生理小种不清楚, 甘蔗抗黑穗病育种存在较大的盲目性^[2]。对该病菌进行分子遗传多样性研究, 探明我国蔗区甘蔗鞭黑粉菌遗传分化类型, 有助于从分子水平上研究我国蔗区甘蔗鞭黑粉菌生理小种的分化, 为甘蔗抗黑穗病育种提供科学依据。

由 Zietkiewicz 等^[3] 在 PCR 基础上发展起来的简单重复序列区间(Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) 扩增多态性标记技术, 已广泛应用于真菌遗传多样性分析、种属间遗传进化关系探讨、遗传图谱构

收稿日期: 2012-02-28 修回日期: 2012-03-30

基金项目: 国家甘蔗产业技术体系建设专项资金项目(CARS-20) 和广东省农业攻关项目(2010B020302001)

作者简介: 沈万宽(1969—), 男, 研究员, 博士, 主要从事甘蔗抗病育种、引种检疫及分子植物病理学研究, E-mail: wkshen69@126.com。

建等诸多领域^[4-6],但在甘蔗鞭黑粉菌上尚未见报道。本研究拟对甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系中的 DNA 模板、*Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物等组分进行浓度梯度比较试验,以期建立最优的反应体系,为进一步开展甘蔗鞭黑粉菌分子遗传多样性研究提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试的甘蔗鞭黑粉菌交配型分离物详细信息见表 1,均由本课题组分离与保存。

1.2 试剂及仪器

琼脂糖、dNTP、*rTaq* 酶、10 × PCR buffer(含 $MgCl_2$)及 DL2000 DNA marker 均由 TaKaRa(大连)生物技术公司提供,EB 替代物购于广州威佳生物技术公司,ISSR 随机引物由上海生工生物工程公司合成。用 BIO-RAD DNA Engine Peltier Thermal Cycler 进行 PCR 扩增,用 Gene Genius Biomaging System 凝胶成像系统成像分析。

1.3 基因组 DNA 提取 (CTAB 法)

参照沈万宽等^[7]的方法,并稍作改进。挑取甘蔗鞭黑粉菌交配型分离物单菌落至 YePS 液体培养基中,于 28 °C,200 r/min 扩大培养 1 ~ 2 d,至 OD_{600} 约 1.2,取菌液 2 mL 于 2 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,倒去上清,加入 900 μ L 经 65 °C 预热的 20 g/L CTAB 抽提缓冲液,65 °C 水浴 1 ~ 2 h,期间不时摇匀,加入 900 μ L 氯仿/异戊醇(24:1)剧烈振荡 30 s,12 000 r/min 超速离心机上离心 10 min,取上清液置于新的 2 mL 离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)温和地混匀,12 000 r/min 超速离心机上离心 10 min,取上清液置于新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积 5 mol/L NaCl 和等体积冷异丙醇,混匀后置 -20 °C 冰箱中 20 ~ 30 min,4 °C 下 12 000 r/min 超速离心机上离心 10 min,弃上清液,沉淀分别用冷体积分数 70% 乙醇和冷无水乙醇各洗 1 次,室温下风干,溶于 50 μ L 双蒸水中(用手指轻弹离心管使沉淀充分悬浮),4 °C 过夜,用分光光度计检测 DNA 质量,-20 °C 保存备用。

1.4 ISSR-PCR 反应体系参数设置

在预备试验的基础上,ISSR-PCR 反应体系中的 5 种主要成分模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*rTaq* DNA 聚合酶及引物等设置了 4 ~ 10 个不同浓度或质量梯度(表 2)。采用随机引物 104(引物序列为 ATGAT-GATGATGATGATG)以 2 号分离物的 DNA 为模板进行 ISSR 反应体系的优化试验,当进行某一因素水平试验时,其他因素均固定在第 4 个浓度梯度。

1.5 反应程序及产物检测

反应程序为:94 °C 预变性 5 min;然后进入循环,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,共 38 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。反应结束后取 10 μ L 扩增产物于 18 g/L 琼脂糖凝胶(含 EB 替代物)中电泳 120 min(95 V),在凝胶成像系统上检测并拍摄保存。

表 1 用于本研究的甘蔗鞭黑粉菌交配型分离物

Tab. 1 A list of *U. scitanminea* mating-type isolates used in this study

分离物编号 Code of isolate	地理来源 Geographical origin	寄主(甘蔗品种) Host (Sugarcane variety)	交配型 Mating type
1	广东广州(甘蔗所)	台糖 134	+
2	广东广州(甘蔗所)	台糖 134	-
3	广东广州(甘蔗所)	粤糖 97-639	+
4	广东广州(甘蔗所)	粤糖 97-639	-
5	广东广州(增城)	新台糖 22	+
6	广东广州(增城)	新台糖 22	-
7	广东湛江(遂溪)	新台糖 10	+
8	广东湛江(遂溪)	新台糖 10	-
9	广东广州(甘蔗所)	CP94-1100	+
10	广东广州(甘蔗所)	CP94-1100	-
11	广东湛江(麻章)	新台糖 22	+

“+”为正交配型,“-”为负交配型。黑穗鞭采集时间为 2009 年 6 月—2011 年 6 月。
“+” for positive mating type,“-” for negative mating type. Smut whips of *U. scitanminea* were collected from June 2009 to June 2011.

表 2 ISSR-PCR 反应体系中 5 种成分用量表
Tab.2 A scale of five components in ISSR-PCR reaction system

处理号 No. of treatment	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	引物/ (μmol · L ⁻¹) Primer	模板 DNA/ng Template DNA	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol · L ⁻¹) Mg ²⁺ concentration	rTaq 酶/U rTaq polymerase
1	0.05	0.1	100	0.5	0.5
2	0.10	0.2	50	1.0	1.0
3	0.15	0.3	25	1.5	1.5
4	0.20	0.4	12.5	2.0	2.0
5	0.25	0.5	6.25	2.5	
6	0.30	0.6	3.13		
7	0.35	0.7	1.56		
8	0.40	0.8			
9	0.45	0.9			
10	0.50				

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

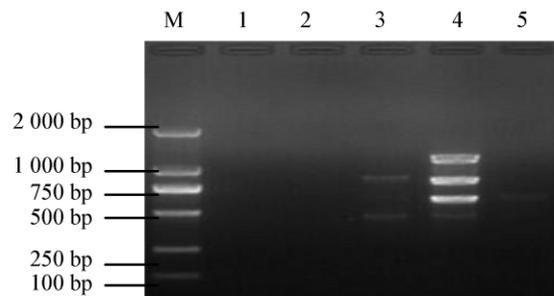
本实验提取的甘蔗鞭黑粉菌交配型分离物基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8 左右, 含量为 100 ng/μL 左右, 有较高的纯度, 可用于 ISSR-PCR 反应体系优化实验。

2.2 Mg²⁺ 对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Mg²⁺ 是 Taq DNA 聚合酶的激活剂, Mg²⁺ 不足 Taq 酶作用效率低。此外 dNTP 同样也竞争 Mg²⁺。扩增结果(图 1)表明, 当 Mg²⁺ 浓度低于 1.0 mmol/L 时不产生扩增条带, 当 Mg²⁺ 浓度处于 1.5 ~ 2.0 mmol/L 时, 扩增条带数和亮度随着 Mg²⁺ 浓度的增加而增加。当 Mg²⁺ 为 2.0 mmol/L 时, 条带清晰, 容易计数; 当 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时, 扩增条带数变少且不明亮。因此, Mg²⁺ 的浓度以 2.0 mmol/L 为宜。

2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

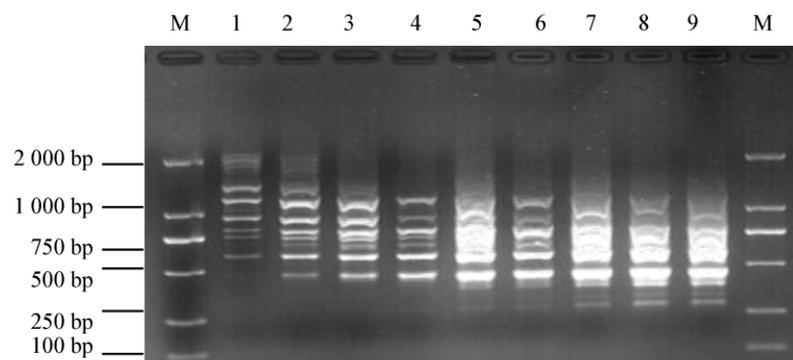
引物浓度也是 ISSR-PCR 反应中的重要影响因素。引物浓度偏低, 导致引物与模板的结合率降低, 多态性减少; 引物浓度太高, 过量的引物导致非特异性扩增和引物二聚体的产生, 从而同靶序列竞争 dNTP 和 Taq 酶, 影响靶序列产量。



M: DL2000; 1 ~ 5: Mg²⁺ 浓度依次为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L。
M: DL2000 DNA marker, 1 - 5: Mg²⁺ concentration 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L.

图 1 Mg²⁺ 对甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应的影响

Fig.1 Effect of Mg²⁺ concentration on ISSR-PCR amplification in *U. scitanminea*



M: DL2000; 1 ~ 9: 引物浓度依次为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 μmol/L。
M: DL2000 DNA marker, 1 - 9: primer concentration 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 μmol/L.

图 2 引物浓度对甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应的影响

Fig.2 Effect of primer concentration on ISSR-PCR amplification in *U. scitanminea*

本试验设置了9个引物浓度梯度,结果(图2)表明,引物浓度在0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 内,条带数多、清晰易读数;当引物浓度在0.5~0.9 $\mu\text{mol/L}$ 内,条带虽多,但呈弥散状态,难以计数。综合考虑,引物浓度以0.2 $\mu\text{mol/L}$ 为宜。

2.4 模板 DNA 的量对 ISSR-PCR 反应的影响

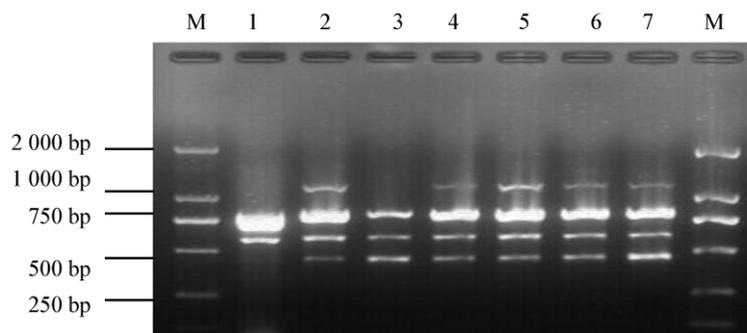
本试验设置了7个模板DNA量的梯度并进行了扩增,从扩增结果(图3)可以看出,当DNA用量较多时,扩增条带数较少、条带亮度太强;当DNA量为50~1.56 ng时,扩增条带清晰、条带数多、带型一致。为了保险起见,在25 μL ISSR-PCR反应体系中加入10~20 ng模板DNA较为合适。

2.5 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

底物dNTP浓度过高,会导致聚合酶错误掺入,浓度过低,又会影响到合成效率,甚至会因dNTP过早消耗而使产物单链化,影响扩增效率。试验结果表明(图4),当dNTP浓度在0.05~0.1 mmol/L及0.25~0.35 mmol/L时,条带数多,但略弥散;当dNTP浓度在0.4~0.5 mmol/L时,条带数明显减少,甚至无扩增条带。当dNTP浓度为0.2~0.25 mmol/L时,条带数多、清晰,容易计数。因此,dNTP浓度为0.2 mmol/L较适宜。

2.6 *rTaq* 聚合酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响

*Taq*酶的活性及用量对ISSR-PCR扩增的条带数量和强弱有重要影响。使用高浓度的*Taq*酶不仅经济上浪费,而且容易产生非特异性扩增产物;*Taq*酶过低,则会使新链合成效率下降,导致扩增产物的减少。本试验结果(图5)表明,当*Taq*酶用量为0.5~1 U时,扩增效率不足;当*Taq*酶用量扩大到1.5~2.0 U时,扩增条带数增多,且清晰。从实际扩增效果及经济角度考虑,在25 μL ISSR-PCR反应体系中加入1.5 U *Taq*酶较合适。

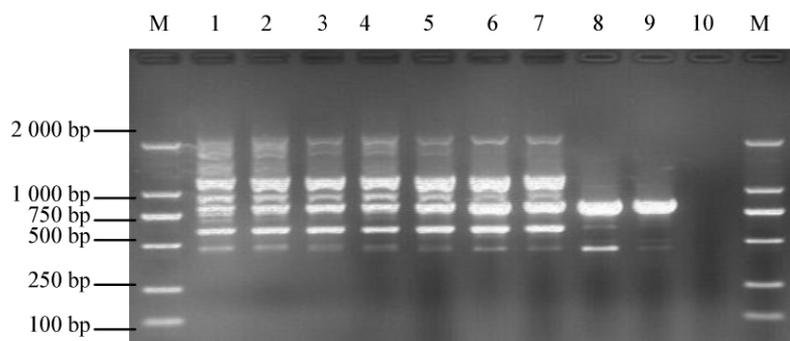


M: DL2000; 1~7 依次为 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ng。

M: DL2000 marker; 1~7: DNA template 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ng。

图3 模板DNA的量对甘蔗鞭黑粉菌ISSR-PCR反应的影响

Fig. 3 Effect of template DNA concentration on ISSR-PCR amplification in *U. scitanminea*

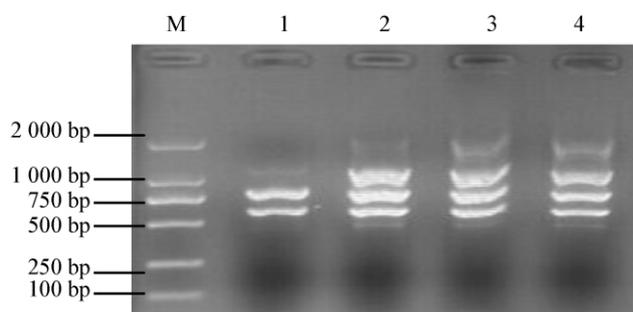


M: DL2000; 1~10: dNTP的浓度依次为0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mmol/L。

M: DL2000 marker, 1~10: dNTPs concentration 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mmol/L。

图4 dNTP浓度对甘蔗鞭黑粉菌ISSR-PCR反应的影响

Fig. 4 Effect of dNTPs concentration on ISSR-PCR amplification in *U. scitanminea*



M: DL2000; 1~4: *rTaq*酶浓度依次为0.5, 1, 1.5, 2 U。

M: DL2000 marker, 1~4: *rTaq* polymerase concentration 0.5, 1, 1.5, 2 U。

图5 *rTaq*酶浓度对甘蔗鞭黑粉菌ISSR-PCR反应的影响

Fig. 5 Effect of *rTaq* polymerase concentration on ISSR-PCR amplification in *U. scitanminea*

2.7 最佳甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系的建立

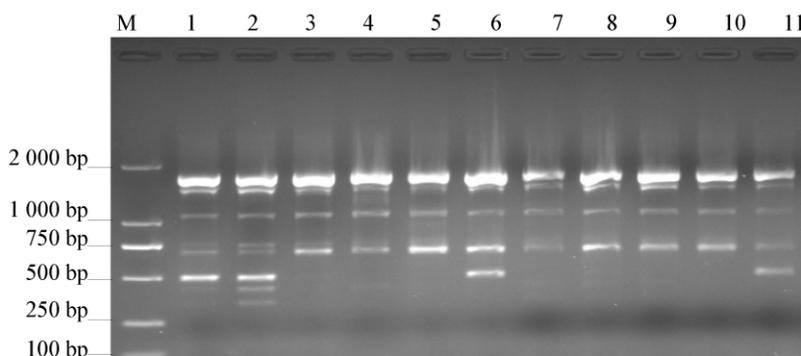
影响 ISSR-PCR 的因素较多,扩增结果的质量由反应中各因子的共同作用决定。经上述反应体系各成分的优化筛选,本研究最后建立的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系见表 3。

2.8 新建立的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 体系的稳定性检验

为了检验新建立的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系的稳定性,利用新建立的反应体系,用随机引物 104(序列 ATGATGATGATGATGATG)对 1~11 号分离物的基因组 DNA 进行扩增。从扩增结果(图 6)可知,11 个参试分离物均能扩增出清晰的条带,大部分菌株条带数 4~6 条。说明新建立的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系稳定性较好。

表 3 优化的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 反应体系
Tab.3 Optimized ISSR-PCR reaction system in *U. scitaminea*

样品名称 Name of sample	用量/ μL Sample volume	终浓度 Terminal concentration
10 × Buffer	2.5	1 × Buffer
dNTP(2.5 mmol/L each) + Mg^{2+} (25 mmol/L)	2.0	0.2 mmol/L(dNTP) ; 2 mmol/L(Mg^{2+})
primer(5 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
<i>rTaq</i> DNA polymerase(5 U/ μL)	0.3	0.06 U/ μL
Template(10 ~ 20 ng/ μL)	1.0	
dd H_2O	18.2	
Total	25	



M: DL2000; 1~11: DNA 模板依次为 1-11 号分离物基因组 DNA。
M: DL2000 DNA marker; 1-11: template DNA of No.1-11 isolates of *U. scitaminea*.

图 6 新建立的甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 体系的稳定性检验

Fig.6 Stability test of the newly established ISSR-PCR system in *U. scitaminea*

3 讨论

ISSR 技术是基于 PCR

反应的分子标记技术,影响 PCR 扩增反应结果的因素很多,确定反应体系中每个因子最适的扩增参数是保证 ISSR 分析稳定性和重复性的前提^[8-10]。PCR 反应体系中,DNA 模板的含量是决定 PCR 扩增能否顺利进行的关键因素。模板含量过低,分子碰撞机率低,偶然性大,不能扩增出产物或扩增不稳定;模板含量过高,会增加杂质的含量,降低 DNA 的纯度,抑制反应正常进行或增加非特异性产物的扩增。本试验研究结果表明,甘蔗鞭黑粉菌 DNA 模板质量浓度在 10~20 ng/(25 μL) 反应体系内扩增效果较好。另外,根据实践经验,在扩增不出任何条带的情况下,可将 DNA 模板稀释 10 倍或 50 倍,往往会扩增出较好的结果。主要因为通过稀释降低了模板 DNA 中杂质的浓度,从而减少了杂质对 PCR 反应的抑制作用^[11]。

Mg^{2+} 作为 *Taq* 酶的辅助因子,不仅影响 *Taq* 酶的活性,还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成。 Mg^{2+} 浓度太高或太低均不能得到好的扩增效果^[9]。本研究中, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 获得了较好的扩增效果。

Taq 酶是 PCR 反应中不可缺少的成分,引物与模板结合后,在 *Taq* 酶作用下延伸。使用高浓度的 *Taq* 酶不仅增加实验成本,而且会增加产生非特异性扩增产物的机率,*Taq* 酶浓度过低则会导致产物的合成效率下降。一般的随机扩增反应中,*Taq* DNA 聚合酶的用量为 0.5~5 U^[12]。本研究中,最适合的 *Taq* DNA 聚合酶的用量为 1.5 U。

dNTP 作为 PCR 反应的原料,其浓度直接影响扩增产物的合成。浓度过低则产率下降,浓度过高不

仅会导致 PCR 错配,而且 dNTP 会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用,使实际反应中 Mg^{2+} 浓度下降而影响 *Taq* 酶的活性,从而影响 PCR 反应的扩增效果,甚至导致 PCR 反应的失败。在 PCR 反应中,dNTPs 的浓度一般为 0.1~0.2 mmol/L,此时,产物量、特异性及忠实性较好^[13]。本研究结果表明,当 dNTPs 的浓度为 0.2 mmol/L,甘蔗鞭黑粉菌 ISSR-PCR 扩增效果较理想。

引物浓度也是影响 PCR 扩增的一个重要因素。引物浓度过高,易引起碱基错配和非特异性扩增,还易形成引物二聚体;引物浓度过低,其与 DNA 模板结合位点少,PCR 扩增效率会大大降低。PCR 反应中引物浓度一般为 0.1~0.5 $\mu\text{mol/L}$ ^[5-6]。本研究中,引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

本研究中发现为了提高试验的稳定性、扩增结果的可重复性,应严格控制实验条件,包括仪器、药品的一致性,反应加样的精确性,保证 DNA 的纯度及尽量减少所用实验材料的更换。这与盖树鹏等^[14]、刘春林等^[15]、桂秀梅等^[16]的结论一致。

参考文献:

- [1]沈万宽. 广东蔗区甘蔗病害现状与综合防治措施[J]. 甘蔗糖业, 2004(1): 1-5.
- [2]沈万宽, 邓海华. 引进甘蔗品种黑穗病抗性鉴定及结果分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 234-238.
- [3]Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4]Zhang H Y, Li F S, He L L, et al. Identification of sugarcane interspecies hybrids with RAPDs[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(8): 1072-1074.
- [5]Subramanyam K, Muralidhararao D, Devanna N. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas*(L.) in India by RAPD analysis[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(9): 1900-1910.
- [6]Zamani P, Akhondi M, Reza M, et al. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(10): 1812-1817.
- [7]沈万宽, 周国辉, 邓海华, 等. 甘蔗宿根矮化病菌 PCR 检测及目的片段核苷酸序列分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(12): 413-416.
- [8]杨静, 刘应高. 散斑壳属真菌 RAPD-PCR 反应条件的优化[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 38-41.
- [9]陈文炳, 林媛, 王泽生, 等. 双孢蘑菇 RAPD-PCR 反应体系的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 428-432.
- [10]谷守芹, 范永山, 李坡, 等. 玉米大斑病菌 ISSR 反应体系的优化和遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 427-432.
- [11]刘睿. 荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.) 作图群体的扩建及分子遗传图谱的继续构建[D]. 广州: 华南农业大学, 2005.
- [12]谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 445-450.
- [13]林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995: 178-183.
- [14]盖树鹏, 孟祥栋. 利用 RAPD 技术进行植物性状标记及辅助选择[J]. 生物技术通报, 1999, 15(6): 33-38.
- [15]桂秀梅, 张金林, 董金皋, 等. 玉米大斑病菌 RAPD 分析最佳反应体系的建立[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(1): 56-58.
- [16]刘春林, 官春云, 李桐. 植物 RAPD 标记的可靠性研究[J]. 生物技术通报, 1999(2): 31-34.