

文章编号: 1674-7054(2010)02-0099-06

女贞 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

李传代^{1,2}, 陈 飞^{1,2}, 王天地^{1,2}, 刘国民^{1,2}

(1. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南, 海口 570228;

2. 海南大学 苦丁茶研究所, 海南, 海口 570228)

摘 要: 利用单因子试验, 测试了女贞 ISSR-PCR 反应体系中的主要影响因子。经过优化实验, 建立了一套适合于女贞的稳定的 ISSR-PCR 反应体系: $10 \times$ buffer $2.5 \mu\text{L}$, $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 , $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPs, 1.5 U 的 Taq 酶, $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物, 10 ng 的 DNA 模板。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 4 min , 94°C 变性 40 s , $52 \sim 62^\circ\text{C}$ 退火 45 s , 72°C 延伸 120 s , 进行 35 个循环, 72°C 延伸 8 min , 4°C 保存。应用该优化的 ISSR-PCR 实验体系对 12 份女贞种质材料进行了扩增, 均能扩增出丰富稳定的条带。

关键词: 女贞; ISSR; 影响因子; 体系优化**中图分类号:** Q 789**文献标志码:** A

女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.) 系木犀科女贞属常绿灌木或小乔木, 其果实、种子、树皮、叶、根均可入药, 且毒性较低^[1]。女贞是木犀科苦丁茶的主要种类之一^[2], 主要分布在我国四川和云南等省区, 民间也俗称为“苦丁茶”, 并在民间广泛作为代茶饮料(苦丁茶)饮用^[3]。女贞果实(即女贞子)中含有多种五环三萜类、皂苷、多糖、油酸及微量元素等多种化学成分^[3-4], 在临床上主要治疗眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、慢性支气管炎、冠心病、高脂血症、高血糖、肝炎等多种疾病^[5-6]。利用 ISSR-PCR 标记技术探讨女贞苦丁茶种质资源的遗传多样性, 对女贞苦丁茶的开发和利用具有重要的意义。

ISSR (Inter-simple Sequence Repeats) 分子标记是由 Zietkiewicz E 等人^[7]于 1994 年创建的, 是在 SSR 基础上发展起来的一项新的标记技术, 已在多种动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性分析等研究方面得到应用^[8]。为了确保 ISSR 分析结果的可靠性和可重复性, 进行 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化是非常必要的。本研究以女贞嫩叶为材料, 采用改良 CTAB 法提取其基因组 DNA, 并以此基因组 DNA 为模板, 采用单因素设计的方法对其 ISSR 反应体系进行优化, 为进一步开展女贞种质资源遗传多样性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 从海南大学苦丁茶种质资源库所定植的 100 余份女贞种质材料中, 任选不同地域的 12 份植株, 取其嫩芽作为供试材料, 各份种质材料的编号和采集地如表 1 所示。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 电热恒温水浴锅, 台式离心机, 低温冰箱, 移液器, 紫外分光光度计, icycleTM Thermal Cycler 型 PCR 仪, DYY-III 型稳压稳流电泳仪, DYY-III 型电泳槽, UVP 型凝胶成像系统等。

收稿日期: 2010-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860048)

作者简介: 李传代(1980-), 男, 海南海口人, 海南大学农学院 2007 级作物遗传育种专业硕士研究生。

通信作者: 刘国民(1955-), 男, 湖南祁东人, 教授, 博士, 博士生导师。E-mail: kudingcha_nol@yahoo.com.cn

表 1 供试材料及来源

编 号	产 地	编 号	产 地
NZ-001	云南省永善县溪落渡镇甘河村	NZ-023	贵州省台江县城
NZ-002	贵州省湄潭县	NZ-027	贵州省扎佐县贵州省林业学校
NZ-007	云南省昆明市	NZ-028	云南省西畴县法斗乡
NZ-009	湖南省祁东县白鹤乡	NZ-029	江西省南昌市
NZ-011	贵州省贵阳市植物园	NZ-046	湖南省祁东县白鹤铺镇高原村高原组
NZ-013	湖南省祁东县步云桥镇双江村对塘组	NZ-097	南京农业大学校园

1.2.2 试剂 Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers,6 × loading buffer,10 g · L⁻¹ Rnase A,Taq DNA polymerase 和 4 × dNTP mix 均购自上海申能博彩生物科技有限公司; 100 bp plus DNA ladder 购自中科瑞泰 (北京) 生物科技有限公司; 引物序列参照哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列,委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成; 琼脂糖购自 Spanish,其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照梁远发等的改良 CTAB 法^[8]:先用 $w = 0.8\%$ 的 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,EB 染色,以 Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers 为参照,电泳结果用 UVP 型凝胶成像分析系统下照相并记录。再用 Eppendorf 公司生产的 Biophotometer 紫外分光光度计分别测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,并计算出 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,每份样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均要求在 1.8 ~ 2.0 范围内。测定每份样品 DNA 的质量浓度,并将其稀释至 20 mg · L⁻¹,分装后,置 -20 °C 冰冻层保存。

1.3.2 ISSR-PCR 实验条件优化设计 以提取的女贞(地理距离相差较远的 NZ-009 和 NZ-097) 基因组 DNA 为模板,根据预备的实验结果,对影响 ISSR-PCR 扩增结果的主要影响因子(模板 DNA 浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、dNTPs 浓度、引物浓度) 和热循环参数(循环次数、退火温度等) 分别设置 8 个不同处理梯度进行实验(见表 2)。

表 2 影响 ISSR-PCR 扩增的主要参数

参数	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5	梯度 6	梯度 7	梯度 8
Template/(mg · L ⁻¹)	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	9.6	12.8
Mg ²⁺ /(mmol · L ⁻¹)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
Taq/(U · μL ⁻¹)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14
dNTPs/(μmol · L ⁻¹)	50	100	150	200	250	300	350	400
Primer/(μmol · L ⁻¹)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Cycles/(times)	20	25	30	35	40	45	50	55

预备实验 PCR 扩增反应体系各组分参数为: 10 × buffer 2.5 μL,2.5 mmol · L⁻¹ 的 MgCl₂,200 μmol · L⁻¹ 的 dNTPs,Taq 酶 1.5 U,引物 0.5 μmol · L⁻¹,DNA 模板 40 ng,最后用灭菌的 ddH₂O 补足至 25 μL。

预备实验 ISSR-PCR 基本扩增程序: 94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 40 s,52 ~ 62 °C 退火 45 s,以 72 °C 延伸 120 s,进行 35 个循环,最后以 72 °C 延伸 8 min,4 °C 保存。反应体系的优化按单因子梯度设置进行,在保持其他因子不变的情况下,变化单一因子,筛选最优水平,每一个实验水平优化后作为后续研究的一个固定因子。

扩增产物在 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶(含 $\rho = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EB) 电泳(0.5 × TBE 缓冲液,电压 5 V · cm⁻¹) 1.5 ~ 2.0 h,以 100 bp plus DNA ladder 作标准分子质量参照物,UVP 型凝胶成像分析系统照相并作记录。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测 用改良后的 CTAB 法提取 12 份女贞苦丁茶种质材料的基因组 DNA,经紫外分光光度计检测其 OD 值,结果显示,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.90 左右(表 3),表明蛋白质、多糖类等杂质含量少,所提取的基因组 DNA 质量高。经 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测并与 Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers 比较,片段长度均接近或等于 21 Kb,无弥散现象(图 1)。这表明所提取的 DNA 完整性较好,符合

ISSR 扩增要求。

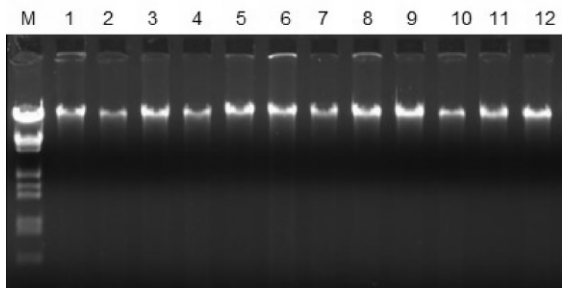


图 1 女贞 12 份种质材料基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

1 ~ 12 泳道分别为: NZ - 001, NZ - 002, NZ - 007, NZ - 009, NZ - 011, NZ - 013, NZ - 023, NZ - 027, NZ - 028, NZ - 029, NZ - 046, NZ - 097

表 3 12 份女贞不同种质材料基因组 DNA 的紫外分光光度分析

编 号	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	编 号	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
NZ - 001	0.1001	0.0535	1.87	500.5	NZ - 023	0.1338	0.0675	1.98	669.0
NZ - 002	0.0882	0.0471	1.87	441.0	NZ - 027	0.0568	0.0289	1.97	284.0
NZ - 007	0.0720	0.0392	1.84	360.0	NZ - 028	0.0937	0.0486	1.93	468.5
NZ - 009	0.0849	0.0451	1.88	424.5	NZ - 029	0.1002	0.0512	1.96	501.0
NZ - 011	0.1129	0.0593	1.90	564.5	NZ - 046	0.0889	0.0451	1.97	444.5
NZ - 013	0.0878	0.0460	1.91	439.0	NZ - 097	0.1183	0.0620	1.91	591.5

2.2 预备实验 不同的物种有其相应的不同引物,不同的引物在相同的条件有不同的退火温度,同一引物对不同的物种其退火温度也有所不同。因此,在对某一物种进行实验条件优化前,有必要进行预备实验,找出 ISSR-PCR 扩增效果相对较好的引物及其退火温度用于实验条件优化,其效果较好。

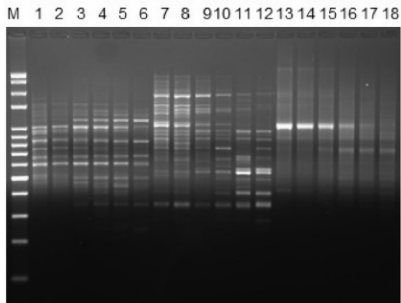


图 2 预备实验结果

泳道 1 ~ 6 为引物 UBC - 811,退火温度分别为 48.6, 50.7,52.6,54.6,56.7 和 58.6 ℃; 泳道 7 ~ 12 为引物 UBC - 873,退火温度分别为 47.6,49.4,51.7,53.6,55.4 和 57.7 ℃; 泳道 13 ~ 18 为引物 UBC - 891,退火温度分别为 47.6,49.4,51.7,53.6,55.4 和 57.7 ℃

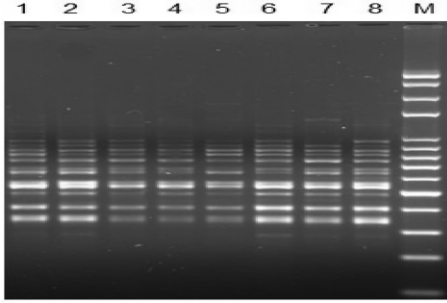


图 3 模板质量浓度试验

1 ~ 8 泳道的质量浓度分别为:0.2,0.4,0.8, 1.6,3.2,6.4,9.6,12.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

从图 2 的扩增结果可以看出,引物 UBC - 811 退火温度为 48.6 ℃ 和 50.7 ℃ 时,扩增条带数少,有些条带模糊(泳道 1,2); 当退火温度为 58.6 ℃ 时,扩增条带虽然清晰,但条带数较少(泳道 6); 当退火温度在 52.6 ~ 56.7 ℃ 时,扩增的条带较多且带型清晰(泳道 3 ~ 5)。考虑到温度过高扩增产物降低,过低会产生非特异性条带,故引物 UBC - 811 退火温度确定为 56.7 ℃。引物 UBC - 873 退火温度在 47.6 ~ 49.4 ℃ 时,背景模糊不清,弱带较多,说明温度太低非特异性条带多(泳道 7,8); 当退火温度为 55.4 ℃ 和 57.7 ℃ 时,条带逐渐减少(图 2 中泳道 11,12); 当退火温度范围在 51.7 ~ 53.6 ℃ 时,带型稳定且清晰(泳道 9,10)。故引物 UBC - 873 的退火温度确定为 53.6 ℃。引物 UBC - 891 退火温度在 47.6 ~ 57.7 ℃ 时,条带数量极少,且随着温度的升高,条带变得越来越暗,故引物 UBC - 891 不适用于女贞 ISSR-PCR 的

扩增。最后确定引物 UBC-811 和 UBC-873 可用于以后的分析实验,其相应的退火温度分别为 56.7 °C 和 53.6 °C。

2.3 DNA 模板浓度对反应体系的影响 DNA 模板的用量是影响 ISSR-PCR 扩增效果的一个重要因子,在一定范围内 PCR 产物随着模板浓度的升高而升高,但浓度过高,又会相应增加非特异性产物的出现。ISSR 反应中对模板 DNA 浓度要求的范围通常较宽,但不同的物种、类群以及不同的 DNA 提取方法所要求最佳的 DNA 模板浓度范围也不尽相同^[14]。从图 3 的扩增结果可知,在 25 μL 反应体系中,在 5 ~ 320 ng 之间,设定了 8 个梯度的模板 DNA 用量,扩增出来的条带数量和清晰度基本一致,条带丰富稳定且清晰可辨,说明女贞 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA 的适宜范围较宽,在 5 ~ 320 ng 用量范围内均可作为女贞 ISSR 反应体系中模板的浓度。由于是单因子实验,故本实验的模板质量浓度确定为 10 ng。

2.4 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的特异性和产物有显著的影响, 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 dNTPs、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^[11]。从图 4 中可以看出,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带很少(泳道 1);当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带清晰,但有一主条带缺失(泳道 2);当浓度在 2.0 ~ 3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增的条带数量基本一致,且清晰稳定(泳道 3 ~ 5);当 Mg^{2+} 浓度在 3.5 ~ 4.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,虽然有些条带变亮,但有些主条带逐渐消失,出现非特异性扩增(泳道 6 ~ 8),所以其合适浓度为 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

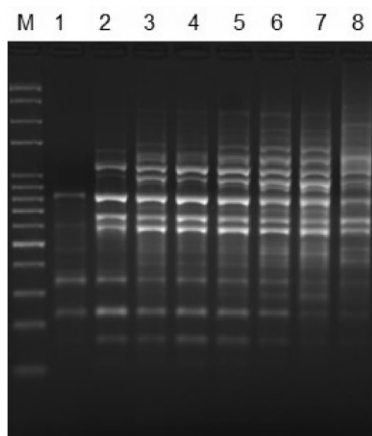


图 4 Mg^{2+} 浓度试验

1 ~ 8 号泳道的浓度分别为: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

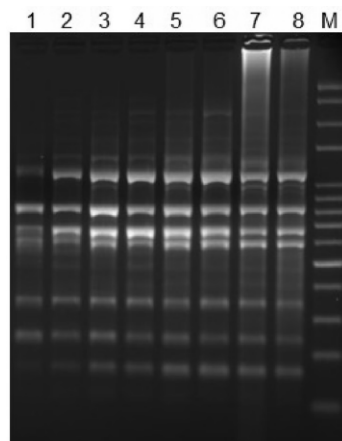


图 5 Taq 酶浓度试验

1 ~ 8 泳道的浓度分别为: 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

2.5 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 在 ISSR-PCR 反应体系中, Taq DNA 聚合酶用量直接影响到扩增反应的成功与否, Taq DNA 聚合酶浓度过高不仅增加试验成本,而且会导致非特异性产物增加,浓度过低则会使酶过早耗完,导致产物合成率下降甚至扩增失败^[13]。从图 5 可以看出,当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.01 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,有一主条带缺失(泳道 1);当 Taq DNA 聚合酶用量在 0.02 ~ 0.1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,随着 Taq 酶用量的增加,条带越来越清晰可辨,亮度逐渐增强(泳道 2 ~ 6);当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.12 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 及以上时,出现非特异性扩增产物(泳道 7 ~ 8)。考虑到实验成本,本实验确定 Taq 酶的适宜用量为 0.06 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.6 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 dNTPs 是反应的原料,其浓度与 PCR 扩增效率有密切关系,浓度过高,会导致聚合酶错误地掺入,影响扩增的特异性和准确性,同时还会与 Taq DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} ,使反应体系中的 Mg^{2+} 总量下降,从而影响聚合酶的活性;浓度过低,会因 dNTPs 过早消耗而使产物单链化,影响扩增效果^[13]。本实验设置了 8 个浓度梯度(图 6),当 dNTPs 用量在 50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,有一主条带没扩增出来,且背景较深(泳道 1, 2);当 dNTPs 用量在 150 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带数量逐渐增加,主带亮度也逐渐增加(泳道 3, 4);当 dNTPs 用量在 250 ~ 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,尽管条带变得越来越清晰,但条带数量逐渐减少(泳道 5 ~ 8)。所以,确定 dNTPs 适宜的浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

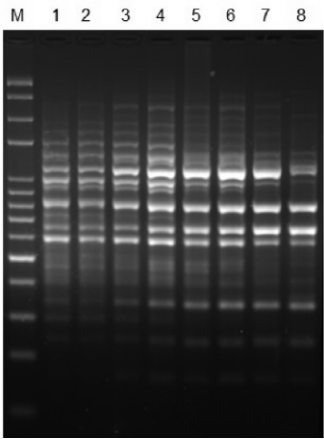


图 6 dNTPs 浓度试验

1~8 泳道的浓度分别为: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

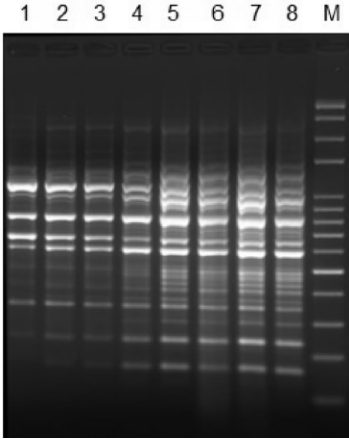


图 7 引物浓度试验

1~8 泳道的浓度分别为: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.7 引物浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响 引物浓度关系到 ISSR-PCR 扩增产物的质量, 浓度太低, 其与 DNA 模板结合位点就少, 不能进行有效的扩增; 浓度太高则会促使引物错误地引导非特异性产物二聚体的生成^[4]。由图 7 可知: 当引物浓度为 0.1~0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 尽管扩增产物随着引物浓度的增加而有所增多, 但有一条主条带缺失(泳道 1~3); 当引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带清晰稳定, 且条带数量较多(泳道 4); 引物浓度为 0.5~0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 主条带亮度有所增加, 但背景逐渐加深, 有些条带变得模糊(泳道 5~8)。故本实验适宜的引物浓度确定为 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.8 反应循环次数对 ISSR-PCR 扩增的影响 ISSR-PCR 循环次数对扩增产物的量具有重要影响, 且不同植物适合的循环次数不同。循环次数不够, 扩增产物少, 部分谱带不能检测; 过多的循环次数可导致一些非特异性的产物干扰, 发生错配的比例也上升, 引起弥散现象^[3]。实验结果(图 8)表明, 当循环次数为 20~25 次时, 不能获得扩增产物(泳道 1, 2); 当循环次数 30 次时, 有一主条带没扩增出来(泳道 3); 当循环次数为 35~40 次时, 条带基本一致, 且清晰稳定(泳道 4, 5); 当循环次数为 45~55 次时, 条带数量变得越来越少, 且背景模糊, 出现非特异性可扩增。考虑到过多的循环次数可导致一些非特异性产物的干扰, 而且发生错误的比例也上升^[4], 因此, 本实验确定女贞 ISSR-PCR 扩增的适宜循环次数为 35 次。

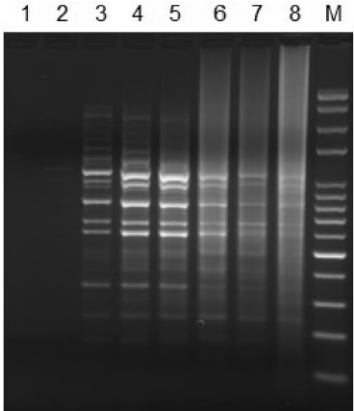


图 8 循环次数试验

1~8 循环次数分别为: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 次

2.9 退火温度的确定 引物的退火温度极大地影响着 ISSR 反应的进行, 不同的引物, 在同样条件下, 退火温度也不一样。一般而言, 退火温度偏低, 背景模糊, 弱带较多; 而退火温度偏高, 则片段少, 而且不利于长片段的扩增^[3]。本实验根据 ISSR 引物的理论 T_m 值, 设置了 6 个温度梯度对 40 条引物进行筛选, 最终确定女贞 ISSR-PCR 实验条件优化体系的适宜引物为 UBC-811 和 UBC-873。

综上所述, 适合女贞扩增的 ISSR-PCR 的反应体系为: 25 μl PCR 反应体系中, 内含 10 $\times$ buffer 2.5 μL , 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPs, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 引物 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DNA 模板 10 ng。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 52~62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 120 s, 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3 讨 论

通过 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值可估测 DNA 的纯度, 一般情况下 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 1.8 ± 0.1 , 表明 DNA 纯度很高。本实验采用改良 CTAB 法提取女贞基因组 DNA, 其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 1.9 左右, 表明所提 DNA 的纯度已基本符合要求。

邹喻萃等^[7] 用中国红花莲 DNA 进行 RAPD 扩增时认为, 模板质量浓度在 1~10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内获

得最佳结果,达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时会丢失大部份的条带。笔者进行 ISSR 扩增的最适宜模板质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,这与邹喻萃的结论完全吻合。

在 ISSR 反应体系优化的报道中,以往学者应用的退火温度大多在 $52 \sim 56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间,本实验结果表明,有些引物的退火温度达到 $62 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。因此,对 ISSR 这样的随机引物标记,根据其引物序列的碱基构成进行相应的退火温度设计和优化是十分必要的。

参考文献:

- [1] 刘国民. 中国木犀科茶植物的多样性与开发状况 [J]. 贵州科学, 2003, 21(1-2): 69-77.
- [2] 刘国民. 浅议新资源食品与苦丁茶产品的卫生管理 [J]. 热带林业, 1999, 27(3): 126-134.
- [3] 张兴辉, 石力夫. 中药女贞子化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(3): 333-334.
- [4] 吕金顺. 甘肃产女贞子挥发油化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(3): 178.
- [5] 李阳, 孙文基. 女贞子的药理作用研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(5): 58.
- [6] 张振明, 葛斌, 许爱霞, 等. 女贞子多糖的抗衰老 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(2): 108.
- [7] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994(20): 176-183.
- [8] 韩晓颖, 梁英海, 王亚军, 等. 基于 ISSR 标记的伏山楂起源及分类地位研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(2): 164-167.
- [9] 梁远发, 郑道君, 刘国民, 等. 一种适用于木犀科苦丁茶的高效 DNA 提取法 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(3): 44-47.
- [10] 孙立夫, 张艳华, 裴成全, 等. 法国蜜环菌 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 261-267.
- [11] 乔燕春, 林顺权, 杨向晖, 等. 均匀设计在枇杷 ISSR-PCR 反应体系优化中的应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 123-126.
- [12] 曲超, 孙群, 丁自勉, 等. 桔楼 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 127-131.
- [13] 潘丽梅, 朱建华, 秦献泉, 等. 龙荔基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系的建立与优化 [J]. 西南农业学报, 2009, 22(1): 145-149.
- [14] 杨水莲, 刘卫东, 马涛, 等. 假俭草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 草原与草坪, 2009(1): 11-14.
- [15] 付燕, 罗楠, 杨芩, 等. 枇杷属植 ISSR 反应体系的建立和优化 [J]. 果树学报, 2009, 26(2): 180-185.
- [16] 刘立军, 孙珍夏, 彭定祥. 苎麻 ISSR-PCR 体系的优化 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(7): 64-68.
- [17] 邹喻萃, 蔡美琳, 王晓东, 等. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种质资源的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 1998, 40(2): 163-168, 444.

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Ligustrum lucidum* Ait.

LI Chuan-dai^{1,2}, CHEN Fei^{1,2}, WANG Tian-di^{1,2}, LIU Guo-min^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources, MOE, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Kudingcha Research Institute of Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Single factor experiment was used to test the effect factors of ISSR-PCR reaction system. After the optimization, a suitable ISSR-PCR reaction system of *Ligustrum lucidum* Ait. was established as follows: $10 \times$ buffer $2.5 \mu\text{L}$, $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 1.5 U Taq polymerase, $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primers, 10 ng DNA template, which were contained in $25 \mu\text{L}$ reaction solution. The optimized amplification program was that predenaturing at $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 min , denaturing at $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 40 s , annealing at $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$ — $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s , extension at $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 120 s , for 35 cycles, extension at $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 min at last. The products were stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The optimized ISSR-PCR experiment system was applied in the amplification of 12 varieties of germplasm materials of *Ligustrum lucidum* Ait and the results indicated that the rich and stable bands can be amplified.

Key words: *Ligustrum lucidum* Ait.; ISSR; influential factors; optimization