

## 黑翅土白蚁 ISSR-PCR 体系的建立与优化

龙雁华<sup>1</sup>, 濮龙军<sup>1,2</sup>, 李娟<sup>3</sup>, 王众<sup>4</sup>, 杨云秋<sup>5\*</sup>

- (1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 230036;  
3. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036; 4. 安徽省蚌埠市白蚁防治研究所, 蚌埠 233000;  
5. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 采用单因子梯度优化的方法, 对已初步建立的黑翅土白蚁 ISSR-PCR 的反应体系在 dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、引物浓度、模板量及 TaqDNA 聚合酶用量等方面进行了优化。结果表明, 适用于黑翅土白蚁的 ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度分别为: dNTPs 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, Mg<sup>2+</sup> 3.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 引物浓度 0.4 μmol·L<sup>-1</sup>, 模板用量 DNA 20 ng, TaqDNA 聚合酶 2.5 U。

**关键词:** 黑翅土白蚁; ISSR-PCR; 优化

中图分类号: S763.33

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0627-04

### Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Odontotermes formosanus*

LONG Yan-hua<sup>1</sup>, PU Long-jun<sup>1,2</sup>, LI Juan<sup>3</sup>, WANG Zhong<sup>4</sup>, YANG Yun-qiu<sup>5</sup>

- (1. School of life sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;  
2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qindao 266003;  
3. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;  
4. Institute of Termite Control of Bengbu, Bengbu 233000;  
5. School of Tea Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Single factor test of concentration of dNTP, Mg<sup>2+</sup>, Taq DNA polymerase, primer and DNA template was used to optimize the ISSR-PCR amplification system which has been established initially. The results showed that suitable ISSR-PCR reaction system for *Odontotermes formosanus* was 20 μl reaction system containing 2.5 U Taq DNA polymerase, 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP, 1.0 μmol·L<sup>-1</sup> primer and 20 ng DNA template.

**Key words:** *Odontotermes formosanus*; ISSR-PCR; optimization

黑翅土白蚁 (*Odontotermes formosanus*), 又名黑翅大白蚁、台湾黑翅蚁, 属等翅目白蚁科。主要分布于我国黄河、长江以南各地区。该种土栖性害虫主要以工蚁危害树皮、浅木质层以及根部, 初期在被害树干外形成大块蚁路, 长久危害可侵入木质部, 导致树木枯萎、长势衰退<sup>[1-2]</sup>。作者通过设计单因素试验, 建立黑翅土白蚁 ISSR-PCR 最佳反应体系, 旨在为今后黑翅土白蚁遗传多样性、亲缘关系、种源鉴定、优良性状标记等研究奠定基础。

简单序列重复区间技术(Inter-simple sequence

repeat, 简称 ISSR)是基于微卫星技术发展起来的一种新型分子标记技术, 具有多态性高、稳定性好、产物特异性强等特点<sup>[3]</sup>。其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物, 在 SSR 序列的 3'端或 5'端加上 2~4 个随机核苷酸, 这种锚定引物可在 PCR 反应中可引起特定位点退火, 获得与锚定引物互补的间隔不太长的重复序列间 DNA 片段。所扩增结果根据聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中谱带的有无及相对位置来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性<sup>[4]</sup>。ISSR 是显性遗传分子标记, 扩增产物在不同个体中存在广

收稿日期: 2013-06-08

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2013A121, KJ2012A104), 国家自然科学基金项目(31200490)和安徽农业大学稳定与引进人才项目(WD2011-10)共同资助。

作者简介: 龙雁华, 女, 博士, 讲师。E-mail: yyq\_lyh@ahau.edu.cn

\* 通讯作者: 杨云秋, 男, 博士, 讲师。E-mail: my669@sina.com

泛的多态性,具有很高的重复性,且使用简单、成本低<sup>[5]</sup>。这种分子标记已广泛应用在多种植物、动物、真菌等物种中<sup>[6-8]</sup>,但利用这种分子标记研究白蚁种群的遗传多样性研究仍然鲜见<sup>[5]</sup>。

目前,ISSR技术虽具有实验操作简单、快速、高效,具有较好的实验重复性及稳定性,广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究等优点,但不足之处在于不同引物、不同植物材料的扩增条件存在差异,其稳定性易受到TaqDNA聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、退火温度等多个因素的影响,PCR反应体系的一系列最适条件需要在实验前进行摸索及优化。本研究为了能将ISSR-PCR反应体系较好地用于白蚁种群多样性的分析以及物种鉴定等方面,获得清晰、可靠的结果,先期以黑翅土白蚁为主要研究对象对该反应体系进行一系列的优化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

4个种群的黑翅土白蚁采由安徽省蚌埠市白蚁防治研究所提供,采集后样品均保存于无水乙醇中置于-20℃冰箱存放,以备实验之用。

### 1.2 方 法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 以黑翅土白蚁为材料,采用改良的蛋白酶K法进行基因组DNA的提取<sup>[9-10]</sup>。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取量和完整性。用紫外分光光度计检测其纯度和浓度并计算得量。

**1.2.2 原初 ISSR 扩增条件及程序** 根据前期研究基础<sup>[9]</sup>,选择ISSR引物IS16(CAC CAC CAC CAC,上海Sangon公司合成)进行相关ISSR扩增。原初扩增反应条件为:20 μL的PCR反应体系中含10×PCR buffer 2.0 μL,1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL,0.4 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 0.4 μL,10 mmol·L<sup>-1</sup> 引物 1.0 μL,5 U·μL<sup>-1</sup> Taq DNA聚合酶(上海Sangon公司)0.4 μL,DNA模板20 ng。原初ISSR扩增程序为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,50℃退火45 s,72℃延伸1.5 min,共35个循环后,72℃延伸10 min,12℃保存。ISSR扩增产物通过SYBR Green核酸染料染色,在1.0%琼脂糖凝胶(电泳缓冲液为1×TAE)进行电泳分离,与1×TAE buffer中100 V稳压电泳1.0 h,电泳结果在Geldoc-It Ts Imaging System紫外凝胶成像系统上检测拍照。

**1.2.3 ISSR-PCR 体系的优化** 用核酸分析仪测定提取的DNA浓度,将其稀释到20 ng·μL<sup>-1</sup>后,置于

-20℃保存,用于后续ISSR分析。

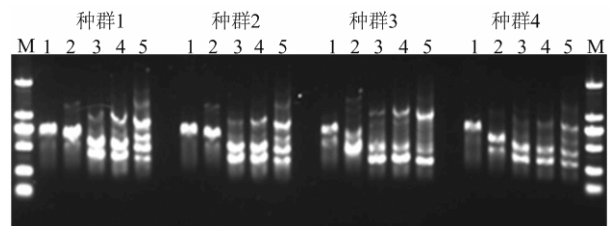
对PCR反应体系中的主要成分分别设置了5个梯度。其中Mg<sup>2+</sup>的5个浓度梯度为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 mmol·L<sup>-1</sup>;dNTPs的5个浓度梯度为0.1、0.15、0.2、0.25和0.3 mmol·L<sup>-1</sup>;引物的5个浓度梯度为0.3、0.4、0.5、0.6和0.7 μmol·L<sup>-1</sup>;Taq酶用量的5个梯度为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 U;模板用量的5个梯度为5、10、20、30和40 ng。依次按照Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、Taq酶、模板的顺序,分别设置某一成分梯度变化。待前一个成分的最适浓度梯度确定后,再进行下一成分浓度的优化,此次优化体系中已优化的成分均采用最适浓度,其余未优化的成分均按1.2.3所述初始反应体系,比较扩增效果。

退火温度设置在46~54℃之间,中间温度由PCR仪自动生成,分别为46℃、46.5℃、47℃、47.7℃、48.8℃、49.8℃、50.5℃、51.5℃、52.5℃、53.3℃、53.8℃和54℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 Mg<sup>2+</sup>浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

Taq DNA聚合酶是Mg<sup>2+</sup>依赖性酶,对Mg<sup>2+</sup>浓度的敏感性较大。Mg<sup>2+</sup>浓度过高不仅会抑制酶活,还会产生较大的背景干扰;而浓度过低将降低扩增产率。由图1可以看出,在4个种群中都表现出随着Mg<sup>2+</sup>浓度的逐渐增大,扩增带谱的数量及亮度呈上升趋势的结果,尤其是泳道5的扩增带谱最清晰,亮度最好且扩增条带的数量最多。因此,本实验确定3.0 mmol·L<sup>-1</sup>为黑翅土白蚁ISSR-PCR反应体系中最佳Mg<sup>2+</sup>浓度。



从左至右1~5泳道代表的Mg<sup>2+</sup>浓度梯度分别为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 mmol·L<sup>-1</sup>, M: DL2000 marker

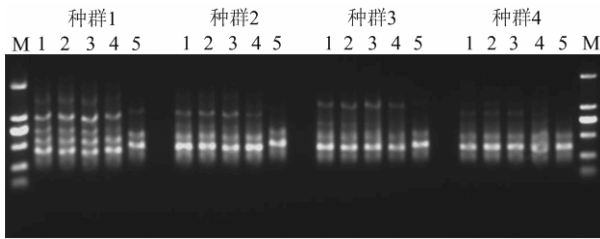
Lanes of 1 to 5 represent the results using Mg<sup>2+</sup> concentrations of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively

图1 Mg<sup>2+</sup>浓度对4个种群ISSR扩增的影响  
Figure 1 The effect of concentration of Mg<sup>2+</sup> on the electrophoregram of ISSR-PCR for four populations

### 2.2 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

作为ISSR-PCR反应的基本原料,dNTP常用的

浓度范围为  $50\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。浓度过高, 会出现非特异性扩增; 而浓度过低, 极可能会因过早的消耗而使产物单链化。从图 2 中可以看出, 4 个种群都表现出了一致性, 即在浓度为  $0.1\sim 0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 扩增出的谱带较为一致, 对 ISSR-PCR 反应的影响不大, 随着 dNTP 浓度的升高, 扩增产物的效果变得更好, 而在泳道浓度为  $0.25\sim 0.30\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时带谱趋于弱化模糊且扩增带条减少。因此可以确定, 在该体系中 dNTPs 的最佳用量为  $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



从左至右 1~5 泳道代表的 dNTPs 的浓度分别为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M: DL2000 marker

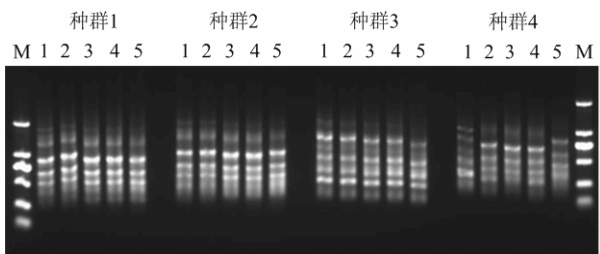
Lanes of 1 to 5 represent the results using dNTPs concentrations of 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 and 0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively

图 2 dNTPs 浓度对 4 个种群 ISSR 扩增的影响

Figure 2 The effect of concentration of dNTPs on the electrophoregram of ISSR-PCR for four populations

### 2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 结果的影响

引物浓度对 PCR 的带型可产生显著影响。浓度过低会导致 PCR 不能正常扩增; 而引物过多, 则会产生引物二聚体。从图 3 可以看出, 在 4 个种群的扩增结果中, 泳道 2 的扩增条带都较完整、清晰, 条带多样, 而随着引物浓度的增大, 扩增出的条带表现出谱带减少、不稳定的状态。因此, 确定该体系中引物浓度的最佳用量为  $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



从左至右 1~5 泳道代表的引物浓度分别为 0.3、0.4、0.5、0.6 和  $0.7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M: marker, DL2000

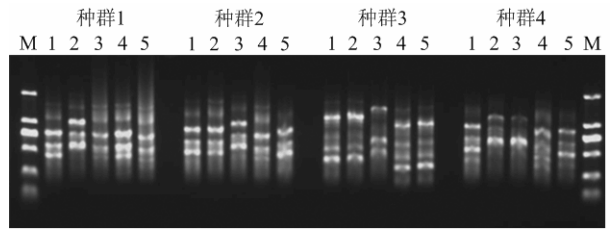
Lanes of 1 to 5 represent the results using primer concentrations of 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and  $0.7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively

图 3 引物浓度对 4 个种群 ISSR 扩增的影响

Figure 3 The effect of primer concentration on the electrophoregram of ISSR-PCR for four populations

### 2.4 Taq DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 结果的影响

Taq DNA 酶是 PCR 扩增反应中最为重要的因素, 决定了 PCR 的成功与否。一般, Taq DNA 聚合酶常用的浓度为每  $20\ \mu\text{L}$  中  $0.5\sim 3.0\ \text{U}$ , 浓度过高不仅造成浪费还易产生非特异性扩增。由图 4 可以看出, 扩增出的谱带在种群 1、种群 4 及种群 2、种群 3 之间出现了两种格局, 但无论是哪种格局, 都可以看出泳道 4 获得了清晰、稳定的多样化谱带。因此, 本实验确定  $2.5\ \text{U}$  为黑翅土白蚁 ISSR-PCR 反应体系中 TaqDNA 聚合酶的最佳用量。



左至右 1~5 泳道代表的 Taq 酶用量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 和  $3.0\ \text{U}$ ; M: marker, DL2000

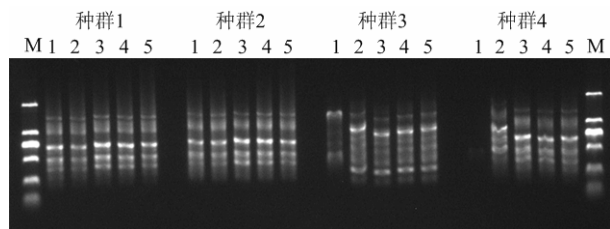
Lanes of 1 to 5 represent the results using Taq DNA polymerase of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and  $3.0\ \text{U}$ , respectively

图 4 TaqDNA 聚合酶浓度对 4 个种群 ISSR 扩增的影响

Figure 4 The effect of concentration of TaqDNA polymerase on the electrophoregram of ISSR-PCR for four populations

### 2.5 模板对 ISSR-PCR 结果的影响

模板 DNA 的量与纯化程度也是 PCR 成败的关键环节之一。由图 5 可见, 在所选模板 DNA 浓度的范围内 ( $5、10、20、30$  和  $40\ \text{ng}$ ) 均可扩增出较为稳定的带谱 (除种群 4 泳道 1 外)。综合考虑结果的稳定性及尽量节约使用模板等因素, 确定在白蚁 ISSR-PCR 反应体系中选用  $20\ \text{ng}$  作为模板 DNA 的适宜浓度。



从左至右 1~5 泳道代表的模板用量分别为 5、10、20、30 和  $40\ \text{ng}$ ; M: marker, DL2000

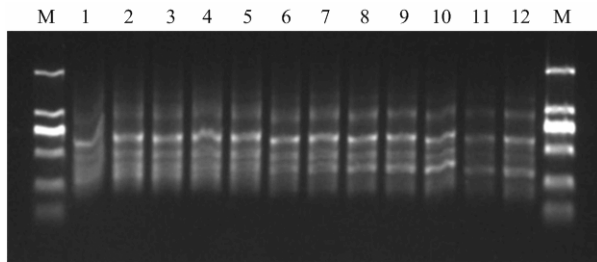
Lanes of 1 to 5 represent the results using template amount of 5, 10, 20, 30 and  $40\ \text{ng}$ , respectively

图 5 模板量对 4 个种群 ISSR 扩增的影响

Figure 5 The effect of template concentration on the electrophoregram of ISSR-PCR for four populations

## 2.6 退火温度对 ISSR-PCR 结果的影响

退火温度的高低对 PCR 产物的影响也是至关重要的。较低的温度会使引物与模板错配,产生非特异性条带,而较高的退火温度则会抑制引物与模板结合。从图 6 可以看出,当退火温度为 46.0~52.5℃时,扩增的条带数目多、带型清晰、亮度适当,而退火温度处于 53.8~54℃时,某些条带的亮度减弱且模糊,一些大的片段扩增缺失;故而综合考虑,最适退火温度定为 52℃。



1~12 泳道代表的温度分别为 46℃、46.5℃、47℃、47.7℃、48.8℃、49.8℃、50.5℃、51.5℃、52.5℃、53.3℃、53.8℃和 54℃; M: marker, DL2000

Lanes of 1 to 12 represent the results under annealing temperature of 46, 46.5, 47, 47.7, 48.8, 49.8, 50.5, 51.5, 52.5, 53.3, 53.8 and 54 °C, respectively

图 6 退火温度对 ISSR 扩增的影响

Figure 6 The effect of annealing temperature on the electrophoregram of ISSR-PCR

## 3 小结与讨论

ISSR-PCR 结果受多种因素的影响,如模板 DNA、*Taq* 酶、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、引物浓度以及退火温度等。在研究时,应针对不同的物种筛选反应条件,优化和建立反应体系。由于 ISSR 引物具有重复序列的特殊性,导致了该种引物与目标序列结合过程中会出现滑动和不均等交换现象,使得对不同品种进行 ISSR 分析时容易出现较大差异的现象,所以必须要针对某一研究对象进行反应体系的优化,建立稳定性好、重复性高的最优体系进行 ISSR 扩增。

基于 ISSR-PCR 分子标记的研究,反应体系的

建立与优化是研究的第一步,这关系着后续试验能否顺利进行并获得理想的结果。本试验首先采用单因子设计筛选出可扩增出条带的 PCR 反应体系,然后结合单因子设计进一步优化体系,简单快速地建立黑翅土白蚁 ISSR-PCR 反应体系,得到稳定且多态性丰富的扩增谱带。试验表明,改变各个因子浓度,在一定浓度范围内对 ISSR-PCR 具有一定的影响。最终,通过单因子试验得到优化的黑翅土白蚁 ISSR-PCR 反应体系为, dNTPs  $0.20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $Mg^{2+}$   $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、*Taq* 酶 2.5 U、引物  $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、模板 DNA 20 ng。该稳定的 ISSR-PCR 反应体系可以为白蚁种群遗传多样性分析、亲缘关系分析以及物种鉴定等方面提供研究平台。

## 参考文献:

- [1] 徐一忠,施必青,王静儿,等. 我国白蚁研究文献分析[J]. 浙江林学院学报, 2003(2): 187-193.
- [2] 薛德钧,王秀丽. 黑翅土白蚁的化学成分研究[J]. 中草药, 2006(7): 989-990.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [4] Houda C K, Marghali S, Marrakchi M, et al. Genetic diversity of *Sulla* genus (*Hedysarea*) and related species using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2007, 35: 682-688.
- [5] Long Y H, Xiang H, Xie L, et al. Intra- and interspecific analysis of genetic diversity and phylogeny of termites (*Isoptera*) in east China detected by ISSR and COII markers[J]. Sociobiology, 2009, 53(2): 411-430
- [6] 金则新,李均敏. 珍稀濒危植物夏蜡梅遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用生态学报, 2007, 18(3): 247-253.
- [7] 梁红蕾,鲍传和,蒋业林,等. 中华鳖两个地理种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(1): 31-35.
- [8] 李鲲鹏,王承芳,黄勃. 中国部分地区冠耳霉的遗传多样性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(2): 238-243.
- [9] 龙雁华. 高等培菌白蚁高效利用木质纤维素的机理研究[D]. 安徽农业大学, 2009.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.