

坛紫菜 ISSR 反应体系的建立与优化

纪德华, 谢潮添, 陈昌生, 徐燕, 张元, 刘冰

(集美大学水产学院, 福建厦门 361021)

摘要: 为了利用 ISSR 分子标记技术对坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 种质资源进行遗传分析及种质鉴定, 获得清晰稳定、重复性好、多态性高的扩增结果, 对影响 ISSR-PCR 扩增的多个因素, 包括 DNA 模板含量、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶含量、引物浓度、dNTP 浓度以及复性温度进行了全面比较和优化, 建立了坛紫菜种质资源 ISSR-PCR 扩增的最佳反应体系: 25 μ L 的反应体系中含 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 5 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 200 nmol/L 引物, 200 μ mol/L dNTP。最佳 PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。

关键词: 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*); ISSR; 实验条件; 优化

中图分类号: S 917.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0020-05

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 是我国特有的暖温带性品种, 是福建、浙江和广东沿海人工养殖的重要经济红藻, 其产量约占全国紫菜总产量的 80% 左右。以往紫菜的分类主要是依靠形态学的方法, 然而由于大多数形态性状受环境因素影响大, 可描述的特征有限, 已经很难满足紫菜种质鉴定和良种选育的要求。分子标记技术的出现给这一问题的解决带来了契机, 它直接在 DNA 水平上标记检测基因组的遗传变异, 不受发育时期和环境因素的影响, 数量丰富且多态性好, 已经广泛应用于高等植物的种质鉴定中^[1]。近年来, 陈昌生等^[2-4] 分离和培养出了多个生长快、品质优、抗病力强、光泽性好、产量高的坛紫菜新品系, 建立了坛紫菜种质资源库。进一步的工作就是要建立分子水平的种质鉴定技术, 利用分子手段管理种质库, 逐步探索分子标记辅助坛紫菜育种技术, 为坛紫菜栽培业的健康、持续发展奠定基础。

简单序列重复区间扩增多态性 ISSR (inter-simple sequence repeat) 是由 Zietkiewicz 等^[5] 在 SSR 标记基础上发展起来的一种新型分子标记技术, 具有 DNA 样品用量少, 操作简单, 无需预先知道受试基因组序列, 结果记录方便, 实验成本低, 且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 实验重复性好等优点, 已经广泛用于植物遗传多样性分析、指纹图谱绘制、品种鉴定、进化及分子生态学研究^[6]。但迄今为止, ISSR 用于海藻研究的报道还很少, 国内仅见用 ISSR 技术对几个江蓠属海藻的遗传变异进行分析的报道^[7,8]。虽然 ISSR 标记具有以上优点, 但它也是基于 PCR

技术的一种分子标记技术, 最终结果易受到多种因素的干扰, 如模板 DNA、引物、dNTP、*Taq*ase、 Mg^{2+} 浓度以及复性温度等。因此, 为确保 ISSR 分析结果的可靠性和重复性, 进行反应体系的优化是非常必要的。本研究详尽探讨了影响 ISSR 扩增的各项实验参数, 建立了重复性好, 结果清晰、稳定的坛紫菜种质 ISSR 分析实验体系, 为进一步利用该标记技术研究坛紫菜种质的遗传多样性及分子标记辅助坛紫菜育种奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

本实验采用的坛紫菜自由丝状体样本均为集美大学坛紫菜种质改良与应用实验室选育、纯化并保存于福建省坛紫菜种质资源库中的品系, 其培养温度为 20 $^{\circ}$ C, 光照强度 1 000~1 500 lx, 光暗周期为 12 h: 12 h。

DNA 提取所用生化试剂均购置于上海生工生物工程有限公司, 而 PCR 扩增所需试剂均由大连宝生物工程有限公司提供。所采用的引物依据加拿大

收稿日期: 2006-06-16; 修回日期: 2007-03-19

基金项目: 福建省科技重大专项资助项目(2004NZ03); 厦门市科技局资助项目(3502Z20041051); 厦门市海洋与渔业局资助项目

作者简介: 纪德华(1976), 男, 山东胶州人, 助研, 主要从事水产增养殖的研究, 电话: 0592-6182643, E-mail: dhji@jmu.edu.cn; 陈昌生, 通讯作者, 教授, 主要从事水产增养殖和育种技术的研究, 电话: 0592-6182643, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

哥伦比亚大学设计的 ISSR 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

收集培养液中培养的各品系自由丝状体用滤纸吸干后,取 0.5 g 置于微型匀浆机中进行高速匀浆,然后采用传统的 CTAB 法^[9]稍作改良后进行 DNA 的提取和纯化,在 1.0% 的琼脂糖胶电泳中检查所提取 DNA 的完整性,并在 Beckman DU-600 核酸蛋白紫外分析仪上测定 DNA 浓度。

1.2.2 实验处理

按照预实验结果及 PCR 反应的一般规律,对影响 ISSR-PCR 扩增的主要参数设置了以下不同处理:反应体系为 25 μ L,其中 DNA 模板设 0.5, 1, 5, 10, 30, 50, 100 ng 7 个梯度;引物设 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L 5 个梯度; dNTP 设 50, 100, 200, 400, 600 μ mol/L 5 个梯度; Mg^{2+} 设 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.5 mmol/L 7 个梯度; *Taq* DNA 聚合酶设 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2 U 共 5 个梯度; PCR 反应中的复性温度依据引物 T_m 值设 46, 48, 50, 52, 54, 56 $^{\circ}C$ 6 个梯度。

1.2.3 ISSR-PCR 反应及产物检测

以提取的坛紫菜自由丝状体基因组 DNA 为模板, 821 为引物, 分别对 1.2.2 中设定的各参数进行 ISSR-PCR 反应优化。根据大量预实验结果, 在进行梯度实验时, ISSR-PCR 反应体系中除需优化的参数外, 其余各参数均按最佳浓度进行。PCR 扩增程序参照 Tsumura^[10] 的体系: 94 $^{\circ}C$ 预变性 7 min; 每个循环 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 复性温度下退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 共进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}C$ 再延伸 7 min。PCR 反应在美国 MJ 公司的 PTG-200 型 PCR 仪上进行, 扩增后 PCR 产物置于 4 $^{\circ}C$ 保存。

最后取扩增产物 6 μ L 在 1.5% 琼脂糖胶中电泳, 经 EB 染色后在紫外灯下观察结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取的基因组 DNA 呈白色或无色絮状沉淀, 电泳显示条带清晰完整, 无明显降解(图 1)。紫外分光光度计分析结果表明纯度较高, A_{260}/A_{280} 值都在 1.7 左右, 完全能满足 ISSR 扩增的要求。

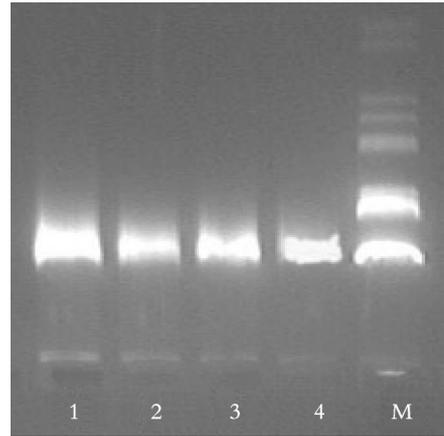


图 1 坛紫菜基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Patterns of *P. haitanensis* genomic DNA
1~ 4. 基因组 DNA; M. 分子质量标记
1~ 4. genomic DNA; M. DNA marker

2.2 ISSR-PCR 反应参数的优化

2.2.1 模板 DNA 含量的优化

DNA 模板的含量是制约扩增产物得率及特异性的一个重要因子, 本实验设置了 7 个梯度的模板含量, 即在 25 μ L 的反应体系中, 用于 PCR 扩增的模板 DNA 含量分别为 100, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 ng。图 2(1~ 7) 中显示了不同模板含量的 ISSR-PCR 扩增结果。从图 2 中可以看出, 模板 DNA 的含量对 ISSR 扩增结果具有显著影响, 在模板含量为 0.5 和 1 ng 时, PCR 无扩增结果或扩增条带数很少; 在 5 和 10 ng 时, 扩增出了基本相同的带型; 而在 DNA 含量大于 30 ng 时, PCR 扩增结果则随着模板 DNA 含量的增加, 条带数减少, 谱带也逐渐模糊, 这可能是因为 DNA 模板量的增加, 使得反应体系中由模板带入的抑制 PCR 反应的物质也同样增加, 抑制了 PCR 反应的进行。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度的优化

Mg^{2+} 浓度是 ISSR-PCR 反应的一个主要变化因素, 是 DNA 聚合酶的辅助因子, 在多数情况下, 低 Mg^{2+} 浓度会造成 DNA 聚合酶活力的下降, 使扩增效率降低, 而较高的 Mg^{2+} 浓度虽然可以增加产量, 但也会增加非特异性扩增, 降低反应的忠实性。为了确定最佳浓度本实验设置了 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.5 mmol/L 7 个梯度的 Mg^{2+} 浓度, 图 2(8~ 14) 显示了不同 Mg^{2+} 浓度下 ISSR-PCR 的扩增结果。从图 2 中可以看出, 在浓度为 0.5 mmol/L 时, PCR 无扩增结果; 在浓度为 1.0~ 2.5 mmol/L 时, PCR 扩增出了基本相似的带型, 其中又以 2.5 mmol/L 时, 条带最为清晰、完整; 而在浓度大于 3.0 mmol/L 时, PCR 非特异性扩增条带明显增加,

且谱带模糊。

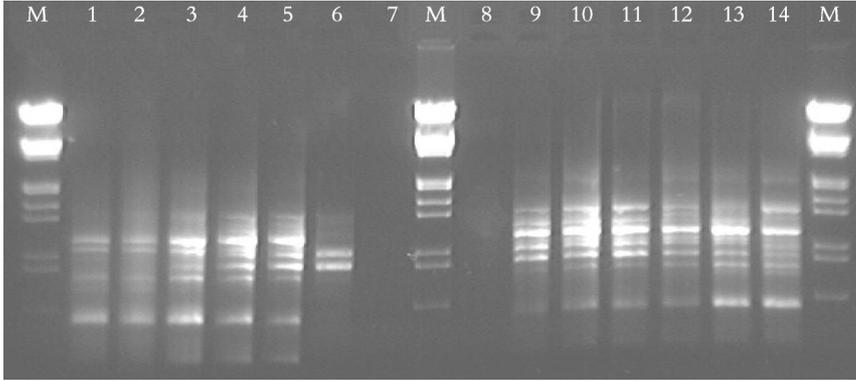


图2 不同模板 DNA 含量和 Mg^{2+} 浓度 ISSR-PCR 扩增结果

Fig.2 The results of ISSR amplification with different amounts of template DNA (1~ 7) and different concentrations of Mg^{2+} (8~ 14)

1~ 7. 100, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 ng 模板 DNA; 8~ 14. Mg^{2+} 浓度 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.5 mmol/L; M. 分子质量标记

1~ 7. 100, 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 ng template DNA; 8~ 14. 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.5 mmol/L Mg^{2+} ; M. DNA marker

2.2.3 DNA 聚合酶含量的优化

在 ISSR-PCR 反应体系中, DNA 聚合酶含量直接影响扩增反应的成功与否。很多实验都已经表明, 不同厂家、不同批次、不同用量的 DNA 聚合酶均会造成 PCR 扩增结果的明显不同。本实验使用的 DNA 聚合酶均为购自大连宝生物工程有限公司同一批次的 DNA 聚合酶, 在 DNA 聚合酶的用量上, 25 μ L 的反应体系中, 设置了 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2 U 共 5 个梯度的反应, 结果如图 3(1~ 5) 所示。由图中可以看出在 DNA 聚合酶含量为 0.25 和 0.5 U 时, PCR 扩增结果条带数很少; 在 1.0 和 1.5 U 时, PCR 扩增出了基本相似的带型, 但以 1.5 U 时, 带型较为清晰完整; 在 2.5 U 时, 虽然

PCR 扩增结果条带也清晰完整, 但出现了较多的非特异性扩增条带。

2.2.4 引物浓度的优化

引物浓度对 PCR 结果的带型会产生明显影响, 为了减少非特异性扩增, 保证实验的重复性, 本实验设置了 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L 5 个梯度来考察引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响, 结果如图 3(6~ 10) 所示。从图中可以看出, 在引物浓度为 25 和 50 nmol/L 时, PCR 扩增无结果或扩增条带很少; 在浓度为 100 和 200 nmol/L 时, PCR 扩增出了基本相似的谱带, 但以 200 nmol/L 条件下扩增出的谱带比较清晰完整; 当引物浓度增加为 400 nmol/L 时, PCR 扩增结果出现了明显的非特异性条带。

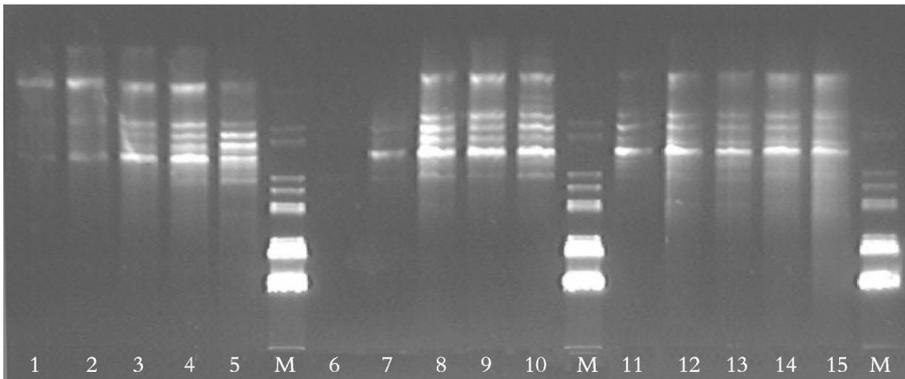


图3 不同 DNA 聚合酶浓度、引物及 dNTP 浓度 ISSR-PCR 扩增结果

Fig.3 The results of ISSR amplification with different amounts of *Taq*DNA polymerase, different concentrations of primers and different concentrations of dNTP

1~ 5. 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2 U DNA 聚合酶; 6~ 10. 引物浓度 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L;

11~ 15. dNTP 浓度 50, 100, 200, 400, 600 μ mol/L; M. 分子质量标记

1~ 5. 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2 U *Taq*DNA polymerase; 6~ 10. 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L primers;

11~ 15. 50, 100, 200, 400, 600 μ mol/L dNTP; M. DNA marker

2.2.5 dNTP 浓度的优化

dNTP 是 PCR 反应的原料, 浓度过高过低均会造成扩增结果的变化, 为了确定 dNTP 的最佳浓度, 作者设定了 50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{mol/L}$ 5 个浓度梯度, 结果如图 3(11~15) 所示。从图中可以看出在 dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, ISSR-PCR 反应能得到背景清晰, 稳定完整的条带; 在 dNTP 浓度为 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 虽然背景也比较清晰, 但扩增条带数较少; 而在 dNTP 浓度为 400 和 600 $\mu\text{mol/L}$, PCR 扩增结果背景模糊, 而且条带数也减少了。dNTP 浓度提高, 扩增结果条带数反而减少的可能原因是 dNTP 浓度的增加, 结合了较多的 Mg^{2+} , 导致游离 Mg^{2+} 浓度降低, 从而引起 DNA 聚合酶活性下降的结果。

2.2.6 复性温度的优化

复性温度是 PCR 反应中的一个关键参数, 它决定着引物同目的序列能否有效退火, 使 PCR 反应得到准确、稳定的扩增。为了确定坛紫菜 ISSR-PCR 扩增的最佳复性温度, 作者以引物 T_m 值为依据, 设定了 46, 48, 50, 52, 54, 56 $^{\circ}\text{C}$ 6 个温度梯度。实验结果如图 4 所示。从图中可以看出在复性温度为 48 $^{\circ}\text{C}$ 时, PCR 扩增结果背景清晰, 条带稳定完整; 在 46 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, PCR 结果背景模糊, 条带也不清晰; 而在复性温度高于 48 $^{\circ}\text{C}$ 时, PCR 扩增结果条带逐渐减少, 甚至完全消失。

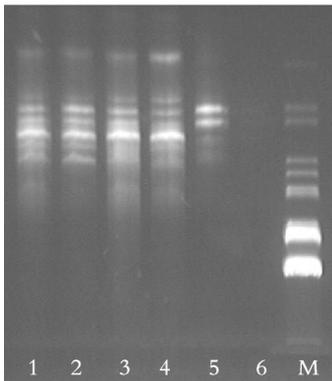


图 4 不同复性温度 ISSR PCR 扩增结果

Fig. 4 The results of ISSR amplification with different annealing temperatures

1~ 6. 复性温度分别为 46, 48, 50, 52, 54, 56 $^{\circ}\text{C}$; M. 分子质量标记
1~ 6. each annealing temperature is 46, 48, 50, 52, 54, 56 $^{\circ}\text{C}$;
M. DNA marker

3 讨论

从上述的实验结果中可以看出影响 ISSR 实验结果的因素很多, 为了利用这一分子标记进行遗传多样性分析及分子标记辅助育种, 获得重复性和可

靠性较高的 ISSR 结果, 提高分析的准确性, 非常有必要对各个影响因子进行全面优化, 筛选出最佳的适合于坛紫菜种质资源 ISSR 分析的条件。

DNA 模板是 PCR 反应的底物, 是 PCR 成功的先决条件, 由于 PCR 反应中对模板浓度要求的范围较宽, 一般每个反应中 1~ 500 ng DNA 都能提供好的结果, 因此, 很多研究者认为在具体实验时可以不把模板 DNA 含量作为重点优化的参数^[11]; 而且冯富娟等^[12]在红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) ISSR-PCR 实验中认为纯度不会影响 ISSR 的扩增结果。因此模板 DNA 在 ISSR 反应中的优化经常被忽略。但是实际情况并非如此, 当模板 DNA 纯度不高时, 模板 DNA 的用量同样会对 ISSR 扩增结果产生重要影响, 因为过量的不纯 DNA 模板中同样含有过量的抑制 PCR 扩增的物质, 如多糖、蛋白质等, 当这些物质超过一定量, 就会导致 PCR 扩增的失败。本实验中的坛紫菜样品, 由于含有较高的多糖, 在 DNA 抽提时很难完全去除干净, 再加上紫菜细胞中又含有较高的 DNase^[13], 为了防止后期 DNA 的降解, 在采用改良 CTAB 法提取模板 DNA 时, 必须加入过量的 EDTA 来抑制 DNase 的活性, 而 EDTA 却是 PCR 扩增的抑制物, 所以在进行坛紫菜 ISSR 反应条件优化时, 必须重点优化 DNA 模板含量, 否则模板含量过低, PCR 反应底物不足会引起扩增失败, 含量过高, 同时带入的多糖和 EDTA 等物质同样会引起 PCR 扩增的失败。Zhou 等^[14]用红花中国莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) DNA 进行 RAPD 扩增时认为, 模板浓度过高时, 扩增结果会丢失大部分条带。本实验的优化结果表明, 在进行坛紫菜 ISSR-PCR 扩增时最佳的模板 DNA 用量为 5 ng。

Mg^{2+} 浓度影响 PCR 的多个方面, 不仅影响 DNA 聚合酶的活性, 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等^[15]。因此不同的反应体系所需要的最佳 Mg^{2+} 浓度存在着较大的差异, 在一般的 PCR 反应中, 1.0~ 2.5 mmol/L 是较为合适的 Mg^{2+} 浓度范围^[16], 本实验所优化得到的 Mg^{2+} 浓度范围同其是一致的, 但以 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时为最佳。

在 PCR 反应中, DNA 聚合酶的种类及使用量直接决定扩增反应的结果: 使用高浓度的 DNA 聚合酶不仅增加成本, 而且也容易产生非特异性条带; 而 DNA 聚合酶浓度过低, 又会导致产物的合成效率下降; 并且不同厂家、不同批次的 DNA 聚合酶也存在着一定的差异^[17]。因此, 在具体实验中必须根据节约成本并得到最佳扩增的原则对 DNA 聚合酶用量进行优化, 而且为了减少实验误差, 应尽量使用同一厂家同一批次的产品, 只有这样才能对 PCR 扩增结果进行准确的评价和分析。本实验的优化结果表

明,在坛紫菜 ISSR-PCR 反应中,最佳的 DNA 聚合酶用量为 1.5 U。

引物浓度的不同同样会造成 PCR 扩增结果带型的差异:浓度过低,引物与模板 DNA 的结合位点少,扩增产量下降,并且有可能出现 smear 现象;浓度过高会导致碱基错配和非特异性反应的发生,还易形成引物二聚体^[15]。一般在 PCR 扩增时,最佳的引物浓度为 50~400 nmol/L^[18],本实验的优化结果表明坛紫菜 ISSR-PCR 反应中,最佳的引物浓度为 200 nmol/L。

dNTP 是 ISSR-PCR 反应的原料,dNTP 浓度过高,会导致 PCR 过程错配率的增加,从而出现非特异性条带,有时过量的 dNTP 也会结合较多的 Mg^{2+} ,在 Mg^{2+} 含量较低时,使 PCR 扩增出现假阴性结果;而浓度过低,又会影响 DNA 合成效率,甚至会因过早的消耗而使产物单链化,影响扩增效果^[15]。在常规 PCR 反应中,dNTP 浓度在 50~200 μ mol/L 的范围是比较合适的浓度范围^[18]。本实验优化结果表明坛紫菜 ISSR 扩增中 dNTP 的最佳浓度是 200 μ mol/L。

在同一 PCR 反应系统中,复性温度不同,扩增结果会出现很大的差异:较低的温度在保证引物与模板结合稳定性的同时,也会使引物与模板之间未完全配对的一些位点得到扩增,即产生一定的非特异性扩增;而太高的温度又会造成引物与模板无法发生有效的退火,导致扩增失败^[15]。因此,在具体实验时,必须在允许的范围内,选择较高的复性温度减少引物和模板之间的非特异性结合,提高 PCR 反应的特异性,同时又可以避免发生假阴性结果。在一般 PCR 反应中复性温度一般设定为比引物 T_m 值低 5~10℃^[16]。而且不同的引物,由于 T_m 值不同,最佳的复性温度也不同,在本实验中,为了避免对不同引物分别优化最佳复性温度的麻烦,提高 ISSR-PCR 反应的可操作性,综合 T_m 值和复性温度的优化结果,统一将坛紫菜 ISSR-PCR 扩增反应中的复性温度定为 48℃。

综上所述,经过优化,坛紫菜 ISSR-PCR 扩增反应的最佳反应体系是:25 μ L 的反应体系中含 2.5 μ L 10×PCR Buffer,5 ng 模板 DNA,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,1.5 U DNA 聚合酶,200 nmol/L 引物,200 μ mol/L dNTP。最佳 PCR 扩增程序为:94℃预变性 7 min;每个循环 94℃变性 1 min,48℃复性 45 s,72℃延伸 2 min,共进行 35 个循环;循环结束后 72℃再延伸 7 min。作者利用此优化系统对本实验室选育、纯化和保存的坛紫菜不同色泽丝状体进行了 ISSR 遗传变异分析,获得了清晰稳定,重复性好,多态性高的 DNA 谱带。

参考文献:

[1] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用

[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

- [2] 陈昌生,纪德华,叶红莲,等.坛紫菜自由丝状体的 γ 射线辐照及培养的研究[J].台湾海峡,2005,24(2): 165-170.
- [3] 纪德华,陈昌生,郑伟刚,等. $^{60}Co\gamma$ 射线辐照坛紫菜叶状体及单克隆培养的研究[J].台湾海峡,2005,24(2): 171-177.
- [4] 陈昌生,纪德华,王秋红,等.坛紫菜丝状体种质保存技术的研究[J].水产学报,2005,29(6): 745-750.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. **Genome**, 1994, 20: 178-183.
- [6] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. **Euphytica**, 2002, 128: 9-17.
- [7] 孙雪,张学成,茅云翔,等.几种江蓠属海藻的 ISSR 标记分析[J].高技术通讯,2003,9: 89-93.
- [8] 李文红,姚建亭,王继成,等.龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析[J].海洋与湖沼,2005,36(3): 241-247.
- [9] 克拉拉克.植物分子生物学实验手册[M].顾红雅译.北京:高等教育出版社,1997.
- [10] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of intersimple sequence repeat polymorphisms in douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. **Theor Appl Genet**, 1996, 92: 40-45.
- [11] 席嘉宾,郑玉忠,杨中艺.地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化[J].中山大学学报(自然科学版),2004,43(3): 80-84.
- [12] 冯富娟,王凤友,刘彤.红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J].植物学通报,2004,21(3): 326-331.
- [13] Yuzuru M, Hishoshi K, Masahiko K. Effect of DNA preparation from laver thalli on reproducibility of RAPD patterns [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1998, 10: 23-29.
- [14] Zhou Y P, Cai M L, Wang X D, et al. RAPD analysis of germplasm in ancient "Taizi lotus" and modern Chinese lotus [J]. **Acta Bot Sin**, 1998, 40(2): 163-168.
- [15] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M].黄培堂,俞炜源,陈添弥,译.北京:科学出版社,2003.
- [16] LU S D. Current Protocols for Molecular Biology [M]. Beijing: Beijing Peking Union Medical College Press, 1999. 458-463.
- [17] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.
- [18] 王延华,景强, Dubus P. PCR 理论与技术[M].北京:科学出版社,2005.

(下转第 29 页)

Establishment and optimization of ISSR reaction system for *Porphyra haitanensis*

Ji De-hua, XIE Chao-tian, CHEN Chang-sheng, XU Yan, ZHANG Yuan, LIU Bing

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Jun. , 16, 2006

Key words: *Porphyra haitanensis*; inter simple sequence repeat (ISSR); experimental conditions; optimization

Abstract: *Porphyra haitanensis* is the most economically important seaweeds in south China. The factors which affect the ISSR analysis in the study of the genetic diversity and variety identification of *P. haitanensis*, such as the amount of template DNA, *Taq* DNA polymerase, primers concentration, Mg^{2+} concentration, dNTP concentration and annealing temperature, were studied for optimizing conditions of the ISSR-PCR. The results showed that the optimal conditions being suitable for ISSR-PCR of *P. haitanensis* were as follows: 25 μ L reaction system containing 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 5 ng template DNA, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U *Taq* DNA polymerase (produced by Takara company), 200 nmol/L primers and 200 μ mol/L dNTP. With an MJ thermal cycle optimal amplification program was 1 cycle of 7 min at 94 $^{\circ}$ C; 35 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 48 $^{\circ}$ C, and 2 min at 72 $^{\circ}$ C; 1 cycle 7 min at 72 $^{\circ}$ C, using block control style. All these results provided a standardizing ISSR-PCR program for the analysis of genetic diversity and variety identification of *P. haitanensis*.

(本文编辑: 张培新)