

## ISSR 实验过程中常见问题及解决方法

卢超<sup>1</sup>, 艾伦强<sup>1</sup>, 何银生<sup>1</sup>, 刘海华<sup>1</sup>, 周武先<sup>1</sup>, 段媛媛<sup>1</sup>, 程天周<sup>2</sup>, 张美德<sup>1\*</sup> (1. 湖北省农业科学院中药材研究所/湖北省农业科技创新中心中药材分中心, 湖北恩施 445000; 2. 恩施程丰农业综合开发有限公司, 湖北恩施 445000)

**摘要** ISSR(inter simple sequence repeat)分子标记是基于PCR技术发展起来的一种多态性检测技术,具有操作简单、多态性和重复性好等优点,近年来已广泛用于植物遗传多样性、亲缘关系等方面研究。该研究对ISSR-PCR实验过程中常遇到的一些问题,如条带拖尾、有无、扭曲等问题进行了分析总结,并提出了相应的解决方法供参考。

**关键词** ISSR; 常见问题; 分析; 解决方法

中图分类号 Q37 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)27-0091-04

### Troubleshooting Analysis in ISSR Experiment

LU Chao, AI Lun-qiang, HE Yin-sheng et al (Institute of Chinese Herbal Medicine, Hubei Academy of Agricultural Science/Hubei Provincial Agricultural Science and Technology Innovation Center, Chinese Medicine Branch, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract** ISSR (inter simple sequence repeat) marker is a PCR-based technique aiming to detect polymorphism in DNA, which features easy-to-operate, abundant polymorphism and robust reproducibility. To date, ISSR has been widely used in plant genetic diversity and phylogenetic relation study. In this paper, we summarized some problems frequently occurred in ISSR experiment and gave relevant suggestions to solve these problems as reference.

**Key words** Inter simple sequence repeat (ISSR); Frequently asked question(FAQ); Analysis; Solution

ISSR(inter simple sequence repeat)分子标记是以植物中广泛存在的微卫星序列为基础,开发出以简单重复序列为单引物进行多位点PCR扩增的检测技术。该标记的首要特点就是引物设计无需预知分析物种的基因组序列,能够直接扩增2个序列相同但方向相反的反向重复序列之间的DNA片段。ISSR技术具有操作简单,且同时综合了其他分子标记多态性好、可重复性、低成本以及无需知道基因组序列等优点。由于植物基因组中微卫星广泛分布,且等位变异特别丰富,采用ISSR扩增条带多态性较丰富,因此被认为是一种理想的遗传标记。

近年来,ISSR标记已经被广泛用于品种鉴定和种质资源收集<sup>[1-4]</sup>、遗传作图、基因定位及标记辅助选择<sup>[5-7]</sup>、遗传多样性和系统进化关系<sup>[8-9]</sup>以及短重复基序丰度预测及辅助设计SSR引物<sup>[10-12]</sup>。但是,在ISSR标记技术的应用过程中,从样品采集、DNA提取、引物筛选与PCR扩增到凝胶电泳检测均存在一些操作误区和局限性,从而对扩增结果及最终的数据分析产生不利影响。迄今为止,针对ISSR扩增结果不理想的研究大多集中于ISSR-PCR反应体系构建与优化,鲜有涉及ISSR整个过程存在问题的分析报道。笔者结合多年ISSR操作中遇到的各种问题进行分析,为其他实验人员进行ISSR研究提供参考。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料与试剂** 试验材料为川续断,采于湖北恩施市三岔乡、新塘镇、中营镇、宜昌市五峰县等地。选取新鲜幼嫩叶

片纯水洗净后装袋, -20℃冰箱保存备用。

核酸染料购自天恩泽;Taq Master Mix 购于北京康为世纪生物科技有限公司;PCR仪由BioRAD公司生产;电泳仪以及凝胶成像系统均购自北京六一生物科技有限公司;SIGMA离心机;岛津紫外可见分光光度计。该试验100条ISSR引物是参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)所设计的引物序列,并交由上海英骏生物技术有限公司合成,试验用引物见表1。

表1 试验用引物序列

Table 1 Primer sequences for test

序号 No.	引物编号 Primer code	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'
1	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG
2	UBC813	CTCTCTCTCTCTCTT
3	UBC818	CACACACACACACAG
4	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG
5	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC

注:R=(A,G)

**1.2 DNA提取** 以中草药川续断的新鲜叶片为材料,采用北京康为世纪生物科技有限公司植物基因组DNA提取试剂盒进行川续断基因组DNA的提取。用1%的琼脂糖初步检测提取DNA的完整性及浓度。紫外分光光度计测定DNA的OD值以及浓度。将提取的DNA经稀释后分装至-20℃冰箱保存备用。

**1.3 ISSR-PCR反应及电泳产物检测** 采用实验室前期优化的ISSR-PCR反应体系:每18μL的反应体系中含有2×Taq Master Mix 10.44μL,模板DNA 45ng。扩增程序:94℃预变性5min;94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸45s(进行40个循环);72℃继续延伸10min;4℃保存。用含有DNA green核酸染料的1%琼脂糖凝胶对PCR扩增产物进行分离,于凝胶成像系统进行拍照保存。

**基金项目** 湖北省农业科学院青年基金项目(2014NKYJ11);湖北省技术创新专项(鄂西民族专项)(2016AKB053);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21)。

**作者简介** 卢超(1986—),男,湖北孝昌人,助理研究员,硕士,从事药用植物遗传育种与栽培研究。\*通讯作者,副研究员,从事中草药资源、栽培、药用植物生理生态研究。

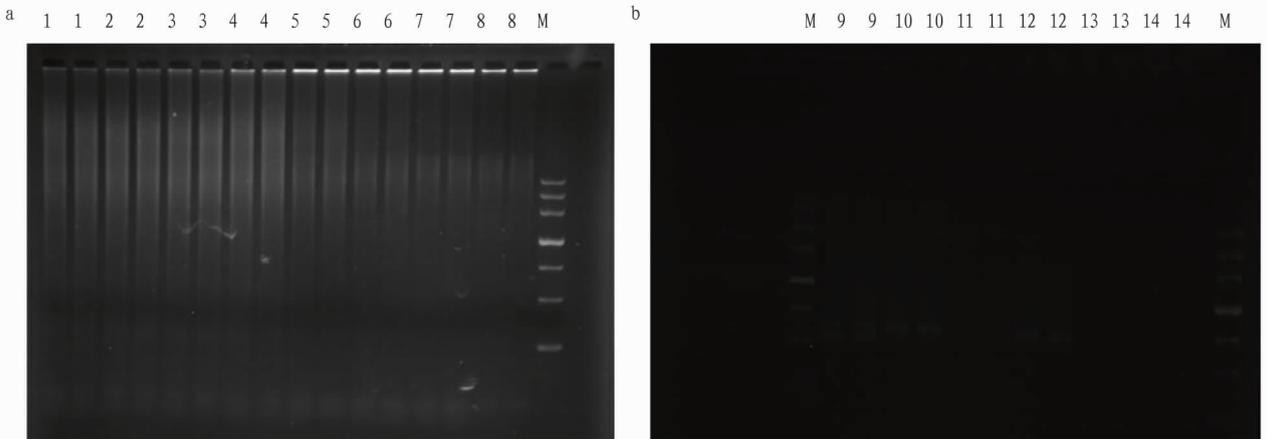
**收稿日期** 2018-05-25

## 2 结果与分析

**2.1 无条带或者条带微弱** 扩增结果如图 1 所示,所用引物均为 UBC813。图 1a 中,除第一泳道的 Marker 以外,其他点样的几个泳道均无任何可见的扩增条带产生,且部分泳道点样孔亮度很高。图 1b 中,除两侧的 Marker 可见外,扩增条带非常微弱,出现上述情况,可能有三方面原因:①ISSR 引物选择不恰当,使得在模板 DNA 上没有合适的互补序列,导致引物无法和模板 DNA 有效结合,扩增后没有产物或仅仅少量的非特异性扩增产物。②引物扩增的片段过大,超过了琼脂糖凝胶的分辨率,使得扩增产物无法在凝胶中有效迁移,进而使 PCR 产物堆积在点样孔无法向正极移动,出现点样孔很亮而相应泳道没有可见的扩增条带的现象。③提取的 DNA 纯度不高,含有未除净的蛋白或抑制 PCR 反应的物质,

或者提取的 DNA 保存不当,出现了降解。

针对上述情况,日常的 ISSR 实验中,在体系优化的基础上,做好以下几方面工作:①针对次生代谢物含量比较丰富的植物物种,尤其是富含酚类物质的物种,应该摸索适宜的基因组 DNA 提取方法或者采用专门的植物基因组 DNA 提取试剂盒,尽量消除酚类物质、蛋白、残留的乙醇等杂质,以免干扰下游 PCR。②由于 ISSR 为随机引物,需针对特定的物种进行引物预筛选,选择合适的引物,以能够扩增出清晰、稳定、重复性好的条带为标准。此外,鉴于 ISSR 引物的随机性以及引物筛选工作量大的问题,可以查阅相关文献,查找与之亲缘关系相近的物种进行 ISSR 分析时采用的引物序列,可以极大地减轻工作量。



注:M 为 Marker,1~14 为引物 UBC813 扩增带

Note:M is Marker,1-14 are amplification bands by primer UBC813

图 1 无条带(a)或者条带微弱(b)

Fig.1 No band or weak band

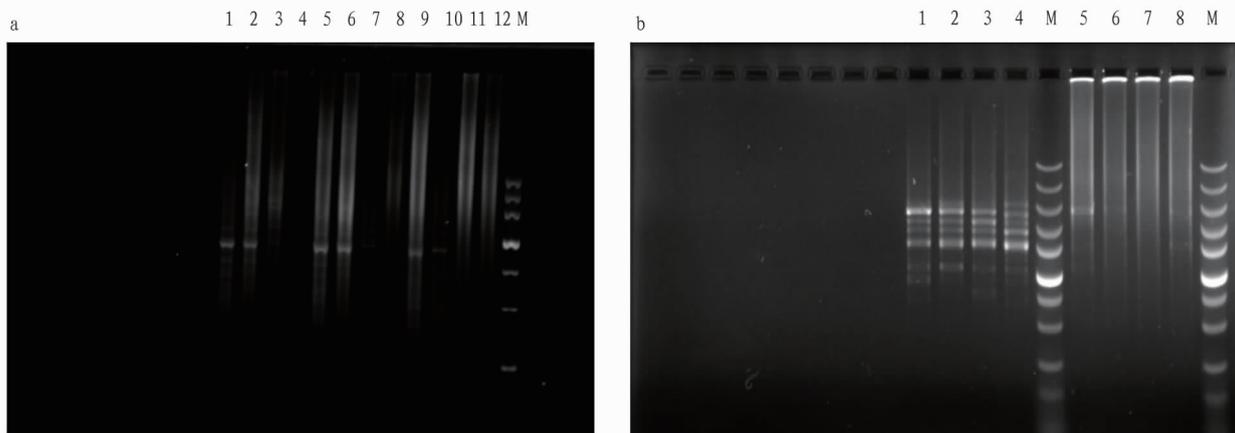
**2.2 条带拖尾** 扩增结果如图 2a 所示,扩增引物为 UBC818,胶图出现非常严重的拖尾现象。造成这种现象的原因主要是:①引物退火温度偏低,一方面 ISSR 反应扩增区域为分布于植物基因组内重复序列之间的片段,重复序列通常间隔较远,导致常规的 PCR 反应不能够扩增出这些特异片段,较低退火温度下 ISSR 部分引物会和这部分重复序列结合,产生长度不一的弥散拖尾条带;另一方面,偏低的退火温度使得引物与重复序列结合位点出现滑动,导致电泳条带模糊不清。②引物浓度偏高,引物内部形成引物二聚体。③PCR 循环次数过多,导致错配。

随后采用同一模板 DNA 和相同的反应体系,更换引物为 UBC824 和 UBC844,分别进行 PCR 扩增,扩增结果见图 2b。从图中可以看出,相同的反应体系下,引物 UBC824 扩增结果呈现为拖尾涂抹,几乎没有可见的主带产生,而 UBC844 扩增结果条带清晰可见,无拖尾现象出现。由于 ISSR 引物本身是随机引物,与模板 DNA 的结合区有很大的不确定性,因此,在 ISSR 扩增结果产生拖尾弥散时,也有可能是所用的引物不适用于该物种的扩增反应,可以考虑更换其他的引物

序列进行 ISSR 扩增分析。

**2.3 条带弯曲** 从图 3a 可以看出,图中左右两侧的 Marker 和中间的扩增条带均出现不同程度的扭曲变形,造成这种现象的原因主要是上样量过大。为验证这一推论,进行一系列上样量梯度试验,从图 3b 可以看出,胶图左边的 5 个泳道条带比较整齐平直,上样量为 2  $\mu$ L,而靠近 Marker 右边的 5 个泳道条带呈现出扭曲月牙形,上样量为 6  $\mu$ L。造成图中条带扭曲的主要原因是上样量过大,上样量过多会造成加样孔超载,从而导致条带扭曲。

**2.4 条带倾斜** 所用扩增引物为 UBC809,PCR 扩增模板为川续断 DNA 模板,从图 4 可以看出,扩增条带明显倾斜,同一分子量的主带不在一条水平线上。造成这种现象的主要原因是电泳过程中,电泳槽没有水平放置,电泳液在胶面上分布不均匀,导致条带在凝胶中所受电场力不一,造成条带倾斜严重。解决的方法是在电泳前,将电泳槽放置在桌面水平的实验台上,同时调整电泳槽的 4 个支脚,使电泳槽液面水平。同时,电泳期间尽量不要晃动台面,避免扰动液面造成电泳液分布不均。

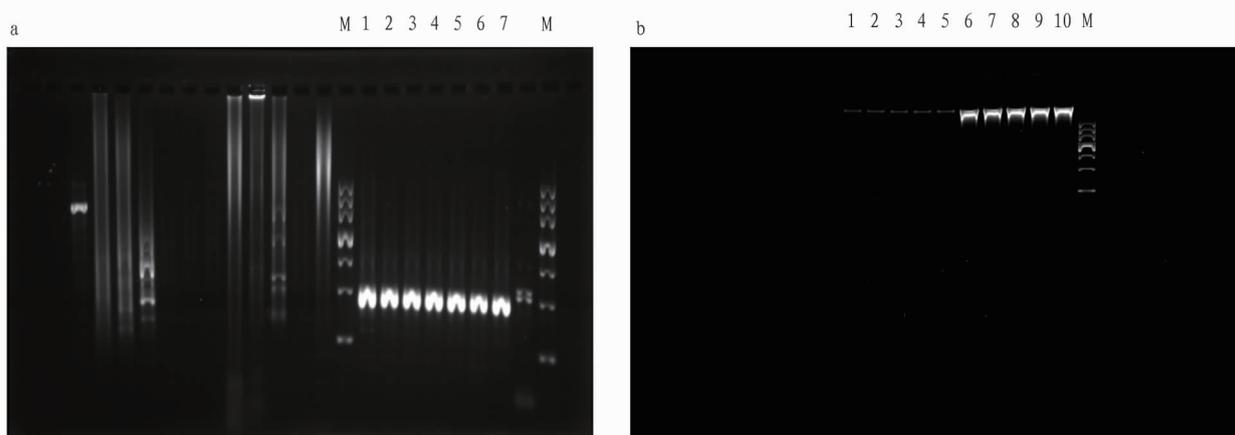


注:图 a 中 M 为 Marker,1~12 为引物 UBC818 扩增带;图 b 中 M 为 Marker,1~4 为引物 UBC844 扩增带,5~8 为引物 UBC824 扩增带

Note:In figure a,M is Marker,1-12 are amplification bands of primer UBC818;in figure b,M is Marker,1-4 are amplification bands of primer UBC844, and 5-8 are amplification bands of primer UBC824

图 2 条带严重拖尾

Fig.2 Severe trailing



注:图 a 中 M 为 Marker,1~7 为 ITS2 扩增片段;图 b 中,M 为 Marker,1~5 为 2  $\mu$ L 上样量,6~10 为 6  $\mu$ L 上样量

Note:In figure a,M is Marker,1-7 are ITS2 amplified fragment;in figure b,M is Marker,1-5 are 2  $\mu$ L loading,and 6-10 are 6  $\mu$ L loading

图 3 条带扭曲变形

Fig.3 Strip distortion

**2.5 条带未跑开** 所用扩增引物为 UBC809,如图 5 所示,ISSR 扩增条带均聚集到一起,互相重叠拖尾,主带也出现了扭曲变形。出现此现象,主要原因:①上样量过大,各个分子量的条带不能有效分离;②电泳条件设置不合理,电泳时电压设置过高导致发热,或者电泳时间不够。

优化与解决方法:①ISSR 扩增产物上样前,应根据点样孔的大小适当调整 PCR 产物的上样体积;②跑胶前,摸索电泳的条件,应根据灌制凝胶的大小,适当延长电泳时间,调整电泳电压,一般凝胶电泳时场强不超过 20 V/cm,过高会导致凝胶过热变形,影响分离效果。

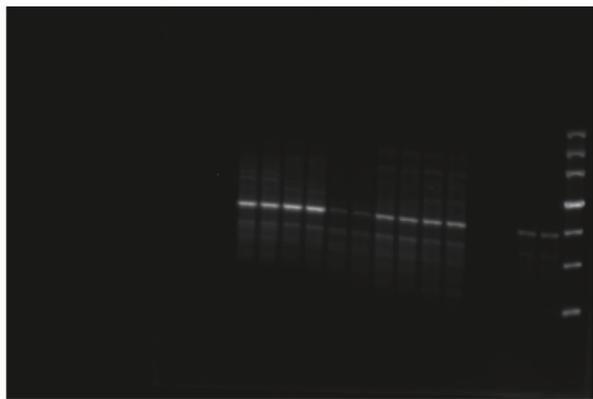
### 3 讨论

ISSR 是基于植物基因组中大量存在的简单重复序列发展起来的一种标记技术,广泛应用于植物的遗传多样性分析与种质资源的鉴定研究<sup>[13]</sup>。目前,查阅大量文献发现大量研究均集中在对 ISSR-PCR 反应体系本身的优化,通过设计正交或者均匀设计试验来优化 PCR 反应各组分的用量,进

而改善 ISSR 扩增条带的清晰度和稳定性。然而,针对在整个 ISSR 实验过程中常存在的一些棘手问题,比如条带扭曲、涂抹带以及条带暗弱的现象,目前还鲜有文献报道以及系统研究。出现这些问题的很大一部分原因不主要是由于反应体系没有优化,还有后期实验操作和参数设置不合理,如琼脂糖电泳电压设置及电泳时间等。该研究针对 ISSR 实验中常见的 5 个问题分别进行了分析讨论,并提出了相应的解决方法。

在 ISSR 实验中,经常出现扩增后的产物电泳后无可见条带或者仅有隐约可见的弱带。由于 ISSR 标记技术无需预知扩增序列信息,与基因组 DNA 结合的位点具有很大随机性,造成这种现象的原因可能比较复杂。常规的 PCR 反应实验中,引物序列都是基于已知目标序列设计出来的,扩增有很强的针对性,因此,出现无扩增条带,一般主要是由于引物设计不合理和退火温度不合适造成的<sup>[14]</sup>。ISSR 扩增结果出现无条带时,可能是所选引物本身就与模板 DNA 没有合

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



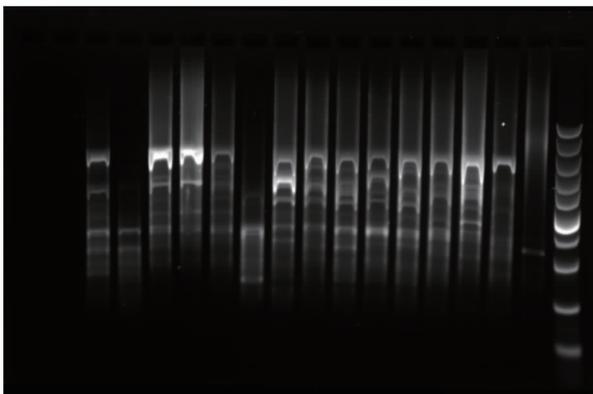
注:M为Marker,1~12为引物UBC809扩增带

Note:M is Marker,1-12 are amplification bands of primer UBC809

图4 条带倾斜

Fig. 4 Strip tilting

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



注:M为Marker,1~15为引物UBC809对15个不同产地川续断基因组DNA的扩增结果

Note:M is Marker,1-15 are the amplification results of primer UBC809 for *Dipsacus asperoides* genome DNA in 15 different habitats

图5 条带未跑开

Fig. 5 Strip does not run away

适的结合位点。因此,ISSR实验前期需要做大量预实验进行引物的筛选工作,筛选出能够扩增出条带的ISSR引物,然后进行PCR反应体系的优化。

ISSR实验中常常会出现条带拖尾现象,一般研究认为,条带拖尾主要是由于PCR反应条件不合适,引物退火温度过低,造成大量的非特异性扩增<sup>[15]</sup>。该实验对这个问题进行了分析,认为在ISSR实验中,拖尾的原因除了常规PCR中退火温度过低以外,引物序列本身可能也是一个原因。ISSR引物序列通常在末端有几个锚定碱基,但是有些锚定碱基可能在模板DNA中不能起到锚定的作用,导致在目标序列附

近滑动,产生一系列大小不一的扩增片段,形成拖尾涂抹状条带。

此外,ISSR反应中,常常伴随产生条带扭曲和未跑开。该研究对这两个现象进行了分析,认为主要是由于点样时,上样量过大和电泳时电压和时间设置不合适造成的。上样量过大,超过了点样孔的负荷,条带不能有效得到分离。电泳时电压过大,容易造成电泳缓冲液和琼脂糖凝胶发热,也会造成条带扭曲变形。此外,电泳时间也需适当延长,电泳时间过短条带仍聚集在一起,没有得到有效分离,也会呈现出聚成一团的扭曲状。总之,ISSR电泳条件需要摸索,根据实验室电泳仪的特点进行调优,电压降低的同时适当延长电泳时间,以指示剂溴酚蓝跑到凝胶2/3处为宜,过长的电泳时间会造成核酸染料漂移,造成小片段的条带暗弱。

## 参考文献

- [1] KUMAR L D, KATHIRVEL M, RAO G V, et al. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays[J]. Forensic science international, 2001, 116(1): 63-68.
- [2] MORENO S, MARTÍN J P, ORTIZ J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm[J]. Euphytica, 1998, 101(1): 117-125.
- [3] TERZOPOULOS P J, KOLANO B, BEBELI P J, et al. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers[J]. Scientia horticulturae, 2005, 105(1): 45-51.
- [4] 黄光文, 陈觉梁, 王伟成, 等. 运用ISSR标记鉴别水稻品种的初步研究[J]. 杂交水稻, 2006, 21(3): 64-67.
- [5] KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers[J]. Theoretical and applied genetics, 1998, 96(1): 37-45.
- [6] DOUCLEFF M, JIN Y, GAO F, et al. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*[J]. Theoretical and applied genetics, 2004, 109(6): 1178-1187.
- [7] HUSSAIN A J, GUPTA V, ALI J, et al. Physiological characterization, genetics and molecular mapping of a new source of temperature sensitive genetic male sterility in rice[C]//Fourth international rice genetics symposium. Philippines: IRRI, 2000: 95.
- [8] NAGAOKA T, OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. Theoretical and applied genetics, 1997, 94(5): 597-602.
- [9] AJIBADE S R, WEEDEN N F, CHITE S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*[J]. Euphytica, 2000, 111(1): 47-55.
- [10] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Theoretical and applied genetics, 1999, 98(5): 780-792.
- [11] HAKKI E E, AKKAYA M S. Microsatellite isolation using amplified fragment length polymorphism markers: No cloning, no screening[J]. Molecular ecology, 2000, 9(12): 2152-2154.
- [12] LIAN C L, ZHOU Z H, HOGETSU T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of Inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. J Plant Res, 2001, 114(3): 381-385.
- [13] 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: 143-146.
- [14] 王英, 邓永强, 张代芬, 等. PCR反应常见问题及对策分析[J]. 中国畜禽种业, 2016(11): 45-46.
- [15] 杨双, 赵江雷, 潘菊, 等. 关于ISSR反应弥散背景消除方法的几点讨论[J]. 生物技术, 2007, 17(3): 42-44.