

青天葵 ISSR-PCR 体系优化及引物筛选

周雨晴^{1,2}, 杜沛霖¹, 傅鹏¹, 谢峰¹, 王跃峰^{2,3}, 朱华^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;
3. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:建立适合青天葵遗传差异分析的简单重复序列区间 (ISSR)-聚合酶链式 (PCR) 反应体系。方法:采用正交试验设计对影响青天葵 ISSR-PCR 反应体系的 5 种因素 (dNTP、模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 和 *Taq* DNA 聚合酶) 4 个水平进行优化,并结合新复极差法,对试验中各单因素进行分析。结果:确立了青天葵最佳反应体系,即在 20 μ L 的总反应体积中含有 $10 \times$ PCR buffer 2 μ L, dNTP 225 μ mol \cdot L⁻¹, Mg^{2+} 2.5 mmol \cdot L⁻¹, 引物 0.4 μ mol \cdot L⁻¹, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, 模板 DNA 60 ng; 从 100 条引物中筛选出 16 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物。结论:建立的青天葵 ISSR-PCR 反应体系,经过 24 份青天葵样品检验,得出该体系稳定可靠,可用于青天葵遗传差异分析。

[关键词] 青天葵; 简单重复序列区间; 体系优化; 引物筛选

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)21-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210095

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1127.017.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:27

Optimization of ISSR-PCR Reaction System and Primers Screening in *Nerviliae fordii*

ZHOU Yu-qing^{1,2}, DU Pei-lin¹, FU Peng¹, XIE Feng¹, WANG Yue-feng^{2,3}, ZHU Hua^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;
3. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a suitable inter-simple sequence repeat (ISSR) -polymerase chain reaction (PCR) system for analysis of genetic differences in *Nerviliae fordii*. **Method:** The ISSP-PCR was optimized using orthogonal design of five factors (dNTP, template DNA, primer, Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase) at four levels. Single factor analysis was conducted using Duncan's new multiple range method. **Result:** An optimum ISSR-PCR reaction system established for *N. fordii* was as follows: 20 μ L ISSR-PCR system contained 60 ng template DNA, 2.0 μ L of $10 \times$ PCR buffer, 1.0 U *Taq* polymerase, 225 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP mix, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ of Mg^{2+} , 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ of primers. Sixteen ISSR primers with stable amplification and abundant polymorphism were selected from 100 ISSR primers. **Conclusion:** The optimized and established ISSR reaction system is stable and credible according to the testing results of 24 samples of *N. fordii*, which provides methodology basis for the genetic analysis of *N. fordii*.

[Key words] *Nerviliae fordii*; inter-simple sequence repeat; optimization of reaction system; primers screening

[收稿日期] 20131116(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260620);广西自然科学基金项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 周雨晴, 硕士, 从事中药及民族药的鉴定与开发研究, Tel:18978937306, E-mail:369590990@qq.com

[通讯作者] *朱华, 博士, 教授, 从事中药品种、品质及资源开发研究, Tel:0771-3922518, E-mail:zhuhuagx@163.com

青天葵为广西常用中药材,具有清热解毒,散瘀消肿等功效^[1]。青天葵在两广及东南亚地区为民间习用的凉茶,也是我国出口创汇的名贵药材^[2]。系药食两用草本植物。本课题组对广西各县(市)的青天葵资源调查研究发现,青天葵生长环境特殊,资源分布极其有限,至今仍以采挖野生资源为主,加上石灰岩地区生态环境的持续恶化,青天葵资源日益减少,种内资源遗传多样性丧失严重,已被列入《濒危动植物种国际贸易公约》^[3-4]。开展青天葵种质资源遗传多样性研究,了解其遗传变异水平、种群遗传结构等,对野生青天葵种质资源的保护、管理及引种驯化有重要的指导意义。

ISSR(inter-simple sequence repeat)简单重复序列区间是由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出的一种以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增为基础的新型分子标记技术,主要是利用基于 SSR(simple sequence repeat,简单重复序列)而设计引物来检测 2 个 SSR 之间的 DNA 序列,与 RFLP 和 RAPD 技术相比有更高的重复性和稳定性^[5]。该技术具有多态性高、稳定性好、产物特异性强及操作简单等特点^[6]。目前已广泛用于药用植物的遗传多样性、品种鉴别、良种选育、基因定位及资源分类等诸多研究^[7-10]。由于 ISSR 主要是由单一引物且以重复序列为主要引物序列的 PCR 标记,所以其反应体系易受到 *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物、模板浓度、dNTP 等因素的影响,建立最佳的 ISSR-PCR 反应体系对保证试验结果的准确可靠非常重要。本试验综合正交实验设计和新复极差法,建立并优化了青天葵 ISSR-PCR 反应体系,并筛选出 16 条适合的引物,为青天葵遗传多样性研究奠定基础。

1 材料

用于优化体系和体系稳定性验证的 24 份样品为青天葵嫩叶,均于 2013 年 5 月采自广西中医药大学药用植物园,经广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为兰科毛唇芋兰 *Nerviliae fordii* (Hance) Schltr. 的地下块茎或全草。

ISSR 引物(上海生工合成), *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Marker 2000 (TaKaRa-公司)。经初步筛选将引物 U835[(AG)₈YC]作为此次正交试验的引物。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

采用高盐低 pH 法^[11]提取试材料幼嫩叶基因组 DNA。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 的浓度和纯度,并稀释到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用。

2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验设计与扩增程序

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计^[12],对影响 PCR 反应的 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶,模板 DNA,ISSR 引物浓度进行 5 因素 4 水平筛选,5 个因素水平和正交试验设计表分别见表 1,2。总反应体积为 $20 \mu\text{L}$,均含 $10 \times \text{PCR buffer}$ $2 \mu\text{L}$ 。扩增程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 55 s,53 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共 40 个循环;72 °C 最后延伸 10 min;4 °C 保存。

以 2 000 bp Ladder Plus Marker 为相对分子质量标记,每个扩增产物加入 $5 \mu\text{L}$ 含有核酸染料的 $6 \times \text{Loading Buffer}$ 充分混匀,取 $10 \mu\text{L}$ 在 2.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳,在凝胶成像系统上检测并拍照。

表 1 PCR 反应的因素水平设计

水平	<i>Taq</i> 聚合酶/U	Mg^{2+} / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTP / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 DNA /ng
1	0.5	1.3	125	0.2	15
2	1.0	1.7	175	0.4	30
3	1.5	2.1	225	0.6	45
4	2.0	2.5	275	0.8	60

表 2 PCR 反应的 $L_{16}(4^5)$ 正交设计

No.	因素				
	<i>Taq</i> 聚合酶/U	Mg^{2+} / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	dNTP / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	模板 DNA /ng
1	0.5	1.3	125	0.2	15
2	0.5	1.7	175	0.4	30
3	0.5	2.1	225	0.6	45
4	0.5	2.5	275	0.8	60
5	1.0	1.3	175	0.6	60
6	1.0	1.7	125	0.8	45
7	1.0	2.1	275	0.2	30
8	1.0	2.5	225	0.4	15
9	1.5	1.3	225	0.8	30
10	1.5	1.7	275	0.6	15
11	1.5	2.1	125	0.4	60
12	1.5	2.5	175	0.2	45
13	2.0	1.3	275	0.6	45
14	2.0	1.7	225	0.2	60
15	2.0	2.1	175	0.8	15
16	2.0	2.5	125	0.4	30

2.3 最佳反应体系的验证和引物筛选 用筛选获得的最佳反应体系和反应程序,选用 2 条引物 U826 [(AC)₈C]和 U835 [(AG)₈YC]对 24 份青天葵样品进行稳定性验证。并对 ISSR 100 条引物进行筛选。

3 结果

3.1 PCR 扩增结果 正交试验 PCR 扩增产物电泳结果见图 1,由图可知 16 个处理均有条带出现。参照何正文等^[13]的方法,依据条带数量和明亮度对扩增结果进行打分,明亮记 3 分,亮记 2 分,暗记 1 分,无条带记 0 分,结果见表 3。

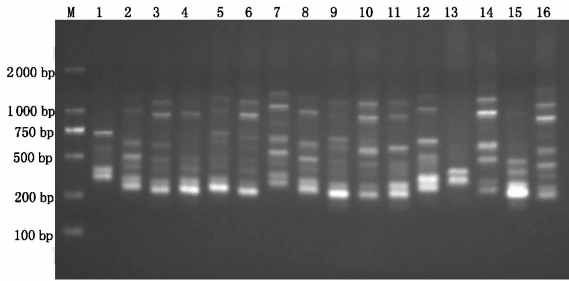


图 1 2.0%琼脂糖凝胶电泳的检测

表 3 青天葵 ISSR 正交优化组合扩增

No.	条带数			总赋值	No.	条带数			总赋值
	明亮	亮	暗			明亮	亮	暗	
1	0	3	1	7	9	1	1	5	10
2	0	3	3	9	10	0	4	2	10
3	0	3	4	10	11	2	1	3	11
4	1	2	3	10	12	2	1	3	11
5	1	2	6	13	13	2	0	1	7
6	1	2	5	12	14	1	3	3	12
7	0	5	3	13	15	1	3	1	10
8	0	5	2	12	16	0	5	3	13

3.2 极差分析结果 运用新复极差法(SSR法)对 PCR 扩增结果进行分析,得到 ISSR-PCR 反应中单因素反应条件的最高分值,见表 4。

3.2.1 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可见,dNTP 浓度为 275 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平

均分值最低为 10 分;dNTP 浓度为 225 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均分最高为 11 分;说明 225 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 浓度为青天葵 PCR 反应的适宜浓度。

3.2.2 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可见,模板 DNA 为 15 ng 时,平均分最低为 9.75 分;模板 DNA 为 60 ng 时,平均分最高为 11.5 分;说明 60 ng 模板 DNA 为青天葵 PCR 反应的适宜浓度。

3.2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可看出,引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均分最低为 10 分;引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均分最高为 11.25 分;说明 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物浓度为青天葵 PCR 反应的适宜浓度。

3.2.4 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可看出, Mg^{2+} 浓度为 1.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均分最低为 9.25 分; Mg^{2+} 浓度为 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均分最高为 11.5 分;说明 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 浓度为青天葵 PCR 反应的适宜浓度。

3.2.5 *Taq* 酶浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 由表 4 可看出,*Taq* 酶为 0.5 U 时,平均分最低为 9 分;*Taq* 酶为 1.0 U 时,平均分最高为 12.5 分;说明 1.0 U *Taq* 酶为青天葵 PCR 反应的适宜浓度。

采用极差法对正交试验中各单因素进行分析后得到最佳处理组合即:dNTP 浓度为 225 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,模板 DNA 为 60 ng,引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 浓度为 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,*Taq* 酶为 1.0 U,总反应体积为 20 μL 。

3.3 ISSR-PCR 体系稳定性的检测和引物筛选 用筛选获得的最佳反应体系及扩增程序,选用引物 U826 和对 U835 对 24 份青天葵基因组 DNA 进行 PCR 扩增,电泳图见图 2,3。2 个引物扩增谱带明亮,背景清晰,多态性丰富,表明该反应体系稳定、重复性好,适合于青天葵 ISSR-PCR 反应。

最后利用验证后的反应体系及扩增程序,以青天葵的基因组 DNA 为模板,对 100 条 ISSR 引物分

表 4 新复极差法对 PCR 扩增结果极差分析

水平	<i>Taq</i> 聚合酶(A)		Mg^{2+} (B)		dNTP(C)		引物(D)		模板 DNA(E)	
	总分	平均分	总分	平均分	总分	平均分	总分	平均分	总分	平均分
1	36	9.00	37	9.25	43	10.75	43	10.75	39	9.75
2	50	12.50	43	10.75	43	10.75	45	11.25	45	11.25
3	42	10.50	44	11.00	44	11.00	40	10.00	40	10.00
4	42	10.50	46	11.50	40	10.00	42	10.50	46	11.50
极差	14	3.50	9	2.25	4	1.00	5	1.25	7	1.75

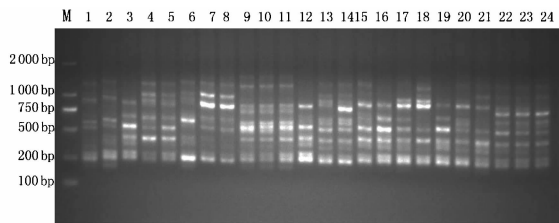


图 2 引物 826[(AC)₈C]的扩增电泳谱

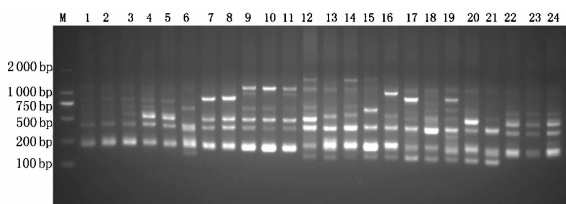


图 3 引物 835[(AG)₈YC]的扩增电泳谱

别进行扩增,依据所扩增带型清晰而重复性好的原则,最终筛出 16 条适合的引物,见表 5。

表 5 筛选出的 16 条 ISSR 引物

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
U808	(AG) ₈ C	U811	(GA) ₈ C
U813	(CT) ₈ T	U822	(TC) ₈ A
U826	(AC) ₈ C	U834	(AG) ₈ YT
U835	(AG) ₈ YC	U840	(GA) ₈ YT
U842	(GA) ₈ YG	U844	(CT) ₈ RC
U848	(CA) ₈ RG	U856	(AC) ₈ YA
U874	(GCCT) ₄	U879	(CTTCA) ₃
U880	(GGAGA) ₃	U881	(GGGTG) ₃

4 讨论

ISSR 分子标记的扩增结果会受反应条件、扩增程序以及物种不同的影响^[14]。要获得较稳定、清晰、可重复的条带,有必要对供试样品和影响 PCR 扩增的主要因子进行适当的调整、筛选和优化^[15]。正交实验设计具有分散均衡、综合可比、可伸缩性强及效用明确的特性,了解各因素之间的内在规律,能较快的找到最优水平的组合^[13,16]。本实验利用 L₁₆(4⁵)的实验设计对青天葵 PCR 反应体系中的 5 种主要影响因素进行了优化,并结合极差法,对试验中各单因素进行分析。通过以上综合分析得出青天葵 ISSR-PCR 扩增体系的最佳处理组合为:20 μL 的总反应体积中含有 10 × PCR buffer 2 μL, dNTP 225 μmol·L⁻¹, Mg²⁺ 2.5 mmol·L⁻¹, 引物 0.4 μmol·L⁻¹, Taq 酶 1.0 U, 模板 DNA 60 ng。

孙雯雯等研究认为 Mg²⁺ 对试验结果影响最大,

dNTPs 次之, Taq 酶和模板 DNA 对 ISSR-PCR 的影响最小^[17], 本试验中, 各因素对试验影响大小依次为 Taq 酶、Mg²⁺、模板 DNA、引物、dNTPs, 其中以 Taq 酶和 Mg²⁺ 最为显著。在 ISSR-PCR 反应中, Taq 酶用量的变化直接影响实验结果, 用量过多易产生非特异扩增的积累; 过低则会降低新链的合成效率。Mg²⁺ 为 Taq 酶的激活剂, 在 PCR 反应体系中有有效浓度的大小直接影响 Taq 酶的活性, 浓度过低不能有效激活 Taq 酶, 扩增条带弱或无, 浓度过高则产生大量非特异性扩增, 致使背景模糊; 同时 Mg²⁺ 还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合, 影响 PCR 扩增的效率以及扩增的特异性^[18]。本实验中发现 Mg²⁺ 浓度较低时扩增产物较少且条带较弱, 而在浓度适合时扩增出清晰明亮的条带。此外, 本实验显示 20 μL 的 ISSR-PCR 反应体系中 15 ~ 60 ng DNA 均能扩增出稳定的条带。

本实验应用 L₁₆(4⁵) 正交实验确立青天葵 ISSR-PCR 最佳反应体系, 同时选用 2 条引物对样品基因组 DNA 扩增结果也检验了该体系的合理性, 实验还筛选出 16 条适合的 ISSR 引物。本研究所建立的 ISSR-PCR 反应稳定体系为青天葵遗传多样性研究、品种鉴定、亲缘关系分析、遗传作图等奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 1231.
- [2] 陆善旦. 地产中药材品种走势点评[J]. 中国现代中药, 2008, 10(2): 53.
- [3] 陈蔚文, 徐鸿华. 岭南道地药材研究[M]. 广州: 广州科技出版社, 2007: 326.
- [4] 杜勤. 青天葵药材规范化种植(GAP)研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger-printing[J]. Nucl Acide Res, 1995, 23(21): 4407.
- [6] 王明明, 宋振巧, 王建华. ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用[J]. 中草药, 2007, 38(1): 134.
- [7] 吴振兴, 王慧中, 施农农. 兰属(Cymbidium)植物 ISSR 遗传多样性分析[J]. 遗传, 2008, 30(5): 627.
- [8] 吴晨炜, 周凌瑜, 王秀丽. 小苍兰种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2009, 29(3): 357.
- [9] 马红勃, 祁建民, 李延坤. 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗传连锁图谱构建[J]. 作物学报, 2008, 34(11): 1958.

锦灯笼化学成分

舒尊鹏¹, 徐炳清¹, 邢娜¹, 李新莉², 王秋红¹, 杨炳友¹, 匡海学^{1*}
(1. 黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室,
黑龙江中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040;
2. 大连医科大学 生物技术系, 辽宁 大连 116000)

[摘要] 目的:研究锦灯笼的化学成分。方法:采用硅胶、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 和半制备液相色谱等技术分离纯化,结合 ESI-MS, UV, NMR 等现代波谱学技术进行结构鉴定。结果:分离并鉴定了 8 个化合物,分别为 (+)-丁香脂素-*O*- β -D-双吡喃葡萄糖苷(1), (+)-松脂酚-*O*- β -D-双吡喃葡萄糖苷(2), (+)-杜仲树脂酚-*O*- β -D-双吡喃葡萄糖苷(3), 芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(4), 金圣草黄素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(5), 香叶木素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(6), 茛菪亭-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(7) 和对羟基苯乙醇-(阿魏酸-4-*O*- β -D-葡萄糖酯)苷(8)。结论:化合物 1~8 均为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 锦灯笼; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.2; R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)21-0099-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014210099

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1126.016.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:26

Chemical Constituents of *Physalis Calyx Seu Fructus*

SHU Zun-peng¹, XU Bing-qing¹, XING Na¹, LI Xin-li², WANG Qiu-hong¹,
YANG Bing-you¹, KUANG Hai-xue^{1*}

(1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education,
Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Dalian Medical University Department of Biotechnology, Dalian 116000, China)

[收稿日期] 20131217(009)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531800)

[第一作者] 舒尊鹏, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础及活性研究, Tel:0451-82193484, E-mail:shuzunpeng2010@163.com

[通讯作者] * 匡海学, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及活性研究, Tel:0451-82193001, E-mail:hokuang@hotmail.com

- [10] 刘荣华, 詹雪晶, 黄璐琦, 等. 利用 ISSR-PCR 方法分析单叶蔓荆居群的遗传多样性[J]. 中国中药杂志, 2010, 20(10):1670.
- [11] 杜勤, 魏智强, 田军. 青天葵总 DNA 的提取与随机扩增多态性 DNA 反应条件的建立[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6):1431.
- [12] 周凌瑜, 吴晨烽, 唐东芹. 利用正交设计优化小苍兰 ISSR-PCR 反应体系[J]. 植物研究, 2008, 28(4):402.
- [13] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4):76.
- [14] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社, 1993:281.
- [15] 任风鸣, 胡开治, 刘燕琴, 等. 传统中药金钱草 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12):2233.
- [16] 李长春, 阳天泉, 戴余军. 正交设计优化莲藕 ISSR-PCR 反应体系研究[J]. 北方园艺, 2011(1):121.
- [17] 孙雯雯, 孙俊, 周军永, 等. 枣 ISSR 反应体系的建立及其指纹图谱构建[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6):940.
- [18] 邵清松, 郭巧生, 谢作成. 基于方差分析优化菊花 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中草药, 2009, 40(2):285.

[责任编辑 邹晓翠]