

麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

朱田田, 晋玲*, 张裴斯, 林丽, 张弦飞

(甘肃中医学院中(藏)药资源研究所, 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级
重点实验室, 药用植物遗传育种研究所, 兰州 730000)

[摘要] 目的:建立麻花秦艽的简单重复序列区间-聚合酶链反应(ISSR-PCR)最佳反应体系,为该药材的种质鉴定及遗传多样性等研究提供参考。方法:运用单因素试验和正交试验优选麻花秦艽的 ISSR-PCR 反应体系中 DNA 模板用量, Mg^{2+} 浓度, dNTPs 浓度, *Taq* DNA 聚合酶用量和引物浓度等参数,确定麻花秦艽每条引物的最佳退火温度。结果:ISSR-PCR 最佳反应体系(20 μ L)为模板 DNA 1 μ L(36 $mg \cdot L^{-1}$), 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 1.75 μ L(20 $mmol \cdot L^{-1}$), dNTPs 0.8 μ L(10 $mmol \cdot L^{-1}$), *Taq* 酶 0.1 μ L(0.5%)及引物 0.6 μ L(10 $mmol \cdot L^{-1}$);筛选出 12 条多态性高、扩增稳定的 ISSR 引物, UBC-809 引物的最佳退火温度 55.5 $^{\circ}C$ 。扩增出的 7 条带中多态性带为 6 条,多态性位点比率 85.71%。结论:建立的麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,位于 500 bp 处的条带为非多态性条带,可作为该种属的特征性条带。

[关键词] 麻花秦艽; ISSR 反应体系; 退火温度; UBC-809 引物

[中图分类号] R282.5; R931.2; R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0074-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015060074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150127.1141.001.html>

[网络出版时间] 2015-01-27 11:41

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Gentiana straminea* ZHU Tian-tian, JIN Ling*, ZHANG Pei-si, LIN Li, ZHANG Xian-fei (*Institute of Chinese (Tibetan) Medicinal Resources, Key Laboratory of Chemistry and Quality for Chinese (Tibetan) Medicine of Colleges and Universities in Gansu Province, Institute of Genetic Breeding of Medicinal Plant, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish optimal inter-simple sequence repeat-polymerase chain reaction (ISSR-PCR) reaction system for *Gentiana straminea* and provide a reference for medicinal germplasm identification and genetic diversity research. **Method:** Influencing factors of ISSR-PCR reaction system (template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, primer and annealing temperature) were selected and optimized by single factor tests and orthogonal test. **Result:** Optimum reaction system (20 μ L) contained template DNA of 1 μ L (36 $mg \cdot L^{-1}$), Mg^{2+} (10 \times PCR buffer) of 1.75 μ L (20 $mmol \cdot L^{-1}$), dNTPs of 0.8 μ L (10 $mmol \cdot L^{-1}$), *Taq* DNA polymerase of 0.1 μ L (0.5%) and primers of 0.6 μ L (10 $mmol \cdot L^{-1}$). The suitable annealing temperature of 12 primers was determined, which had rich polymorphism and stable amplification. The best annealing temperature of UBC-809 primer was 55.5 $^{\circ}C$, there were 6 polymorphism bands in amplification of 7 bands, the percentage of polymorphism loci reached 85.71%. **Conclusion:** This established ISSR reaction system is stable and credible. The polymorphic bands, which is located at 500 bp of strip, can be used as the species characteristic band.

[Key words] *Gentiana straminea*; inter-simple sequence repeat reaction system; annealing temperature; UBC-809 primer

[收稿日期] 20140704(005)

[基金项目] 中央本级重大增减支项目(20603020212, 20603020110); 甘肃省中医药科学技术研究课题重点项目(GZK-2010-Z2)

[第一作者] 朱田田, 硕士, 讲师, 从事中药资源开发与质量综合评价研究, Tel: 0931-8765393, E-mail: zt0935@163.com

[通讯作者] * 晋玲, 博士, 教授, 从事珍稀濒危和大宗常用中药资源可持续利用研究, Tel: 0931-8765304, E-mail: zyxyjl@163.com

麻花秦艽习称麻花苳,具有清热利胆、舒筋止痛之功效,可用于治疗风湿性关节炎、肺结核、低热盗汗、黄疸型肝炎等^[1-2]。由于近年来临床用药量的增加与多年的过度采挖,致使麻花秦艽在我国的种群数量和分布范围日趋缩减,种质资源急待保护。目前,国内外对麻花秦艽的研究多集中在化学成分、组织培养、药理作用等方面^[3-5],在分子生物学方面的研究较为薄弱,尤其是基于简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术的研究报道较少。ISSR 分子标记技术具有实验操作简单、重复性好、无需知道基因组序列信息等特点,现已被广泛应用于植物种质资源鉴定、遗传多样性分析、分子标记育种和遗传作图等方面^[6-8]。ISSR-聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系稳定性易受模板 DNA 用量, Mg^{2+} 浓度, *Taq* 聚合酶浓度, dNTPs 浓度及引物退火温度等多方面的影响^[9-10]。本实验拟采用单因素试验和正交试验优选麻花秦艽的 ISSR-PCR 反应体系,为深入开展其种质鉴定、遗传多样性研究、分子标记辅助育种等工作奠定基础。

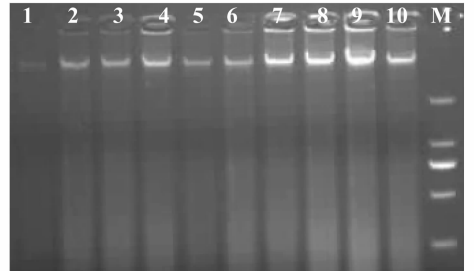
1 材料

GelDoc XR System 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad), TProfessional Standard 型梯度 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司), TGL16M 型台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司), DYY-7 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。麻花秦艽的干燥叶片于 2012 年 7 月采集于甘肃省张掖市民乐县和青海省祁连县,每地选取无病虫害植株各 5 株,置于干燥硅胶中带回实验室,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用,全部样品经甘肃中医学院中药资源教研室晋玲教授鉴定为龙胆科麻花秦艽 *Gentiana straminea*。植物基因组 DNA 提取试剂盒(NEP003-1)、核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)、琼脂糖、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)及 *Taq* DNA 聚合酶等 PCR 试剂均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)等均购于西安科昊生物工程有限责任公司,ISSR 随机引物(根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。

2 方法与结果

2.1 基因组 DNA 提取 采用试剂盒法提取麻花秦艽基因组 DNA,利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测各

样本基因组 DNA 的完整性,见图 1。结果发现 10 个样品均显示出清晰、整齐、明亮的条带,表明提取的基因组 DNA 浓度较高、质量好、未发生降解。检测后的样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,每个样品取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 混匀后用于 ISSR-PCR 反应条件的优化。



1 ~ 10. 样品; M. DL2000 Marker

图 1 麻花秦艽基因组 DNA 琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *Gentiana straminea*

2.2 ISSR-PCR 反应体系优化

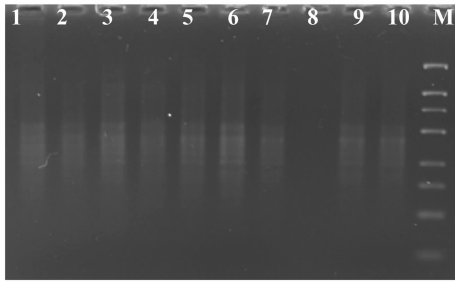
2.2.1 单因素试验 选用引物 UBC-809,模板 DNA 用量, Mg^{2+} 浓度, 脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTPs) 浓度, *Taq* DNA 聚合酶用量和引物浓度设置不同梯度,见表 1,通过单因素试验确定各个因素的适用范围。PCR 扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, $52.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (理论退火温度) 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增结束后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,电泳

表 1 麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体系单因素试验设计

Table 1 Single factor design of ISSR-PCR reaction system for *Gentiana straminea*

水平	模板 DNA /ng	Mg^{2+} 浓度 /mmol·L ⁻¹	dNTPs /mmol·L ⁻¹	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U	引物浓度 /μmol·L ⁻¹
1	6	0.5	0.1	0.1	0.1
2	12	0.75	0.15	0.5	0.15
3	18	1.0	0.2	1.0	0.2
4	24	1.25	0.25	1.5	0.25
5	30	1.5	0.3	2.0	0.3
6	36	1.75	0.4	2.5	0.35
7	42	2.0	0.5		0.4
8	48	2.25			0.5
9	54	2.5			0.6
10	60				0.7
11					0.8
12					0.9

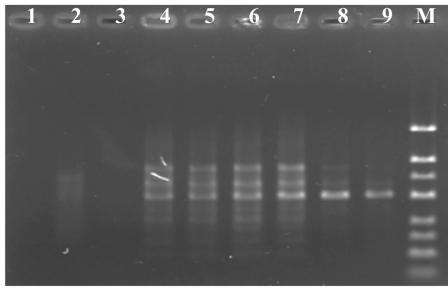
缓冲液为 $1 \times$ Tris-硼酸 (TBE), 于 110 V 电泳约 100 min, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EB 染色 20 min, 在凝胶成像系统下检测并照像, 见图 2~6。



1~10. 样品; M. DL2000 Marker

图 2 不同模板 DNA 用量对麻花秦艽扩增的影响

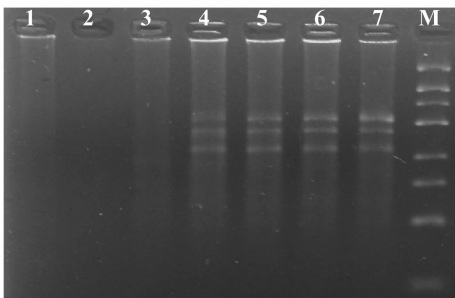
Fig. 2 Effects of different template DNA concentrations on PCR reaction of *Gentiana straminea*



1~9. 样品; M. DL2000 Marker

图 3 不同 Mg^{2+} 浓度对麻花秦艽扩增的影响

Fig. 3 Effects of different Mg^{2+} concentrations on PCR reaction of *Gentiana straminea*

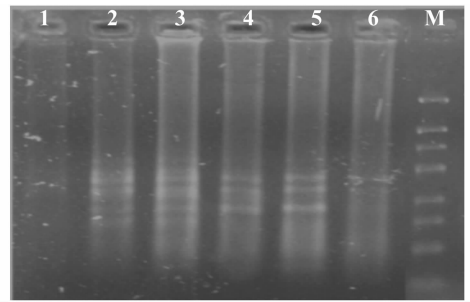


1~7. 样品; M. DL2000 Marker

图 4 不同 dNTPs 浓度对麻花秦艽扩增的影响

Fig. 4 Effects of different dNTPs concentrations on PCR reaction of *Gentiana straminea*

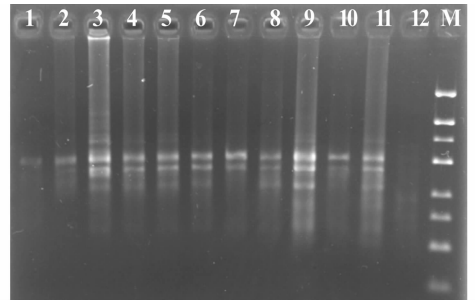
由图 2 可知, 除 8 号外其余样本均能扩增出条带, 结合清晰度、条带数等考虑, 选择模板 DNA 用量 18~36 ng。图 3 显示当 Mg^{2+} 浓度 $< 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $> 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带少且不清晰、特异性条带增多, 故 Mg^{2+} 浓度选择 $1.25 \sim 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 4 可知, 当 dNTPs 浓度 $< 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 条带较



1~6. 样品; M. DL2000 Marker

图 5 不同 Taq DNA 酶用量对麻花秦艽扩增的影响

Fig. 5 Effects of different Taq DNA polymerase concentrations on PCR reaction of *Gentiana straminea*



1~12. 样品; M. DL2000 Marker

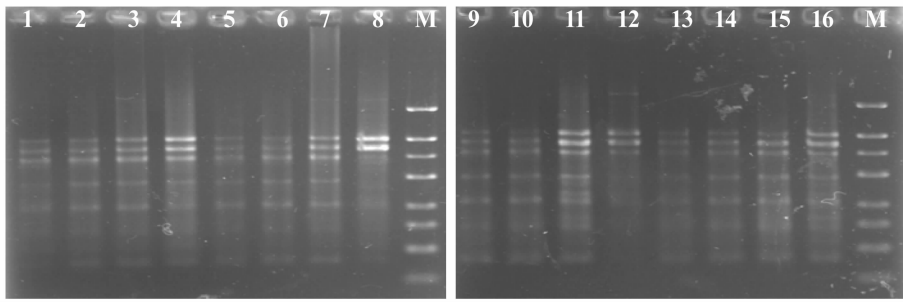
图 6 不同引物浓度对麻花秦艽扩增的影响

Fig. 6 Effects of different primer concentrations on PCR reaction of *Gentiana straminea*

少, $> 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带增多且清晰, 故确定 dNTPs 浓度 $0.25 \sim 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 5 显示可确定 Taq DNA 聚合酶用量 $0.5 \sim 2.0 \text{ U}$ 。由图 6 可知, 引物浓度在 $0.2 \sim 0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 均能扩增出数量多的条带, 当浓度 $> 0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 虽然扩增条带清晰, 但特异性条带的数量会增加, 故确定引物浓度 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 正交试验 在单因素试验基础上, 选择模板 DNA 用量, Mg^{2+} 浓度, dNTPs 浓度, Taq DNA 聚合酶用量和引物浓度为考察因素, 通过 $L_{16}(4^5)$ 正交设计优选反应体系, 扩增程序和电泳检测同 2.2.1 项, 试验安排及结果见表 2 和图 7。显示 16 个处理组合均能扩增出条带, 但不同组合条带数目和清晰度不一致。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则, 确定 11 号为麻花秦艽 ISSR-PCR 的最佳处理组合。

2.2.3 引物筛选与退火温度确定 在优化体系下从 70 条 ISSR 随机引物中选择扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物; 利用梯度 PCR 仪对引物逐个进行退火温度梯度试验, 通过比较不同退火温度对



1 ~ 16. 样品; M. DL2000 Marker

图 7 麻花秦艽 ISSR-PCR 正交试验样品电泳谱

Fig. 7 Electrophoresis of *Gentiana straminea* samples in ISSR-PCR orthogonal design

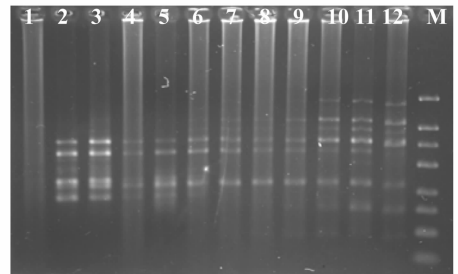
表 2 麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体系正交试验安排

Table 2 Orthogonal design of ISSR-PCR reaction system for *Gentiana straminea*

No.	Mg ²⁺ /mmol·L ⁻¹	dNTPs /mmol·L ⁻¹	Taq DNA 聚合酶/U	引物浓度 /μmol·L ⁻¹	模板 DNA /ng
1	1.25	0.25	0.5	0.2	18
2	1.25	0.30	1.0	0.3	24
3	1.25	0.40	1.5	0.4	30
4	1.25	0.50	2.0	0.5	36
5	1.50	0.25	1.0	0.4	36
6	1.50	0.30	0.5	0.5	30
7	1.50	0.40	2.0	0.2	24
8	1.50	0.50	1.5	0.3	18
9	1.75	0.25	1.5	0.5	24
10	1.75	0.30	2.0	0.4	18
11	1.75	0.40	0.5	0.3	36
12	1.75	0.50	1.0	0.2	30
13	2.00	0.25	2.0	0.3	30
14	2.00	0.30	1.5	0.2	36
15	2.00	0.40	1.0	0.5	18
16	2.00	0.50	0.5	0.4	24

条带数量和条带清晰度的影响,确定引物的最佳退火温度。图 8 为 UBC-809 引物不同退火温度(47.9, 48.3, 49.1, 50.4, 51.8, 52.3, 53.7, 54.3, 55.5, 56.4, 57.6, 58.1 °C)的扩增结果,表明退火温度较低时(47.9 ~ 53.7 °C),扩增条带清晰但数量少,当退火温度由 56.4 °C 升至 58.1 °C 时,特异性条带增多,故确定 UBC-809 引物的最佳退火温度 55.5 °C,其余引物类同,结果见表 3。

2.3 麻花秦艽 ISSR-PCR 最优反应体系建立 确定麻花秦艽 ISSR-PCR 的最佳反应体系为 20 μL,内含模板 DNA 1 μL(36 mg·L⁻¹), 10 × PCR 缓冲液



1 ~ 12. 样品; M. DL2000 Marker

图 8 麻花秦艽 UBC-809 引物退火温度扩增谱

Fig. 8 Amplified spectrum of annealing temperature for UBC-809 primer of *Gentiana straminea*

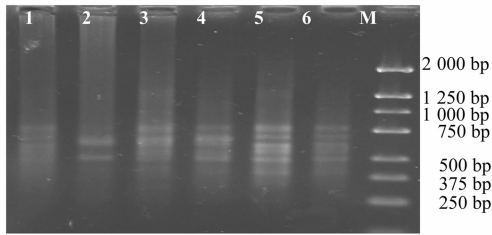
表 3 麻花秦艽不同 ISSR 引物的最佳退火温度

Table 3 Optimal annealing temperature of ISSR primers for *Gentiana straminea*

引物编号	引物序列(5' ~ 3')	理论值/°C	实际值/°C
UBC-826	ACACACACACACACACC	52.0	51.3
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.0	55.5
UBC-889	DBDACACACACACACAC	48.0 ~ 54.0	52.7
UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA	48.0	50.1
UBC-876	GATAGATAGACAGACA	46.0	48.7
UBC-899	DBDACACACACACACAC	51.0	51.7
UBC-817	CACACACACACACACAA	50.0	54.9
UBC-851	GTGTGTGTGTGTGTGTG	52.0 ~ 54.0	52.3
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.0	48.0
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50.0	50.6
UBC-818	CACACACACACACACAG	52.0	49.0
UBC-825	ACACACACACACACACT	50.0	57.8

(含 Mg²⁺) 1.75 μL(20 mmol·L⁻¹), dNTPs 0.8 μL(10 mmol·L⁻¹), Taq 酶 0.1 μL(0.5%) 及引物 0.6 μL(10 mmol·L⁻¹)。利用 UBC-809 引物对 6 个不同麻花秦艽基因组 DNA 样本进行扩增,采用人工读带法,在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记

为 0, 建立数据矩阵, 把图形资料转换为数据资料并进行扩增条带的多态性统计, 扩增图谱见图 9。结果显示 6 个麻花秦艽 DNA 样本共扩增出 7 条带, 其中 5 号和 6 号样本扩增的带数最多, 2 号样本扩增的带数最少; 扩增条带的多态性统计结果显示扩增出的 7 条带中多态性带为 6 条, 多态性位点比率 85. 71%, 位于 500 bp 处的条带为非多态性条带, 是 6 个样本共有条带, 故可作为该种属的特征性条带。证明优选的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 适用于麻花秦艽的后续分子试验中。



1~6. 样品; M. DL2000 Marker

图 9 麻花秦艽引物 UBC-809 的扩增电泳

Fig. 9 PCR reaction electrophoresis of primer UBC-809 for *Gentiana straminea*

3 讨论

ISSR 分子标记的重复性、多态性均较随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 高, 但稳定性仍受到反应体系中影响因素浓度和退火温度的影响, 且 ISSR-PCR 最佳反应体系会因物种不同而不同, 因此对某一种植物进行 ISSR 分子标记时, 应先对各影响因素进行优化, 以增加分析结果的可靠性。ISSR-PCR 反应体系的优选常采用单因素试验和正交设计^[11-13], 结合这 2 种方法来优化体系可使试验结果更加准确、可靠。

除了体系浓度外, 引物的退火温度对 PCR 扩增亦有明显影响, 不同序列引物或同一引物对不同物种的 PCR 反应退火温度不尽相同, 需要逐一筛选以获得较为稳定的标记结果。本文确定的 12 条引物的退火温度多数与理论值相差较多, 说明对每条引物进行退火温度筛选十分必要。麻花秦艽作为秦艽的主要品种和主要药源之一, 其野生资源已处于濒危状态^[14], 进行种质资源遗传多样性分析与物种保护很有必要。本文对麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体

系进行优化, 并筛选出适合麻花秦艽扩增, 多态性高、重复性好的 12 条 ISSR 随机引物, 可为麻花秦艽种质鉴定及遗传多样性等研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 253.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 9-10.
- [3] 林燕, 韩贺东, 胡海清, 等. 3 种藏药秦艽花脂溶性成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 102-107.
- [4] 晋玲, 刘进, 张延红, 等. 麻花秦艽休眠芽的玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1374-1377.
- [5] 张新新, 贾娜, 孙琛, 等. 大叶秦艽花与麻花秦艽花抗炎镇痛作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(4): 341-343.
- [6] 高致明, 孙寒, 吴月红, 等. 裕丹参不同变异类型 ISSR 鉴定[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(2): 142-144, 159.
- [7] 朱田田, 晋玲, 杜毅, 等. 基于 ISSR 的甘肃中麻黄遗传多样性研究[J]. 中草药, 2014, 45(12): 1764-1768.
- [8] 张一, 谭小梅, 周志春, 等. 马尾松二代育种亲本主要生长性状和 ISSR 遗传变异[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 501-510.
- [9] 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: 143-156.
- [10] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21.
- [11] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [12] 李喜凤, 邱天宝, 张红梅, 等. 蒲公英 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序的建立与优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 119-122.
- [13] 申彦晶, 赵翮, 赵树进. 正交实验设计优化白木香 ISSR-PCR 反应体系的研究[J]. 药物生物技术, 2008, 15(1): 31-34.
- [14] 李永平, 李向阳, 田丰, 等. 青海境内麻花秦艽野生种质资源调查研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(3): 71-75.

[责任编辑 刘德文]