

开口箭 ISSR-PCR 实验反应体系条件的优化

李玥, 周天华, 赵桦*

(陕西理工学院陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的: 建立与优化药用植物开口箭 ISSR-PCR 实验反应体系。方法: 以开口箭 DNA 为材料, 分析了 Mg^{2+} , dNTP, 引物及 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响。结果: 确立了稳定的、可重复的开口箭 ISSR 最佳反应体系, 即在 10 μ L 的 PCR 反应体系中, 含 1 \times buffer, 2 U Taq DNA 聚合酶, 2 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.75 μ L 引物。结论: 从 80 条简单序列重复区间 (ISSR) 通用引物中筛选出了 16 条条带清晰稳定的引物, 设置了不同的引物退火温度, 为进一步进行开口箭的遗传多样性分析的研究奠定了基础。

[关键词] 开口箭; 简单序列重复区间; 反应体系

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0149-05

[doi] 10.11653/syfy2013130149

Optimization for ISSR-PCR Reaction System of *Tupistra chinensis*

LI Yue, ZHOU Tian-hua, ZHAO Hua*

(Bio-Resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the inter simple sequence repeat (ISSR) -PCR reaction system of

[收稿日期] 20121112(004)

[基金项目] 陕西省重点实验室项目(2010JS047); 陕西省重点学科专项建设资金(2012)

[第一作者] 李玥, 在读硕士, 从事植物生物多样性保护研究

[通讯作者] * 赵桦, 硕士, 教授, 从事植物资源保护与开发研究, Tel: 13572608158, E-mail: zhaohuahz@163.com

藤药材分为 3 类, 结合相似度评价结果说明市场上大血藤药材的质量存在一定的差异, 这可能跟大血藤药材的产地、采收时间和贮藏条件等因素相关。

[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.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 682.
- [3] 崔承彬, 毛水春, 顾谦群, 等. 中药大血藤中酚类化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(6): 326.
- [4] 王宇歆, 李惠芳, 周静, 等. 大血藤有效部位含量测定及对腹腔感染细菌的抑制活性的研究[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1230.
- [5] 吴宗群. 大血藤、鸡血藤的药用解惑[J]. 北京中医, 1999(5): 43.
- [6] 国家中药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 6

卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 918.

- [7] 陈智仙, 高文远, 刘岱琳, 等. 大血藤的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 867.
- [8] 高玉琼, 赵德刚, 刘建华, 等. 大血藤挥发性成分研究[J]. 中成药, 2004, 26(10): 843.
- [9] 王祥培, 孙宜春, 靳风云, 等. 芭蕉根 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 30.
- [10] 杨立勇, 王祥培, 李雨生, 等. 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 104.
- [11] 邵林, 郭庆梅, 周凤琴, 等. 山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 117.
- [12] 施伶俐, 桂双英, 周金凤. HPLC 法测定大血藤中红景天苷的含量[J]. 安徽医学, 2011, 15(4): 441.

[责任编辑 邹晓翠]

Tupistra chinensis. **Method:** The total genome DNA of *T. chinensis*. was used as the material. The concentration of Mg^{2+} , dNTP, primer and *Taq* DNA polymerase, which greatly influence ISSR-PCR reaction, were optimized. **Result:** The optimized reaction conditions was established as follows: in a volume of 10 μ L containing 1 \times buffer, 2 U *Taq* DNA polymerase, 2 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.75 μ L primer. **Conclusion:** Sixteen primers with stable amplification and rich polymorphism were screened from 80 (inter simple sequence repeat) ISSR primers. The optimized annealing temperature for each primer in ISSR-PCR reaction was proposed. This study will be helpful for research on the genetic diversity analysis and germplasm identification of *T. chinensis*.

[**Key words**] *Tupistra chinensis*; inter simple sequence repeat; reaction system

开口箭系百合科铃兰族开口箭属植物,分布于日本及我国中部和西南部的陕西、甘肃、湖北、四川、云南、贵州、广西等省^[1]。开口箭属植物一般以根状茎及全株入药,在土家族民间用其漱口液治疗咽喉炎、扁桃体炎,疗效显著^[2]。目前,开口箭属植物作为一种民间用药,主要是靠人工采挖野生植株,极易导致开口箭自然资源的枯竭以及生境的破坏,迫切需要科学的保护和利用措施。另外,开口箭属除开口箭外其他植物也可入药,有研究表明,开口箭属各个种在根茎和叶的组织学、花粉形态学、植物核型、化学成分等方面存在一定差异^[3]。近年来,分子生物学技术在药用植物资源研究,药材药理学研究以及药材质量鉴别方面得到广泛的应用,为药材的引种栽培、品种改良、品种鉴定以及药材质量控制提供了分子生物学手段,对中药材的理论研究以及生产实践具有重要的意义^[4-7]。目前,利用分子生物学技术开展开口箭属植物种质资源的遗传学研究仍是空白,因此,建立开口箭属植物的简单序列重复区间 (ISSR) 标记指纹图谱,有望从分子水平进一步揭示开口箭的遗传多样性和遗传差异,为开口箭植物资源的保护与鉴定奠定分子生物学研究的基础。

ISSR, DNA 分子标记技术具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需 DNA 量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点^[8]。在进行植物遗传多样性以及系统发育的研究时,也可优先考虑使用 ISSR^[9]。然而 ISSR 技术也是一种基于 PCR 的分子标记,其反应条件易受各种因素的干扰^[10-11],如 Mg^{2+} 、引物、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 的浓度以及引物的退火温度都会影响 ISSR 的稳定性和重复性。因此,本文以开口箭为研究材料,对 ISSR 反应各成分的最佳反应条件进行优化,以建立适合开口箭的 ISSR 反应体系,为开口箭的遗传多样性分析和种质资源鉴定提供参考。

1 材料

开口箭 *Tupistra chinensis* Baker. 的实验材料采

自陕西汉中略阳、洋县等地,经陕西理工学院植物学教授杨培君鉴定。在野外取植物新鲜幼嫩叶片置干净自封袋中,硅胶干燥,常温保存。

CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、Tris、HCl、抗坏血酸、EDTA、 β -巯基乙醇、DNA Marker DL2000、Gold view 型核酸染色剂、氯仿、异戊醇、无水乙醇等。

Restsch MM400 型生物组织研磨机、Eppendorf Biophotometer plus 型核酸测定仪、Effendorf Centrifuge 5415R 型离心机、伯乐 S1000™型 PCR 扩增仪、DY-6C 型电泳仪、Eppendorf 型移液器等。

2 方法

2.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[12]和改良的 CTAB^[13]2 种方法提取开口箭叶的总基因组 DNA,并用核酸检测仪检测样品纯度。

2.2 扩增反应体系的建立 PCR 扩增反应在扩增仪上进行。初步扩增程序为:模板 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;接着进行 34 个循环:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度下 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min^[13]。

扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳,用 DNA Marker-DL2000 (上海生工)作为标准相对分子质量对照,Gold view 核酸染色剂染色,凝胶成像仪上观察照相、记录。

2.3 ISSR 反应条件优化 为了确定开口箭 ISSR-PCR 反应的最佳扩增条件,笔者对 ISSR-PCR 反应的影响因素 (Mg^{2+} 浓度, dNTP 浓度, *Taq* DNA 聚合酶用量, 引物浓度) 逐个作单因素实验,在此基础上再对各引物的退火温度做温度梯度实验。单因素试验各反应参数如表 1, ISSR-PCR 反应体系优化时,固定其他条件,每次改变 1 个参数,以确定该参数对 ISSR 结果的影响。根据表 1 制备总体积为 10 μ L 的 PCR 反应体系,除表中变化因素外,每管中还含有 1 \times buffer 以及模板 DNA, 试验设置 3 次重复。

各引物 T_m 值的计算公式如下: $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$, 其中 A, G, C, T 为各碱基的

表 1 ISSR 反应体系条件设计

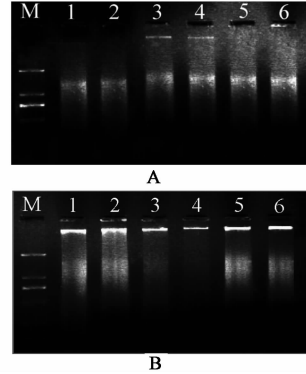
反应条件	水平
退火温度/°C	46.0, 46.8, 48.1, 49.6, 51.6, 53.3, 54.3, 55.0
Mg ²⁺ 浓度/mmol·L ⁻¹	1.00, 1.50, 2.00, 2.50
4 × dNTP 浓度/mmol·L ⁻¹	0.10, 0.15, 0.20, 0.25
Taq DNA 聚合酶/U	0.50, 1.00, 1.50, 2.00
引物浓度/μmol·L ⁻¹	0.50, 0.75, 1.00, 1.25

碱基数,由于引物的 GC 含量各不相同,各个引物的 T_m 值均有所不同,根据引物的理论退火温度一般为 $T_m \pm 5$,因此,在以上试验的基础上,根据引物的 T_m 值,本实验退火温度采用梯度 PCR 模式,设置的退火温度范围为 46 ~ 55 °C,生成的温度梯度为 46, 46.8, 48.1, 49.6, 51.6, 53.3, 54.3, 55 °C。

3 结果

3.1 基因组 DNA 纯度的电泳检测 2 种提取方法

提取 DNA 的电泳结果如图 1,基因组 DNA 经核酸检测仪测定结果如表 2。经电泳检测表明改良的 CTAB 法提取的 DNA 大片段清晰、均匀(图 1-B),经核酸检测仪测定也表明改良的 CTAB 法比 CTAB 法提取的 DNA 纯度高。



A. CTAB 法提取 DNA 电泳检测;
B. 改良的 CTAB 法提取 DNA 电泳检测
图 1 供试材料基因组 DNA 电泳检测

表 2 CTAB 法和改良的 CTAB 法提取开口箭 DNA 的结果比较

提取方法	No.	A_{260}/A_{280}	平均值	方差	质量浓度/mg·L ⁻¹	平均值	方差
CTAB	1	1.54	1.58	0.003 58	16.90	16.03	2.30
	2	1.59			15.90		
	3	1.56			15.20		
	4	1.69			15.70		
	5	1.59			14.20		
	6	1.52			18.70		
改良的 CTAB	1	1.80	1.86	0.582	4.20	5.48	1.97
	2	1.85			5.30		
	3	1.77			4.70		
	4	1.91			4.40		
	5	1.98			6.50		
	6	1.84			7.80		

表 3 ISSR 分析所用的引物

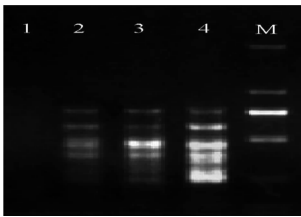
引物	T_m /°C	退火温度 /°C	引物	T_m /°C	退火温度 /°C
UBC815	52	50	UBC828	50	53
UBC816	50	52	UBC829	52	50
UBC817	50	53	UBC830	52	50
UBC818	52	52	UBC834	54	49
UBC820	52	48	UBC835	52	55
UBC825	50	55	UBC840	54	50
UBC826	52	54	UBC842	54	49
UBC827	52	52	UBC844	54	50

以 6 个个体的基因组 DNA 为模板,从 80 个引物(加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司 2006 年公布的序列合成)中筛选出条带清晰、多态性丰富、稳定性好的引物 16 个(表 3)。

3.2 单因素实验

3.2.1 Mg²⁺ 浓度的确定 Mg²⁺ 浓度作为 Taq 酶的辅助因子,它不仅影响 Taq 酶活性及合成的忠实性,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^[14]。在 10 μL 的反应体系中,当 Mg²⁺ 浓度为 1.0 mmol·L⁻¹ 时,无扩增条带;当 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol·L⁻¹ 时,扩增条带较少,但特异性强;当 Mg²⁺ 浓度为 2 mmol·L⁻¹ 时,扩增出的条带清晰稳定,且无非特异性扩增(图 2);当 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol·L⁻¹ 时条带基本保持不变,但扩增不稳定;因此, Mg²⁺ 的最佳浓度为 2 mmol·L⁻¹。

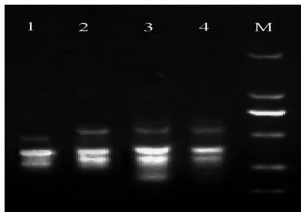
3.2.2 dNTP 浓度的确定 dNTP 浓度过高或过低



1~4 泳道 Mg^{2+} 浓度分别为
1.0, 1.5, 2.0, 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$; M. DNA Marker-DL2000

图 2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 的影响

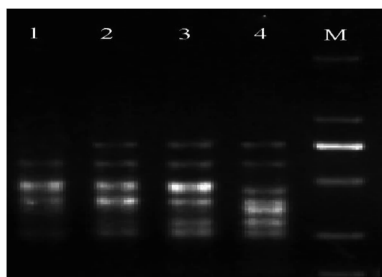
都会导致扩增带产率低。在 10 μL 的反应体系中, 图 3 可看出, dNTP 在 0.1 ~ 0.25 $mmol \cdot L^{-1}$ 都能扩增出条带, 特别在 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 扩增出了最多且最清晰的条带。因此, dNTP 的浓度在 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 时效果最好。



1~4 泳道 dNTP 分别为 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 $mmol \cdot L^{-1}$;
M. DNA Marker-D L2000

图 3 dNTP 浓度对 ISSR 的影响

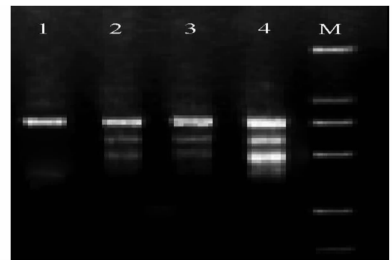
3.2.3 Taq DNA 聚合酶浓度的确定 在 PCR 反应中, Taq DNA 酶用量过多, 不仅增加实验成本, 而且会导致非特异性产物增加, 用量过少, 则会使酶过早地消耗完, 导致产物的合成率下降^[15-16]。由图 4 可知, 在 10 μL 的反应体系中, 4 个浓度的 Taq DNA 聚合酶都能较好地扩增, 除 1 泳道外条带基本一致, 因此从节省成本考虑, 酶的最佳浓度为 1 U。



1~4 泳道 Taq 聚合酶分别为 0.5, 1, 1.5, 2 U;
M. DNA Marker-D L2000

图 4 Taq 聚合酶浓度对 ISSR 的影响

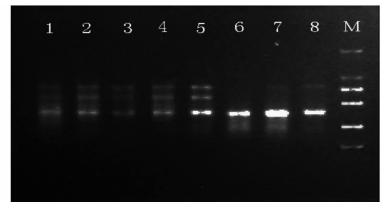
3.2.4 引物浓度的确定 引物浓度的高低也是 PCR 反应的影响因素。在 10 μL 的反应体系中, 由图 5 可知, 低浓度时出现扩增不足; 引物浓度越高, 扩增的产物的亮度越强, 并出现非特异性扩增。比较起来, 引物浓度在 0.75 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时, 扩增的条带多且清晰。因此, 本引物的浓度定为 0.75 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。



1~4 泳道引物浓度分别为 0.5, 0.75, 1, 1.25 $\mu mol \cdot L^{-1}$;
M. DNA Marker-D L2000

图 5 引物浓度对 ISSR 的影响

3.2.5 退火温度的确定 首先根据实验得出的 PCR 反应条件进行引物的初筛, 选择能看到清晰条带的引物进行退火温度的测定, 可用于 ISSR 分析的引物退火温度见表 3。在 10 μL 的反应体系中, 从 46 ~ 55 $^{\circ}C$ 尝试了不同的退火温度。引物 UBC828 (图 6) 在退火温度为 53.3 $^{\circ}C$ 时, 所选引物扩增出最清晰明亮的 ISSR 带, 温度过高或过低时, 条带都将减少或减弱, 因此将 UBC828 引物的退火温度定为 53.0 $^{\circ}C$ 。



从左到右各泳道代表的温度依次为
46, 46.8, 48.1, 49.6, 51.6, 53.3, 54.3, 55 $^{\circ}C$

图 6 引物 828 在 8 种温度条件下的电泳分析

3.2.6 ISSR-PCR 最佳反应体系与反应程序的确立 根据上述 4 个影响因素对开口箭 ISSR 的作用, 以及各个因素的交互作用结果, 最终确立 ISSR 最佳反应体系 (10 μL): 1 \times buffer; 1U Taq DNA 聚合酶; 2 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$; 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ dNTP; 0.75 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 引物; 50 ng 模板 DNA。

ISSR 的 PCR 循环程序: 95 $^{\circ}C$ 预变性 2 min; 接着进行 34 个循环: 95 $^{\circ}C$ 变性 30 s; 退火 45, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 34 次循环; 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 in, 4 $^{\circ}C$ 保存。

3.2.7 ISSR 最佳反应体系稳定性检测 利用本研究建立的优化体系和反应条件对采自汉中略阳的一个开口箭居群的 21 个个体进行 ISSR 扩增, 结果见图 7。所选的引物能扩增出比较理想的结果, 表明优化的开口箭 ISSR 反应体系是比较稳定可靠的。

4 讨论

开口箭材料的保存方法为硅胶干燥法, 叶片容易衰老变质、后含物含量较多, 通过对比实验可知使用改良的 CTAB 法, 即在加入 2 \times CTAB 提取缓冲液



UBC840 序列为 GAGAGAGAGAGAGAYT

图7 引物 840 对寒峰山居群(HFS)样品的扩增分析

之前,先用预处理液通过两次浸泡和洗涤叶片粉末,在细胞裂解之前除去组织细胞中大部分的杂质,可以使提取的 DNA 更为纯净,更加符合 ISSR 的要求。

从 80 个引物中筛选出了 16 个在开口箭材料上均能扩增出清晰条带的引物,为以后的试验打下了基础。通过优化,在 10 μL PCR 反应体系中含 1 \times buffer; 1 U *Taq* DNA 聚合酶; 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ; 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP; 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物; 50 ng 模板 DNA。

Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增影响较大。由于 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶激活所必需的, Mg^{2+} 浓度过低时,酶活性显著降低;过高时,则酶催化非特异性产物的扩增。而且,游离的 Mg^{2+} 与 dNTP 中的磷酸基结合,其与 dNTP 在 PCR 扩增过程中相互作用。所以,只有 Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度在一定的比例范围内,才能得到高质量的 PCR 扩增结果^[17]。因此,在 PCR 的反应体系中, Mg^{2+} 浓度是一个至关重要的因素。本试验根据综合比较,确定 dNTP 浓度为 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 浓度为 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Taq DNA 聚合酶也是影响 PCR 扩增的重要因素。*Taq* DNA 聚合酶浓度根据 DNA 模板的不同用量有很大差异,过高,会导致非特异性产物的增加;过低,则无扩增产物或产物不稳定。通过优化,本试验 10 μL 的反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶为 1 U。

在反应体系中,引物浓度过高易形成引物二聚体且产生非特异性产物,过低又不足以完成 34 个循环的扩增反应,会降低 PCR 的扩增产量。本试验中,引物浓度在 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,用于不同引物的扩增,均获得了良好效果。

在 PCR 扩增中,退火温度过低会导致引物与模板的非特异性结合,使扩增的特异性下降;过高会提高反应的特异性,但扩增产物减少。由于引物碱基构成不同,最佳的退火温度也不同,因此,要根据引物序列的碱基构成进行相应的退火温度设计、优化,才能获得清晰、稳定的扩增条带,本试验根据所选引物的 T_m 值选择了 46 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 共 8 个温度梯度,分别获得了比较理想的退火温度。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志. 第 15 卷[M]. 北京:科学出版社,1978:6.
- [2] 瞿士辉. 土家族药开口箭漱口液临床应用治疗咽喉炎 45 例[J]. 中国民族民间医药杂志,1999(3):140.
- [3] 陈江华,刘忠华,李凤兰,等. 开口箭属植物研究进展[J]. 中药材,2008,31(5):791.
- [4] 朱化珍,陈德兴. 分子生物技术在中药复方药理研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):278.
- [5] 周涛,吴钰,金艳蕾,等. 头花蓼重复片段多态性分析-多聚酶链式反应体系建立与正交优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):50.
- [6] 李贝宁,南博,李春生,等. 道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):90.
- [7] 朱田田,晋玲,杜弢,等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):125.
- [8] 何予卿,张宇,孙海,等. 利用 ISSR 标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123.
- [9] Jonsson B O, Jonsdottir I S, Cronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic *Carex bigelowii*[J]. J Ecol, 1996(84):449.
- [10] 刘孟军. 苹果属植物 RAPD 分析的影响因素及其稳定性研究[J]. 河北农业大学学报,1998,21(4):48.
- [11] 宣继萍,章镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):549.
- [12] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987(19):11.
- [13] 周天华. 中国特有属植物——马蹄香(*Saruma henryi* Oliv.) 的分子谱系地理学与遗传多样性研究[D]. 西安:西北大学,2010:18.
- [14] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1993:7.
- [15] 周俊亚,宾晓云,彭云涛,等. 罗汉果 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2004,22(3):81.
- [16] 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.
- [17] 雷一东. 大花红景天的 ISSR 遗传多样性与精油化学成分多样性研究[D]. 上海:复旦大学,2004.

[责任编辑 邹晓翠]