

· 资源与鉴定 ·

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

周涛^{1*}, 吴钰¹, 金艳蕾¹, 江维克¹, 陈美兰²

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立头花蓼 ISSR 的反应体系。方法:通过正交试验,研究了 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、引物浓度这 4 个因素在 3 个水平上对 ISSR-PCR 的影响。结果:确立了适合于头花蓼 ISSR PCR 的优化体系:25 μ L PCR 反应体系中含有 1 \times buffer 缓冲液 (10 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl, 8 $mmol \cdot L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 10 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris·HCl, pH 8.0), 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$, d NTP 200 $\mu mol \cdot L^{-1}$, 2.0 U·25 μL^{-1} *Taq* 酶, 0.25 $mmol \cdot L^{-1}$ 引物, 40 $ng \cdot L^{-1}$ 模板 DNA。利用温度梯度 PCR, 确定了最适宜的退火温度为 48 $^{\circ}C$ 。结论:该优化体系的建立为进一步对头花蓼进行种质资源的遗传多样性分析奠定了基础。

[关键词] 头花蓼;重复片段多态性分析;正交设计

[中图分类号] R 282.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0050-04

Optimization for ISSR-PCR System of *Polygonum Capitatum* Buch-Ham. ex D. Don by Orthogonal Design

ZHOU Tao^{1*}, WU Yu¹, JING Yan-lei¹, JIANG Wei-ke¹, CHEN Mei-lan²

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Institute of Chinese Material Medicinal, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the optimum ISSR-PCR system of *Polygonum capitatum*. **Method:** The Mg^{2+} , dNTPs, primers and *Taq* DNA polymerase, were investigated to optimize the ISSR-PCR reaction system of *Polygonum capitatum* by orthogonal tests. **Result:** The optimized ISSR-PCR system of *P. capitatum* included 1 \times DNA polymerase buffer (10 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl, 8 $mmol \cdot L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, 10 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris·HCl, pH 8.0), 3.0 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$ 200 $\mu mol \cdot L^{-1}$ dNTPs, 2.0 U·25 μL^{-1} *Taq* DNA polymerase, 0.25 $mmol \cdot L^{-1}$ primer, 40 $ng \cdot L^{-1}$ DNA template, in 25 μ L PCR reaction system. By temperature gradient PCR, the optimum annealing temperature was determined as 48 $^{\circ}C$. **Conclusion:** The optimized system laid the groundwork for ISSR molecular analysis of *P. capitatum* Buch-Ham. ex D. Don.

[Key words] *Polygonum capitatum* Buch-Ham. ex D. Don; ISSR-PCR; orthogonal design

头花蓼用于痢疾, 肾炎, 膀胱炎, 尿路结石, 跌打

损伤, 疮疡湿疹等症, 具有解毒, 散瘀, 利尿通淋的功效^[1-2], 是贵州苗药的代表品种之一。由于头花蓼栽培资源在遗传背景上多来源于混杂野生群体, 现在随着头花蓼栽培的推广, 在种植上不仅存在连作障碍, 而且一些栽培产区的种质资源已产生了明显的遗传分化, 植株发生变异, 产量和品质下降, 这不仅严重影响了头花蓼栽培的推广及整个产业的良性发展, 也制约了头花蓼良种选育的进程。因此, 研究头

[收稿日期] 2010-01-20

[基金项目] 贵州省科技重大专项计划(黔科合重大专项字 20080620); 贵州省教育厅自然科学基金项目(黔教科 2008026)

[通讯作者] *周涛, Tel: 13985175215, E-mail: taozhou88@163.com

花蓼种质的遗传多样性对头花蓼的引种、品种改良、品种鉴定和生产实践等均具有重要意义。而利用 ISSR 标记技术开展头花蓼种质资源的遗传性研究至今尚未见到报道。

ISSR (inter simple sequence repeat) 分子标记技术是由 Zietkiewicz 等人于 1994 年创建^[3], 以稳定性、重复性、操作方便、成本低廉、多态性高, 被广泛应用于物种亲缘关系和遗传多样性研究、DNA 指纹图谱的建立、遗传图谱的构建、基因定位及分子标记辅助育种等研究中^[4]。由于 ISSR 是基于 PCR 的一种分子标记技术, 其扩增结果容易受 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 等因素的影响。为了确保 ISSR 分析结果的稳定和重复性, 需要对不同物种就上述因素进行优化。本文通过 4 因素 3 水平的正交试验, 对头花蓼 ISSR-PCR 反应的各因子进行优化, 目的是建立一个稳定、可靠的头花蓼 ISSR 反应体系, 为下一步进行头花蓼的遗传多样性分析、遗传图谱构建奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 药材来源 实验所用材料采自贵州省施秉县牛大场镇头花蓼 GAP 栽培基地的原种质保存圃, 经贵阳中医学院江维克副教授鉴定为头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch-Ham. ex D. Don, 叶片经液氮速冻后冷藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 引物与试剂 ISSR 引物设计参照加拿大哥伦比亚大学 (University of British Columbia, Set No. 9, No. 801-900) 公布的序列。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶以及标准分子质量 Marker V 由贵阳恒因生物公司代理, 购于北京三博生物有限公司。

1.3 基因组 DNA 的提取与纯化 采用改良 CTAB 法提取新鲜头花蓼叶片基因组总 DNA^[5], 总 DNA 溶于 $0.1 \times \text{TE}$ 缓冲液后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存, 用美国 Thermo Electron Corporation 公司生产的 UnicamUV 300 紫外分光光度计测定基因组 DNA 的纯度和浓度, 并稀释至 $20\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 用于 ISSR 反应条件的优化实验。

1.4 ISSR-PCR 体系优化的正交设计 为了优化影响 PCR 反应的 4 个因素 (Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶浓度、引物浓度), 采用了 $L_9(3^4)$ 的正交设计, 在 4 因素 3 水平上进行筛选。设计方案见表 1, 2。正交表中的 9 个试验均重复 2 次。

1.5 ISSR 初始扩增条件及 PCR 扩增程序 扩增反

应条件为 $25\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体积, 引物选用 804 (5'-TCTCTCTCTCTCTCA-3'), 除表 1, 2 变化因素外, 每管含有 $1 \times \text{PCR buffer}$ 和 40 ng 模板 DNA。反应在德国 Eppendorf 公司生产的 Mastercycles PCR 仪和美国热电公司生产的 Thermo P $\times 2$ 梯度热循环仪中进行, 根据引物的 T_m 值, 初步确定 ISSR-PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min , 共 40 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后延伸 5 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 $0.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB) 在 $4\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电压下电泳 1 h , 电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 以 100 bp DNA 标准分子质量 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 做为分子质量标记。电泳凝胶用英国 SYNGENE 公司生产的 BritainGGM/D2 凝胶成像系统进行拍照和分析。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的因素水平

水平	dNTP $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Primers $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Mg^{2+} $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>Taq</i> DNA $/\text{U} \cdot 20\text{ }\mu\text{L}^{-1}$
1	100	0.25	1.0	1.5
2	150	0.50	2.0	2.0
3	200	1.00	3.0	2.5

表 2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验设计

处理组合	dNTP $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Primers $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Mg^{2+} $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>Taq</i> DNA $/\text{U} \cdot 20\text{ }\mu\text{L}^{-1}$
1	100	0.25	1.0	1.5
2	100	0.50	2.0	2.0
3	100	1.00	3.0	2.5
4	150	0.25	2.0	2.5
5	150	0.50	3.0	1.5
6	150	1.00	1.0	2.0
7	200	0.25	3.0	2.0
8	200	0.50	1.0	2.5
9	200	1.00	2.0	1.5

1.6 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA 浓度的优化

根据正交试验结果选出最佳反应体系组合后, 再对模板 DNA 浓度进行梯度试验, 优化筛选合适的模板 DNA 浓度。 $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中模板 DNA 设 20, 40, 60, 80, 100 ng 5 个处理, 每个处理设 2 次重复, 其他反应程序和体系组合均与正交试验设计中最佳反应体系相同。

1.7 ISSR-PCR 反应体系中退火温度的优化 在上述试验确定的最佳反应体系基础之上, 对退火温度

进行梯度试验,优化筛选最佳退火温度。在 PCR 梯度扩增仪上设置最小退火温度为 46 ℃,最大为 50 ℃,PCR 仪自动形成 6 个梯度,即 46,47,48,49,50,51 ℃,每个梯度设 2 次重复,其他反应程序和体系组合均与试验确定的最佳反应体系相同。

1.8 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测 另外选择 3 个 ISSR 引物 UBC802(5'-GGATGGATGGATGGAT-3')、UBC825(5'-TGTGTGTGTGTGTGA-3')、UBC846(5'-ATATATATATATATATT-3')对优化确定的头花蓼 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测,每个引物设 3 次重复。

2 结果与讨论

2.1 ISSR-PCR 正交试验的直观分析 PCR 扩增结果可依据谱带的强弱和杂带的多少进行直观分析^[6]。由图 1 看出,不同实验中,由于 dNTP、引物、Mg²⁺ 和 *Taq* DNA 聚合酶的浓度不同,扩增结果存在明显的差异。组合 7,8 多态性较好且较清晰。结合 3 个引物的稳定实验结果,组合 7 最佳,其扩增带清晰明亮、条带丰富、重复性好,可适用于不同的引物扩增。该优化体系为:25 μL PCR 反应体系中含有 1 × buffer 缓冲液(10 mmol · L⁻¹ KCl, 8 mmol · L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 10 mmol · L⁻¹ Tris · HCl, pH 8.0), 3.0 mmol · L⁻¹ MgCl₂, dNTP 200 μmol · L⁻¹, 2.0 U · 25 μL⁻¹ *Taq* 酶, 0.25 mmol · L⁻¹ 引物, 40 ng · L⁻¹ 模板 DNA。

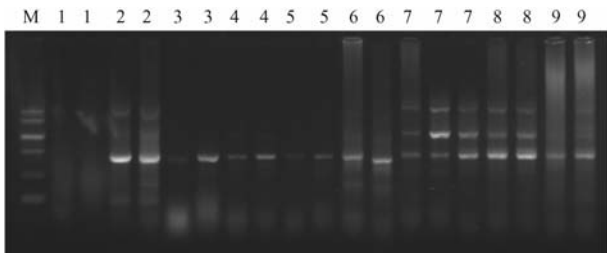


图 1 正交试验设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增结果
M: marker; 1~9 为处理组合, 2 次重复

2.2 各因素的不同水平对头花蓼 ISSR-PCR 反应的影响

2.2.1 不同模板浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 用正交试验中所优选的组合 7 考查模板 DNA 的质量和浓度对 PCR 结果的影响。本试验设定了 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200 ng 共 9 个浓度梯度进行实验。在图 2 可以看到,随着模板浓度的增加,扩增带由弱至强,浓度在 40 ~ 140 ng 时主带明显,杂带少且较稳定。为了节约 DNA 模板,本实验确定 25 μL 的 ISSR-PCR 反应体系中,参与反应的模板 DNA

浓度在 40 ~ 60 ng。

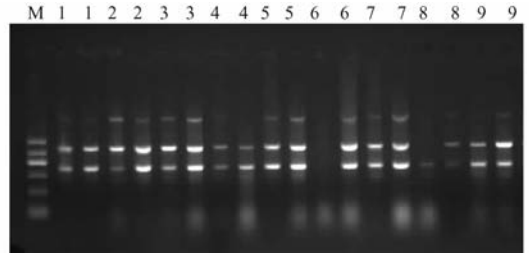


图 2 不同模板浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响
M: DNA marker; 1~9 表示 DNA 模板浓度为 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200 ng, 2 次重复

2.2.2 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测 本文选择另外 3 个 ISSR 引物对头花蓼的优化体系组合 7 进行稳定性检测。由图 3 可以看出,所用的 3 个 ISSR 引物均能扩增出清晰、多态性高、重复性好的条带,表明所建立的头花蓼 ISSR-PCR 反应体系是稳定的。

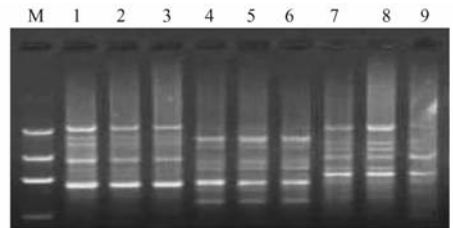


图 3 不同引物对 ISSR-PCR 扩增的影响
M: DNA marker; 1~9 表示引物为 802, 825, 846, 3 次重复

2.2.3 最适退火温度的确定 退火温度是影响 PCR 的重要因素之一。退火温度不仅与引物序列有关,还与物种 DNA 的序列有密切关系,因此确定最适宜的退火温度对获得稳定可靠的 ISSR-PCR 结果非常重要。根据正交试验结果,选择组合 7 对引物 816 的退活温度进行梯度筛选。电泳图经 GIS 凝胶成像系统分析,统计扩增条带数和条带亮度(用峰高

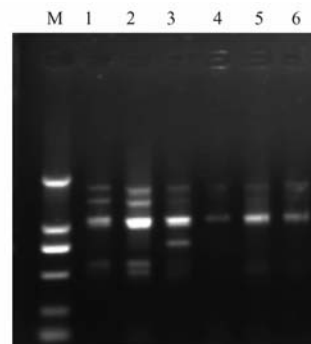


图 4 ISSR-PCR 反应体系中不同退火温度的扩增结果
M: marker; 1~6 表示退火温度为 46, 47, 48, 49, 50, 51 ℃

表示强度),结果如图 4 所示,第 1,2,3 泳道背景清晰,扩增条带数 4~6 条,且主带明显,亮度也最高。因此退火温度以 47~49 °C 较好。因为较高的退火温度可降低非特异性扩增,所以选 48 °C 为最适宜的退火温度。

3 结论

ISSR 分子标记技术是基于 PCR 反应的方法,易受多种因素的干扰,如模板 DNA, *Taq* 酶, dNTP, 引物以及 Mg^{2+} 等。其中,引物的质量和浓度是影响 PCR 结果的一个重要因素,对 ISSR-PCR 的带型和背景会产生明显的影响。浓度太低不能进行有效扩增,浓度太高会增加引物二聚体的形成,引起碱基错配,导致条带不稳定及清晰度下降^[7]。其次, Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶活性所必需的,对 PCR 扩增的效率、特异性、退火温度都有影响,因为 Mg^{2+} 可以和 dNTP, DNA 和引物形成复合物,从而降低 Mg^{2+} 的有效浓度,影响 PCR 的结果^[8]。而 *Taq* 聚合酶是 PCR 反应中的关键因素,其浓度变化对试验结果影响较大,酶用量过高不仅增加成本,还会造成非特异扩增;过低则会降低产物合成效率。dNTP 是 *Taq* 酶的底物,它的浓度直接影响到 PCR 反应的结果。dNTP 浓度过低会降低 PCR 产物的产量,过高会造成浪费。除了上述反应体系,不同的物种对反应条件也存在一定的差异^[7]。所以,在采用该标记技术时首先对其反应体系进行筛选和优化是必要的。本试验为获得重复性好、可靠性高的扩增谱带,通过正交试验对影响头花蓼 ISSR-PCR 反应在 4 因素 3 水平上进行了优化。筛选的最优的水平组合为:dNTP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Mg^{2+} $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 酶 $2.0 \text{ U} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ 、 $40 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 模板

DNA,最适退火温度为 48 °C。利用此优化系统进行 ISSR-PCR 反应,可获得稳定性高,重复性好,背景清晰的电泳结果。

实验中采用的 DNA 聚合酶、dNTP 均为国内生产,与进口试剂相比,大大降低了实验成本。利用本文建立的 ISSR-PCR 反应体系,我们完成了多态性引物筛选,开展了头花蓼遗传多样性的研究工作。

[参考文献]

- [1] 白佩瑜. 中国植物志[M]. 第 25 卷. 第 1 分册. 北京: 科学出版社, 1998, 25(1):57.
- [2] 贵州省中药资源普查办公室. 贵州中药资源[M]. 北京:中国医药科技出版社,1992:653.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J], *Genomics*, 1994, 20:176.
- [4] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. *遗传*, 2002,24(5):613.
- [5] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980,8:4321.
- [6] 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):403.
- [7] 余艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2003, 11(1):15.
- [8] 李文表,周先叶,李勇,等. 棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化[J]. *广西植物*, 2006, 26(2):204.

[责任编辑 顾雪竹]