

与否,没有酶的催化,反应无法进行。因此,寻找合适浓度的 *Taq* DNA 聚合酶是实验的重要任务。但是,酶的活性又与 Mg^{2+} 相关联,合适的 Mg^{2+} 浓度又是决定酶活性的重要因素。所以,笔者采用了酶与 Mg^{2+} 的二因子交叉试验,通过不同的搭配,找出最适的浓度组合。值得注意的是,不同厂家,甚至同一厂家不同批次的酶,其活力都存在着差异。为了减少实验误差,应该尽量使用同一厂家生产的同一批次的酶。

dNTP 是扩增的主要原料,其浓度过高时,dNTP 分子中的磷酸基团会定量地与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度降低,与酶竞争 Mg^{2+} ,使得酶的活性降低,扩增产物大大减少。并且还会导致 PCR 错配,出现非特异性扩增,影响结果。浓度过低,又会影响扩增的产量。因此,合适的 dNTP 浓度也是十分关键的。本实验通过梯度设置,得到了合适的 dNTP 浓度。ISSR 对模板的浓度要求并不高,只要是在一定的范围内,多样性条带不会有变化,但是产量则有不同。一般而言,模板的浓度越高,产量越高^[12]。

由于 ISSR-PCR 所用的每条引物碱基组成和数量是不同的,因此,每条引物都有适合自己的退火温度。退火温度有时候并不严格等于其 T_m 值,而是在 T_m 值附近波动。在 PCR 反应中,过低的温度在保证模板与引物结合的同时,也使得模板与引物之间未完全配对的位点得到扩增,产生了所谓的错误扩增。因此,在允许的温度范围内,较高的温度会提高反应的特异性,减少非特异性产物的生成。在本实验中,每条引物都要单独摸索退火温度,其基本的原则是逐步递缩法^[13],即首先设置较宽的温度梯度,找到大体合适的温度范围之后,再把此范围的温

度细分,直至找到合适的温度为止。

因为分子标记实验受很多因素的影响,因此要尽量严格地控制各反应因素,减少不必要的误差出现。并且实验要重复多次,取稳定的条件作为最终反应条件,从而得到最佳实验结果。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第27卷. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] 王立群, 叶晓川, 邓 芬, 等. 生态技术栽培黄连的质量评价 [J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(6): 607-610.
- [4] 郭志刚, 赵 琳, 孙瑞强, 等. 利川黄连小檗碱含量 [J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(6): 618-621.
- [5] 庄 平, 黄明远. 峨眉山野生黄连个体生物量与生物碱含量研究 [J]. 中草药, 1994, 25(8): 425-428.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [7] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 726.
- [8] Casasoh M, Mattioni C, Cherubina C, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR, and isozyme markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1190.
- [9] Jin Y, Zhang W J, Fu D X, et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers [J]. *植物学报*, 2003, 45(8): 995-1002.
- [10] Li H S, Chen G Z. Genetic diversity of *Sonneratia alba* in China detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. *植物学报*, 2004, 46(5): 515-521.
- [11] 邱英雄, 傅承新, 吴斐捷. 明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的 ISSR 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(7): 598-603.
- [12] 余 艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列 (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): 15-19.
- [13] 姜 静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. *生态学杂志*, 2003, 22(3): 91-93.

基于方差分析优化菊花 ISSR-PCR 反应体系

邵清松^{1,2}, 郭巧生^{1*}, 谢作成^{1*}

(1. 南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095; 2. 浙江林学院, 浙江 杭州 311300)

摘要:目的 对影响药用菊花 ISSR-PCR 扩增效果的一些因素进行优化,为进一步研究其遗传多样性奠定基础。方法 基于方差分析方法,利用正交试验从 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物等 4 因素 3 水平对药用菊花反应体系进行优化。结果 药用菊花 ISSR-PCR 的最佳反应体系:在 20 μ L 的反应体系中,*Taq* 酶 1.00 U, Mg^{2+} 2.00 mmol/L,

* 收稿日期:2008-04-12

基金项目:国家科技攻关计划项目(2004BA721A20);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A12-11)

作者简介:邵清松(1980—),男,浙江温州人,博士研究生,主要从事药用植物遗传多样性及中药资源开发与利用方面的研究。

* 通讯作者 郭巧生 Tel:(025)84396591 E-mail:gqs@njau.edu.cn

dNTP 0.20 mmol/L, 引物 0.50 μ mol/L。结论 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP 等对 ISSR 反应结果有极显著影响。所建立的药用菊花 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、检测多态性能力较强、重复性好等特点,可用于药用菊花的遗传多样性研究。

关键词:菊花;ISSR 反应体系;优化

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0284-04

Optimization of ISSR-PCR reaction system for *Chrysanthemum morifolium* based on analysis of variance

SHAO Qing-song^{1,2}, GUO Qiao-sheng¹, XIE Zuo-cheng¹

(1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Zhejiang Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract : Objective To establish and optimize ISSR-PCR systems of *Chrysanthemum morifolium* and lay the foundation for its genetic diversity research. **Methods** Based on the analysis of variance, an orthogonal design was used to optimize the ISSR-PCR amplification system on *C. morifolium* by four factors (*Taq* polymerase, Mg^{2+} , dNTP, and primer) at three concentration levels, respectively. **Results** A suitable ISSR reaction system was constructed with the 20 μ L reaction system containing 1.00 U *Taq* polymerase, 2.00 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 mmol/L dNTP, and 0.50 μ mol/L primer. **Conclusion** ISSR-PCR is significantly influenced by the concentration of *Taq* polymerase, Mg^{2+} , and dNTP. This ISSR-PCR system could provide clear bands, reliable reaction system, and abundant polymorphisms. It is proved to be suitable for the study of the genetic diversity of *C. morifolium*.

Key words : *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; ISSR reaction system; optimization

菊花为菊科菊属植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序,为常用中药,具有散风清热、平肝明目等功效,用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花等病症。我国药用菊花具有悠久的历史,分布广泛,类型多样,根据产地的不同,主要有杭菊、贡菊、毫菊、滁菊、怀菊、济菊和祁菊等类型。由于经过长期的相互引种栽培,造成了地区间药用菊花类型的混杂。据初步调查,药用菊花种质资源在形态特征、内在质量和产量等方面均有较大差异,但彼此间遗传背景、亲缘关系尚不清楚,故有必要运用新的技术手段加强药用菊花种质资源遗传多样性研究。简单序列重复区间扩增(inter simple sequence repeats, ISSR)是 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种 DNA 标记技术。ISSR 技术基于 PCR 的分子标记技术,它对两个序列相同但方向相反的微卫星重复序列之间的区域进行扩增,具有操作简单、成本低、快速、灵敏、检测多态性能力强、所需 DNA 模板量少等优点,其产物的多态性比随机扩增多态 DNA (RAPD) 丰富,而且比 RAPD 技术更为稳定可靠,重复性更好^[1]。目前 ISSR 技术已用于植物品种鉴定^[2,3]、遗传作图^[4,5]、遗传多样性^[6,7]和居群遗传学^[8]等研究中。

本研究基于方差分析方法,采用正交设计方法

对影响药用菊花 ISSR-PCR 反应体系的 4 个主要因素(*Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物)的浓度(数量)在 3 个水平上进行优化试验,选取最佳因素水平,建立药用菊花 ISSR-PCR 最佳反应体系,为开展药用菊花种质资源多样性评价、新品种鉴定和亲缘关系分析等提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料:供试材料为搜集到的我国药用菊花主产区的 35 份种质,经郭巧生教授鉴定。材料取自南京农业大学中药材研究所药用菊花种质资源圃。采取幼嫩叶片,液氮速冻后置于 -70°C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取:采用改良的 CTAB 法^[9]提取基因组 DNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,Ep-pendorf 公司生产的 Bio Photometer 核酸检测仪检测 DNA 溶液浓度,并将浓度稀释至 30 ng/ μ L。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验:以黄药菊 DNA 为试材,针对影响 PCR 反应的 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物 4 个因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交表在 3 个水平上试验, $L_9(3^4)$ 正交设计方案见表 1。

将表 1 的 9 个处理重复 2 次,在 MJ Research 公司生产的 PTC-200™ 型扩增仪上进行扩增,反应体系为 20 μ L,引物为 ISSR-Y11 (GA) 8 T,除上

表 1 PCR 扩增体系 $L_9(3^4)$ 正交设计
Table 1 Orthogonal design of $L_9(3^4)$ for PCR

试验号	Taq 酶/ U	Mg^{2+} / (mmol · L ⁻¹)	dNTP/ (mmol · L ⁻¹)	引物/ (mmol · L ⁻¹)
1	0.50	1.50	0.10	0.30
2	0.50	2.00	0.15	0.40
3	0.50	2.50	0.20	0.50
4	1.00	1.50	0.15	0.50
5	1.00	2.00	0.20	0.30
6	1.00	2.50	0.10	0.40
7	1.50	1.50	0.20	0.40
8	1.50	2.00	0.10	0.50
9	1.50	2.50	0.15	0.30

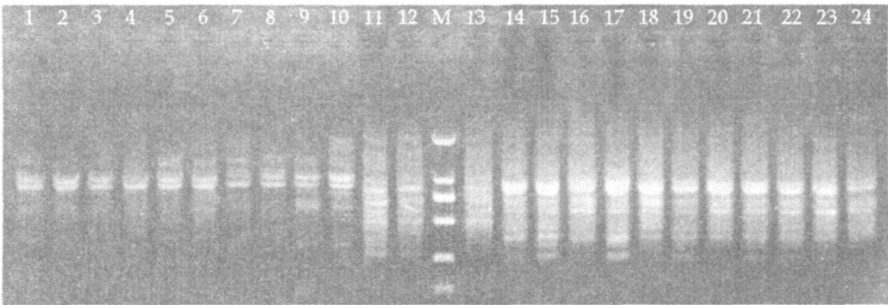
述变化因素外,还含有 1 × PCR buffer, 60 ng 模板 DNA。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 70 s, 循环 45 次; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 电泳结束后在上海培清科技有限公司生产的 JS-380 型凝胶成像分析仪上观

测并照相。
1. 2. 3 优化体系应用: 根据以上试验结果确定 ISSR-PCR 的最佳反应体系和扩增程序, 对我国不同产地的 35 份菊花种质材料进行 DNA 扩增, 对筛选出的体系和扩增程序进行稳定性检测。

2 结果与分析

2. 1 正交试验结果及数据处理: 根据 $L_9(3^4)$ 正交试验 PCR 产物电泳结果(图 1), 按照遗传多样性分析要求, 依据扩增出的谱带特异性与敏感性即谱带多少、亮度的强弱和杂带的有无对 PCR 扩增结果从高到低依次打分。谱带越多、亮度越强、又无杂带则评分越高。最好的处理定为 9 分, 最差的处理定为 1 分, 以这两个处理的结果为比较标准, 再将其他处理的谱带结果与这两个标准比较依次评分, 对两次重复分别独立统计, 依处理得到的两次记分结果分别为: 5、4、2、7、9、3、8、6、1; 4、5、3、6、9、2、8、7、1。

2. 2 各因素对 ISSR-PCR 反应影响的方差分析: 用



1~9-处理代号参见表 1 M-DL 2000
1-9-treatment number and treatment as showed in Table 1 M-DL 2000 marker

图 1 ISSR-PCR 正交试验电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of ISSR-PCR orthogonal design

SPSS 13.0 统计软件对正交试验结果进行方差分析(表 2)。结果表明, Taq 酶数量、 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度对实验结果有极显著的影响 ($P < 0.01$), 引物浓度对实验结果影响无显著性 ($P < 0.05$)。根据两次记分结果分别计算 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物各反应梯度 PCR 结果均值, 进一步对各因素的不同水

表 2 PCR 反应各因素正交设计方差分析

变异来源	自由度	均方	F 值	显著水平
Taq 酶数量	2	7.167	21.500	0.000
Mg^{2+} 浓度	2	40.667	122.000	0.000
dNTP 浓度	2	10.500	31.500	0.000
引物浓度	2	0.167	0.500	0.622
误差	9	0.333		

平进行多重比较。

2. 2. 1 Taq 酶数量的影响: 对 Taq 酶用量进行因素

内多重比较, 结果表明, 20 μ L 反应体系中, Taq 酶不同的反应梯度只有 1.00~1.50 U 差异不显著, P 值为 0.088, 其余梯度之间差异均达到了极显著。从图 2 反应结果均值与酶量的关系图中可以看出, Taq 酶活性过低, PCR 反应的敏感性差, 扩增的条带少(1~3 号处理), 所能提供的信息少。酶量在 0.50~1.00 U 时, 均值随酶量的增加而递加, 在 1.00 U 时, 达到最高, 继续增加酶量, 均值下降, 故选择 1.00 U 作为 ISSR-PCR 反应体系中酶的最佳浓度。

2. 2. 2 Mg^{2+} 浓度的影响: Mg^{2+} 主要是通过改变聚合酶的活性对 PCR 反应结果产生影响。 Mg^{2+} 的均值极差分析结果为 4.667, 是 4 个影响因子中极差值最大的, 说明 Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 的最重要因素。对 Mg^{2+} 进行因素内多重比较, 结果表明, 20 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 的反应梯度只有

1. 50~2.00 mmol/L 差异不显著, P 值为 0.450, 其余梯度之间差异都极显著。从图 3 反应结果均值与 Mg^{2+} 浓度的关系图中也可以看出, Mg^{2+} 浓度在 2.00~2.50 mmol/L 时, 结果均值随着 Mg^{2+} 浓度的增加而递减, 在 2.00 mmol/L 时为最高。故在 20 μ L 反应体系中选择 2.00 mmol/L 作为 ISSR-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 的最佳浓度。

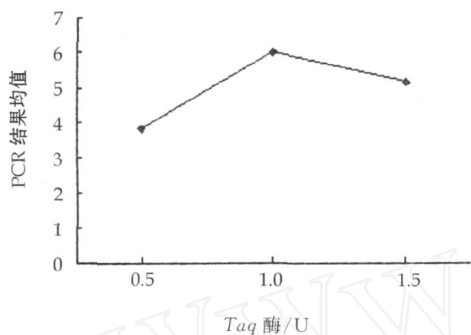


图 2 PCR 结果均值与 Taq 酶活性的关系

Fig. 2 Relationship of PCR result mean and Taq polymerase activity

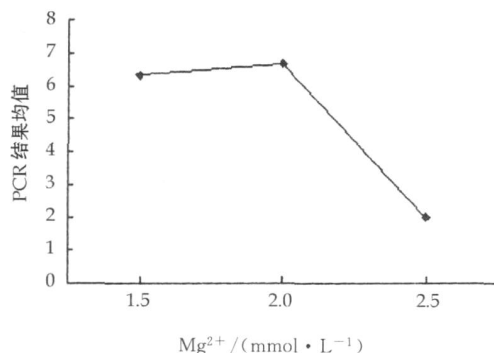


图 3 PCR 结果均值与 Mg^{2+} 浓度的关系

Fig. 3 Relationship of PCR result mean and Mg^{2+} concentration

2.2.3 dNTP 浓度的影响: dNTP 作为 PCR 反应的原料, 量太少会使扩增反应进行不完全, 而过多用量会使 dNTP 分子中的磷酸基团能定量地与 Mg^{2+} 结合, 使实际反应中 Mg^{2+} 的浓度下降而影响聚合酶的活力。对 dNTP 进行因素内多重比较, 结果表明, 20 μ L 反应体系中, dNTP 的反应梯度只有 0.10~0.15 mmol/L 差异不显著, P 值为 0.081, 其余梯度之间差异都极显著。从图 4 反应结果均值与 dNTP 浓度的关系图中也可以看出, dNTP 浓度在 0.15~0.20 mmol/L 时, 结果均值随着 Mg^{2+} 浓度的增加而递增, 在 0.20 mmol/L 时为最高。故在 20 μ L 反应体系中选择 0.20 mmol/L 作为 ISSR-PCR 反应体系中 dNTP 的最佳浓度。

2.2.4 引物浓度的影响: 引物浓度过低可能会无扩

增带, 而浓度过高则会出现非特异性扩增, 产生模糊小片断和引物二聚体。对引物浓度进行因素内多重比较, 结果表明, 20 μ L 反应体系中, 引物的各反应梯度之间差异均不显著, 均值极差分析结果为 0.334。从图 5 反应结果均值与引物浓度的关系图中也可以看出, 引物浓度在 0.30~0.50 μ mol/L 时, 结果均值随着引物浓度的增加而递增, 在 0.50 μ mol/L 时为最高。故在 20 μ L 反应体系中选择 0.50 μ mol/L 作为 ISSR-PCR 反应体系中引物的最佳浓度。

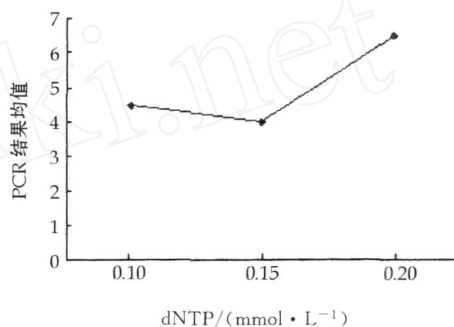


图 4 PCR 结果均值与 dNTP 浓度的关系

Fig. 4 Relationship of PCR result mean and dNTP concentration

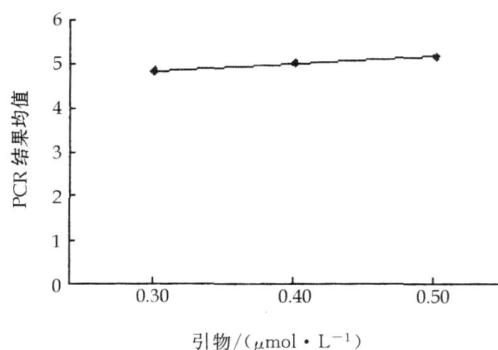


图 5 PCR 结果均值与引物的关系

Fig. 5 Relationship of PCR result mean and primer concentration

2.3 ISSR-PCR 反应体系应用: 根据以上试验结果确定的 ISSR-PCR 最佳反应体系和扩增程序, 对 35 份菊花种质材料进行 DNA 扩增, 以检测确定的 ISSR-PCR 反应体系的应用可靠性。结果见图 6。35 份药用菊花种质材料上都能扩增出清晰、重复性好、多态性高的 DNA 谱带, 表明已确立的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可用于药用菊花遗传多样性分析、种质资源鉴定等研究。

3 讨论

ISSR-PCR 反应对模板浓度的要求范围较宽。冯富娟等^[10]在进行红松 ISSR-PCR 反应体系优化

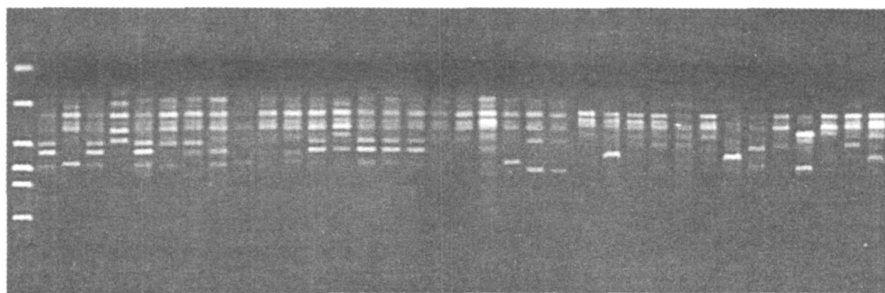


图 6 35 份药用菊花种质 ISSR 扩增的结果

Fig 6 ISSR Amplification of tested thirty-five medicinal *C. morifolium* germplasm

时证实模板纯度不会影响扩增结果,模板浓度在 10~200 ng/ μ L 扩增结果相同。因此,本研究在进行优化时没有考虑模板纯度和浓度对反应体系的影响,采用 30 ng/ μ L 作为模板浓度进行 PCR 扩增,取得了良好的扩增效果。

以往对 PCR 体系的优化试验,大多采用单因素梯度试验来进行最佳水平的摸索,不能兼顾到各因素间的交互作用,且多数单因素试验仅对扩增结果作直观分析,并未进行统计分析,无从考察各组分不同水平对扩增结果影响的差异显著性。本研究基于方差分析方法,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对影响药用菊花 ISSR-PCR 反应体系的 4 个因素 (Taq 酶, Mg^{2+} , dNTP, 引物) 在 3 个水平上进行的优化。系统地研究了不同因素和不同水平对 ISSR-PCR 的扩增结果影响,建立了菊花 ISSR-PCR 反应体系,即在 20 μ L 的反应体系中, Taq 酶 1.00 U, Mg^{2+} 2.00 mol/L, dNTP 0.20 mmol/L, 引物 0.50 μ mol/L; 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 循环 45 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。在正交试验中,某一因素对扩增结果的影响是通过固定其浓度,而动态变化其他多种组分浓度时获得的平均结果。所取得的结果包含了更多的信息,且工作量较小,数据分析简易,并可分析交互作用。但该方法也存在局限性,如对试验结果本身的评价带

有主观成分,打分的先后次序直接影响分析结果,使影响因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性。如何建立对 PCR 扩增结果评判的客观标准,提高试验结果的可信度和易操作性,对于促进 ISSR-PCR 技术的发展具有重要价值。

参考文献:

- [1] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125-1131.
- [2] 沈颖,徐程,万小凤,等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. *中草药*, 2005, 36(3): 423-427.
- [3] 左云娟,朱培林,刘强,等. 道地药材江枳壳品种遗传学关系的 ISSR 证据 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(18): 1416-1419.
- [4] 邱英雄,傅承新,吴斐捷. 明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的 ISSR 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(7): 598-603.
- [5] 梁洪卉,程舟,杨晓伶,等. 青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2005, 36(12): 1859-1864.
- [6] 吴卫,郑有良,陈黎,等. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性 [J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2003, 5(1): 70-77.
- [7] 李靖,程舟,杨晓伶,等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2007, 38(9): 1392-1395.
- [8] 沈洁,丁小余,丁鸽,等. 铁皮石斛居群差异的研究 II ISSR 指纹标记方法的建立与优化 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(4): 291-294.
- [9] 邹喻萃,葛颂,王晓东,等. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 冯富娟,王凤友,刘彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素 [J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 326-331.

中国药学会 6 种期刊入选“中国精品科技期刊”

2008 年 12 月 10 日,在北京举行的“中国科技论文统计结果新闻发布会”上,中国药学会主办的《药学报》、《中国药理学杂志》、《中草药》、《中国新药杂志》、《中国医院药学杂志》、《中国中药杂志》共 6 种期刊被评为“中国精品科技期刊”。

国家科技部自 2000 年以来立项进行“中国精品科技期刊战略研究”,“中国精品科技期刊”是指在某一学科内质量和水平较高、在国内具有较高影响且具有一定发展潜力的科技期刊。“中国精品科技期刊”的遴选指标由定量指标和定性指标两部分组成,遴选时以定量指标为主,定性指标为辅。定量指标主要包括学术质量水平指标和国际竞争力水平指标。定性指标主要是指期刊的可持续发展潜力指标。2008 年首批“精品科技期刊”由 23 种中国国际化精品科技期刊和 300 种中国精品科技期刊组成。