·药材与资源 ·

三角叶黄连 ISSR 反应体系的建立与优化

张春平,何 平*,王瑞波,高 姗,张益锋*

(西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室,重庆 400715)

摘 要:**目的** 针对三角叶黄连 ISSR 的反应特点,建立稳定可靠的 ISSR-PCR 分子标记反应体系,为进一步研究三角叶黄连的种质资源遗传多样性奠定基础。**方法** 通过筛选引物并设定影响三角叶黄连 ISSR-PCR 反应诸因子的不同梯度,检测其不同反应体系的扩增效果,分析非特异性条带的产生原因并进行条件优化,建立三角叶黄连 ISSR-PCR 稳定可靠的反应体系。**结果** 建立了可用于三角叶黄连 ISSR-PCR 分析的最适宜的反应体系:25 μL PCR 反应体系中,内含 10 ×PCR Buffer 2.5 μL,1.5 mmol/L Mg^{2+},200 μmol/L dNTP,0.3 μmol/L 引物,40 ng 模板,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶。扩增程序为 94 ℃预变性 5 min,然后进行 35 个循环:94 ℃变性 30 s,(据不同引物的退火温度)复性 60 s,72 ℃延伸 90 s,循环结束后 72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。**结论** 所建立的三角叶黄连 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、检测多态性能力强、重复性好等特点,可以较好地应用于三角叶黄连的种质资源遗传多样性及居群鉴别的研究。

关键词:三角叶黄连;ISSR;种质资源;优化

中图分类号:R282.2 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2009)02-0280-05

Establishment and optimization of ISSR reaction system for *Coptis deltoidea*

ZHANG Chun-ping, HE Ping, WANG Rui-bo, GAO Shan, ZHANG Yi-feng

(Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Objective In order to study the genetic diversity of *Coptis deltoidea* germplasm, ISSR-PCR system of *C. deltoide* was established and optimized according to the characters of it. **Methods** The effect of ISSR-PCR was examined by screening primers and designing the different concentration of the factors in the ISSR. The reliable system for *C. deltoide* populations researching was established by analyzing the reasons for occurrence of differential bands and optimizing the reaction conditions. **Results** The optimal ISSR-PCR system in *C. deltoide* was established for the first time, that is, 25 μL amplification reactions system containing 10 ×PCR Buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L Mg^{2+}, 200 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L primer, 40 ng template, 1.0 U *Taq* DNA polymerase. The optimal amplified procedure was as follows: after a pre-denaturing of 5 min at 94 ℃, 35 cycles were performed with denaturing of 30 s at 94 ℃, annealing of 1 min due to denaturing temperature of different primer, extension of 1.5 min at 72 ℃, a final extension step of 7 min at 72 ℃ and kept at 4 ℃. **Conclusion** The ISSR-PCR systems established for studying of *C. deltoide* show the characters of clear marker site, stable reaction system, reliable abundant polymorphisms, and better repeatability. It is suitable for the study on genetic diversity of germplasm resource and identification of *C. deltoide* population.

Key words: *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao; ISSR; germplasm resource; optimization

三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 为毛茛科黄连属多年生草本植物,主要分布在四川西部的峨眉、洪雅与雅安地区海拔 1 600～2 200 m 的山地林下[1]。三角叶黄连根茎入药,干

* 收稿日期:2008-03-08
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070080)
作者简介:张春平(1982—),男,山东潍坊人,硕士,主要从事植物资源学与植物分子生物学方面的研究。E-mail:chunpingzhang520@163.com
*通讯作者 何 平 Tel:(023)68254122 E-mail:heping196373@126.com

品称为“黄连”或“雅连”,内含小檗碱、黄连碱等多种生物碱,具有清热、解毒、泻火、燥湿和良好的抗菌作用[2]。目前,三角叶黄连主要是以人工栽培的方式生产,种内遗传多样性较低。野生三角叶黄连居群数量及个体数濒危稀少,野生资源相当匮乏。为了从野生三角叶黄连中筛选出性状优良的品种,研究野生三角叶黄连的遗传多样性极有必要。目前,对其药理、药化方面的研究相对较多[3~5],但是对其种质资源的遗传多样性研究,特别是运用像 ISSR 等分子手段的研究未见报道。

ISSR(inter-simple sequence repeat)是一种由 Zietkiewiez等于 1994 年创建[6],建立在 PCR 反应基础上的 DNA 分子标记。近年来,ISSR-PCR 已成功用于植物遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制、分子生态学研究等领域[7~11]。该技术无需预知受试材料基因组序列,成本低、操作简单、灵敏性高且重复性好等优点,被认为是非常理想的分子标记。研究三角叶黄连居群的遗传多样性时,发现改变 ISSR-PCR 反应的各因子会直接影响到实验结果的稳定性。为此,必须对三角叶黄连 ISSR-PCR 的反应体系进行优化,分析非特异性条带产生的原因,以建立适合三角叶黄连 ISSR-PCR 反应的可靠体系,为深入开展三角叶黄连种质资源的遗传多样性研究奠定基础。本研究旨在建立重复性好、结果明显而稳定的 ISSR 反应体系和扩增程序,为进一步对三角叶黄连的鉴定和种质资源遗传多样性研究提供有效便利的方法,为挖掘潜在的药物资源和开发新药提供良好基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料:采自三角叶黄连的主产区四川洪雅和雅安地区。选取当年生嫩叶,低温条件下带回实验室洗净、晾干,冻于 −80 ℃的超低温冰箱中备用。

1.2 仪器与试剂:扩增仪(Bio-Rad 公司),核酸蛋白分析仪(Bio-Rad 公司),电泳仪(Bio-Rad 公司),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司),引物(上海生工),dNTP(Promega 公司),*Taq* DNA 聚合酶(Promega 公司),Mg^{2+}(上海生工),Buffer(上海生工),DNA Marker(TakaRa),PVP(Sigma),β-巯基乙醇(Sigma),CTAB(Sigma),其余为国产分析纯试剂。

1.3 基因组 DNA 提取及检测:取新鲜的三角叶黄连叶片 1 g,采用改良后的 CTAB 法提取三角叶黄连的基因组 DNA。用 Bio-Rad 核酸蛋白分析仪测定所提 DNA 浓度及纯度,同时用 1.5 %的琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 是否降解。

1.4 扩增的优化实验设计:优化实验中选用筛选好的 U840 为扩增引物,对影响三角叶黄连 ISSR-PCR 反应的主要因素进行梯度实验。在进行梯度实验之前,先根据经验确定一个基本反应体系(25 μL PCR 反应体系中,内含 10 ×PCR Buffer 2.5 μL,2.0 mmol/L Mg^{2+},200 μmol/L dNTP,0.2 μmol/L 引物,20 ng 模板,1.0 U DNA 聚合酶),再通过固定其他变量改变一个变量的方法进行实验。具体的梯度设计分别为:*Taq* DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 二因素梯度实验,dNTP、模板、引物单因素梯度实验和引物退火温度梯度单因素实验。在酶与 Mg^{2+} 二因素梯度实验中,*Taq* DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 分别设置了 4 个浓度梯度,二因素交叉共 16 个处理。引物的退火温度梯度则是在其 Tm 值附近设置 8 个梯度进行筛选。结果见表 1。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的试验设计

Table 1 Design of experiment for ISSR-PCR reactions system

反应成分	反应浓度梯度
Mg^{2+}/(mmol·L^{-1})	1.0、1.5、2.0、2.5
Taq DNA 聚合酶/U	0.5、1.0、1.5、2.0
dNTPs/(mmol·L^{-1})	20、50、100、200、250、300、350、400
引物/(μmol·L^{-1})	0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8
模板 DNA/ng	10、20、40、80、100、120、160、200
低温退火温度/℃	52.0、53.5、54.5、55.5、56.5、57.0、57.5、58.0

1.5 ISSR-PCR 反应产物的检测:反应产物在含有 goldview 的 1.5 %的琼脂糖凝胶中电泳分离,电压 5 V/cm。用 DL 2000 的 DNA marker(100～2 000 bp)作为标记,电泳结束后在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取:结果见图 1。随意提取 8 个个体的基因组 DNA 经电泳后显示出清晰整齐的条带,这表明 DNA 并未发生降解。在 Bio-Rad 核酸蛋白分析仪上测其质量浓度,将其稀释至 40 ng/μL,供 ISSR-PCR 试验所用。

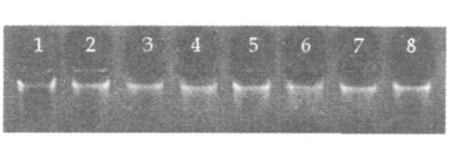


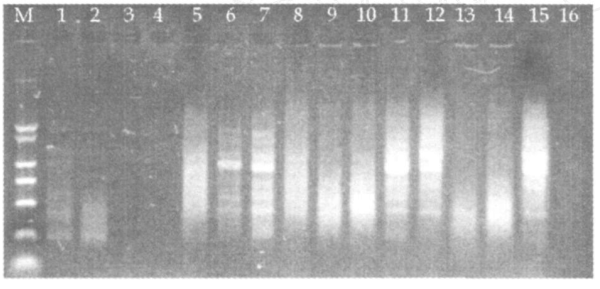
图 1 基因组 DNA 的提取结果

Fig. 1 Extraction of genomic DNA

2.2 反应体系中各组分对扩增的影响

2.2.1 *Taq* DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 对 ISSR 扩增的影响:本研究采用 *Taq* DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 的二因

素交叉试验,设置了 16 个处理,结果见图 2。当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时,*Taq* DNA 聚合酶从 0.5～2.0 U 均无扩增产物生成,并有拖尾现象产生。当 Mg^{2+} 浓度达到 1.5 mmol/L 时,开始出现条带,并且当酶的量达到 1.0～1.5 U 时,条带清晰,但是当酶量为 1.0 U 时,产生的条带明亮且背景清晰,效果优于酶量为 1.5 U 时的,本着高效节省的原则,1.0 U 可定为最适用量。当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时,所扩增的产物形成拖尾现象,模糊不清。当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,同样出现拖尾现象,并且在此 Mg^{2+} 浓度下,高酶量不产生任何条带。因此,泳道 6 的组合,即当 Mg^{2+} 为 1.5 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶为 1.0 U 时,整体效果最好。



1～4-Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L,聚合酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 U 5～8-Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L,聚合酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 U 9～12-Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L,聚合酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 U 13～16-Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L,聚合酶浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 U

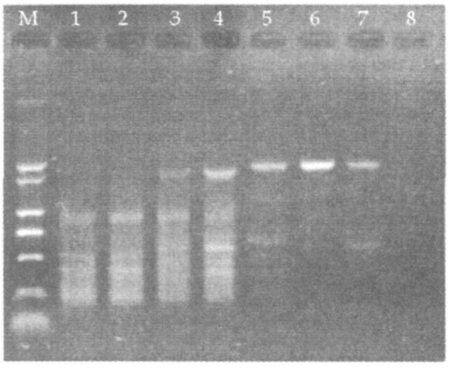
1—4-Mg^{2+} concentration: 1.0 mmol/L, polymerase concentration: 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 U, respectively 5—8-Mg^{2+} concentration: 1.5 mmol/L, polymerase concentration: 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 U, respectively 9—12-Mg^{2+} concentration: 2.0 mmol/L, polymerase concentration: 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 U, respectively

13—16-Mg^{2+} concentration: 2.5 mmol/L, polymerase concentration: 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 U, respectively

图 2 Taq DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 对 ISSR 扩增的影响

Fig. 2 Effect of Taq DNA polymerase and Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

2.2.2 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响:dNTP 是 PCR 扩增的原料,为了寻求最佳浓度,本实验设置了从 20～400 mmol/L 共 8 个浓度梯度,结果见图 3。在 8 个浓度梯度中,当浓度在 20～200 mmol/L 时,随着 dNTP 浓度的增加,条带数量增加,并且在 200 mmol/L 时产生的多样性条带数量多且清晰。当 dNTP 的浓度达到 250 mmol/L 时,仅产生少量条带。当在 400 mmol/L 时并无任何条带产生,这表示无 PCR 产物生成,因此,200 mmol/L 的 dNTP 为最佳浓度。



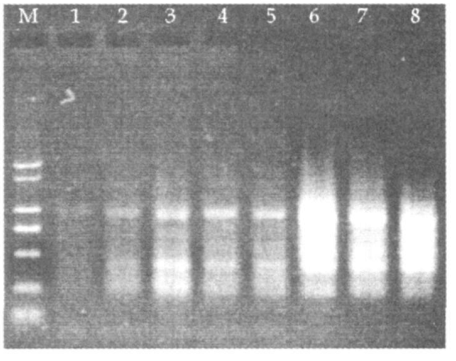
1～8-显示 dNTP 浓度:20、50、100、200、250、300、350、400 mmol/L

1—8-concentration of dNTPs: 20, 50, 100, 200, 250, 300, 350, and 400 mmol/L

图 3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification

2.2.3 引物浓度对 ISSR 扩增的影响:本实验中采用筛选出的 U840 作为扩增引物,共设置了 8 个浓度梯度,结果见图 4。当引物浓度在 0.2～0.5 μmol/L 时有扩增产生,并且引物浓度在 0.3 μmol/L 时,条带最清晰且数目最多,这表明生成的扩增产物最多。当引物浓度在 0.6～0.8 μmol/L 时,得到的条带模糊不清。这表明非特异性扩增显著增强。相对而言,0.3 μmol/L 时扩增明显且效果较好,可以被确定为反应的理想浓度。



1～8-显示引物浓度:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μmol/L

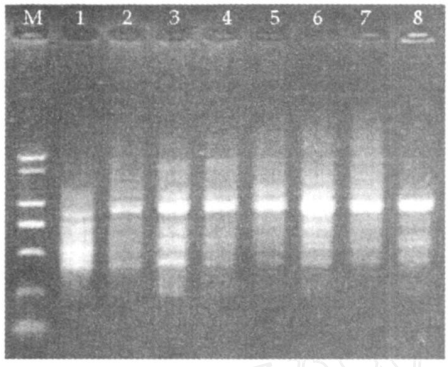
1—8-concentration of primer: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, and 0.8 μmol/L

图 4 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of primer concentration on ISSR amplification

2.2.4 模板浓度对 ISSR 扩增的影响:本实验中,模板设置 8 个浓度梯度进行扩增,结果见图 5。当模板的质量在 40、80 ng 时,扩增产物没有太大的影响,只是在质量大于 80 ng 时,出现轻微的拖尾现

象,条带模糊不清。但是,反应体系中如果模板过少,分子碰撞的机率降低,过多反而又会产生非特异性产物。所以,本着高效、节省的原则,选择 40 ng 作为最佳的模板质量。



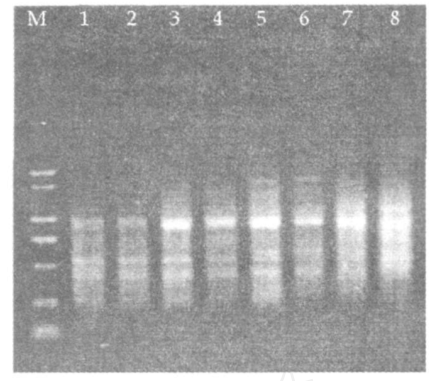
1～8-显示模板浓度:10、20、40、80、100、120、160、200 ng
1—8-concentration of template: 10, 20, 40, 80, 100, 120, 160, and 200 ng

图 5 模板浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of template concentration on ISSR amplification

2.3 **退火温度对扩增的影响**:从图 6 中可以看出,第 1～4 泳道中虽然出现了条带,但是亮度太弱,多样性条带不多。只有在第 5 泳道时,出现背景清晰、亮度适宜、且界限分明的多样性条带。高的退火温度会使产生的条带减少,并且背景模糊。因此,第 5 个温度梯度时,即 56.5 ℃可以确定为最佳退火温度。

2.4 **三角叶黄连反应体系的建立**:通过对上述各反应条件的分析,建立了适合三角叶黄连扩增的反应体系和扩增程序。反应体系为:25 μL PCR 反应体系中,内含 10 ×PCR Buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L Mg^{2+}, 200 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L 引物, 40 ng 模板, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶。扩增程序为 94 ℃预变性 5 min,然后进行 35 个循环:94 ℃变性 30 s,(据不同引物退火温度)复性 60 s, 72 ℃延伸 90 s,循环结束后 72 ℃延伸 7 min, 4 ℃保存。



1～8-显示通火浓度:52.0、53.5、54.5、55.5、56.5、57.0、57.5、58.0 ℃
1—8-annealing temperature gradient: 52.0, 53.5, 54.5, 55.5, 56.5, 57.0, 57.5, and 58.0 ℃

图 6 退火温度对扩增的影响

Fig. 6 Effect of annealing temperature gradient on ISSR amplification

2.5 **优化体系对三角叶黄连的扩增效果**:利用此优化体系,对来自不同地区的 24 个三角叶黄连样本进行了扩增,得到了背景清晰、多态性稳定丰富的 DNA 扩增片段(图 7),可用于三角叶黄连的居群鉴别及遗传结构分析研究。

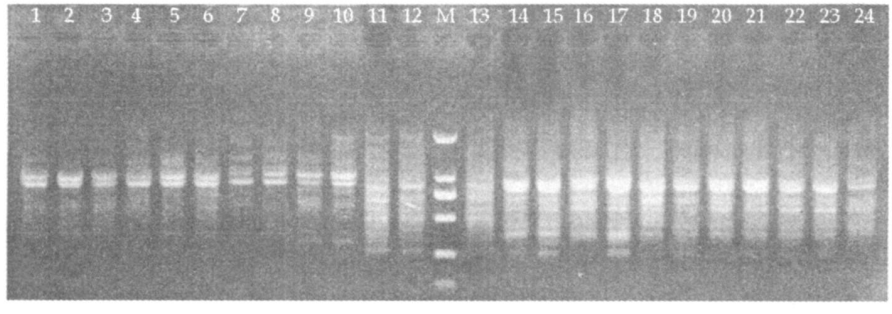


图 7 引物 U840 对 24 样本的扩增结果

Fig. 7 Result of ISSR amplification generated with Primer U840 for 24 samples

3 讨论

Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 结果的一个重要因素,Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的依赖性因素,其浓度的大小可直接影响酶活性的发挥。因此,选择合适的 Mg^{2+} 浓度对 PCR 的结果至关重要。另外,Mg^{2+} 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、模板与产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成。在一般的 PCR 反应中,0.15～2.10 mmol/L 是较合适的 Mg^{2+} 浓度范围,本实验的结果也证实了这一点。

在影响扩增的众多因子中,*Taq* DNA 聚合酶是一个很重要的因素,酶的浓度直接决定扩增的成功

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 Tm 值,而是在 Tm 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 repaeats (SSR)-anhored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomis*, 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 sequenece 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 μL 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