

## 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化

欧立军<sup>1,2,3</sup>, 颜 旺<sup>3</sup>, 廖亚西<sup>3</sup>, 梁云浩<sup>3</sup>, 余朝文<sup>1,2,3</sup>

1. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008
2. 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008
3. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008

**摘要:** 目的 建立并优化天门冬 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序, 为探讨天门冬种质间遗传多样性提供依据。方法 采用单因子试验和正交设计法, 研究  $Mg^{2+}$ 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA、延伸时间及循环次数对 PCR 扩增的影响。结果 天门冬 ISSR-PCR 的最佳反应体系为 25  $\mu$ L 的反应体系中含模板 DNA 40 ng、 $Mg^{2+}$  1.25 mmol/L、dNTP 320  $\mu$ mol/L、引物 1.2  $\mu$ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。在此基础上, 从 50 条引物中筛选出 13 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物, 并通过梯度 PCR 试验, 确定引物最佳退火温度。结论 建立的天门冬 ISSR-PCR 反应体系, 经过 17 份天门冬种质检验, 证明该体系稳定可靠, 可用于天门冬遗传分析。

**关键词:** 天门冬; ISSR-PCR; 正交设计; 单因子试验; 遗传分析

中图分类号: R286.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0353-05

## Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system in *Asparagus cochinchinensis*

OU Li-jun<sup>1,2,3</sup>, YAN Wang<sup>3</sup>, LIAO Ya-xi<sup>3</sup>, LIANG Yun-hao<sup>3</sup>, SHE Chao-wen<sup>1,2,3</sup>

1. Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua 418008, China
2. Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua 418008, China
3. Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

**Abstract: Objective** To establish and optimize ISSR-PCR reaction system for *Asparagus cochinchinensis* and lay foundation for its genetic diversity research. **Methods** The single-factor test and orthogonal design were applied for optimizing seven factors in the ISSR-PCR reaction system including  $Mg^{2+}$ , dNTP, primers, *Taq* DNA polymerase, the template DNA, extension time, and cycle times. **Results** The suitable PCR reaction system contained 1.25 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 320  $\mu$ mol/L dNTP, 1.2  $\mu$ mol/L primer, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, and 40 ng template DNA in total 25  $\mu$ L reaction solution. On this basis, 13 primers were screened with stable amplification and rich polymorphism from 50 ISSR primers. The optimal annealing temperature for ISSR-PCR reaction was proposed by gradient PCR. **Conclusion** It is proved that the established and optimized ISSR reaction system would be stable and credible by the germplasm testing result of 17 *A. cochinchinensis* populations. This would provide the basis for the genetic analysis of *A. cochinchinensis*.

**Key words:** *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.; ISSR-PCR; orthogonal design; single factor test; genetic analysis

天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 为百合科天门冬属植物, 原产非洲, 我国多省有分布, 是传统的中草药, 已有几千年的药用历史, 其块根有养阴润燥、清肺生津的作用, 具有抗菌和抗肿瘤等生理活性<sup>[1]</sup>, 常用于治疗肺燥干咳、咽干口渴和肠燥便秘等症<sup>[2]</sup>, 并也常用作滋补品使用<sup>[3]</sup>, 极具开发价值。

简单序列重复区间扩增 (inter simple sequence repeats, ISSR) 是在微卫星技术上发展起来的分子

标记技术, 具有多态性高和产物特异性强等特点<sup>[4]</sup>, 广泛应用于物种鉴定、遗传作图、基因定位、系统发育与进化等领域<sup>[5-9]</sup>。但同时该标记的稳定性易受 PCR 体系的组成和程序影响, 不同植物的 ISSR 反应体系中的各成分、反应程序和最佳引物均不同<sup>[10-12]</sup>, 因此进行 ISSR-PCR 体系的建立和优化是进行应用研究的前提。本研究采用正交试验和单因素试验相结合的实验设计, 建立天门冬 ISSR-PCR 最佳反应体系, 同时筛选最佳的退火温度、延伸时间、循环次

收稿日期: 2010-05-30

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目 (09K106); 湖南省科技计划重点项目 (2009FJ2008)

作者简介: 欧立军 (1976—), 男, 湖南长沙人, 博士, 主要研究方向为药用植物遗传与分子生物学。Tel: 15974048762 E-mail: ou9572@126.com

数及引物,为天门冬资源的鉴定、系统进化与发育等方面的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采自湖南、贵州、广西、浙江等省的 17 份不同居群天门冬种质,经怀化学院曾汉元教授鉴定为天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根。采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 1.0% 琼脂糖电泳和核酸检测仪检测 DNA 质量浓度,并稀释至 30 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 1.2 方法

**1.2.1 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计** 采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计,对  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP、引物、*Taq* 酶和模板 DNA 筛选(表 1),此外还包括 2.5  $\mu\text{L}$   $10\times$  PCR Buffer,引物选用(AC)<sub>8</sub>T,总反应体系为 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,50  $^{\circ}\text{C}$  退火 70 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,39 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增结束后,产物在 3.0% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶中含 0.05% 溴化乙锭,电极缓冲液为  $1\times$ TAE,电压 5 V/cm。电泳结束后在凝胶成像分析仪上观测分析并照相。

**1.2.2 ISSR-PCR 反应体系单因素试验** 依据正交试验结果,选择扩增效果较好的反应体系,在此基

表 1  $L_{16}(4^5)$  正交试验

Table 1  $L_{16}(4^5)$  Orthogonal test for ISSR-PCR

试验号	因素				
	<i>Taq</i> 酶/ /U	dNTP/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Mg}^{2+}$ / ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	引物/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	DNA/ ng
1	0.5	200	1.00	0.8	25
2	1.0	200	1.25	1.0	30
3	1.5	200	1.50	1.2	35
4	2.0	200	1.75	1.4	40
5	1.5	260	1.25	0.8	40
6	2.0	260	1.00	1.0	35
7	0.5	260	1.75	1.2	30
8	1.0	260	1.50	1.4	25
9	2.0	320	1.50	0.8	30
10	1.5	320	1.75	1.0	25
11	1.0	320	1.00	1.2	40
12	0.5	320	1.25	1.4	35
13	1.0	380	1.75	0.8	40
14	0.5	380	1.50	1.0	35
15	2.0	380	1.25	1.2	25
16	1.5	380	1.00	1.4	30

础上进行单因素试验,进一步优化影响扩增效果的因素。其中 *Taq* 酶用量设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U 6 个梯度,dNTP 浓度设置 140、200、260、320、380、440  $\mu\text{mol/L}$  6 个梯度, $\text{Mg}^{2+}$  浓度设置 1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25  $\text{mmol/L}$  6 个梯度,引物浓度设置 0.60、0.80、1.00、1.20、1.40、1.60  $\mu\text{mol/L}$  6 个梯度,DNA 模板设置 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 ng 共 10 个梯度,重复 2 次。每一个最佳条件确定后作为后续研究的一个条件。

**1.2.3 ISSR-PCR 反应程序优化** 在确定最佳反应体系基础上,对延伸时间和循环次数进行优化筛选。延伸时间为 0.5、1、1.5、2 min;延伸温度为 72  $^{\circ}\text{C}$ ;设 5 个循环次数,分别为 25、30、35、40、45 次。

**1.2.4 引物筛选** 根据 ISSR-PCR 的最佳反应体系和扩增条件进行引物筛选。

**1.2.5 数据分析** 以上试验各重复 3 次,取 3 次扩增效果相同的图谱进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 正交设计直观分析

根据  $L_{16}(4^5)$  正交试验 PCR 产物电泳结果发现,所有组合均能扩增出条带,但不同组合条带的数目和清晰度不一致(图 1)。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,同时考虑实验成本,确定实验 11 为天门冬 ISSR-PCR 的最佳反应体系。

### 2.2 单因素试验结果分析

**2.2.1 *Taq* 酶用量对 ISSR-PCR 的影响** 在一定范围内,扩增条带的清晰度随着 *Taq* 酶用量的增加而逐渐增加(图 2)。当 *Taq* 酶用量达到 1.5 U 时,扩增条带达到最清晰,随着酶用量增加,清晰度的增加不再明显,结合条带的清晰度和实验成本,确定天门冬 ISSR-PCR 体系中酶的最佳用量为 1.5 U。

**2.2.2 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响** 低 dNTP 浓度( $<200 \mu\text{mol/L}$ )时,扩增条带清晰度较低且数目较少;随着浓度的上升,谱带数目增多且逐渐变得清晰,当浓度为 320  $\mu\text{mol/L}$  时谱带达到最清晰;随着浓度的增加条带的清晰度和数目不再增加(图 3)。因此,选择 320  $\mu\text{mol/L}$  dNTP 为天门冬 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度。

**2.2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 的影响** 随着  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加,条带数目增多,清晰度增加,当浓度为 1.25  $\text{mmol/L}$  时条带最为清晰(图 4)。因此,选择 1.25  $\text{mmol/L}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  为天门冬 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度。

2.2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响 随着引物浓度的升高, 条带清晰度由弱到强; 浓度为 1.20

$\mu\text{mol/L}$  时, 条带最为清晰, 随着浓度的上升, 条带清晰度反而变弱 (图 5)。因此, 选择 1.20  $\mu\text{mol/L}$

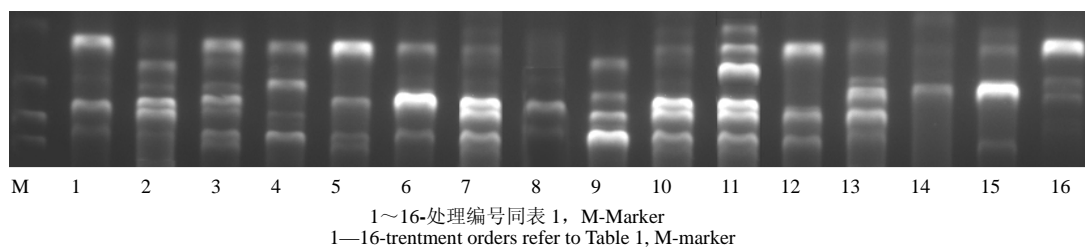


图 1 天门冬 ISSR-PCR 正交试验

Fig. 1 Electrophoregram of ISSR-PCR products of *A. cochinchinensis*

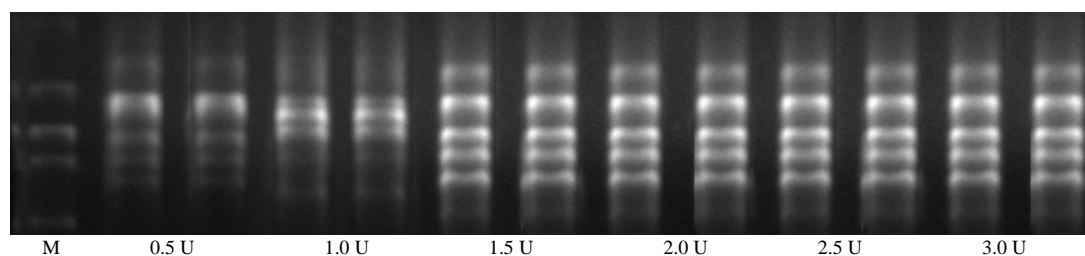


图 2 *Taq* 酶用量对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 2 Effect of *Taq* polymerases with different levels on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

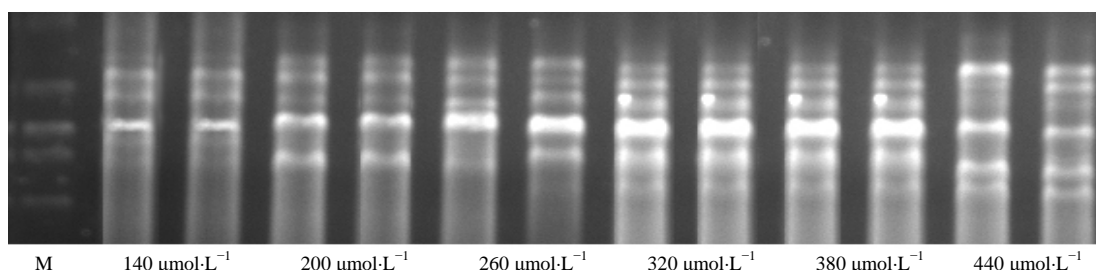


图 3 dNTP 浓度对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of dNTP with different concentrations on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

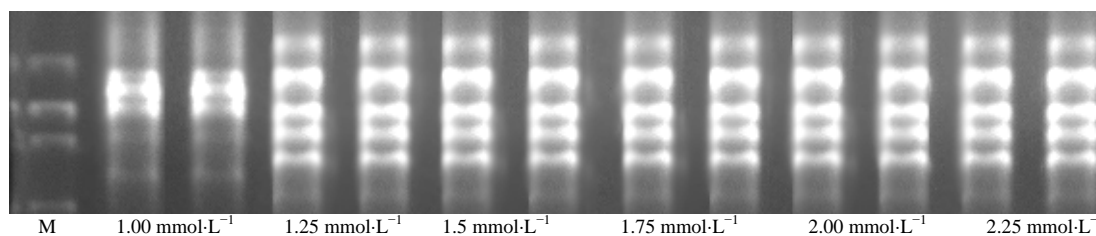


图 4  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  with different concentrations on of ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

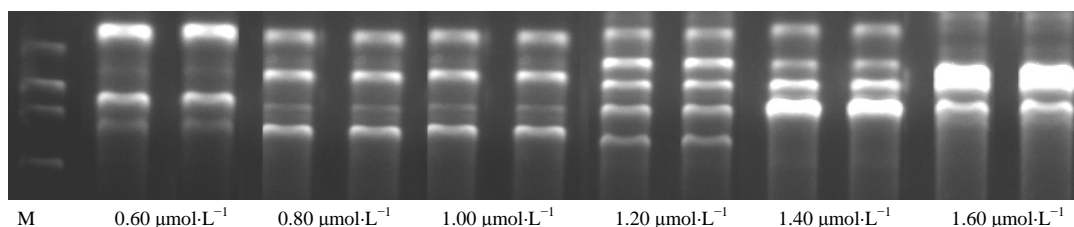


图 5 引物浓度对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of primer with different concentrations on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

的浓度引物为天门冬 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度。

**2.2.5 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 的影响** 模板 DNA 用量为 25 ng 时, 条带数目较少; 在 30~55 ng 时条带多态性高, 且 40 ng 时的清晰度最高; 超过 55 ng 时, 条带数目和清晰度减弱 (图 6)。因此, 选择 40 ng 的模板为天门冬 ISSR-PCR 反应体系的最佳用量。

**2.3 ISSR-PCR 反应程序优化**

**2.3.1 循环次数对 ISSR-PCR 的影响** 循环次数为 25 时, 条带很少; 以后随着循环次数的增加, 条带数目逐渐增多且清晰; 当达到 40 个循环时, 得到的条带强弱合适, 清晰度高; 45 个循环时的条带与 40 个循环的几乎没差异 (图 7)。因此, 为节省时间, 确定 40 个循环为天门冬 ISSR-PCR 反应的最佳循环次数。

**2.3.2 延伸时间对 ISSR-PCR 的影响** 延伸时间的长短与扩增片断的长度呈正相关, 0.5 min 的延伸时间过短, 一些较大的片段无法完成扩增, 造成条带缺失; 延伸时间达到 1.5 min 时, 扩增的条带数目多, 较大的片段清晰可见, 延伸时间为 2.0 min 与 1.5 min 基本相同 (图 8)。因此, 确定 1.5 min 为天门冬 ISSR-PCR 反应的最佳延伸时间。

**2.4 ISSR-PCR 正交反应体系应用**

应用建立的天门冬 ISSR-PCR 的最佳体系, 从 50 个 ISSR 引物中筛选出 13 个扩增稳定、多态性高的引物。以 (AC)<sub>8</sub>G 为引物, 运用最优组合对 17 份天门冬种质材料进行扩增, 发现得到的条带数目多、清晰、重复性好, 能区分 17 份天门冬种质, 结果见图 9 和表 2。这表明建立的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可应用于天门冬的分子标记研究中。

通过正交试验和单因素试验及体系的优化, 建

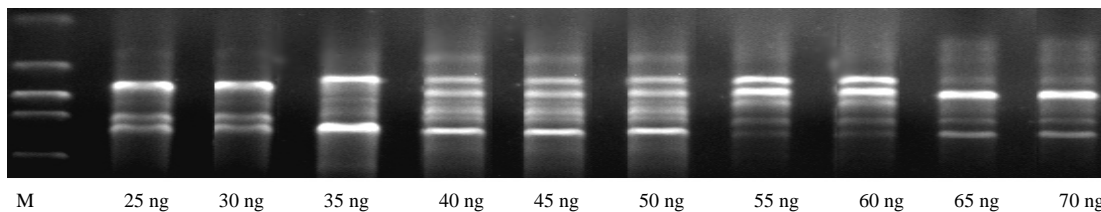


图 6 模板 DNA 用量对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 6 Effect of template DNA with different concentrations on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

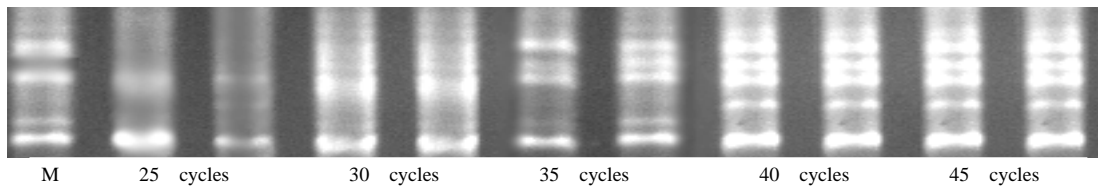


图 7 循环次数对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 7 Effect of different cycle times on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*

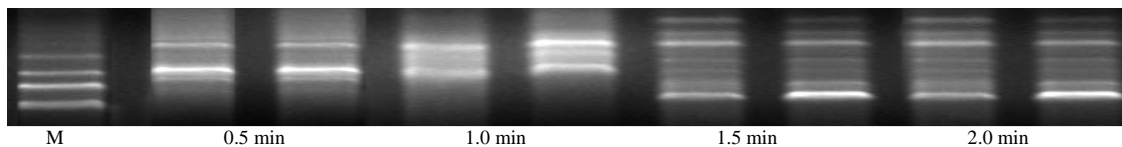
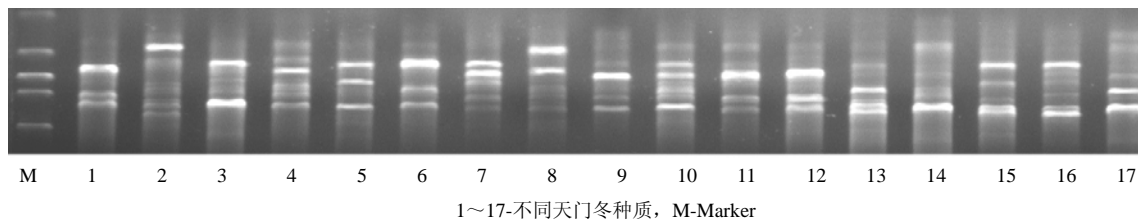


图 8 延伸时间对天门冬 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 8 Effect of different extension times on ISSR-PCR amplification of *A. cochinchinensis*



1~17-不同天门冬种质, M-Marker  
1—17-different *A. cochinchinensis* germplasm, M-Marker

图 9 优化的 ISSR-PCR 反应体系对 17 份天门冬种质 DNA 扩增的影响

Fig. 9 Effect of optimized ISSR-PCR reaction system on DNA amplification of 17 *A. cochinchinensis* germplasm

表2 筛选的天门冬 ISSR 引物和最佳退火温度  
Table 2 ISSR Primers and optimal annealing temperatures of *A. cochinchinensis*

引物	序列	退火温度/°C
ISSR-807	(AG) <sub>8</sub> T	50.6
ISSR-811	(GA) <sub>8</sub> C	52.2
ISSR-815	(CT) <sub>8</sub> G	51.9
ISSR-823	(TC) <sub>8</sub> C	52.5
ISSR-825	(AC) <sub>8</sub> T	50.5
ISSR-827	(AC) <sub>8</sub> G	51.5
ISSR-843	(CT) <sub>8</sub> RA	50.3
ISSR-849	(GT) <sub>8</sub> YA	50.7
ISSR-851	(GT) <sub>8</sub> YG	52.1
ISSR-853	(TC) <sub>8</sub> RT	50.3
ISSR-857	(AC) <sub>8</sub> YG	51.8
ISSR-861	(ACC) <sub>6</sub>	60.2
ISSR-892	HVH(TG) <sub>7</sub>	59.5

立了适宜于天门冬 ISSR-PCR 分析的扩增体系: 25 μL 的反应体系中含 40 ng 的模板 DNA、1.5 U *Taq* 酶、1.2 μmol/L 引物、0.32 mmol/L dNTPs、1.25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>以及循环 40 次, 延伸时间 1.5 min, 并筛选得到了多个适合天门冬扩增的引物。

### 3 讨论

研究表明, ISSR 标记虽然是随机标记, 但在一定的条件下是比较稳定的, 这个条件就是进行 ISSR-PCR 体系优化, 得到适合该物种的最佳体系和程序。影响 ISSR 扩增的因素很多, 几乎组成反应体系和程序中的每个因子都可以影响到扩增的效果。因此, 要获得较稳定、清晰、可重复的条带, 对 ISSR-PCR 反应体系的各种影响因子如 *Taq* 酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、引物浓度、模板浓度以及循环次数和延伸时间进行试验是完全必要的。

dNTPs 作为聚合链的原料, *Taq* 酶作为聚合酶, 在 PCR 反应中起着非常重要的作用。一般说来, PCR 体系中的 *Taq* 酶和 dNTPs 需要达到临界浓度, 才能避免条带的模糊和数目的减少。从本实验结果来看, 当 *Taq* 酶和 dNTPs 达到一定量时, 扩增的效果达到最佳, 以后即使增加量, 扩增效果只是和临界位点一致; 同时 dNTPs 浓度过高会与 *Taq* 酶竞争 Mg<sup>2+</sup>, 抑制聚合酶的活性; 因为 PCR 反应体系中, *Taq* 酶和 dNTPs 是主要材料, 所以为达到最佳扩增

效果和节约成本, 应该在每个 PCR 反应大规模进行前摸索出临界浓度。

Mg<sup>2+</sup>浓度对 PCR 扩增效率影响很大, 浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性, 浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使扩增失败。从本实验的结果来看, 反应体系中 Mg<sup>2+</sup>浓度在 1.25~2.25 mmol/L 能扩增出较好的条带。因此, 认为天门冬 ISSR-PCR 反应对 Mg<sup>2+</sup>浓度要求不是太严格, 只要达到一定的浓度就能达到很好的效果。

ISSR-PCR 反应中, 不是所有的引物都能扩增出较好的条带。不同的植物种类有不同的适宜引物, 因此针对不同的作物种类, 有必要进行最佳引物的筛选。本实验通过筛选得到了 13 条适合天门冬 ISSR 分析的引物, 为进一步研究天门冬的遗传多样性和种质鉴定等奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 中国药科大学. 中药辞海 [M]. 第一卷. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 姚念环, 孔令义. 天门冬属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然药物研究与开发, 1999, 11(2): 67-71.
- [4] Ziet K E, Rafal S A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20 (2): 176-183.
- [5] 温文婷, 贾定洪, 郭勇, 等. 中国主栽银耳配对香灰菌的系统发育和遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 552-558.
- [6] 王翀, 周天华, 杨雪, 等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 588-591.
- [7] 邵清松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- [8] 杨生超, 文国松, 刘雪玲, 等. 灯盏花种质资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1523-1527.
- [9] 许永华, 张爱华, 金慧, 等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [10] 张春平, 何平, 王瑞波, 等. 三角叶黄连 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 282-284.
- [11] 廖丽, 郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1131-1135.
- [12] 刘海河, 侯喜林, 张彦萍. 西瓜 ISSR-PCR 体系的正交优化研究 [J]. 果树学报, 2004, 21(6): 615-617.
- [13] 李开拓, 赵依杰, 钟凤林, 等. 黄皮 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 37-41.