

正交设计优化翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系

吴 生^{1,3}, 熊宇婷^{1,2}, 谢 砚³, 顾 蔚^{1,2,3*}

1. 陕西师范大学 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

2. 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710062

3. 陕西师范大学生命科学院, 陕西 西安 710062

摘 要: 目的 对影响翼梗五味子 ISSR-PCR 扩增反应的各因素进行优化, 建立稳定的反应体系。方法 基于正交极差分析方法, 以 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTP 和引物 5 因素 4 水平的正交试验对翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系进行优化。结果 翼梗五味子 ISSR-PCR 的最佳反应体系 (20 μ L) 为: *Taq* 酶 1.00 U、 Mg^{2+} 1.50 mmol/L、模板 DNA 40.00 ng、dNTP 0.25 mmol/L、引物 0.50 μ mol/L。筛选出 12 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物, 并确定了每个引物的最佳退火温度。结论 所建立的翼梗五味子 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、重复性好等优点, 为翼梗五味子的分子水平研究提供实验依据。

关键词: 翼梗五味子; ISSR-PCR; 正交优化; 多态性; 退火温度

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0976-04

Optimization for ISSR-PCR reaction system on *Schisandra henryi* by orthogonal design

WU Sheng^{1,3}, XIONG Yu-ting^{1,2}, XIE Yan³, GU Wei^{1,2,3}

1. National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an 710062, China

3. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Objective To optimize the each factor affecting on ISSR-PCR reaction system of *Schisandra henryi* and establish the stable ISSR-PCR system. **Methods** Based on the analysis of orthogonal design test, an orthogonal design was used to optimize the ISSR-PCR amplification system on *S. henryi* by five factors (*Taq* polymerase, Mg^{2+} , DNA template, dNTP, and primer) at four concentration levels, respectively. **Results** A suitable ISSR-PCR reaction system was constructed with the 20 μ L reaction system containing 1.00 U *Taq* polymerase, Mg^{2+} 1.50 mmol/L, DNA template 40.00 ng, dNTP 0.25 mmol/L, and primer 0.50 μ mol/L. Twelve effective ISSR primers were selected and the optional annealing temperature of every one primers was fixed. **Conclusion** ISSR-PCR is significantly influenced by the concentration of *S. henryi*. This ISSR-PCR system could provide clear bands, reliable reaction system, and abundant polymorphisms. It proves a reference for molecular research of *S. henryi*.

Key words: *Schisandra henryi* Clarke; ISSR-PCR; orthogonal optimization; primer; annealing temperature

翼梗五味子 *Schisandra henryi* Clarke 为五味子科 (Schisandraceae) 五味子属 (*Schisandra* Michx.) 多年生落叶木质藤本, 分布于浙江、江西、福建、河南南部、湖北、贵州、湖南、广东、广西、四川中部、云南东南部^[1]。本属植物大多为药用植物, 其中五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 和华中五味子 *S. sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟

果实是常用中药材, 分别称为五味子和南五味子^[2]。而翼梗五味子的干燥成熟果实在民间作为五味子的代用品, 其藤条可入药。目前翼梗五味子遗传学背景资料匮乏, 亟待研究。ISSR (intersimple sequence repeat) 分子标记技术^[3]具有操作简单、稳定且重复性好等优点, 已广泛应用于遗传多样性分析^[4-6]、遗传图谱构建^[7]等研究领域。

收稿日期: 2010-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070293); 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAI06A13-06)

作者简介: 吴 生 (1986—), 男, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 主要从事药用资源遗传多样性研究。

*通讯作者 顾 蔚 Tel: (029)85310266 E-mail: weigu@snnu.edu.cn

ISSR 反应体系受 PCR 各因素的综合影响,故有必要对其实验体系进行优化。本研究基于正交试验与正交极差分析,通过 5 因素 4 水平试验设计 $L_{16}(4^5)$, 建立翼梗五味子 ISSR 反应体系。此外,在此基础上筛选出适合翼梗五味子的 ISSR 引物,并探讨引物最佳退火温度和循环次数,为翼梗五味子种群遗传多样性和种质鉴定等研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采自贵州大方县,经陕西师范大学生命科学学院任毅教授鉴定为翼梗五味子 *Schisandra henryi* Clarke。选取无病虫害的嫩叶,经硅胶干燥处理后于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱储存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用改进 CTAB 法^[8]提取基因组 DNA。

1.3 ISSR-PCR 反应体系正交设计

为了确定 PCR 反应中 5 个因素(Taq 酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTP、引物)的最佳水平组合,采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行试验,以 UBC843 [CT₈ RA] 为实验引物,PCR 反应的因素水平见表 1, $L_{16}(4^5)$ 正交设计见表 2。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的因素与水平

水平	因素				
	Taq 酶/ U	Mg^{2+} / ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ ng	dNTP/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	引物/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.50	1.50	20.00	0.15	0.20
2	1.00	2.00	40.00	0.20	0.30
3	1.50	2.50	60.00	0.25	0.40
4	2.00	3.00	80.00	0.30	0.50

扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共计 40 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。ISSR-PCR 产物用 1.4% 琼脂糖凝胶(含 EB $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) 于 5 V/cm 电压下电泳, Tanon—1600 全自动数码凝胶图像处理系统成像。

1.4 翼梗五味子 ISSR-PCR 反应程序优化

根据正交试验筛选出的最佳反应体系,对翼梗五味子 ISSR-PCR 反应程序进行优化,以最佳反应体系对退火温度和循环次数进行梯度试验。

1.5 引物筛选

根据正交试验筛选出的最佳反应体系筛选 ISSR 引物。

表 2 ISSR 反应体系的正交试验设计

Table 2 Orthogonal design of factors and levels of ISSR-PCR reaction system

处理	Taq 酶/ U	Mg^{2+} / ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	模板 DNA/ng	dNTP/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	引物/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.50	1.50	20.00	0.15	0.20
2	0.50	2.00	40.00	0.20	0.30
3	0.50	2.50	60.00	0.25	0.40
4	0.50	3.00	80.00	0.30	0.50
5	1.00	1.50	40.00	0.25	0.50
6	1.00	2.00	20.00	0.30	0.40
7	1.00	2.50	80.00	0.15	0.30
8	1.00	3.00	60.00	0.20	0.20
9	1.50	1.50	60.00	0.30	0.30
10	1.50	2.00	80.00	0.25	0.20
11	1.50	2.50	20.00	0.20	0.50
12	1.50	3.00	40.00	0.15	0.40
13	2.00	1.50	80.00	0.20	0.40
14	2.00	2.00	60.00	0.15	0.50
15	2.00	2.50	40.00	0.30	0.20
16	2.00	3.00	20.00	0.25	0.30
K_1	28.00	51.00	27.00	24.00	30.00
K_2	44.00	35.00	23.00	26.00	28.00
K_3	32.00	24.00	42.00	43.00	43.00
K_4	32.00	26.00	44.00	43.00	39.00
k_1	7.00	12.75	6.75	6.00	7.50
k_2	11.00	8.75	5.75	6.50	7.00
k_3	8.00	6.00	10.50	10.75	10.75
k_4	8.00	6.50	11.00	10.75	9.75
R	4.00	6.75	5.25	4.75	3.75

1.6 最佳反应体系验证

对 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序的优化结果经不同样品反复加以验证,确定其实验体系是稳定并且可靠的。

2 结果与分析

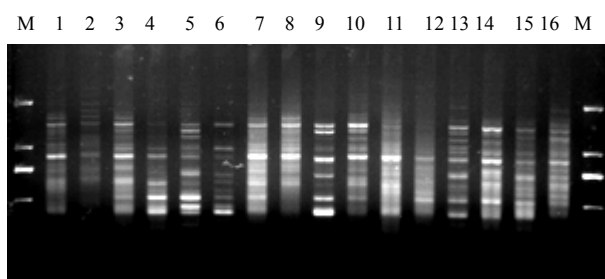
2.1 基因组 DNA 提取

改良 CTAB 法提取翼梗五味子基因组 DNA,用紫外分光光度法检测, A_{260}/A_{280} 值在 1.80~2.00,表明 DNA 样品的纯度较高,符合 ISSR 反应的要求。通过 A_{260} 值计算 DNA 的质量浓度,并将其稀释至 $40.00\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

2.2 正交试验结果与分析

引物 UBC843 正交试验 PCR 产物电泳结果见图

1, 依据扩增条带的多少、亮度强弱和杂带的有无对 PCR 扩增结果从高到低依次打分。条带越多、亮度越强且无杂带则评分越高, 最好的定为 16 分, 最差的定为 1 分^[9]。以这两个结果为参照标准, 再与其他各组比较, 并依次打分。正交试验结果见表 2。



1~16-正交设计 1~16 组 M-DL 2000
1-16-1-16 groups of orthogonal design M-DL 2000 Marker

图 1 ISSR-PCR 正交设计电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ISSR-PCR orthogonal design

极差 R 反映了各因素对反应体系的影响, R 越大, 影响越显著。由表 2 可知各因素水平的变化对翼梗五味子 PCR 反应的影响从大到小依次为: Mg^{2+} > 模板 DNA > dNTP > *Taq* 酶 > 引物。

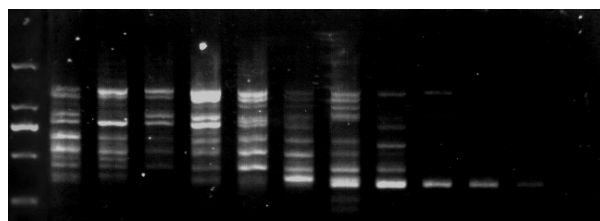
每一因素水平下平均值 (k_i) 越大, 反应水平越好。从表 2 可见 ISSR-PCR 反应中 5 个因素的最佳组合为 *Taq* 酶 k_2 (1.00 U)、 Mg^{2+} k_1 (1.50 mmol/L)、DNA 模板 k_4 (80.00 ng)、dNTP k_3 (0.25 mmol/L)、引物 k_5 (0.40 μ mol/L)。此最佳因素水平组合对应于表 2 中的各个因素水平组合, 与分值最高的组合 5 接近, 仅模板 DNA 和引物的用量不同。

以 UBC843 为引物, 按正交试验设计各因素水平进行 ISSR-PCR 反应, 电泳图见图 1。可见, 组合 5 扩增的条带最多 (10 条带), 扩增亮度较强, 而组合 9 扩增亮度最强, 但扩增的条带较少且重复性较差。虽然组合 3、7、10、14、15、16 扩增的条带较多, 扩增亮度较强, 但背景模糊, 而组合 6、13 扩增的条带也较多, 但扩增亮度较弱。其余组合仅扩增出较少的条带或扩增亮度十分微弱。综合分析表明, 本实验选择组合 5 为翼梗五味子 ISSR-PCR 最佳反应体系, 即 20 μ L ISSR-PCR 反应体系中包含 1.00 U *Taq* 酶 (0.20 μ L)、1.50 mmol/L Mg^{2+} (1.20 μ L)、40.00 ng DNA 模板 (1.00 μ L)、0.25 mmol/L dNTP (2.00 μ L)、0.50 μ mol/L 引物 (1.00 μ L) 和 2.50 μ L 10 $\times$ PCR Buffer。

2.3 翼梗五味子 ISSR-PCR 反应程序优化

2.3.1 退火温度确定 从 49.0~59.0 $^{\circ}$ C 设置梯度,

在 PTC-200 PCR 仪上自动生成 12 个温度梯度 (49.0、49.3、49.9、50.7、51.8、53.3、55.0、56.4、57.5、58.3、58.8、59.0 $^{\circ}$ C), 用最佳反应体系, 以引物 (UBC843) 进行梯度退火试验, 筛选出最佳退火温度, 结果见图 2。退火温度为 49.0~49.9 $^{\circ}$ C 条带亮度较弱; 50.7~56.4 $^{\circ}$ C 条带逐渐变亮, 其中 55.0 $^{\circ}$ C 的条带清晰明亮, 且数目最多, 温度为 57.5~59.0 $^{\circ}$ C 条带亮度逐渐变弱、特异性条带减少, 因此最佳退火温度为 55.0 $^{\circ}$ C。



M 49.0 49.3 49.9 50.7 51.8 53.3 55.0 56.4 57.5 58.3 58.8 59.0

温度/ $^{\circ}$ C

图 2 引物梯度退火电泳图 (引物 UBC843)

Fig. 2 Electrophoretogram of annealing temperature of Primer (Primer UBC843)

2.3.2 循环次数确定 以最佳反应体系和最佳退火温度对循环次数进行 4 个梯度试验: 35 次、38 次、40 次、45 次, 每个梯度设 2 个重复。图 3 显示, 循环 40 次, 出现的条带清晰、亮度适宜且条带界限分明。因此, 确定最佳循环次数为 40。

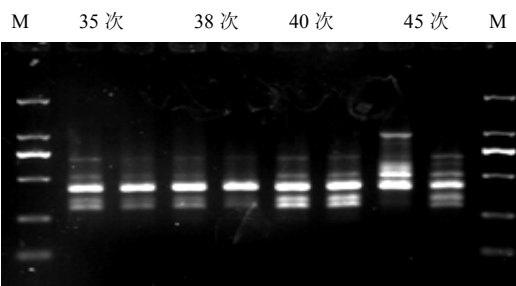


图 3 循环次数对 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 3 Electrophoretogram of ISSR-PCR with different cycle times

2.4 引物筛选

根据正交试验结果, 从 100 条引物中筛选出 12 条有效引物 (表 3, 图 4), 其扩增条带清晰、稳定性、重复性好。

2.5 样品扩增

采用翼梗五味子 ISSR-PCR 最佳反应体系和筛选出的 12 条引物对 1~4 号样品进行扩增, 部分引物扩增结果见图 5 (引物 849、855), 结果表明扩增

表 3 筛选出 12 条 ISSR 引物
Table 3 Selected twelve ISSR primers

引物	序列(5'-3')	T_m 值*/°C	退火温度/°C
827	(AC) ₈ G	54.59	56.5
818	(CA) ₈ G	54.59	57.0
825	(AC) ₈ T	52.18	52.0
811	(GA) ₈ C	54.59	53.0
855	(AC) ₈ YT	53.88	52.0
841	(GA) ₈ YC	56.16	57.0
859	(TG) ₈ RC	56.16	52.0
873	(GACA) ₄	51.55	53.2
843	(CT) ₈ RA	53.88	55.0
849	(GT) ₈ YA	53.88	54.0
848	(CA) ₈ RG	56.16	56.5
836	(AG) ₈ YA	53.88	53.2

*上海生工 DNA 合成报告单提供的 T_m 值 (DNA 双螺旋结构降解一半时的温度)

*DNA synthesis report card was provided by the T_m values from Shanghai Sangon

M 827 818 825 811 855 841 859 873 849 848 836

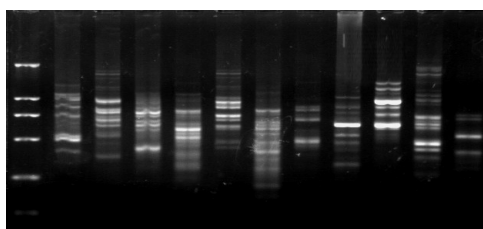


图 4 引物筛选结果

Fig. 4 Electrophoresis of ISSR-PCR amplification with different primers

M(849) 1 2 3 4 M(855) 1 2 3 4

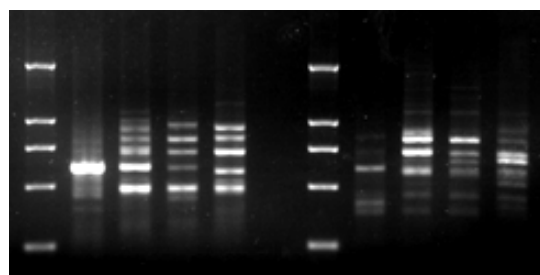


图 5 引物 849、855 对 1~4 样品扩增结果

Fig. 5 Electrophoretogram of 1—4 samples by Primer 849 and 855

条带清晰可辨, 多态性丰富, 说明本实验建立的翼梗五味子 ISSR-PCR 最佳反应体系和反应程序稳定可靠。

3 讨论

通过 5 因素 4 水平正交试验得出 Mg^{2+} 对反应体

系影响最显著, 与冯富娟等^[10]研究结果一致。在翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系中, 模板 DNA 也对反应体系影响显著, 其原因可能是模板 DNA 中含有蛋白质、多糖和酚类等会抑制 *Taq* 酶活性^[10], 从而影响扩增结果, 因而高质量的基因组 DNA 是获得稳定 ISSR-PCR 结果的前提。

PCR 扩增程序中, 退火温度能明显地影响 ISSR-PCR 扩增条带特异性, 退火温度过低或过高都会导致特异性条带减少^[11], 因此本实验对筛选出 12 条引物逐个进行退火温度梯度实验, 确定每个引物的最佳退火温度, 为翼梗五味子分子实验提供参考。循环次数对扩增产物量有明显的影响, 因此本实验还对循环次数进行了优化。整个实验过程应尽可能使用同一厂家的实验试剂和仪器, 同时 PCR 反应体系中加入一定量的 BSA (100 μ g/mL) 会使实验结果更加稳定。

本实验所建立的 ISSR-PCR 反应稳定体系可为翼梗五味子品种鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性研究、遗传图谱构建等提供实验基础。

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]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [4] 郭丁丁, 马逾英, 唐琳, 等. 白芷种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(10): 1627-1630.
- [5] 张春平, 何平, 胡世俊, 等. 黄连遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2009, 40(10): 1630-1634.
- [6] 李靖, 程舟, 杨晓伶, 等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(9): 1392-1395.
- [7] 李凤岚, 马小军. 药用植物分子遗传图谱研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 129-133.
- [8] 刘锦, 罗成, 顾蔚, 等. 适于 AFLP 分析的华中五味子 DNA 提取方法改进 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(6): 68-70.
- [9] 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): 403-404.
- [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.
- [11] 彭学贤. 植物分子生物技术应用手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.