

水蛭 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化

张香东¹, 刘庚¹, 常素慧¹, 白秀娟^{1,2}, 杨洪雁², 朱洪强^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 东北农业大学动物科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要: 目的 建立并优化水蛭 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序, 为水蛭进行遗传多样性研究提供依据。方法 使用引物 ISSR825, 采用正交优化方法对影响 PCR 反应的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 进行了体系优化, 同时对引物的最佳退火温度进行了选择。结果 在 25 μ L 总体积中, 其中包括 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、引物 0.8 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 2.5 U、模板 DNA 2.0 ng/ μ L, 最佳退火温度为 49.7 $^{\circ}$ C。结论 所建立的最佳 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可用于水蛭遗传多样性评价、不同种源鉴定及亲缘关系分析。

关键词: 水蛭; ISSR-PCR 体系; 正交设计; 体系优化; 种质资源

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0215-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.020

Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Hirudo nipponica*

ZHANG Xiang-dong¹, LIU Geng¹, CHANG Su-hui¹, BAI Xiu-juan^{1,2}, YANG Hong-yan², ZHU Hong-qiang¹

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Objective To establish and optimize the ISSR-PCR reaction system and amplification procedure for *Hirudo nipponica* and to provide the basis for its genetic diversity research. **Methods** Using Primer ISSR825, the orthogonal test design was adopted to optimize the ISSR-PCR amplification system on *H. nipponica* in five factors (Mg^{2+} , dNTP, primer, Taq DNA polymerase, and template DNA) at four levels, and the suitable anneal temperature of the primer was selected. **Results** The suitable ISSR-PCR system (25 μ L reaction volume) in *H. nipponica* included 10 \times PCR buffer (2.5 μ L), Mg^{2+} (2.0 mmol/L), dNTP (0.25 mmol/L), primer (0.8 μ mol/L), Taq DNA polymerase (2.5 U), and template DNA (2.0 ng/ μ L); The suitable anneal temperature was 49.7 $^{\circ}$ C. **Conclusion** The established and optimized ISSR reaction system is stable and reliable, which could provide the basis for the analysis of genetic diversity, germplasm resources, and genetic relationship of *H. nipponica*.

Key words: *Hirudo nipponica* Whitman; ISSR-PCR system; orthogonal design; system optimization; germplasm resources

水蛭是一味传统中药, 具有破血、逐瘀、通经之功效。《中国药典》2010 年版记载为医蛭科动物水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman、黄蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 或柳叶蚂蟥 *W. acranulate* Whitman 的干燥全体。水蛭中除了含有熟知的水蛭素以外, 还有多种生物活性成分, 包括蛋白酶、蛋白酶抑制剂、血小板聚集抑制剂、血小板黏附抑制剂等, 在临床中广泛用于脑血栓、冠心病、脑水肿等的治疗^[1]。据报道水蛭还有改善微循环、改善脑部缺氧、抗纤维化^[2]及抑制肿瘤细胞^[3]等作用。随着水蛭及其相关产品的开发, 其需求量快速增长, 水蛭已成为世界性的畅销中药材之一。水蛭种质资

源丰富, 分布较广, 各品种之间的药用效果差异显著^[4], 且水蛭种质资源的内在质量缺乏系统的分析和评价。因此, 有必要从分子水平上对其进行研究, 从而找到药效较好的中药材资源, 为水蛭种质资源的合理开发和利用提供技术指导。

简单序列重复区间扩增多态性分子标记 (intersimple sequence repeat, ISSR) 是建立在 PCR 反应基础上的一种新的所用模板量少的扩增技术, 其产物的多态性比随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 丰富, 而且比 RAPD 技术更为稳定可靠^[5]。目前已广泛应用于种质鉴定^[6-7]、多样性分析^[8-10]及遗传图谱^[11-12]等方面的研究。

收稿日期: 2012-07-31

作者简介: 张香东 (1986—), 男, 在读硕士, 主要研究方向为生药学。E-mail: ZXD254835231@163.com

*通信作者 朱洪强 E-mail: zhq5858588@163.com

网络出版时间: 2012-12-18 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121218.1013.002.html>

ISSR-PCR 具有重复性高的优点,但如果在不同的实验条件下,甚至在相同实验条件下其反应体系不同,也可能产生不同的结果。为了确保 ISSR 分析结果的可靠性和可重复性,有必要对 ISSR-PCR 反应体系进行优化。本研究以水蛭为模板,采用正交试验设计的方法^[13],对 ISSR 反应体系进行优化,并对 PCR 反应程序中的退火温度进行选择,以期获得适合水蛭的最优的 ISSR 反应体系,并用 10 份水蛭材料对优化后的体系进行验证,为水蛭遗传多样性的研究提供技术支持。

1 材料

水蛭药材购于哈尔滨中药材大市场,批号为 110901,来源为黑龙江省鹤岗,共分成 10 份。经东北农业大学白秀娟教授鉴定为水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥体。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于基因组的提取及 ISSR-PCR 实验研究。dNTP 购自哈尔滨海基生物科技有限公司, Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 购自北京全式金生物科技有限公司。实验所使用的引物根据哥伦比亚大学发布的 ISSR 引物序列,由北京

华大基因合成,通过预试验,筛选出引物 ISSR825 作为此次实验的固定引物,引物序列为 ACACACACACACACT。

2 方法

2.1 总 DNA 的提取及检测

按照常规酚/氯仿抽提法进行 DNA 提取,使用紫外分光光度计,测定 DNA 浓度。根据记录的 A_{260}/A_{280} 比值,估测 DNA 质量,一般 A_{260}/A_{280} 在 1.6~1.8,可以满足试验要求。根据记录的 A_{260} 数值及稀释倍数,换算出待测 DNA 的浓度,并做相应的稀释,以 50 ng/ μL 分装,作为工作液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存使用, DNA 原液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 ISSR-PCR 正交试验设计

针对影响 ISSR-PCR 的 5 个主要因素 (Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA) 在 4 个水平上进行正交设计,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行试验,设计方案见表 1,反应体系中除表中的因素外,还有 $10\times$ 缓冲液 (Mg^{2+}) 2.5 μL ,加双蒸水至 25 μL 。共 16 组,每组 2 次重复,共 32 管。

表 1 ISSP-PCR 反应体系的正交试验设计

Table 1 Orthogonal test design of ISSR-PCR reaction system

编号	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	dNTPs $/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	引物 $/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Taq DNA 酶 / U	模板 DNA $/(\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1})$
1	2.0	0.10	0.2	1.0	0.8
2	2.0	0.15	0.4	1.5	1.2
3	2.0	0.20	0.6	2.0	1.6
4	2.0	0.25	0.8	2.5	2.0
5	2.6	0.10	0.4	2.0	2.0
6	2.6	0.15	0.2	2.5	1.6
7	2.6	0.20	0.8	1.0	1.2
8	2.6	0.25	0.6	1.5	0.8
9	3.2	0.10	0.6	2.5	1.2
10	3.2	0.15	0.8	2.0	0.8
11	3.2	0.20	0.2	1.5	2.0
12	3.2	0.25	0.4	1.0	1.6
13	4.0	0.10	0.8	1.0	1.6
14	4.0	0.15	0.6	1.5	2.0
15	4.0	0.20	0.4	2.5	0.8
16	4.0	0.25	0.2	2.0	1.2

2.3 ISSR-PCR 扩增

用引物 ISSR825 在 PCR 仪上进行扩增,反应体系为 25 μL 。扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 38 次; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2.4 退火温度的确定

根据正交试验结果,选择合适的反应体系,设定温度梯度,通过对比,选出最适退火温度。

2.5 ISSR-PCR 优化所得体系稳定性的验证

用 10 份水蛭的基因组 DNA 对所建立的反应体

系可靠性和稳定性进行检测,反应程序同 ISSR-PCR 扩增反应程序。

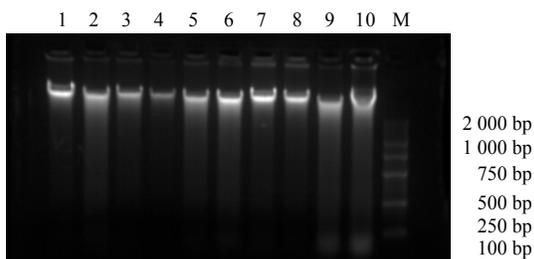
3 结果分析

3.1 水蛭基因组 DNA 的提取与检测

水蛭组织的 DNA 用紫外分光光度计测定浓度, A_{260}/A_{280} 值为 1.6~1.8,用琼脂糖凝胶电泳可清晰显现基因组 DNA 条带(图 1),DNA 可用于后续实验。

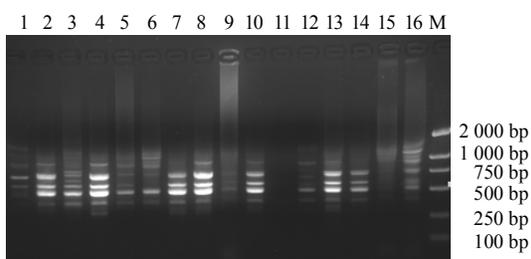
3.2 PCR 正交试验设计的直观分析

正交试验在 16 个处理组合中,由于 Mg^{2+} 浓度、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶、DNA 模板 5 种影响因素组合的不同,扩增效果存在着明显差异(图 2)。



1~10 为 10 份样品 M-Marker
1—10-Ten samples of *H. nipponica* M-Marker

图 1 水蛭总 DNA 1%琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 1% Agarose gel electrophoresis analysis of total DNA from *H. nipponica*



1~16 为处理号 M-Marker
1—16-treatment number M-Marker

图 2 ISSR-PCR 正交试验设计电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of ISSR-PCR orthogonal test design

体系 11 无条带, 体系 1、5、6、9、12、15 虽然有条带, 但扩增效果差, 条带弱且多态性低。综合比较, 体系 2、3、4、10、13 的条带特异性好, 其中体系 4 条带多特异性最好。因此确定水蛭 ISSR-PCR 反应的最佳体系为: 反应总体积 25 μL 其中包括 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, 引物 0.8 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 2.0 ng/ μL , 加双蒸水补足 25 μL 。

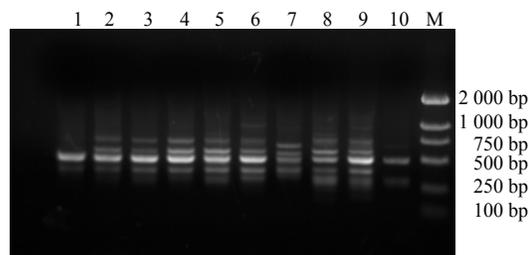
3.3 体系中不同因素对 ISSR-PCR 的影响

为了建立水蛭 ISSR-PCR 最优体系, 对影响 ISSR-PCR 扩增的因素模板 DNA、Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTP 的浓度设置了不同处理。结果表明, 模板 DNA 对 ISSR-PCR 扩增的结果无显著影响; Taq DNA 聚合酶在一定范围内随着酶量的增加扩增条带的清晰度亦增加, 当酶量在 2.5 U 时, 条带最清晰; Mg^{2+} 是影响 ISSR-PCR 反应的主要因素, 在试验中设置的 Mg^{2+} 浓度梯度均能扩增出条带, 但随着 Mg^{2+} 浓度的升高, 扩增条带特异性越来越差, 且清晰度不高。在 2.0 mmol/L 处扩增的条带最清晰, 多态性最好, 选为最适浓度; 引物浓度对扩增的影响也较大, 引物浓度较在 0.2

$\mu\text{mol/L}$ 时, 条带较少或者模糊不清, 随着引物浓度的升高, 扩增条带的清晰度和多态性都增强, 当引物浓度在 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时最好。dNTP 的浓度决定着 ISSR-PCR 反应的成败, dNTP 与 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶相互影响, 无论哪个因素的浓度过高或过低, 都影响扩增条带的有无, 当三者浓度的比例在一定的范围时即可扩增出清晰、多态性好的条带, 综合各因素的相互作用得出适宜的 dNTP 浓度为 0.25 mmol/L。

3.4 退火温度的确定

用以上所得最佳体系进行 48~54 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度梯度实验。电泳结果表明 (图 3), 在温度较低时, 扩增条带虽清晰, 但多态性不好, 随着退火温度的升高, 扩增条带的清晰度和多态性增强, 若超过一定的退火温度, 有的引物的多态性减弱。由此确定, 该实验所用引物 ISSR825 的退火温度为 49.7 $^{\circ}\text{C}$ 。



1~10 对应温度为 48.3、48.6、49.1、49.7、50.5、51.2、51.9、52.6、53.2、53.6 $^{\circ}\text{C}$ M-Marker
The annealing temperature of 1—10 is 48.3, 48.6, 49.1, 49.7, 50.5, 51.2, 51.9, 52.6, 53.2, and 53.6 $^{\circ}\text{C}$ M-Marker

图 3 退火温度对 ISSR 反应的影响

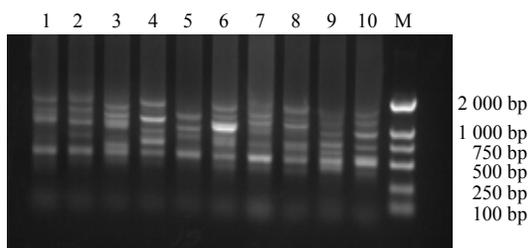
Fig. 3 Effect of annealing temperature on ISSR-PCR reaction

3.5 优化体系的验证

采用最优 PCR 反应体系, 用 10 份水蛭进行 PCR 扩增以检测体系的稳定性, 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 4, 从图中的验证结果来看, 不同模板 DNA 均能获得清晰明亮、重复性好、多态性高的电泳条带, 说明经优化的 ISSR-PCR 反应体系稳定性好, 可用于后续实验。

4 讨论

ISSR 技术是一种具有较多优点的分子标记技术, 适用于各类生物资源和遗传多样性的分子研究, 但其扩增反应易受反应体系内各因子浓度和反应程序的影响。且对于不同的物种, 其实验参数均有差异, 没有一种普遍适宜的反应条件。因此, 为了使 ISSR 研究获得科学、稳定、准确、可重复的结果, 为种质资源和遗传多样性研究提供可靠的实验数据,



1~10-10 份水蛭样品 M-Marker
1—10-ten samples of *H. nipponica* M-Marker

图4 用最优化体系对 10 份水蛭个体扩增的结果
Fig. 4 Amplification of ten samples of *H. nipponica* with optimized ISSR-PCR reaction system

在进行某物种 ISSR 分子标记研究的前期, 筛选出适合该物种的 ISSR 引物, 根据各引物选取适合的退火温度, 确立和优化适应该物种的 ISSR-PCR 体系是非常必要的工作。

反应体系中 Mg^{2+} 浓度十分重要, 浓度过高, 反应特异性降低, 易出现非特异性扩增, 浓度过低则会降低 Taq DNA 聚合酶的活性, 使反应产物减少^[14]; dNTP 是 PCR 反应的原料, 参与新链 DNA 的合成, 其浓度大小与 ISSR 扩增条带数量及强弱密切相关^[15], 浓度过低会降低 PCR 产物的产量, 同时, dNTP 能与 Mg^{2+} 结合, 浓度过高将使游离的 Mg^{2+} 浓度降低^[16]; Taq DNA 酶的活性与用量直接关系到 PCR 扩增反应的成败, 是 PCR 反应中最重要的因子。Taq DNA 酶浓度过低扩增速率低, 条带少且弱; 酶浓度过高则会产生非特异性条带, 而且增加了成本^[17]; 引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增, 且会在引物之间形成引物二聚体, 当引物浓度偏低时, 会导致条带数目稀少、模糊^[18]; ISSR 反应对模板浓度不太敏感^[19]; 就反应程序而言, 变性、退火和延伸的时间及温度对反应结果都有一定的影响。

本研究综合考虑各因素之间的互相作用, 采用 5 因素 4 水平的正交试验的方法确定了水蛭 ISSR-PCR 反应的最佳体系: $10 \times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, 引物 0.8 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 2.0 ng/ μ L, 加双蒸水补足 25 μ L, 最佳退火温度为 49.7 $^{\circ}$ C。同时用 10 份水蛭个体对最佳体系进行了稳定性验证。此最佳体系的获得为利用 ISSR 标记技术开展水蛭遗传多样性分析和构建遗传图谱提供一定的依据。

参考文献

[1] 黄荣清, 骆传环, 彭江南, 等. 水蛭中小分子活性成分

的 GC-MS 研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 788-789.

- [2] 贾彦, 牛英才, 张英博. 天然水蛭素对实验性肝纤维化大鼠肝脏结缔组织生长因子 mRNA 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 95-97.
- [3] 任青华, 牟忠祥, 耿延君, 等. 中药水蛭素对荷瘤鼠 Ki-67 与 VEGF 表达的影响 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(6): 46-48.
- [4] 韩国柱. 水蛭素的生理处置及药动学研究现状 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 附 6-附 8.
- [5] 杨增海. 园艺植物组织培养 [M]. 北京: 农业出版社, 1987.
- [6] 胡甦, 王永清, 陶炼, 等. 三角紫叶酢浆草叶色变异株系的 RAPD 和 ISSR 标记初步鉴定 [J]. 园艺学报, 2011, 38(5): 930-938.
- [7] 郭兴, 李滇华, 任广明, 等. ISSR 分子标记鉴别黑龙江地区黑木耳主栽品种的研究 [J]. 中国林副特产, 2010(6): 14-16.
- [8] Fernandez M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 845-851.
- [9] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311-1320.
- [10] Du J K, Yao Y Y, Ni Z F, et al. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compactum and progeny of recurrent selection [J]. *Acta Genet Sin*, 2002, 29(5): 445-452.
- [11] Zhao W G, Miao X X, Zang B. Construction of fingerprinting and genetic diversity of Mulberry cultivars in China by ISSR markers [J]. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(9): 851-860.
- [12] 汪斌, 祁伟, 兰涛, 等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱 [J]. 作物学报, 2011, 37(6): 1116-1120.
- [13] 盖钧镒. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [14] 刘燕霞, 侯丽娟, 李卫. 棉花黄萎病菌 ISSR 反应体系优化及其遗传多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 425-430.
- [15] 杨华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 反应体系的条件优化 [J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 152-155.
- [16] 王佳, 梁国华, 缪眠, 等. 正交设计优化黄瓜 ISSR 体系 [J]. 分子植物育种, 2005, 4(3): 439-442.
- [17] 任海霞, 宫志远, 曲玲, 等. 平菇 ISSR-PCR 反应体系影响因素研究 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(4): 35-37.
- [18] 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.
- [19] 杨水莲, 刘卫东, 马涛, 等. 假俭草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 草原与草坪, 2009(1): 11-14.