

乌药 ISSR 扩增条件的优化

顾婧婧^{1,2}, 金则新^{2*}, 李钧敏², 李建辉², 毕泉鑫²

(1. 西南大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 北碚 400715; 2. 台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

摘要: 为了确保 ISSR 分析的可靠性和重复性, 有必要进行 ISSR-PCR 反应体系的优化。以浙江省天台山乌药 (*Lindera aggregata*) 自然种群随机个体的基因组 DNA 为研究对象, 通过对反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 用量、Taq DNA 聚合酶用量、BSA 浓度、引物用量进行筛选和优化, 得出了适用于乌药 ISSR 分析的扩增条件: 10 μ L PCR 反应体积, 1 \times Taq 酶配套缓冲液 (200 mmol \cdot L⁻¹ Tris \cdot HCl, pH 8.8, 100 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1% Triton X-100, 100 mmol \cdot L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 20 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂), 0.5U Taq DNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA, 10 pmol 引物, 0.4 mmol \cdot L⁻¹ dNTP。利用优化反应体系从 100 个 ISSR 引物中筛选出 12 个重复性好、稳定性高的引物对 20 个乌药个体的 DNA 进行扩增, 共得到 142 个位点, 其中, 102 个为多态位点, 多态位点百分率为 71.83%, Nei 指数为 0.284 3, Shannon 信息指数为 0.415 3, 乌药的遗传多样性处于较高水平。

关键词: 乌药; ISSR; 优化; 遗传多样性

中图分类号: Q948.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2008)06-0094-04

Optimization of the ISSR Conditions in *Lindera aggregata*

GU Jing-jing^{1,2}, JIN Ze-xin², LI Jun-min², LI Jian-hui², BI Quan-xin²

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region's (Ministry of Education), Southwest University, Beibei, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Ecology, Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000, China)

Abstract: It is necessary to optimize the ISSR-PCR reaction system to make sure of getting the reliable and repeatable results in the PCR amplification. The ISSR reaction system of *Lindera aggregata* obtained from DNA group of random individual of *Lindera aggregata* community in Tiantai mountain of Zhejiang province was optimized, and the effect of Mg^{2+} concentration, dNTP concentration, DNA templates dosage, Taq DNA polymerase dosage, BSA concentration and primer dosage on ISSR amplification were tested. The optimal reaction system of ISSR was determined as follows: 1 \times Taq polymerase corresponding buffer (200 mmol \cdot L⁻¹ Tris \cdot HCl, pH 8.8, 100 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1% Triton X-100, 100 mmol \cdot L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 20 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂), 0.5U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 10 pmol primer, 0.4 mmol \cdot L⁻¹ dNTP in total 10 μ L reaction volume. 12 reliable and repeatable primers were selected from 100 primers using the optimal ISSR reaction system. 142 bands were amplified in 20 individuals, among which 102 were polymorphic loci, the percentage of which was 71.83%. Nei's (1973) index 0.284 3 and Shannon's Information index was 0.415 3, indicating the relatively higher genetic diversity within population of *L. aggregate*.

Key words: *Lindera aggregata*; ISSR; optimization; genetic diversity

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 又称为 Inter-SSR, 称为简单重复序列区间, 是 Zietkiewicz

等^[1]于 1994 年创建的建立在 PCR 基础上的一种新的分子技术, 它结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 并由

收稿日期: 2007-10-02 修回日期: 2007-11-20

基金项目: 浙江省自然科学基金资助 (Y505331)

作者简介: 顾婧婧, 女, 硕士研究生, 从事植物生态学研究。

* 通讯作者: 金则新, 男, 教授, 从事植物生态学研究。E-mail: jzx@tzc.edu.cn.

于其具有引物开发费用低、DNA 用量少、多态水平高等特点^[2],近年来已广泛用于品种鉴定、物种多样性等相关领域的研究^[3-4]。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子技术,因此,影响 PCR 效果的因素诸如牛血清白蛋白浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 用量、引物用量以及 Taq DNA 聚合酶用量等均会影响 ISSR 的扩增结果。因此,为了获得稳定而可靠的扩增结果,在研究时都应先建立合适的反应体系并对其进行优化。

乌药(*Lindera aggregata*)属樟科山胡椒属,常绿灌木或小乔木,主要分布于长江以南广大地区,是一种重要的药用植物,具有温胃散寒、理气止痛的功效。目前,对乌药的研究主要集中在其药理以及根、茎、叶的化学成分方面^[5-9],关于其种源苗期性状变异方面也有报道^[10],但是利用 ISSR 分子标记研究乌药种群的遗传多样性迄今未见报道。笔者以乌药的基因组 DNA 为模板,探讨 ISSR-PCR 反应体系中 6 种因素对扩增的影响,以期获得乌药 ISSR 反应的最佳体系,为乌药遗传多样性的分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采自浙江省天台县泳溪乡四合村蜡烛田,海拔 500 m。随机选取 20 株乌药个体,每个个体至少间隔 20 m,采集植株的幼嫩叶片置于保鲜袋中,并编号、封口,于样品贮藏箱(由超低温冰袋保持冷藏条件)带回实验室, -70°C 低温冰箱保存,供 DNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与定量 采用改进的 SDS 法^[11]。DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,用 GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照定量,稀释成终浓度 $20\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存,备用。

1.2.2 ISSR 原初扩增条件及 PCR 扩增程序 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学提供的序列(Uni-

versity of British Columbia, Set No. 9, No. 801 ~ 900),由上海生工生物工程公司合成。原初 ISSR 扩增反应体系为: $10\ \mu\text{L}$ 的 PCR 反应体积中, $0.3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白, 10 ng 模板 DNA, 10 pmol 引物(上海 Sangon 公司), 0.5 U Taq DNA 聚合酶(北京鼎国公司)。ISSR-PCR 扩增采用 Touchdown PCR 扩增程序: 94°C 预变性 5 min , 94°C 变性 1 min , 57°C 退火 1 min (每个循环降低 0.5°C), 72°C 延伸 1.5 min , 共 10 个循环; 94°C 变性 1 min , 52°C 退火 1 min , 72°C 延伸 1.5 min , 共 25 个循环; 72°C 延伸 5 min 。所有反应在美国 Bio-Rad 公司生产的 PTC 220 PCR 仪中进行。扩增产物在 1.6% 的琼脂糖凝胶(含 $0.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭)中电泳,电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$,用 200 bp DNA Ladder 做分子量标记,于 GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照保存。根据原初 PCR 反应条件,筛选出扩增条带多且清晰的 UBC807 作为优化的引物。

1.2.3 乌药 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化 按常规方法,采用单因素试验,共试验了 6 个因素各 4 个水平(表 1)。其余条件同“1.2.2”。

2 结果与分析

2.1 BSA 用量对 ISSR 扩增的影响

植物 DNA 中常含有内源多酚类化合物,该类化合物可与相应的蛋白质结合,致使酶失活,而 BSA 可以通过其上富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物的阴离子相互作用,或通过疏水相互作用力消除内源多酚类化合物,起到消除多酚化合物与蛋白质的作用,即阻止它们与 Taq 酶结合,从而提高酶活性,最终对 PCR 反应起到改善的作用^[12]。但研究中发现,添加 BSA 会使分子量小的条带亮度明显下降甚至丢失(图 1-A)。因此,在本研究采用不添加 BSA 的方法。

表 1 ISSR-PCR 体系优化的因素与水平

Table 1 The factors and levels for the optimization of ISSR-PCR reaction system

水平	BSA(牛血清白蛋白)浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Mg^{2+} 浓度/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	模板 DNA 用量/ ng	Taq (DNA 聚合酶) 用量/ U	dNTP(三磷酸脱氧核糖核苷酸)浓度/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物用量/ pmol
1	0	2.00	5	0.5	0.3	5
2	1	2.25	10	1.0	0.4	10
3	2	2.50	15	1.5	0.5	15
4	3	2.75	20	2.0	0.6	20

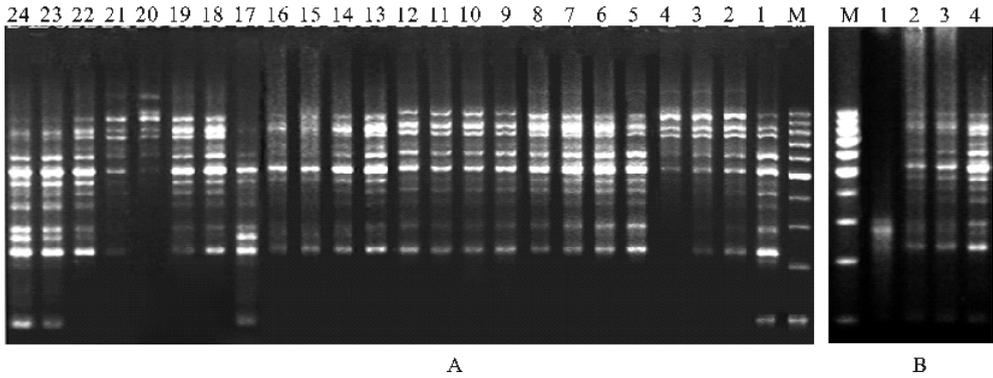
2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 扩增结果的一个重要因素。它通过影响 Taq DNA 聚合酶的活性从

而显著地影响 PCR 扩增^[13]。在乌药的 ISSR-PCR 扩增中, Mg^{2+} 浓度的变化对 ISSR 的条带数量影响不大。从图 1-A 可以看出, Mg^{2+} 浓度以 2.00 mmol

• L^{-1} 效果最佳,可扩增出明亮清晰且稳定的条带;随着 Mg^{2+} 浓度升高,条带数量变化不大,而扩增背

景略有增高,但差异不明显,因此,本研究中, Mg^{2+} 的最适浓度为 $2.00 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。



M:200bp DNA Ladder 标准分子量参照物;A1~4:BSA 浓度分别为 $0, 1, 2, 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; A5~8: Mg^{2+} 浓度分别为 $2.00, 2.25, 2.50, 2.75 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; A9~12:模板 DNA 用量分别为 $5, 10, 15, 20 \text{ ng}$; A13~16: Taq DNA 聚合酶用量分别为 $0.5, 1, 1.5, 2.0 \text{ U}$; A17~20: dNTP 浓度分别为 $0.3, 0.4, 0.5, 0.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; A21~24:引物用量分别为 $5, 10, 15, 20 \text{ pmol}$; B1~4: Taq DNA 聚合酶用量分别为 $0.2, 0.3, 0.4, 0.5 \text{ U}$ 。

图 1 几种因素对乌药 ISSR 扩增的影响

Fig. 1 The effect of some factor on ISSR amplification of *L. aggregate*

2.3 模板 DNA 用量对 ISSR 扩增的影响

从图 1-A 可知,模板 DNA 用量的变化对 ISSR 条带的数量和强弱影响不大。 $10 \mu\text{L}$ 反应体积中,模板 DNA 用量从 $5 \sim 20 \text{ ng}$ 均可扩增获得清晰的条带,带型与亮度变化不大,只是当模板 DNA 用量为 5 ng 时,扩增的条带亮度较弱。考虑到模板 DNA 浓度过低,将导致扩增产物不稳定,而模板 DNA 浓度过高,又会增加非特异性产物的扩增,因此,本研究采用的最适模板 DNA 用量为 10 ng 。

2.4 Taq DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增的影响

在 PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶用量的变化影响实验结果。用量过少,不能扩增;用量过多,不仅增加实验成本,而且导致非特异性产物增加。在 $10 \mu\text{L}$ 的反应体系中,当 Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 时,条带最多且最清晰,此后随着 Taq DNA 聚合酶用量的增加,条带变得模糊不清, Taq DNA 聚合酶用量过高,会引起 PCR 扩增效果的降低,这与其他文献报道一致^[14-15]。其原因可能是受 Taq DNA 聚合酶中甘油成分的影响,甘油是 Taq DNA 聚合酶的抑制剂,能够降低 Taq 聚合酶的活性,从而影响扩增结果^[16]。为了确定最佳 Taq DNA 聚合酶用量,对该因素做了进一步分析(图 1-B),发现当 Taq 酶单位低于 0.5 U 时,条带模糊不清甚至丢失,因此,本实验确定最佳 Taq DNA 聚合酶用量为 0.5 U 。

2.5 dNTP 用量对 ISSR 扩增的影响

dNTP 作为扩增的底物,其浓度变化直接影响 PCR 扩增结果。当 dNTP 的浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时,分子量小的条带较清晰,但高分子条带亮度

较低弱;当 dNTP 浓度大于 $0.4 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时,小分子条带亮度明显下降甚至丢失,因此,本研究中的最佳 dNTP 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。

2.6 引物用量对 ISSR 扩增的影响

引物浓度会对 ISSR-PCR 的扩增结果产生明显的影响,浓度过低不能扩增,浓度太高则会引起非特异性扩增,并形成引物二聚体。在本研究中,引物用量的变化对扩增条带的数量和强弱影响较明显。当引物量为 5 pmol 时,条带亮度低,且分子量小的条带扩增不出,当用量增加到 10 pmol 时,条带最多且亮度清晰,但是当引物量增加至 15 pmol 和 20 pmol 时,出现杂带,并且高分子条带亮度减弱。本研究选择的引物用量为 10 pmol 。

2.7 乌药 ISSR 扩增及遗传多样性

经以上分析,确立了乌药最适宜的 ISSR 反应体系,利用该反应体系对 100 个引物进行了筛选,得到 12 个扩增条带清晰、重复性好、稳定性高的引物,并作为正式扩增的 ISSR 引物(表 2)。用这 12 个引物对分布在天台县的乌药种群共 20 个个体的 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 142 个 DNA 片段,分子量为 $200 \sim 2000 \text{ bp}$ 。不同的引物在乌药中检测到的位点数不同,如引物 UBC815 和 UBC825 只检测到 9 个位点,而引物 UBC807 和 UBC842 却检测到 15 个位点。不同引物之间检测到的多态位点数目也不相同,除引物 UBC873 检测到的多态位点较少外,其余均检测到较多的多态位点,如引物 UBC810、UBC811 多态位点比率为 100%。经 POPGENE32 软件分析,在所检测到的 142 个位点中,多态位点为 102 个,多态位点百分率为 71.83%。

Nei 指数为 0.284 3, Shannon 信息指数为 0.415 3, 表明乌药的遗传多样性处于较高水平。

表 2 用于 ISSR 分析的 12 个随机引物序列

Table 2 The sequence of twelve random primers for ISSR analysis

引物	序列	引物	序列	引物	序列
UBC807	(AG) ₈ T	UBC824	(TC) ₈ G	UBC873	(GACA) ₄
UBC810	(GA) ₈ T	UBC825	(AC) ₈ T	UBC888	BDB(CA) ₇
UBC811	(GA) ₈ C	UBC840	(GA) ₈ YT	UBC890	VHV(GT) ₇
UBC815	(CT) ₈ G	UBC842	(GA) ₈ YG	UBC891	HVH(TG) ₇

3 结论与讨论

ISSR 技术是基于 PCR 扩增反应的一种新型分子标记技术,虽然具有诸多的优点,但同时也易受多种因素的影响,通过分析 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、BSA 浓度、模板 DNA 用量、引物用量、Taq DNA 聚合酶用量等因素对乌药 ISSR 扩增结果的影响,获得乌药 ISSR-PCR 反应体系较适宜的扩增条件为: 10 μ L PCR 反应体积中, $1 \times$ Taq 酶配套缓冲液 (200 mmol \cdot L⁻¹ Tris \cdot HCl, pH8.8, 100 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1% Triton X-100, 100 mmol \cdot L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 20 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂), 0.5U Taq DNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA, 10 pmol 引物, 0.4 mmol \cdot L⁻¹ dNTP。

经反复试验,在此优化条件下可以获得重复、稳定的 ISSR 扩增结果。采用 12 个引物对分布在浙江省天台县的乌药自然种群进行初步检测,其多态位点百分率为 71.83%, Nei 指数为 0.284 3, Shannon 信息指数为 0.415 3, 表明天台山乌药自然种群的遗传多样性较高。为进一步研究乌药种群遗传多样性与遗传结构奠定了基础。

参考文献:

[1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fin-

ger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.

- [2] 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.
- [3] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *生物多样性*, 2003, 11(4): 276-287.
- [4] LI A G. Genetic variation and clonal diversity of *psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers [J]. *Ann Bot*, 2001, 87: 585-590.
- [5] 王峥涛, 徐珞珊, 徐国钧, 等. 乌药的化学成分及药理作用 [J]. *中国野生植物资源*, 1999, 18(3): 5-10.
- [6] 王军伟, 阮冰. 乌药的植化及药理研究概况 [J]. *浙江中医杂志*, 2006, 41(11): 675-677.
- [7] 张朝凤, 孙启时, 赵燕燕, 等. 乌药叶中黄酮类成分研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2001, 11(5): 274-276.
- [8] 张朝凤, 孙启时, 王峥涛, 等. 乌药茎中鞣质类成分及其抗 HIV21 整合酶活性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(12): 911-914.
- [9] 周继斌, 翁水旺, 范明, 等. 乌药块根及根、茎挥发油成分测定 [J]. *中国野生植物资源*, 1999, 19(3): 45-47.
- [10] 陈丽华, 姜景民, 栾启福, 等. 乌药种源苗期性状变异研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(5): 748-752.
- [11] 李均敏, 金则新, 柯世省. 濒危植物七子花 RAPD 条件的优化 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(4): 452-456.
- [12] KREADER C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein [J]. *Appl Environ Microbio*, 1996, 62 (3): 1102-1106.
- [13] 卢盛栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458-463.
- [14] 袁长春, 施苏华, 叶创兴. 扩增条件对茶类植物 RAPD 带的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 1999, 7 (4): 313-317.
- [15] 蔡琰琳, 金则新, 李钧敏. 大血藤 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(4): 583-586.
- [16] 张君毅, 郭巧生, 杭悦宇. 半夏 ISSR-PCR 反应体系的建立及条件优化研究 [J]. *江苏农业科学*, 2007(2): 154-157.