

唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化

胡延萍^{1,2}, 谢小龙^{1,2}, 王莉¹, 杨建^{1,2}, 李毅^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所高原适应与进化重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用单因素试验对影响唐古特大黄 ISSR-PCR 扩增的重要参数进行优化, 以期建立其最佳反应条件。结果如下: 20 μL 反应体系包括 $1.5 \times \text{PCR buffer}$ (15 mmol/L Tris-HCl, 75 mmol/L KCl), 1.00 mmol/L MgCl_2 , 0.6 U Taq DNA 聚合酶, 0.125 mmol/L dNTP, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物和 30 ng 模板 DNA; 引物 UBC888 适宜的退火温度为 57.4 $^\circ\text{C}$ 。ISSR 反应条件的建立为利用分子标记技术研究唐古特大黄居群遗传多样性奠定了良好基础。

关键词: 唐古特大黄; ISSR-PCR; 优化

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)01-0112-05

Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum*

HU Yan-Ping^{1,2}, XIE Xiao-Long^{1,2}, WANG Li¹,
YANG Jian^{1,2}, LI Yi^{1*}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) is a good molecular marker for revealing genetic diversity. Reaction system differed in different species, so optimization of ISSR-PCR reaction is very important. Factors which affect the ISSR-PCR amplification, such as the concentration of Mg^{2+} , Taq DNA polymerase, dNTP, primer and template DNA with different annealing temperatures, were optimized and selected by using the genomic DNA of *Rheum tanguticum* as material. Optimal PCR (20 μL) mix contained $1.5 \times \text{PCR buffer}$ (15 mmol/L Tris-HCl, 75 mmol/L KCl), 1.00 mmol/L MgCl_2 , 0.6 U Taq DNA polymerase, 0.125 mmol/L dNTP, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ primer and 30 ng template DNA. The suitable annealing temperature was 57.4 $^\circ\text{C}$ for primer UBC888. Establishment of the PCR reaction conditions could favor further studies on the genetic diversity of *R. tanguticum* by using ISSR molecular marker techniques.

Key words: *Rheum tanguticum*; ISSR-PCR; optimization

ISSR (Inter-simple Sequence Repeats) 标记, 即简单重复序列区间 DNA 标记, 是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种基于 PCR 的分子标记技术。基本原理是: 利用基因组中存在的简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 本身设计引物, 在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1~4

个随机碱基, 然后以此为 3' 或 5' 引物, 对两侧具有反向排列的 SSR 间的基因组片段进行扩增。与 RAPD 相同, ISSR 具有操作简单, 所需 DNA 量少, 无需预知研究对象基因组序列等优点, 但 ISSR 标记产物多态性远比 RFLP、SSR、RAPD 丰富, 可提供更多关于基因组的信息, 且由于其引物较长、退火

收稿日期: 2008-04-14 修回日期: 2009-03-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD64B04) [Supported by National Key Technology R & D Program (2007BAD64B04)]

作者简介: 胡延萍 (1981-), 女, 山东定陶人, 博士研究生, 主要从事植物生物技术研究, (E-mail) huyanpingqfnu@163.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail, liyi@nwipb.ac.cn)

温度较高,使其多态性和稳定性明显优于 RAPD 标记技术,现已广泛应用于动植物的种质资源鉴定、遗传连锁图谱的构建、基因定位、分类、进化和遗传多样性等方面的研究(王建波,2002;周延清,2005;Nagaoka 等,1997;Ammiraju 等,2001;Sankar 等,2001;Kim 等,2002)。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子技术,所以同其它标记一样,其最终结果易受多种因素的干扰,如 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA、dNTP 和引物等都能影响扩增的结果,甚至其中一个因子的改变都会导致扩增条带弥散、消失及位置的改变,从而严重影响整个实验结果,因此,在研究时都应先建立合适的反应体系并对其进行优化(李文表等,2006;顾奇萍等,2007)。

唐古特大黄(*Rheum tanguticum*),又名鸡爪大黄,为蓼科(Polygonaceae)大黄属(*Rheum*)多年生草本植物,分布在西藏东部、青海、甘肃,生于海拔在 1 700~4 300 m 的山坡林缘、灌丛及半阴坡石堆中(中国科学院西北高原生物研究所,1991),是我国的特有种(李安仁,1998;吴玉虎,2004)。其干燥根及根茎入药,性寒,味苦;具有泻热通肠,凉血解毒,逐瘀通经之功效;为“正品大黄”之一(国家药典委员会,2005)。迄今为止,对唐古特大黄的药用化学成

分提取,HPLC 指纹图谱(郑俊华,1991;李磊等,2005),有效成分的药理作用(李淑娟等,2005),组织培养(董相军等,2004)和细胞学(胡延萍等,2007)进行了大量研究。有关唐古特大黄的分子生物学研究甚少,文献报道仅见杨美华(2001)以 RAPD 标记鉴别三种正品大黄;采用 ISSR 分子标记来研究唐古特大黄植物,至今未见报道。

本文以唐古特大黄基因组 DNA 为模板,建立了条带清晰、重复性好的唐古特大黄 ISSR-PCR 反应体系,为进一步利用该技术进行唐古特大黄种质资源鉴定及遗传多样性研究奠定了良好技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

来源:唐古特大黄幼嫩叶片采自青海省果洛州,硅胶干燥后于 -20°C 冰箱保存。主要试剂:ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)提供的序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Taq DNA 聚合酶,dNTP, $MgCl_2$,200bp DNA Ladder Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

表 1 ISSR-PCR 体系的因素与水平

Table 1 Factors and levels used in ISSR-PCR reaction system

因素 Factor	水平 Level				
	1	2	3	4	5
$MgCl_2$ (mmol/L)	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
Taq DNA 聚合酶(U/20L)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
dNTP(mmol/L)	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
Primer($\mu\text{mol/L}$)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
DNA(ng/20L)	50	40	30	20	10

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 基因组 DNA 提取采用改进 CTAB 法(Doyle 等,1987;杨美华,2001)。用 0.8% 琼脂糖凝胶对 DNA 质量进行电泳检测,以 $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$ 为对照,检测 DNA 片段的长度和 DNA 浓度。

1.2.2 PCR 反应与产物检测 ISSR-PCR 原初反应体系为 20 μL PCR 反应体积中,1.5 \times PCR buffer (15 mmol/L Tris-HCl, 75 mmol/L KCl), 1.875 mmol/L $MgCl_2$, 0.075 mmol/L dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.9 U TaqDNA 聚合酶, 20 ng 模板 DNA。扩增反应在 DyadDiscipleTM Peltier Thermal Cy-

cler 型 PCR 仪上进行。扩增程序为 94°C 变性 5 min, 然后进行 38 个循环: 94°C 变性 20 s, 55°C 复性 60 s, 72°C 延伸 80 s, 循环结束后 72°C 延伸 6 min, 4°C 保存。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB)中电泳,电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$,电压 3~5 V/cm, UVP BioImaging System 紫外成像系统拍照记录电泳结果。

1.2.3 ISSR 反应体系的优化 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化采用单因素试验,试验因素及水平见表 1,每个水平重复 2 次,每一因素的合适条件确定后作为后续因素研究的基础。

1.2.4 退火温度的确定 采用梯度 PCR 模式:在

UBC888 引物 Tm(53.8 °C)值上下设置 12 个温度梯度(50.0、50.3、50.9、51.7、52.8、54.3、56.0、57.4、58.5、59.3、59.8、60.0 °C)进行筛选,其余 PCR 扩增程序同 1.3.2。

2 结果与讨论

2.1 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 扩增的影响

Mg²⁺ 浓度是影响 PCR 扩增的一个主要因素。作为 Taq DNA 聚合酶的辅助因子, Mg²⁺ 浓度不仅影响 Taq DNA 聚合酶的活性,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 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成(林万明,1993)。本试验对 5 个 Mg²⁺ 浓度梯度(表 1)进行比较,结果(图 1)显示不同浓度间扩增结果差异较大: Mg²⁺ 浓度的变化不仅影响 ISSR 条带的数量,还影响其强弱及有无。Mg²⁺ 浓度大于等于 1.50 mmol/L 时,出现非特异性模糊条带且泳道背景较深; Mg²⁺ 浓度为 1.25 mmol/L 时,两个重复不一致,2 号扩增在 600 bp 和 800 bp 之间出现一条模糊条带,且大于 1 400 bp 处也有模糊条带; Mg²⁺ 浓度为 1.00 mmol/L 时,扩增条带清晰,稳定性好,因此, Mg²⁺ 浓度选用 1.00 mmol/L。

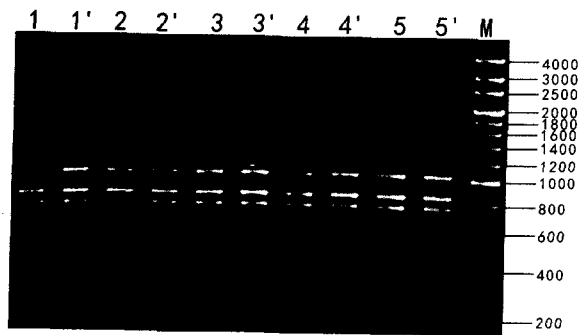


图 1 Mg²⁺ 对 ISSR 扩增的影响(引物 UBC888)
Fig. 1 Effect of Mg²⁺ concentration on ISSR amplification(Primer UBC888)

1'-5' 为 1-5 的重复, 1-5: Mg²⁺ 浓度分别为 1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 mmol/L; M: 200 bp 标准分子参物,下同。

2.2 Taq DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响

Taq DNA 聚合酶是 PCR 扩增反应的关键因素。在实验过程中,为了保持扩增反应的稳定性,应尽量使用同一厂家同一批次的 Taq DNA 聚合酶。Taq DNA 聚合酶为 0.4 U 时(图 2),扩增条带少,

重复性差; Taq DNA 聚合酶大于等于 0.8U 时,扩增条带数量增多,但出现模糊条带,不易辨认;唯有 Taq DNA 聚合酶为 0.6U 时,扩增条带清晰且稳定性好。20 μL 反应体系 Taq DNA 聚合酶的量以 0.6 U 较为适宜。

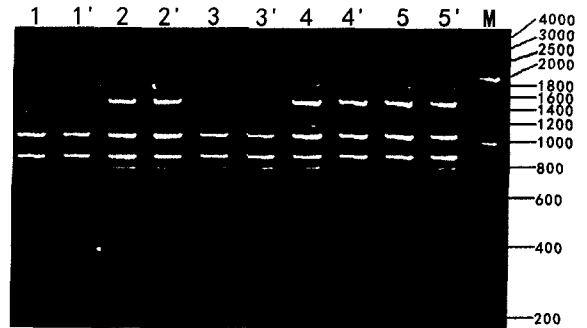


图 2 Taq DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响
Fig. 2 Effect of Taq DNA polymerase on ISSR amplification

1'-5' 为 1-5 的重复, 1-5: Taq DNA 聚合酶的量分别为: 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 U。

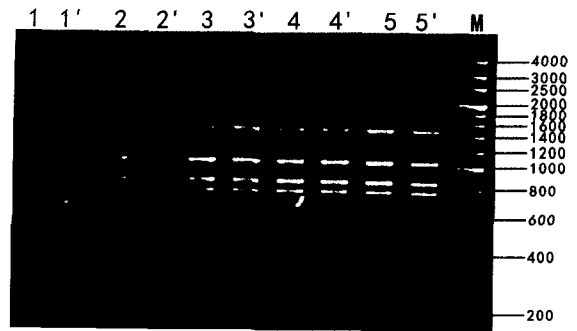


图 3 dNTP 对 ISSR 扩增的影响
Fig. 3 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification

1'-5' 为 1-5 的重复, 1-5: dNTP 浓度分别为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mmol/L。

2.3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

dNTP 是 PCR 反应的原料。dNTP 浓度过低会导致扩增带产率低,过高会产生错误掺入。当 dNTP 浓度为 0.050 mmol/L 和 0.100 mmol/L 时,扩增条带少,且位于 1 400~2 000 bp 之间的条带模糊不易辨认;当 dNTP 浓度为 0.150 mmol/L 时,两次重复不一致;当 dNTP 浓度为 0.075 mmol/L 时,1 600 bp 左右的条带有些模糊,且 800~1 000 bp 之间出现一条非特异性带。dNTP 浓度为 0.125 mmol/L 时,产物丰富,条带清晰,重复性好。从整

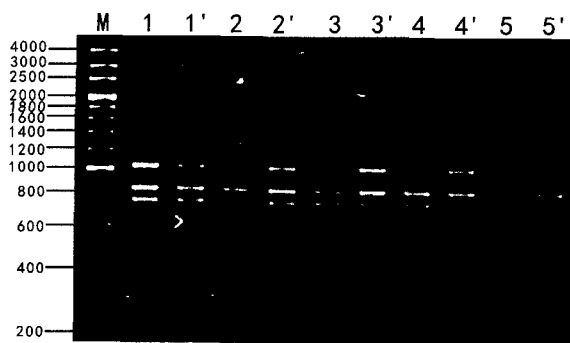


图 4 模板 DNA 对 ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of template DNA concentration on ISSR amplification

1'-5' 为 1-5 的重复, 1-5: 模板 DNA 用量分别为 50、40、30、20、10 ng。

体上看, dNTP 的适宜浓度为 0.125 mmol/L。

2.4 模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响

从图 4 所示的 5 个模板梯度扩增结果可以看出: 当模板用量大于等于 40 ng 时, 有模糊条带, 不

易辨认; 模板用量越大, 产物越多, 条带越亮。当用量小于等于 20 ng 时, 出现一些模糊条带和非特异性带, 且扩增条带不稳定。模板用量为 30 ng 时, 条带稳定且清晰, 亮度适中, 是最适模板 DNA 用量。

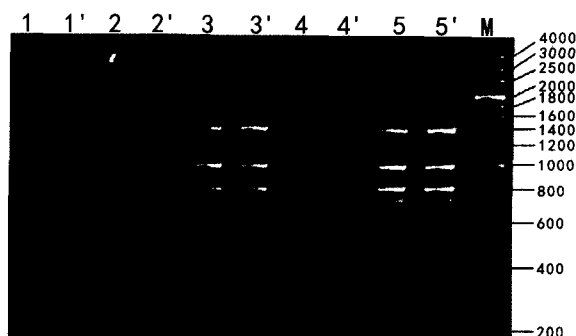


图 5 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of primer concentration on ISSR amplification

1'-5' 为 1-5 的重复, 1-5: 引物浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L。

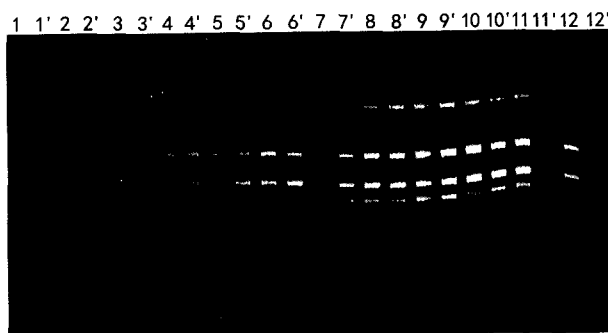


图 6 UBC888 退火温度梯度

Fig. 6 The gradient of annealing temperature in UBC888

1'-12' 为 1-12 的重复, 1-12 退火温度分别为: 50.0、50.3、50.9、51.7、52.8、54.3、56.0、57.4、58.5、59.3、59.8、60.0。

2.5 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

当引物浓度为 0.1 μmol/L 时, 无扩增产物; 当引物浓度为 0.2 μmol/L 和 0.4 μmol/L 时扩增条带较少且强度弱; 当引物浓度为 0.3 μmol/L 虽然扩增条带多, 亮度增强, 但大于 1 400 bp 的条带模糊, 不清晰。当引物浓度为 0.5 μmol/L 时, 带型清晰, 稳定性好。本试验最佳引物浓度为 0.5 μmol/L。

2.6 退火温度的确定

根据公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 计算引物理论退火温度, ISSR-PCR 退火温度一般在 T_m 值附近上下浮动 1~3 °C (陈大霞等, 2007)。本试验以引物 UBC888 为例, 梯度 PCR 仪在 50.0~60.0 °C 之间自动生成 12 个退火温度梯度, 电泳结果见图

6。当退火温度 50.0~54.3 °C 时, 扩增条带较弱, 背景较深, 且出现模糊条带和非特异性条带; 退火温度 56.0 °C 时条带清晰, 但大分子量 (1 400~2 000 bp) 的条带模糊; 退火温度 58.5 °C 和大于 59.8 °C 时, 两个重复不一致, 稳定性差; 退火温度 59.3 °C 时出现非特异性条带。唯有退火温度 57.4 °C, 扩增的条带之间界限分明、亮度适宜、背景清晰且重复性好。故选择 57.4 °C 为 UBC888 的最适退火温度。

3 结论

影响 ISSR-PCR 扩增结果的因素很多, 为获得稳定、可靠的 ISSR 谱带, 有必要对其影响因子进行

优化,筛选出最佳 ISSR 扩增条件。唐古特大黄 ISSR-PCR 分析较适宜的扩增条件是:20 μ L 反应体积含 1.5 \times PCR buffer (15 mmol/L Tris-HCl, 75 mmol/L KCl), 1.00 mmol/L MgCl₂, 0.6 U Taq DNA 聚合酶, 0.125 mmol/L dNTP, 0.5 μ mol/L 引物, 30 ng 模板 DNA; 引物 UBC888 的最佳退火温度为 57.4 $^{\circ}$ C。利用优化的系统,从 100 个 ISSR 引物中筛选出重复性好、条带清晰的 15 个引物,对

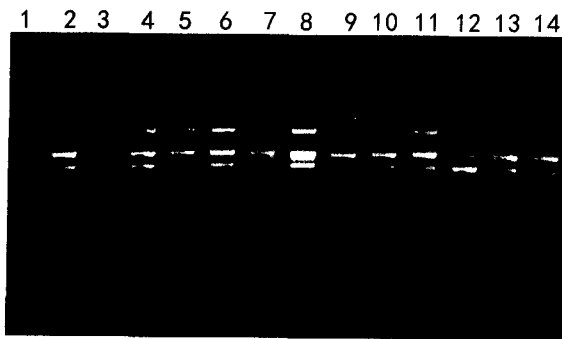


图 7 引物 UBC888 对唐古特大黄个体的扩增结果
Fig. 7 The amplification results of 14 *R. tanguticum* individuals by UBC888

唐古特大黄不同个体进行扩增,能得到清晰、稳定、多态性高的 ISSR 谱带(图 7)。这为进行唐古特大黄种质资源鉴定及遗传多样性研究奠定了良好基础。有关唐古特大黄居群遗传多样性和遗传分化将另发文章。

参考文献:

- 中国科学院西北高原生物研究所. 1991. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社:83
- 李安仁. 1998. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 25:184-186
- 杨美华. 2001. 正品大黄的分子鉴定及其系统亲缘关系[D]. 北京:北京大学
- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社:17-18
- 林万明. 1993. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社:7-14
- 周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社:146-161
- Ammiraju JSS, Dholakia BB, Santra DK, et al. 2001. Identification of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 102:726-732
- Chen DX(陈大霞), Li LY(李隆云), Lu C(鲁成), et al. 2007. Dong XJ(董相军), Wang L(王莉), Xu WH(徐文华), et al. 2004. Plantlet regeneration from dormancy buds of *Rheum tanguticum*(唐古特大黄休眠芽诱导植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 40(4):45
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Focus*, 12:13-15
- Gu QP(顾奇萍), Jin ZX(金刚新), Li JM(李钧敏). 2007. Optimization of ISSR amplification conditions for *Rhododendron fortunei*(云锦杜鹃 ISSR 扩增条件的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), 27(4):560-563
- Hu YP(胡延萍), Xie XL(谢小龙), Wen Q(温泉), et al. 2007. Studies on karyotypes of five populations of *Rheum tanguticum* (Polygonaceae)(唐古特大黄五个居群的核型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 29(4):429-433
- Kim DH, Zur G, Danin-Poleg Y, et al. 2002. Genetic relationships of sesame germplasm collection as revealed by inter-simple sequence repeats[J]. *Plant Breeding*, 121:259-262
- Li L(李磊), Liu R(刘瑞), Yuan B(袁波), et al. 2005. Fingerprints analysis of Radix et Rhizoma Rhei by HPLC(大黄 HPLC 指纹图谱分析)[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 40(17):1302-1305
- Li SJ(李淑娟), Dong XH(董晓华), Wu HX(武海霞), et al. 2005. Review of Rhubarb and pharmaceutical effects of its effective constituents(大黄及其有效成分药理作用研究)[J]. *Medical Recapitulate*(医学综述), 11(1):76-78
- Li WB(李文表), Zhou XY(周先叶), Li Y(李勇), et al. 2006. Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei*(棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(2):204-208
- Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 94:597-602
- Sankar AA, Moore GA. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map[J]. *Theor Appl Genet*, 102:206-214
- Study on optimization of ISSR reaction conditions for *Coptis chinensis*(黄连 ISSR 反应条件优化的研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 27(1):76-81
- Wang JB(王建波). 2002. ISSR markers and their applications in plant genetics(ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用)[J]. *Hereditas*(遗传), 24(5):613-616
- Wu YH(吴玉虎). 2004. Floristic characteristics in the region of Bayan Har Mountains(巴颜喀拉山地区植物区系研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 26(6):587-603
- Zheng JH(郑俊华). 1991. Analysis of chemical constituents of the genus *Rheum*[J]. *J Beijing Med Univ*(北京医科大学学报), 23(1):51-53
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20:176-183