

濒危植物峨眉野连 ISSR 反应体系的建立与优化

张春平¹, 何平^{1*}, 胡世俊², 高珊¹

(1. 西南大学 生命科学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要: 针对峨眉野连 ISSR 的反应特点, 建立稳定可靠的 ISSR-PCR 分子标记反应体系, 为进一步研究峨眉野连的种质资源遗传多样性奠定基础。通过筛选引物并设定影响峨眉野连 ISSR-PCR 反应诸因子的不同梯度, 检测其不同反应体系的扩增效果, 分析非特异性条带的产生原因并进行条件优化, 建立峨眉野连 ISSR-PCR 稳定可靠的反应体系。首次建立了可用于峨眉野连 ISSR-PCR 分析的最适宜的反应体系: 25 μL PCR 反应体系中, 内含 1×PCR Buffer, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 200 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L 引物, 80 ng 模板, 1.0 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, (据不同引物的退火温度) 复性 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环结束后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。所建立的峨眉野连 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、检测多态性能力强、重复性好等特点, 可以较好地应用于峨眉野连的种质资源多样性及居群鉴别的研究。

关键词: 峨眉野连; ISSR; 建立; 优化

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)01-0039-05

Establishment and optimization of ISSR reaction system for endangered plant *Coptis omeiensis*

ZHANG Chun-Ping¹, HE Ping^{1*}, HU Shi-Jun², GAO Shan¹

(1. School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory (Ministry of Education) of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: In order to study the genetic diversity of *Coptis omeiensis* germplasm, ISSR-PCR system of *C. omeiensis* was established and optimized according to the characters of it. The effects of ISSR-PCR was examined by selecting primers and designing different concentrations of the factors in the ISSR, the reliable systems for *C. omeiensis* populations researching was established by analyzing the reasons for occurrence of differential bands and optimizing reaction conditions. The optimal ISSR-PCR system in *C. omeiensis* was established for the first time, that is, 25 μL amplification reactions system containing 1×PCR Buffer, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 200 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L primer, 80 ng template, 1.0 U Taq DNA polymerase. The optimal amplified procedure was as follows, after a pre-denaturing of 5 min at 94 °C, 35 cycles were performed with denaturing of 30 s at 94 °C, annealing of 1 min due to denaturing temperature of different primer, extension of 1.5 min at 72 °C, a final extension step of 7 min at 72 °C and hold at 4 °C. The ISSR-PCR systems, which were established in this paper for studying *C. omeiensis*, could provide clear reliable abundant polymorphisms molecular markers and were proved suitable for germplasm resource studying and identification of *C. omeiensis*.

收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(30070080)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070080)]

作者简介: 张春平(1982-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事植物保护生物学和系统进化等方面的研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: heping196373@126.com)

Key words: *Coptis omeiensis*; ISSR; establishment; optimization

峨眉野连(*Coptis omeiensis*)为毛茛科黄连属多年生草本植物,习称“岩连”,为国家二级濒危保护植物(傅立国等,1991),主要分布在四川西部的峨眉、雅安与洪雅地区海拔 1 000~1 700 m 的隐蔽悬崖陡壁上。野连性寒、味苦,具有清热、解毒、泻火、燥湿和良好的抗菌作用。由于其叶片窄长,形似雉尾,故又有“凤尾连”的美称,野连单枝略微弯曲,表面黑褐,断面金黄,比家种黄连色泽更深,味道更苦,质量更优。峨眉野连根茎及叶部的有效成份小檗碱的含量高于属内其它各种,具值得重视的资源保护与利用价值,但是现在野连居群数量及个体数濒危稀少,野生资源相当匮乏。目前,对其药理、药化方面的研究相对较多(王立群等,2004;郭志刚等,2004;庄平等,1994),但是对其种质资源的遗传多样性研究,特别是运用像 ISSR 等分子手段的研究未见报道。本研究旨在建立重复性好、结果明显而稳定的 ISSR 反应体系和扩增程序,为进一步对野连的鉴定和种质资源遗传多样性研究提供有效便利的方法,为挖掘潜在药物资源和开发新药提供良好基础。

ISSR 由 Zietkiewicz 等(1994)创建,是一种建立在 PCR 反反应基础上的 DNA 分子标记。近年来,ISSR-PCR 已成功用于植物遗传多样性分析(邱英雄等,2003)、DNA 指纹图谱绘制(Ammiraju 等,2001)、分子生态学研究等领域(Casasoh 等,2001;李先文等,2006)。该技术无需预知受试材料基因组序列,成本低、操作简单、灵敏性高且重复性好等优点,被认为是非常理想的分子标记。研究峨眉野连居群的遗传多样性时,发现改变 ISSR-PCR 反应各因子会直接影响到实验结果的稳定性。为此,必须对峨眉野连 ISSR-PCR 的反应体系进行优化,分析非特异性条带产生的原因,以建立适合峨眉野连 ISSR-PCR 反应的可靠体系,为深入开展峨眉野连种质资源的遗传多样性研究奠定基础。

1 材料

所用峨眉野连采自我国野连的主产区:四川峨眉、雅安与洪雅地区。选取当年生嫩叶,低温条件下带回实验室洗净、晾干,冻于-80℃的超低温冰箱中备用。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取及检测

取新鲜的野连叶片 1 g,采用改良后的 CTAB 法提取野连的基因组 DNA。用 Bio-Rad 核酸蛋白分析仪测量所提 DNA 浓度及纯度,同时用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 是否降解。

2.2 优化实验设计

优化实验中选用筛选好的 U807 为扩增引物,对影响野连 ISSR-PCR 反应的主要因素进行梯度实验。分别为 TaqDNA 聚合酶与 Mg^{2+} 二因素梯度实验,dNTP、模板、引物单因子梯度实验和引物退火温度梯度单因子实验。在酶与 Mg^{2+} 二因素梯度实验中,Taq DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 分别设置了 4 个浓度梯度,二因素交叉共 16 个处理。引物的退火温度梯度则是在其 T_m 值附近设置 8 个梯度进行筛选(表 1)。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的实验设计

Table 1 Design of the experiment for ISSR-PCR amplification reactions system

反应成分 Composition	反应浓度 Reaction Concentration
Mg^{2+} (mmol · L ⁻¹)	1.0、1.5、2.0、2.5
Taq DNA polymerase (U)	0.5、1.0、1.5、2.0
dNTPs (mmol · L ⁻¹)	10、20、40、80、160、200、300、400
Primer (μmol · L ⁻¹)	0.05、0.1、0.2、0.3、0.6、1.2
Template DNA (ng)	5、10、20、40、80、120、160、200

2.3 ISSR-PCR 产物鉴定

反应产物在含 goldview 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离,电压 5V/cm。用 DL2000 的 DNA marker(100~2 000 bp)作为标记,电泳结束后在 Bio-Rad Gel Doc2000 凝胶成像系统下观察并拍照。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 提取结果

所提取的基因组 DNA 经电泳后显示出清晰整齐的条带,表明 DNA 并未发生降解。在 Bio-Rad 核酸蛋白分析仪上测其原始浓度,然后统一将其稀释至 40 ng/μL,供 ISSR-PCR 实验所用(图 1)。

3.2 反应体系中各组分对扩增的影响

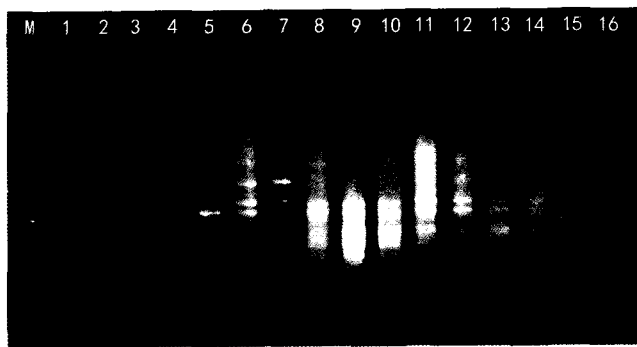
3.2.1 Taq DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 对 ISSR 扩增的影响



图 1 基因组 DNA 的提取结果

Fig. 1 The result of genomic DNA extraction

响 Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶的依赖性因素, Mg^{2+} 浓度的大小可直接影响酶活性的发挥。因此, 选择合适的 Mg^{2+} 浓度, 对 PCR 的结果至关重要。本研究采用 TaqDNA 聚合酶与 Mg^{2+} 的二因素交叉实验, 设置了 16 个处理。由图 2 看出: 当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时, Taq DNA 聚合酶从 0.5~2.0 U 均无扩增产物生成; 当 Mg^{2+} 浓度达到 1.5 mmol/L 时, 开始出现条带, 并且当酶的量达到 1.0 和 1.5 U 时均产生清晰地条带, 但相对来说酶量为 1.0 U 时条带最为清晰, 如图 2 中第 6 泳道所示; 当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时, 所扩增的产物有拖尾现象, 形成明亮一片, 如第 9~12 泳道所示; 当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时, 同样有拖尾现象出现。因此, 第 6 泳道的组合, 即当 Mg^{2+} 为 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶为 1.0 U 时, 整体效果最好。

图 2 Taq DNA 聚合酶与 Mg^{2+} 对 ISSR 扩增的影响Fig. 2 Effect of Taq DNA polymerase and Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

(1-4, 5-8, 9-12, 13-16: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L Mg^{2+} ;
1, 5, 9, 13: 0.5 U Taq DNA polymerase; 2, 6, 10, 14: 1.0 U Taq
DNA polymerase; 3, 7, 11, 15: 1.5 U Taq DNA polymerase;
4, 8, 12, 16: 2.0 U Taq DNA polymerase).

3.2.2 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响 dNTP 是

PCR 扩增的原料, 为了寻求最佳浓度, 本实验设置了从 10~400 mmol/L 共 8 个浓度梯度, 结果如图 3 所示。在 8 个浓度梯度中, 10~20 mmol/L 范围内无条带产生。在 40~200 mmol/L 范围内随着 dNTP 浓度的增加, 条带数量增加, 并且在 200 mmol/L 时产生的多样性条带数量最多且清晰, 如泳道 6 所示。当 dNTP 的浓度达到 300 mmol/L 时, 仅产生少量条带, 并且模糊不清。当浓度达到 400 mmol/L 时基本无条带产生, 这表示无 PCR 产物生成。因此, 200 mmol/L 的 dNTP 为最佳浓度。

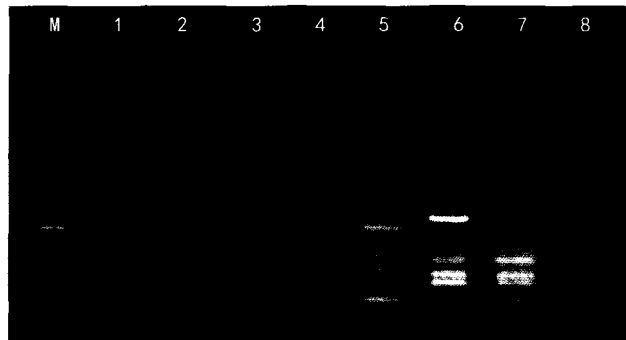


图 3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification

3.2.3 引物浓度对 ISSR 扩增的影响 引物是选定模板中特定序列进行扩增的一段碱基序列, 引物的浓度也是决定 PCR 扩增的重要因素。本实验中采用筛选出的 U807 作为扩增引物, 共设置 8 个浓度梯度, 扩增结果如图 4 所示。在所设计的 6 个引物浓度范围内皆有条带产生, 在 0.05~0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 产生的多样性条带少且不清晰。引物浓度在 0.6~1.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围时, 得到的条带模糊不清。只有在 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时, 条带最清晰且数目最多, 如泳道 4 所示。所以, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 被确定为反应的最佳引物浓度。

3.2.4 模板浓度对 ISSR 扩增的影响 本实验中, 模板设置 8 个浓度梯度进行扩增, 结果如图 5 所示: 模板对扩增没有太大的特异性。当模板的浓度在 40 ng、80 ng 和 160 ng 时, 如泳道 4, 5 所示。扩增产物没有太大的影响, 只是在浓度大于 160 ng 时, 出现轻微的拖尾现象, 条带模糊不清。但是, 反应体系中如果模板过少, 分子碰撞的机率降低, 过多反而又会产生非特异性产物。所以, 本着高效、节省的原则, 选择 80 ng 作为最佳的模板浓度。

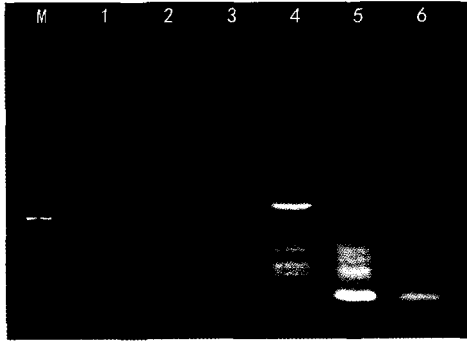


图 4 引物浓度对 ISSR 扩增的影响
Fig. 4 Effect of primer concentration on ISSR amplification

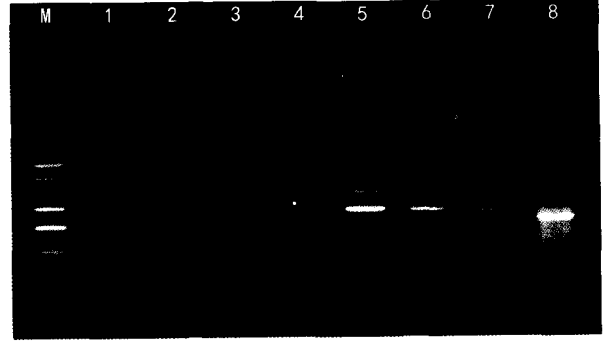


图 6 退火温度对扩增的影响
Fig. 6 Effect of the annealing temperature gradient on ISSR amplification

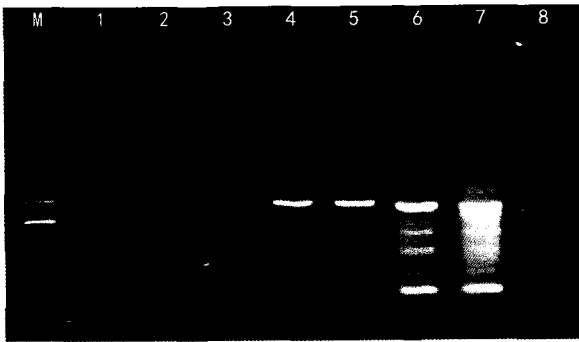


图 5 模板浓度对 ISSR 扩增的影响
Fig. 5 Effect of template concentration on ISSR amplification

3.2.5 退火温度对扩增的影响 退火温度有时候并不严格等于其 T_m 值,而是在 T_m 值附近波动。在 PCR 反应中,过低的温度在保证模板与引物结合的同时,也使得模板与引物之间未完全配对的位点得到扩增,产生了所谓的错误扩增。因此,在允许的温度范围内,较高的温度会提高反应的特异性,减少非特异性产物的生成。在本实验中,在引物的 T_m 值附近共设置 8 个梯度。其结果如图 6 所示:当在第 5 个温度梯度时,扩增出的多样性条带数目多,并且清晰明亮,可以选为最佳退火温度。

3.3 野连反应体系和扩增程序的建立

通过对上述各反应条件的分析,建立了适合峨眉野连扩增的反应体系和扩增程序。反应体系为:25 μL PCR 反应体系中,内含 $1\times$ PCR Buffer, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 80 ng 模板, 1.0 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变

性 30 s, (据不同引物退火温度) 复性 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.4 优化体系对峨眉野连的扩增效果

利用此优化体系,对 50 个 ISSR 引物进行了筛选,结果筛选出 18 个扩增条带清晰、重复性好、稳定性高的引物作为正式扩增引物。利用筛选好的引物 U807 对峨眉野连的 24 个个体进行了扩增,结果得到了背景清晰、多态性稳定丰富的 DNA 扩增片段(图 7),可见优化后的体系可用于峨眉野连的居群鉴别及遗传结构分析研究。实验中对来自 10 个不同居群的峨眉野连进行了遗传多样性研究,结果得到峨眉野连的遗传多态性为 77.6%,各种群间的平均遗传一致度为 0.647 9,平均遗传距离为 0.388 3,这明显的表明了野连有比较高的遗传多样性。

4 讨论

高质量的模板是保证 ISSR-PCR 成功的基础,所以模板 DNA 的提取是非常关键的,本实验中采用的是改进后的 CTAB 提取法,针对峨眉野连次生代谢产物高的特点,采用氯仿-异戊醇进行反复抽提的方法,有效地去除了蛋白质和多糖,为下一步扩增提供良好的模板。

在影响扩增的众多因子中,酶是一个很重要的因素, TaqDNA 聚合酶的浓度直接决定扩增的成功与否,没有酶的催化,反应无法进行。因此,寻找合适浓度的 TaqDNA 聚合酶是实验的重要任务。但是,酶的活性又与 Mg^{2+} 相关联,合适的 Mg^{2+} 浓度又是决定酶活性的重要因素。所以,本实验采用了酶与 Mg^{2+} 的二因子交叉实验,通过不同的搭配,找出最适的浓度组合。值得注意的是,不同厂家,甚至

同一厂家不同批次的酶,其活力都存在着差异。为了减少实验误差,因该尽量使用同一厂家生产的同一批次的酶。

dNTP 是扩增的主要原料,浓度过高会与部分 Mg^{2+} 相结合,从而与酶竞争 Mg^{2+} ,使得酶的活性

降低,扩增产物大大减少,并且还会导致 PCR 错配,出现非特异性扩增,影响结果。浓度过低,又会影响扩增的产量。因此,合适的 dNTP 浓度也是十分关键的。本实验中,通过梯度设置,得到了合适的 dNTP 浓度。

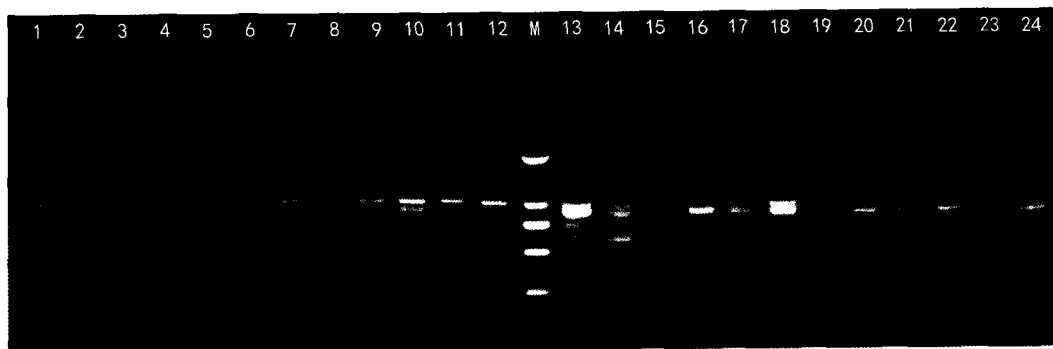


图 7 引物 U807 对 24 样本的扩增结果

Fig. 7 The result of ISSR amplification generated with primer U807 for 24 samples

由于 ISSR-PCR 所用的每条引物碱基组成和数量是不同的,因此,每条引物都有适合自己的退火温度。在实验中,每条引物都要单独摸索退火温度,其基本的原则是逐步递缩法(Dieffenbach 等,1998;姜静等,2003)。即首先设置较宽的温度梯度,找到大体合适的温度范围之后,再把此范围的温度细分,直到找到合适的温度为止。

参考文献:

- 傅立国. 1991. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北京:科学出版社,524
- Dieffenbach CW, Dveksler GS. 1998. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,118
- 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
- Casasoh M, Mattioni C, Cherubina, et al. 2001. genetic linkage ap of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers[J]. *Theor Appl Genet*, **102**:1 190
- Guo ZG(郭志刚), Sun RQ(孙瑞强), Zhao L(赵琳), et al. 2004. Analysis of contents of berberine in *Coptis chinensis* of Lichuan (利川黄连小檗碱含量)[J]. *Acta Aca Med Sin*(中国医学科学院学报), **26**(6):618—621
- Jiang J(姜静), Yang CP(杨传平), Liu GF(刘桂丰), et al. 2003.

- Optimization for the reaction system of birch ISSR-RCR(桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化)[J]. *Chin J. Ecol*(生态学杂志), **22**(3):91—93
- 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
- Qiu YX(邱英雄), Fu CX(傅承新), Wu FJ(吴斐捷). 2003. A-nalys of population genetic structure and molecular identification of *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum* with ISSR marker(明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的 ISSR 分析)[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), **28**(7):598
- Wang LQ(王立群), Ye XC(叶晓川), Deng F(邓芬), et al. 2004. Quality assessment for *Coptis chinensis* planted with ecological techniques(生态技术栽培黄连的质量评价)[J]. *Acta Aca Med Sin*(中国医学科学院学报), **26**(6):608—610
- Zhuang P(庄平), Huang MY(黄明远). 1994. Studies on individual biomass and alkaloid content of wild coptis on Mt. Emei(峨眉山野生黄连个体生物量与生物碱含量研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **25**(8):425—428
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats(SSR)-anohed polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomis*, **20**(2):176—183