

# 玉树地区独一味 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

王 京, 张 晓 明, 乔 枫, 金 兰, 陈 志, 罗 桂 花

(青海师范大学 生命与地理科学学院, 教育部环境与资源重点实验室, 青海 西宁 810008)

**摘 要:**为了建立玉树地区独一味的简单重复序列区间聚合酶链式反应(ISSR-PCR)体系并筛选出引物,采用  $Mg^{2+}$ 、DNA *Taq* 酶、dNTP、模板 DNA 和引物进行 5 因素 4 水平正交实验,对独一味 ISSR-PCR 反应体系进行筛选。结果表明:最佳反应体系(25  $\mu$ L)为:10 $\times$ PCR Buffer, 75 ng 模板 DNA, 0.75  $\mu$ mol/L 引物, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 1.25 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.05 mmol/L dNTP。然后确定了引物的最佳退火温度,并筛选出 811、818、825、826、834、835、836、840 这 8 条丰富多态稳定扩增的引物。该研究建立的玉树地区独一味 ISSR 反应体系具有稳定、清晰以及重复性好等特点,可为该区独一味的繁育系统和遗传多样性的进一步研究提供参考。

**关键词:**独一味;ISSR-PCR;反应体系;正交设计;优化;引物筛选

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0126-05

独一味(*Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo)属唇形科(Labiatae)独一味属(*Lamiophlomis*)多年生草本植物,是青藏高原特有的一种重要药用植物,常生于海拔 3 900~5 100 m 的石质高山草甸、河滩地或强度风化的碎石滩上。独一味作为常用中草药,能治跌打损伤、筋骨疼痛、气滞闪腰、浮肿后流黄水、关节积黄水、骨松质发炎、心脏疾病,而且还有止血作用<sup>[1]</sup>,所以很受医学临床试验的青睐。由于特定的生境条件,独一味资源目前都来自于野生,加上临床试验和制药方面的需求致使人为过度开采,导致独一味濒临灭绝危机<sup>[2]</sup>。玉树地震后,该地区的生态环境和植被种群结构发生变化,迫切需要对独一味物种进行遗传多样性的研究。该试验以玉树独一味基因组为模板,建立条带清晰、重复性好的独一味 ISSR-PCR 反应体系,为进一步研究玉树独一味繁育系统和遗传多样性分析奠定了技术基础。

简单重复序列区间扩增(Inter-Simple Sequence Repeats, ISSR)DNA 标记,即 ISSR 标记,是 1994 年加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等创建的一种基于 PCR 的新型分子标记技术。ISSR 标记结合了 RAPD 和 SSR 的优点,且 ISSR 标记产物多态性远比 SSR、RAPD 丰富,可提供更多关于基因组的信息。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<sup>[3]</sup>。同其它标记一样,ISSR 标记的最终结果易受多种因素的干扰,需要对其反应体系进行优化试验。

ISSR-PCR 反应体系的优化试验方法一般多采用正交或单因素设计,单因素设计可以较系统和精细地研究各主要因子的影响,却无法探讨因素间相互效应,但正交设计可以更快、更有效地分析不同因素的互相作用。为确保 ISSR 分析的特异性和可重复性,现对 5 个重要因素,即模板 DNA 用量、*Taq* DNA 聚合酶用量、dNTP 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度进行正交设计,以期建立独一味 ISSR-PCR 最佳反应体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试独一味采自青海省玉树自治州,采集后置于冰盒中,后放置于-20℃冰箱保存备用。

试剂材料 PCR buffer、 $MgCl_2$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、Ladder Marker 等均购于 Fermentas 公司,ISSR 引物由北京三博远志生物技术公司合成。试验仪器:离心机(Eppendorf 公司 centrifuge 5804R)、PCR 扩增仪(BIO-RAD 公司 S1000™ Thermal Cycler)、电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-12C 型)、紫外透射反射仪(上海精科实业有限公司 WFH-201B)、紫外分光光度计(GE 公司 GeneQuant100)、Molecular Imager(BIO-RAD 公司 Gel Doc™ XR)等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与检测 将样本从-20℃冰箱取出,液氮研磨后用 CTAB 法<sup>[4]</sup>进行 DNA 提取,溶于

**第一作者简介:**王京(1987-),男,安徽安庆人,在读硕士,现主要从事植物遗传多样性等研究工作。

**责任作者:**罗桂花(1956-),女,四川通江人,本科,教授,硕士生导师,现主要从事药用植物资源遗传多样性及开发利用等研究工作。E-mail:luoguihua@qhnu.edu.cn。

**基金项目:**青海省科技厅资助项目(2010-Z-743)。

**收稿日期:**2012-12-17

1×TE 缓冲液后-20℃贮存。用 1.0% 琼脂糖凝胶对 DNA 质量进行检测,用紫外分光光度计测量 DNA 浓度,记录结果。

**1.2.2 ISSR-PCR 反应体系正交设计** 为了确定 PCR 反应的最佳水平组合,采用正交设计  $L_{16}(4^5)$  进行试验<sup>[5]</sup>,对影响 PCR 反应的 5 个因素: *Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、dNTP、引物进行 4 水平筛选,PCR 反应的因素水平见表 1。扩增程序为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 40 s,58℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s,循环 40 次,循环结束后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu$ g/mL EB)中电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE 溶液,电泳结束后,用紫外成像系统记录结果。

表 1 ISSR-PCR 体系的因素和水平

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

水平 Levels	因素 Factors				
	模板 DNA /ng	引物 Primer / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	$Mg^{2+}$ /mmol·L <sup>-1</sup>	dNTP /mmol·L <sup>-1</sup>	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U
1	25	0.25	1.25	0.025	0.5
2	50	0.50	1.50	0.050	1.0
3	75	0.75	2.00	0.075	1.5
4	100	1.00	2.50	0.100	2.0

**1.2.3 引物筛选** 根据正交实验筛选出的最佳反应体系筛选 ISSR 引物。

**1.2.4 ISSR-PCR 反应程序优化** 根据正交实验筛选出的最佳反应体系,对独一味 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。

**1.2.5 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,确定其试验体系的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取

改良 CTAB 法提取独一味基因组 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<sup>[6]</sup>。通过  $A_{260}$  值计算 DNA 的质量浓度,并将其稀释至 50.00 ng/ $\mu$ L。

### 2.2 正交实验结果

正交实验 PCR 产物电泳结果见图 1。依据特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则<sup>[7]</sup>。条带越多、亮度越强、背景越清晰则评分越高,最好的定为 16 分,最差的定为 1 分<sup>[8]</sup>。以这 2 个结果为参照标准,再与其它各组比较,并依次打分。1~16 组分值依次为:2、9、14、12、15、7、6、5、13、1、8、10、16、11、3、4。由表 2 中所反映出来的最佳组合为 DNA *Taq* 酶  $k_1$  (0.5 U)、 $Mg^{2+}$   $k_1$  (1.25 mmol/L)、DNA 模板  $k_3$  (75 ng)、dNTP  $k_2$  (0.050 mmol/L)、引物  $k_3$  (0.75  $\mu$ mol/L)。由表 2 的极差  $R$  值大小可知,对独一味 PCR 反应的影响的各因素由大到小依

次为:Primer 引物、模板 DNA、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶。

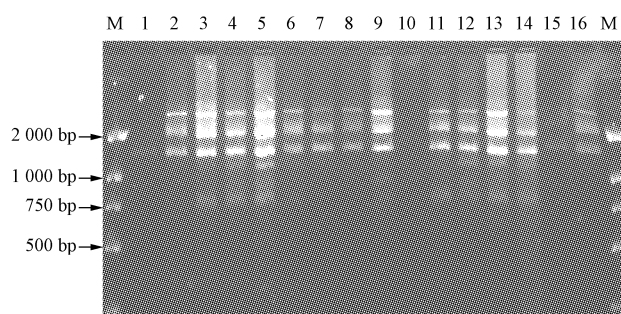


图 1 ISSR-PCR 正交设计电泳图

Fig. 1 Electrophoresis result of ISSR-PCR orthogonal design

表 2 ISSR-PCR 反应体系正交实验结果

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

处理组合	<i>Taq</i> 聚合酶 /U	$Mg^{2+}$ 浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	模板 DNA /ng	dNTP /mmol·L <sup>-1</sup>	Primer 引物 / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>
1	0.5	1.25	25	0.025	0.25
2	0.5	1.50	50	0.050	0.50
3	0.5	2.00	75	0.075	0.75
4	0.5	2.50	100	0.100	1.00
5	1.0	1.25	50	0.075	1.00
6	1.0	1.50	25	0.100	0.75
7	1.0	2.00	100	0.025	0.50
8	1.0	2.50	75	0.050	0.25
9	1.5	1.25	75	0.100	0.50
10	1.5	1.50	100	0.075	0.25
11	1.5	2.00	25	0.050	1.00
12	1.5	2.50	50	0.025	0.75
13	2.0	1.25	100	0.050	0.75
14	2.0	1.50	75	0.025	1.00
15	2.0	2.00	50	0.100	0.25
16	2.0	2.50	25	0.075	0.50
$K_1$	37	46	21	29	11
$K_2$	33	28	37	38	31
$K_3$	32	31	43	34	47
$K_4$	34	31	35	35	46
$k_1$	9.25	11.5	5.25	7.25	2.75
$k_2$	8.25	7.00	9.25	9.50	7.75
$k_3$	8.00	7.75	10.75	8.50	11.75
$k_4$	8.50	7.75	8.75	8.75	11.50
$R$	1.25	4.50	5.50	2.25	9.00

注: $K$  为各因素同一水平最后评分总和; $k$  为各因素同一水平最后评分总和的平均值; $R$  为极差,即  $k$  值中最大值与最小值之差。

### 2.3 ISSR-PCR 反应体系的优化

**2.3.1 循环次数的确定** 利用正交实验设计所得出的最佳反应体系进行 4 个梯度的循环次数试验,依次进行 35、38、40、45 次,每个梯度设 2 个重复。由图 2 可知,循环次数在 35~38 次之间时条带模糊、黯淡,而循环次数在 40~45 次之间时,条带清晰、明亮。所以,循环次数以 40 次最佳。

**2.3.2 退火温度的确定** 该试验以引物 811 为例,在 52~64℃ 间设置 6 个梯度(图 3 中 1~6 分别代表 52.0、54.4、56.7、59.6、62.0、64.0℃),从中选出最佳退火温度。根据正交实验筛选出的最佳反应体系以及循环次数,通过退火温度试验对独一味 ISSR-PCR 反应程序进行再优化。从图 3 可以看出,引物 811 在 52.0~62.0℃ 间的条



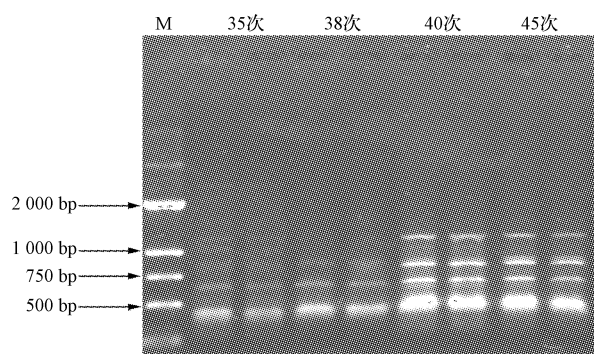


图2 循环次数对 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 2 Electrophoresis results of ISSR-PCR amplified with different cycle times

带相对较为清晰,当退火温度超过 62℃时,扩增出来的条带开始模糊,当退火温度为 52.0~54.4℃时,虽然条带较 62.0℃以上的条带清晰,但是背景相对较深,只有退火温度为 56.7~59.6℃时,扩增的条带界限分明,亮度适合,背景清晰。所以选择 56.0℃为引物 811 的最适退火温度。

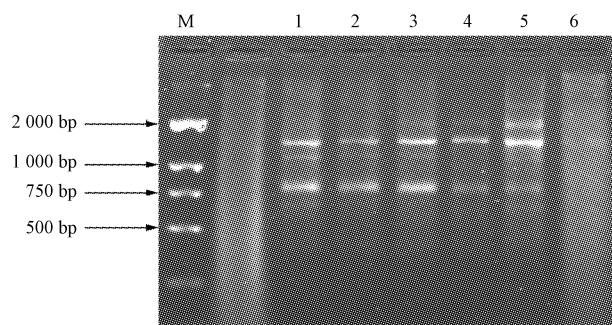


图3 引物 811 退火温度梯度

Fig. 3 The gradient of annealing

#### 2.4 引物筛选结果

在 40 种引物中,初步筛选了 12 种有条带的引物,然后对这 12 种引物进一步筛选(图 4 中 1~12 引物分别

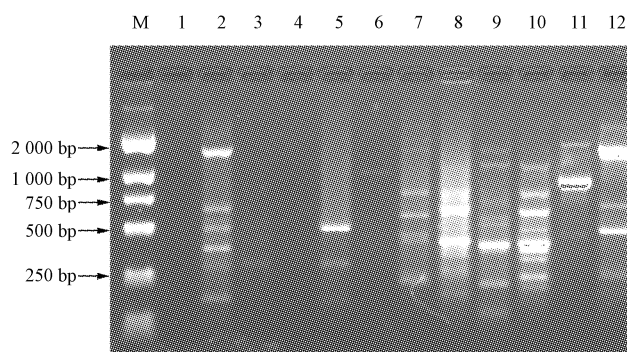


图4 引物筛选结果

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

为 810、811、812、815、818、823、825、826、834、835、836、840),并筛选出 8 条多态性好且清晰的引物(表 3)。

表3 筛选出独一味引物的退火温度及扩增产物条带结果

Table 3 Annealing temperature and bands of screened primers screened in *Lamiophlomis rotata*

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	$T_m$ 值 Values of $T_m$ /℃	退火温度 Annealing temperature/℃
811	(GA) <sub>8</sub> C	54.59	56.00
818	(CA) <sub>8</sub> G	54.59	54.40
825	(AC) <sub>8</sub> T	52.18	54.40
826	(AC) <sub>8</sub> C	54.59	52.00
834	(AG) <sub>8</sub> YT	—	59.60
835	(AG) <sub>8</sub> YC	—	59.60
836	(AG) <sub>8</sub> YA	—	56.70
840	(GA) <sub>8</sub> YT	—	54.40

注:北京三博远志 DNA 合成报告单提供的  $T_m$  值。

#### 2.5 样品扩增可重复性检验

利用上述试验结果,用筛选出的 8 种引物中的 835、836、840 引物对样品进行群体扩增,引物结果见图 5、6、7。该结果表明扩增的产物多态性丰富,主带清晰表明,该试验建立并优化的反应体系和扩增程序是稳定可重复的。

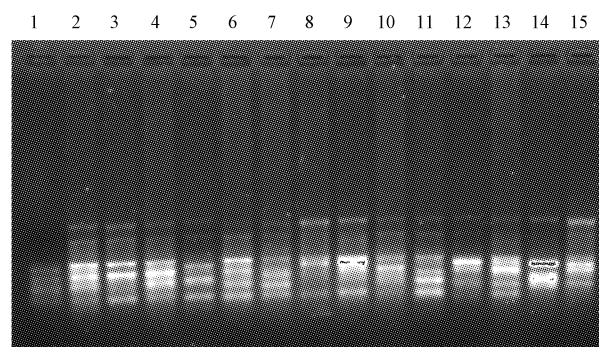


图5 引物 835 对 1~15 样品扩增结果

Fig. 5 Electrophoresis results of 1~15 samples amplified by Primer 835

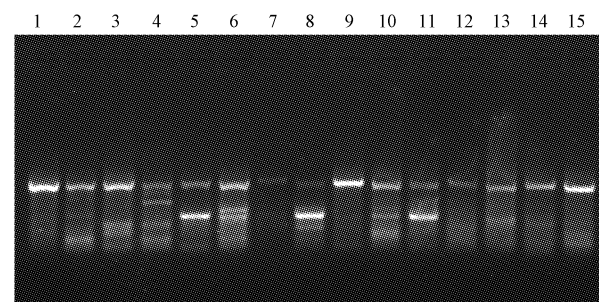


图6 引物 836 对 1~15 样品扩增结果

Fig. 6 Electrophoresis results of 1~15 samples amplified by Primer 836

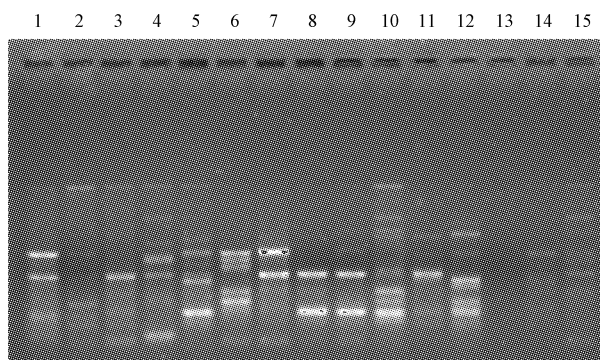


图7 引物840对1~15样品扩增结果

Fig. 7 Electrophoresis results of 1~15 samples amplified by Primer 840

### 3 讨论与结论

该试验利用正交设计对不同因素水平进行初步筛选,经过极差和数理分析后,确立了初步的反应体系组合。但是与吴生等<sup>[6]</sup>研究结果有些地方不一致。在该试验中引物对反应体系影响最显著,很可能是该试验中对引物浓度设置的梯度差值较大所致。而  $Mg^{2+}$  对该反应体系也有显著影响,这与吴生等<sup>[6]</sup>结果一致。关于DNA模板对反应体系的影响显著,原因有二,一是由于独一味是伏地生长,采集时常会带有一些泥土,而在提取DNA时也会带入部分泥土,所以在独一味基因组DNA中会含有少量泥土微生物DNA,这些会影响试验结果;二是独一味中含有大量色素与多糖,这些会影响 *Taq* DNA酶的扩增,最终影响试验结果。经过与得分较高的条带比较, *Taq* 酶、模板以及引物因素水平比较接近极差数理分析的结果,但  $Mg^{2+}$  和 dNTP 的浓度却差异较大。通过仔细分析发现,  $Mg^{2+}$  和 dNTP 的用量浓度存在一定的正相关,  $Mg^{2+}$  浓度单一,较大浓度的 dNTP 有增强条带亮度的作用,而 dNTP 浓度单一,过高的  $Mg^{2+}$  浓度能抑制反应。

扩增过程中,退火温度明显影响条带特异性,因此该研究对筛选出的8条引物进行退火梯度试验,最终确立最佳退火温度。同时,该试验还对循环次数进行了优化,最终结果确立为40次循环效果较好。最终确立独一味 ISSR-PCR 较适宜的扩增条件为:  $10 \times$  PCR Buffer Tango, 75 ng 模板 DNA, 0.75  $\mu$ mol/L 引物, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 1.25 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.050 mmol/L dNTP。该试验对玉树地区独一味种质资源、繁育系统以及遗传多样性研究奠定了技术基础,也为进一步保护该地区独一味种群生存提供了参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 刘继梅. 青藏高原特有植物独一味的遗传多样性及其溶质化学成分分析[D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [3] 周延清. 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, 2005: 17-18.
- [4] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Focus, 1987(12): 13-15.
- [5] 广东省推广优选法领导小组. 优选法与正交法在农业上的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 13-12.
- [6] 吴生, 熊宇婷, 谢砚, 等. 正交设计优化翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中草药, 2011, 42(5): 976-979.
- [7] 廖丽, 郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1131-1135.
- [8] 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.
- [9] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 7-14.
- [10] 胡延萍, 谢小龙, 王莉, 等. 唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件优化[J]. 广西植物, 2010, 30(1): 112-116.
- [11] 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): 1627-1634.
- [12] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

## Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for Yushu *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo

WANG Jing, ZHANG Xiao-ming, QIAO Feng, JIN Lan, CHEN Zhi, LUO Gui-hua

(Key Laboratory of Education Ministry on Environment and Resources of Qinghai and Tibet Plateau, School of Life and Geographical Sciences, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

**Abstract:** To establish the optimized Inter-Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) reaction system of Yushu *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo and screen primers, the orthogonal design test was used to optimize the ISSR-PCR amplification system on *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo by five factors such as  $Mg^{2+}$ , DNA *Taq* polymerase, dNTP, DNA template and primer at four levels. The results showed that the optimal reaction system (25  $\mu$ L) was as following:  $10 \times$  PCR Buffer Tango, 75 ng template DNA, 0.75  $\mu$ mol/L primer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase, 1.25 mmol/L  $MgCl_2$  and 0.05 mmol/L dNTP. Then, the optimal annealing temperature of primers was investigated and



# 五味子组培苗生根培养基配方筛选试验

包 岩

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

**摘 要:**以五味子组培苗为试材,研究比较了不同配比基本培养基、不同浓度 IAA 和活性炭对五味子组培苗生根的影响。结果表明:五味子理想的生根培养基配方为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+活性炭 0.3 g/L,该配方有利于五味子生根,平均生根率达 99.8%,且根系生长良好。

**关键词:**生根培养基;五味子;配方筛选

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)09-0130-02

五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.) 属木兰科五味子属多年生落叶藤本植物,也称北五味子,是我国东北地区及长白山区珍贵的道地药材,传统医学中将其果实入药,性酸味温,具有益气、滋肾、敛肺、涩精、生津止渴、益智安神之功效,主要用于治疗神经衰弱、头脑健忘、心悸不眠、急慢性肝炎等症<sup>[1]</sup>。目前五味子作为医药、保健品、酿酒的重要原料,国内国际的市场需求逐年增加,具有广阔的开发前景。但由于五味子在野生状态下,主要靠营养体进行繁殖,由母株的地下横走茎不断萌生出新植株,繁殖率不高,致使不能满足市场苗木需求。因此在生产上开始采用组培工厂化育苗方式,以便快速得到五味子苗木。在组培生产中,生根阶段非常关键,尤其是生根培养基配方的选取直接影响到组培苗的质量及移栽成活率<sup>[2]</sup>。现对五味子组培苗生根培养基配方的筛选进行研究,以期五味子组培苗快繁提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

五味子组培瓶苗由吉林农业科技学院花卉组培室提供,从中挑选增殖良好、叶色浓绿、生长健壮、无污染的瓶苗以供生根所用。

**作者简介:**包岩(1979-),女,蒙古族,吉林镇赉人,硕士,讲师,现主要从事农作物教学与科研工作。

**收稿日期:**2013-01-18

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基本培养基的筛选** 选取 MS、1/2MS、1/4MS 3 个配比基本培养基,在超净台下将五味子组培瓶苗切割茎段转入 3 个配比的配方中,每个配比接种 15 瓶,每瓶 3 个茎段,重复 3 次,然后放入培养室进行培养,开始观察统计。

**1.2.2 激素浓度的筛选** 以 1.2.1 选取出的最佳培养基为基本培养基,添加 6 种不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)的 IAA。在超净台下将五味子组培瓶苗切段转入 6 个配比的配方中,每个配比接种 15 瓶,每瓶 3 个茎段,重复 3 次,然后置于培养室进行培养,开始观察统计。

**1.2.3 活性炭浓度的筛选** 通过 1.2.1、1.2.2 筛选的最佳基本培养基和最 IAA 浓度,再往其中添加不同浓度(0、0.1、0.3、0.5 g/L)的活性炭,即在超净台下将五味子组培瓶苗切段转入 4 个配比的配方中,每个配比接种 15 瓶,每瓶 3 个茎段,重复 3 次,然后置于培养室进行培养,观察统计。

**1.2.4 培养条件** 培养室温度控制在 25℃,光照时间 10~12 h/d,光照强度 2 000 lx,相对湿度 80%<sup>[3]</sup>。

### 1.3 项目测定

以上各处理均于处理 25 d 后,统计组培苗的生根时间、平均生根率、平均生根数和平均根长度。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同配比基本培养基对五味子组培苗生根的影响

由表 1 可以看出,降低 MS 的无机盐浓度后,无论

8 effective primers (811,818,825,826,834,835,836,840) were selected out. In this study, the ISSR-PCR reaction system for *Yushu Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo could provide reliable reaction, clear bands and abundant polymorphisms that facilitate the further research of mating system and genetic diversity.

**Key words:** *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo; ISSR - PCR; reaction system; orthogonal design; optimization; primers screening