高慧新,严炯艺,王明杰,等. 白花蛇舌草 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):72 - 74.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2018.23.017

白花蛇舌草 ISSR 反应体系的建立与优化

高慧新, 严炯艺, 王明杰, 田 慧
(广西中医药大学,广西南宁 530200)

摘要:通过单因素考察结合正交试验的方法,基于反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶量、DNA 模板用量、dNTPs 浓度、引物浓度、Mg^{2+} 浓度等 5 因素 4 水平条件对 ISSR 反应体系进行优化。白花蛇舌草 ISSR - PCR 的 20 μL 最佳反应体系为引物浓度 0.562 5 μmol/L,Mg^{2+} 浓度 2.75 mmol/L,dNTPs 浓度 0.375 mmol/L,DNA 模板量 60 ng,*Taq* DNA 聚合酶 1.25 U,2.0 μL 10 × *Taq* Buffer,其余用 ddH_2O 补齐。该试验建立并优化了白花蛇舌草 ISSR - PCR 反应体系,为白花蛇舌草种质资源遗传多态性的研究提供参考依据。

关键词:白花蛇舌草;ISSR;单因素试验;正交设计;遗传多态性
中图分类号:S567.21+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2018)23 - 0072 - 03

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)为茜草科耳草属植物,常于夏秋采集,洗净,鲜用或晒干[1]。白花蛇舌草产于我国广东、香港、广西、海南、安徽、云南等省(区),多见于水田、田埂和湿润的旷地,始载于《广西中药志》[2]。中医认为其味苦、甘,具有清热解毒、利尿消肿的功效,壮医认为其味苦、甜,可用于通龙路、解热毒、除湿毒、散结消肿[1]。白花蛇舌草的主要成分为有萜类、黄酮类、蒽醌类、甾醇类等,有抗癌、抗氧化和抗炎等作用,临床上常用于治疗多种癌症[3],且效果良好,是一味常用的中药材。

随着分子标记快速发展,越来越多的学者利用分子标记对物种遗传分化进行研究。常见的分子标记有随机引物扩增 DNA 多态性(random amplified polymorphism DNA,RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragrment length polymorhism,AFLP)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)、简单重复序列标记(simple sequence repeat,SSR)、简单重复序列间标记技术(inter - simple sequence repeat,ISSR)等几类。ISSR 是由加拿大学者 Zietkiewicz 等于 1994 年在 PCR 的基础上创建的分子标记技术[4],其以微卫星重复序列为引物,通常为 16 ~ 18 个碱基序列,由 1 ~ 4 个碱基组成的串联重复序列和几个非重复的锚定碱基组成,提高了 PCR 扩增反应的专一性。同时 ISSR 分子标记具有多态性高、重复高、稳定性好、操作方便及成本低等优点,被视为理想的遗传标记方法[5]。

ISSR - PCR 反应易受多种因素的影响,本试验利用单因素结合正交设计的方法,旨在建立适合于白花蛇舌草 ISSR - PCR 反应的最佳体系,为白花蛇舌草种质资源遗传多态性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 白花蛇舌草新鲜叶片采自广西中医药大学仙葫校区,并由广西中医药大学中药鉴定教研室主任田慧教授鉴定为茜草科耳草属植物白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)。

1.1.2 试剂与仪器 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker(D2000)、5 × TBE 均购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖(西班牙);GelRed 核酸染料(美国);其他所用试剂均为国产分析纯。ISSR - PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

Eppendorf 移液枪(德国艾本德生命科学公司),电子分析天平(BSA224S,北京赛多利斯科学仪器有限公司),超纯水机(MILIPORE ZMQS 5001,法国 MILIPORE 公司),旋涡混合器(XW - 80A,上海青浦滬西仪器厂),高速冷冻离心机(SIGMA Sartorius,德国赛默飞世尔公司),紫外分光光度计[UV1780 岛津企业管理(中国)有限公司],梯度 PCR 仪(T100,美国 Bio - Rad 公司),电泳仪(美国 Bio - Rad 公司),凝胶成像系统(Gel Doc™ XR +,美国 Bio - Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 白花蛇舌草植物总 DNA 的提取 根据新型植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤对试验材料进行植物总 DNA 的提取,并采用琼脂糖电泳及紫外分光光度法检测总 DNA 的纯度及浓度,将其稀释至 40 ng/μL 备用。

1.2.2 单因素条件考察 查阅相关文献[5 - 7],设定该试验 ISSR - PCR 基本反应体系组成为总体积 20 μL,*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U,DNA 模板量 40 ng,dNTPs 浓度 0.225 mmol/L,引物浓度 0.5 μmol/L,Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L,10 × *Taq* buffer

收稿日期:2017 - 08 - 21
基金项目:广西中医药民族医药传承创新专项(编号:GZBZ16 - 05);广西中医药大学中药学优势学科建设课题(编号:ZYX2015001);壮瑶药协同创新中心项目(编号:桂教科研[2013]20 号);广西壮瑶药重点实验室项目(编号:桂科基字[2014]32 号);广西重点学科(壮药学)项目(编号:桂教科研[2013]16 号);广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目。
作者简介:高慧新(1993—),女,河北阜城人,硕士研究生,主要从事中药品种鉴定与质量评价研究。E - mail:2456658048@qq.com。
通信作者:田 慧,硕士,教授,硕士生导师,主要从事中药品种鉴定与质量评价研究。E - mail:377244732@qq.com。

2.0 μL,其余用 ddH_2O 补齐。扩增程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,退火 30 s(退火温度由引物 T_m 值决定),72 ℃延伸 2 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存。以初步筛选出的引物 UBC826(ACACACACACACA CACC)作为单因素试验及正交试验的引物。对影响白花蛇舌草 ISSR－PCR 反应体系的 5 个因素:*Taq* DNA 聚合酶用量、DNA 模板量、dNTPs 浓度、引物浓度、Mg^{2+} 浓度分别设置 6 个水平浓度梯度,采取控制单一因素变量的方法,初步确定该因素对 ISSR－PCR 的影响。各因素水平如表 1 所示。将 PCR 所得产物置于 1% 琼脂糖凝胶中,75 V 电压电泳 50 min。使用凝胶成像系统观察并采集图像。

表 1　白花蛇舌草 ISSR－PCR 单因素试验设计

水平	引物浓度(μmmol/L)	Mg^{2+} 浓度(mmol/L)	dNTPs 浓度(mmol/L)	DNA 模板量(ng)	*Taq* DNA 聚合酶量(U)
1	0.125	1.0	0.075	20	0.5
2	0.250	1.5	0.150	40	1.0
3	0.375	2.0	0.225	60	1.5
4	0.500	2.5	0.300	80	2.0
5	0.625	3.0	0.375	100	2.5
6	0.750	3.5	0.450	120	3.0

1.2.3　正交试验设计　根据单因素试验的结果,确定各因素的正交试验水平,见表 2。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,根据单因素试验结果分别确定 5 个相关因素的 4 个水平,共 16 个处理组,见表 3。其基础反应体系和反应程序与单因素试验所用体系和程序均一致。

表 2　白花蛇舌草 ISSR－PCR 正交试验水平

水平	引物浓度(μmmol/L)	Mg^{2+} 浓度(mmol/L)	dNTPs 浓度(mmol/L)	DNA 模板量(ng)	*Taq* DNA 聚合酶量(U)
1	0.437 5	2.50	0.150	20	1.25
2	0.500 0	2.75	0.225	40	1.50
3	0.562 5	3.00	0.300	60	1.75
4	0.625 0	3.25	0.375	80	2.00

1.2.4　退火温度的优化　利用 PCR,以 UBC826 引物的 T_m 值(52 ± 5) ℃为范围,由 PCR 仪自动生成 8 个温度梯度:57.0、56.2、55.0、53.2、50.9、48.9、47.7、47.0 ℃。

2　结果与分析

2.1　DNA 提取结果

通过琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度法检测,本试验所提取白花蛇舌草 DNA 条带清晰、明亮、无拖尾;DNA 样品的 $D_{260\ nm}/D_{280\ nm}$ = 1.83,介于 1.80 ~ 2.0 之间,说明 DNA 样品的纯度较高,能满足后续试验的需要。

表 3　白花蛇舌草 ISSR－PCR 正交试验设计

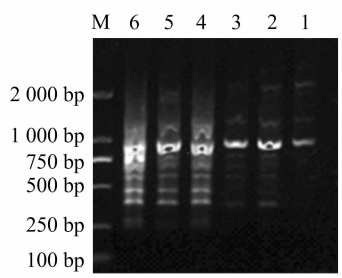
水平	引物浓度(μmmol/L)	Mg^{2+} 浓度(mmol/L)	dNTPs 浓度(mmol/L)	DNA 模板量(ng)	*Taq* DNA 聚合酶(U)
1	0.437 5	2.50	0.150	20	1.25
2	0.437 5	2.75	0.225	40	1.50
3	0.437 5	3.00	0.300	60	1.75
4	0.437 5	3.25	0.375	80	2.00
5	0.500 0	2.50	0.225	60	2.00
6	0.500 0	2.75	0.150	80	1.75
7	0.500 0	3.00	0.375	20	1.50
8	0.500 0	3.25	0.300	40	1.25
9	0.562 5	2.50	0.300	80	1.50
10	0.562 5	2.75	0.375	60	1.25
11	0.562 5	3.00	0.150	40	2.00
12	0.562 5	3.25	0.225	20	1.75
13	0.625 0	2.50	0.375	40	1.75
14	0.625 0	2.75	0.300	20	2.00
15	0.625 0	3.00	0.225	80	1.25
16	0.625 0	3.25	0.150	60	1.50

2.2　单因素试验结果

由图 1 可知,引物浓度在 0.500 ~ 0.625 μmmol/L 时,扩增出的条带数多且较为清晰明亮;浓度降低时,条带暗淡,条数减少;浓度增大时,条带异常明亮,粘连在一起,特异性降低。由图 2 可知,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 ~ 2.0 mmol/L 时,扩增的条带少,且不清晰,当浓度为 2.5 mmol/L 时,条带逐渐增多,当浓度为 3.5 mmol/L 时,扩增条带亮度降低。由于 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的辅助因子,其浓度影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,又兼在保证特异性条带和清晰度的情况下,确定 ISSR 体系中 Mg^{2+} 浓度 2.50 ~ 3.25 mmol/L。由图 3 可知,dNTPs 浓度在 0.150 ~ 0.375 mmol/L 时,条带清晰明亮,特异性强,浓度增大时,条带数减少,亮度降低。由图 4 可知,DNA 量在 20、40、60、80、100 ng 时,条带均清晰明亮,特异性强,但考虑到试验成本,故确定正交试验中 DNA 量的范围是 20 ~ 80 ng。由图 5 可知,*Taq* DNA 聚合酶量在 1.5 ~ 2.0 U 时,条带相对清晰明亮,无拖尾,特异性强。

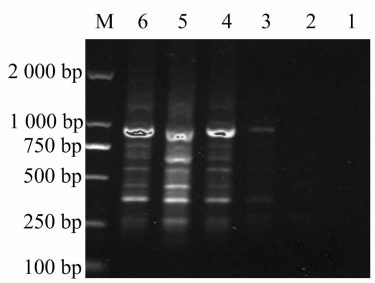
2.3　正交试验结果

由图 6 可知,依照遗传多样性分析要求,对正交试验 PCR 结果依次打分,结果中条带稳定、清晰、丰富的最佳产物记为



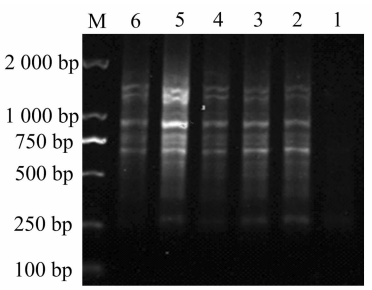
M为 DNA maker(D2000);1~6 对应的引物浓度分别为 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625、0.750 mmol/L

图1　引物浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响



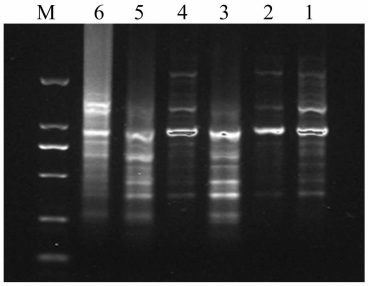
M 为 DNA marker(D2000);1 ~ 6对应的 Mg^{2+} 浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L

图2　Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响



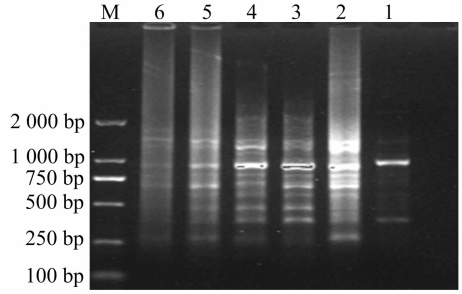
M 为 DNA marker(D2000);1 ~ 6 对应的 dNTP 浓度分别为 0.075、0.150、0.225、0.300、0.375、0.450mmol/L

图3　dNTP 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响



M 为 DNA marker(D2000)；1～6对应的 DNA 模板量分别为20、40、60、80、100、120 ng

图4　DNA 模板量对 ISSR-PCR 反应体系的影响



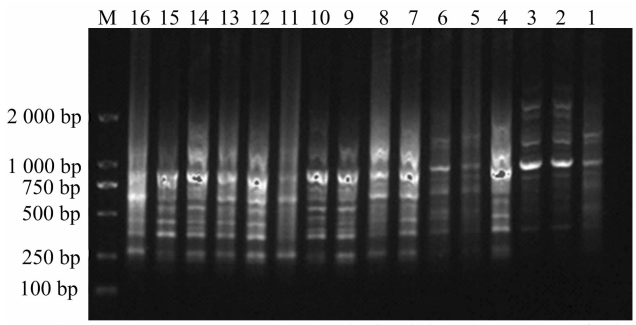
M 为 DNA marker(D2000)；1～6 对应的 *Taq* DNA 酶量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U

图5　*Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 反应体系的影响

16 分，最差的记为 1 分。编号 1～16 打分结果依次为 2、12、12、10、3、9、10、9、14、16、7、13、11、12、7、1。根据打分结果算出每个因素同水平下的均值和极差，见表 4。

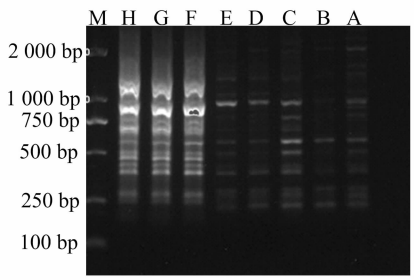
2.4　退火温度的优化结果

由图7可知，当退火温度为56.2～57.0 ℃时，扩增条带少，部分条带缺失；退火温度为 50.9～53.2 ℃时，扩增条带少且模糊，亮度较低；退火温度在 47.0～48.9 ℃时，由于温度过低导致扩增条带背景弥漫，难以分辨，当退火温度为 55.0 ℃时，条带数目多且清晰明亮，因此确定 55.0 ℃为 UBC826 号引物的最佳退火温度。



M 为 DNA marker(D2000)；1～16分别对应各正交试验组(顺序同表3)

图6　正交试验结果



M为DNA marker(D2000)；A～H分别对应8个退火温度：57.0、56.2、55.0、53.2、50.9、48.9、47.7、47.0 ℃

图7　退火温度的优化结果

表 4　各因素水平下的均值和极差

因素	均值 1	均值 2	均值 3	均值 4	极差
引物浓度	9.00	7.75	12.50	7.75	4.75
Mg^{2+} 浓度	9.00	7.75	12.50	7.75	4.75
dNTPs 浓度	4.75	8.75	11.75	11.75	7.00
DNA 模板量	9.25	9.75	8.00	10.00	2.00
Taq DNA 聚合酶量	8.50	9.25	11.25	8.00	3.25

3　讨论与结论

影响白花蛇舌草扩增反应效果的主要因素包括引物浓度、dNTPs 浓度、DNA 模板量、Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶量等。在本试验中，dNTPs 浓度对扩增反应的影响最大，dNTPs 浓度过高可加快反应速度，同时也增加碱基的错误掺入率和试验成本；反之，低浓度的 dNTPs 会导致反应速度的下降，但可提高试验的精确性。由于 dNTPs 可能与 Mg^{2+} 结合，因此应注意 dNTPs 浓度和 Mg^{2+} 浓度之间的关系。如果 dNTPs 的浓度达到 1 mmol/L，则会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性。引物浓度偏高会引起错配和非特异性产物增加、引物之间易形成二聚体，浓度太低又可能得不到扩增结果或产量过低。最佳的 Mg^{2+} 浓度对于不同的引物和模板都不相同，较高的浓度可以增加产量，但也会增加非特异性扩增，降低忠实度。*Taq* DNA 聚合酶量过高，会引起非特异性产物的扩增；浓度过低则合成产物量减少，得不到预期的 PCR 产物产量。

本试验运用单因素结合正交设计的方法，首先确定各因素用量或浓度的有效范围，再利用正交设计进行优化组合，确立了白花蛇舌草的最佳 20 μL ISSR－PCR 反应体系：引物浓度 0.562 5 μmol/L，Mg^{2+} 浓度 2.75 mmol/L，dNTPs 浓度 0.375 mmol/L，DNA 模板 60 ng，*Taq* DNA 聚合酶 1.25 U，2.0 μL 10×*Taq* Buffer，其余用 ddH_2O 补齐，为以后开展白花蛇舌草 ISSR 多态性的相关研究奠定了基础。

参考文献：

[1]广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准：第一卷(2008 年版)[M]. 南宁：广西科技出版社，2008：82－84.

[2]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第 71 卷第 1 册[M]. 北京：科学出版社，1979：75.

[3]纪宝玉，范崇庆，裴莉昕，等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20(19)：235－240.

[4]Zietkiewicz E，Rafalski A，Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)－anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics，1994，20(2)：176－183.

[5]王明明，宋振巧，王建华. ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用[J]. 中草药，2007，38(1)：134－137.

[6]邵　飞，尹海波，赵　容，等. 穿龙薯蓣 ISSR－PCR 反应体系的优化及引物筛选[J]. 时珍国医国药，2016，27(11)：2813－2816.

[7]任凤鸣，胡开治，刘燕琴，等. 传统中药金钱草 ISSR－PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国中药杂志，2014，39(12)：2233－2238.