

陈淑吟, 陆勤勤, 张美如, 等. 紫菜丝状体种质特性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 17-20.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.005

# 紫菜丝状体种质特性的 ISSR 分析

陈淑吟, 陆勤勤, 张美如, 许广平, 陈国耀

(江苏省海洋水产研究所, 江苏南通 226007)

**摘要:**利用 ISSR 标记扩增分析多个紫菜丝状体种质材料, 筛选获得条带稳定表达且清晰的 30 个引物, 其中 10 个引物的扩增条带有种质特异性。利用这些 ISSR 引物分析不同种质的 DNA 指纹图谱, 可为紫菜种质评价与分子标记鉴定提供依据。

**关键词:**紫菜; 丝状体; ISSR; 种质鉴定; DNA 指纹图谱

**中图分类号:** S917.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0017-03

紫菜属 (*Pyropia*) 为大型海产红藻类, 全世界约 134 种, 在我国分布约 22 种, 其中条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 与坛紫菜 (*P. haitanensis*) 为主要栽培种类, 在海藻产业中占有重要经济地位。紫菜不同种类、不同品系种质的鉴定与分析是优良遗传资源利用的基础。紫菜属物种形态特征简单, 易受环境影响, 依靠传统形态性状难以准确鉴别, 且随着育种材料遗传基础研究的不断深入及选育品种数目的日益增多, 品种间差异越来越小。采用基于 DNA 水平的标记技术, 有助于准确、直接获得不同种质间的遗传差异, 将大量种质资源区分开来。由高多态性分子标记构建的指纹图谱如 SSR、SRAP 等标记方法<sup>[1-5]</sup>具有明显的个体特异性和环境稳定性, 已广泛应用于大型海洋藻类的不同种质评价、鉴定或纯度分析中。ISSR 标记的原理与 SSR 相似<sup>[6]</sup>, 其扩增位点具有丰富的等位变异性, 是一种操作简便、成本较低的 DNA 标记方法, 在植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、进化与遗传多样性等方面有大量研究<sup>[7]</sup>, 在紫菜遗传特性、亲缘关系相关研究中也有不少报道<sup>[8-10]</sup>。本研究利用 ISSR 技术, 对国家级紫菜种质库保有的一些优良种质资源进行遗传特性分析, 构建这些种质的特征性 DNA 图谱, 为紫菜种质的评价与分子标记鉴定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品材料与基因组总 DNA 提取

丝状体样品 (表 1), 由江苏省海洋水产研究所国家紫菜种质库提供。取样品丝状体组织, 用 TaKaRa 试剂盒 (编号: DV811A) 提取基因组总 DNA, 于 4 ℃ 保存, 备用。DNA 浓度用加标准分子量电泳检测 (图 1)。

### 1.2 PCR 扩增与图谱分析

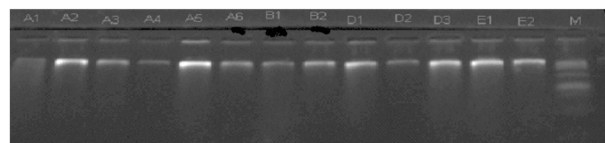
ISSR 引物为 British Columbia 大学公布的第 9 套引物, 由上海生工合成; MgCl<sub>2</sub>、dNTP 及 Taq DNA 聚合酶等试剂为上

表 1 紫菜丝状体样品编号及特性

序号	样品编号	丝状体代码	序号	样品编号	丝状体代码
1	A1	H-9220	17	E2	4018 (D4-2)
2	A2	H-9302	18	B1-1	94-U008
3	A3	K-9502	19	B2-1	Y-gr-SC
4	A4	K-2004	20	D1-2	RB-2151
5	A5	O-9403	21	D1-3	RB-2403
6	A6	9101 (Lyg)	22	D2-2	Qdg1
7	B1	94-U	23	D2-3	Qdg2
8	B2	Y-gr	24	D3-2	2221
9	C1	9302 (Qd)	25	D3-3	3016
10	C2	9503 (Qd)	26	F1	Y-008
11	C3	2060 (Qd)	27	F2	L0601
12	C4	qwc (Qd)	28	F3	Y-h2001
13	D1	Y-9006	29	J1	Y-gr-1
14	D2	Y-qdg	30	J2	Y-gr-2
15	D3	3012-Xg	31	J3	Y-gr-3
16	E1	4053 (D4)	32	J4	Y-gr-4

注: 代码中以 H 开头的为坛紫菜, 以 K 开头的为半叶紫菜 (*P. katadaivar hemiphylla*), 以 O 开头的为少精紫菜 (*P. oligospermatangia*), 其他样品为条斑紫菜。

A1 A2 A3 A4 A5 A6 B1 B2 D1 D2 D3 E1 E2 M



M 为 marker, 其余代号同表 1

图 1 13 个条斑紫菜 DNA 模板电泳图

海生工产品; 250 bp DNA marker 为 TaKaRa 产品 (编号: D515A)。PCR 反应在 Biometra PCR 仪上进行, 先选取 3 个 DNA 模板分组进行 100 条引物的 PCR 扩增筛选; 对模板、Mg<sup>2+</sup>、dNTP 浓度、引物及退火温度等多个因子进行优化选择; 选用优化后的参数进行扩增反应, 反应体系为 25 μL, 内含 Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、引物 0.5 mmol/L、约 20 ng 的 DNA 模板和 1.5 U Taq 酶。PCR 扩增反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 45 s, 52 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min, 36 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。所有引物采用同一 PCR 反应参数, 扩

收稿日期: 2014-07-29

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (编号: 201105023); 江苏省南通市农业创新 (编号: HL2013013)。

作者简介: 陈淑吟 (1966—), 女, 广东汕尾人, 博士, 研究员, 从事海洋生物种质资源研究。E-mail: shuyinchen89@163.com。

增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶中含定量的溴化乙锭(EB)。由紫外分析仪观察结果并拍照。在图谱中,以引物每一个相同迁移位置的 DNA 扩增带作为同一个位点,记为 1,无带则为 0,将 DNA 带的有无转化成(0,1)数据矩阵;利用 NTSYS - pc version2. 10e 软件<sup>[11]</sup> 计算样品间的遗传相似性系数(GS),用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选与紫菜丝状体的特异性扩增

在设定的 PCR 反应条件及反应参数中,有 30 个引物在紫菜 4 个种类中稳定扩增出 DNA 片段,有些引物的扩增产物可直接区分出不同种(表 2)。少精紫菜(A5)相对于其他 3 个种类紫菜有明显差异,较容易被区分出来,这些引物包括 808、810、816、818、826、827、847、861、886、887;少精紫菜在引物为 816 的电泳图谱中,在 1 250 ~ 2 250 bp 之间有 3 个特异条带,在引物 829 的电泳图谱中,坛紫菜(A1、A2)在 1 000 bp 处有 1 个特异条带(图 2);条斑紫菜在 500 bp 及 1 200 bp 附近均有 1 个特异条带(图 3)。

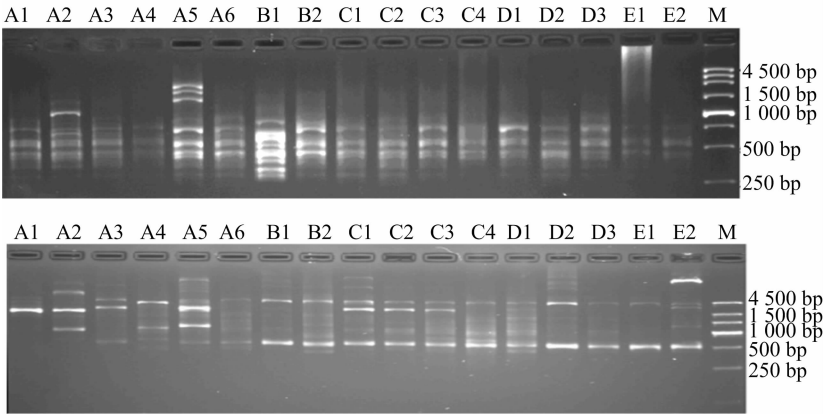
2.2 条斑紫菜不同品系遗传差异

由图 3 可见,条斑紫菜 B1 - 2 有 1 个亮带不同于其他品系;品系 C1 为采自青岛、最早保存的纯系,比另外 3 个较晚系的保持系(C2、C3、C4)多 1 或 2 个条带;品系 C4 为最晚选育的保持系,比 C1、C2、C3 在约 1 000 bp 处少 1 个条带;F 组为具优良性状的条斑紫菜栽培品系,样品 F1 比 F2、F3 多 1 个特征带;J 组为绿色株系不同培育组织的丝状体,样品 J1、J3 比样品 J2、J4 多 1 或 2 个条带;D 组间的样本没有明显差异。引物 829 可作为条斑紫菜不同品系特异性条带的分子标记。

表 2 30 个引物对 4 种紫菜叶状体 DNA 的扩增情况

编号	引物	序列	总条带数 (个)	多态性条带 (个)	特异带
1	807	(AG) <sub>8</sub> T	13	13	
2	808	(AG) <sub>8</sub> C	14	13	
3	809	(AG) <sub>8</sub> G	8	8	
4	810	(GA) <sub>8</sub> T	15	15	+, A5
5	811	(GA) <sub>8</sub> C	7	7	
6	816	(CA) <sub>8</sub> T	11	6	+, A5
7	818	(CA) <sub>8</sub> G	8	8	+
8	826	(AC) <sub>8</sub> C	8	8	
9	827	(AC) <sub>8</sub> G	9	9	+, A1
10	829	(TG) <sub>8</sub> C	11	11	+, A5
11	840	(GA) <sub>8</sub> YT	16	15	
12	841	(GA) <sub>8</sub> YC	17	15	
13	842	(GA) <sub>8</sub> YG	18	18	
14	847	(CA) <sub>8</sub> RC	13	13	+
15	848	(CA) <sub>8</sub> RG	15	12	
16	855	(AC) <sub>8</sub> YT	22	22	
17	856	(AC) <sub>8</sub> YA	13	12	
18	857	(AC) <sub>8</sub> YG	13	13	
19	861	(ACC) <sub>6</sub>	13	13	+
20	862	(ACG) <sub>6</sub>	12	10	
21	864	(ATG) <sub>6</sub>	16	12	
22	873	(GACA) <sub>4</sub>	19	15	
23	880	(GGAGA) <sub>3</sub>	14	6	
24	885	BHB(GA) <sub>7</sub>	11	9	
25	886	VDV(CT) <sub>7</sub>	14	11	+
26	887	DVD(TC) <sub>7</sub>	13	11	+
27	888	BDB(CA) <sub>7</sub>	18	15	+, D
28	889	DBD(AC) <sub>7</sub>	20	15	
29	890	HVH(TG) <sub>7</sub>	24	20	
30	891	VHV(GT) <sub>7</sub>	19	16	

注:R = (A, G); Y = (C, T); H = (A, T, C); V = (A, C, G)。“+”为对多个样品具特异带的引物。



M为marker, 其余代号同表1

图2 引物816(上)和829(下)对紫菜属17个样品的扩增结果

由图 3、图 4 可见,引物 888 在条斑紫菜的多个种质也得到特异性表达条带,其中:D 组品系间的谱带与引物 829 的有所不同,C 组、J 组品系间条带表达与 829 的相一致;D1 组样品来自日本,其扩增结果不同于南通产区的 D2、D3 及 D4,后三者条带表达基本一样,均在 500 ~ 1 000 bp 之间相同位置有 3 条亮带;J1 与 J3 条带一样,J2 与 J4 结果相近,这与用引物 829 扩增的结果基本一致;F 组中的 3 个优选栽培品系谱带均各有特异性表达。

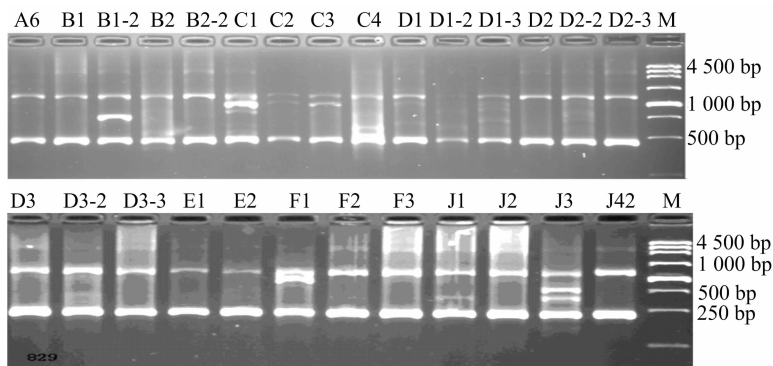
2.3 遗传相似性与聚类分析

由图 5 可见,在 4 种紫菜中,南方的坛紫菜与华北的半叶

紫菜遗传相似性为 0.735 4,少精紫菜与条斑紫菜为 0.705 8,条斑紫菜与坛紫菜、少精紫菜与半叶紫菜的遗传距离相对较远,这与崔灵英等的结论<sup>[8]</sup> 相似;条斑紫菜种内各种质虽聚于一起,但样品间的相似度相差较大,来自南通同一海域的优选育种材料 16 号与 17 号样品具有最大遗传相似性,系数为 0.960 8,其次是 10 号与 17 号、6 号与 9 号,相似系数分别为 0.921 6、0.901 9。

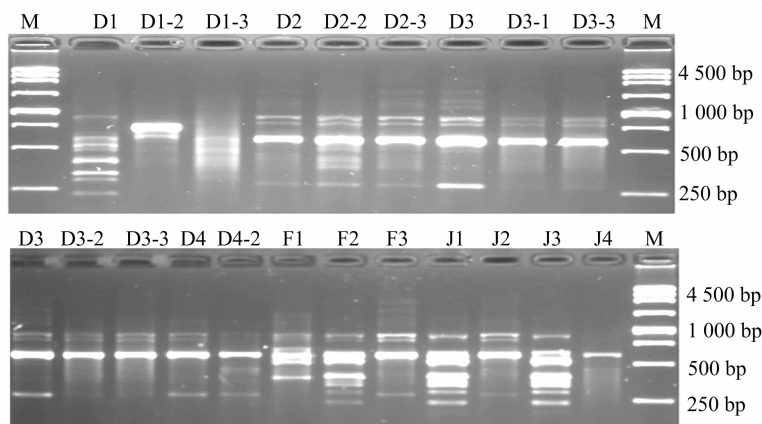
3 结论与讨论

在同一反应条件下,30 个有稳定扩增条带的引物中有 10



M为marker, 其余代号同表1

图3 引物 829 对条斑紫菜不同品系的扩增结果



M为marker, 其余代号同表1

图4 引物 888 对条斑紫菜不同样品的扩增结果

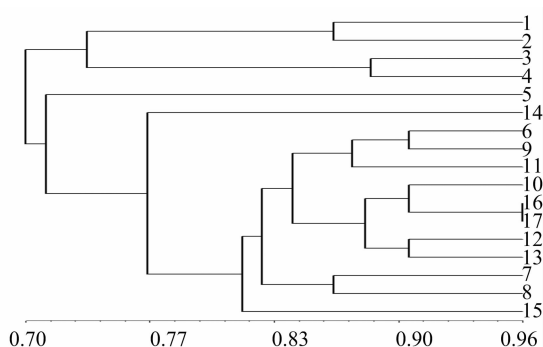


图5 4个种类紫菜 17个样品(序号见表1)的聚类关系

个引物获得特异性表达,以 829、888 等不同引物对同一种质、同一引物对不同种质扩增可以产生不同的特异性条带,并得到多个种质的扩增图谱。在这些图谱中,不同种类或品系有独一的指纹模式,用引物 816、829 可区分出少精紫菜、坛紫菜;针对 27 个条斑紫菜,引物 829、888 可用于条斑紫菜种内多个品系鉴定。样品 F3 为显示条斑紫菜形态性状的杂交品系,ISSR 扩增图谱也多与条斑紫菜一致,这表明该标记既可构建特异性图谱,也可反映种质属性。有研究报道,部分引物如 812、830、834、850、859、866、878、881、895 等可以得到扩增产物<sup>[7]</sup>,但由于试验条件或试验参数等原因,本试验未能获得相应的 PCR 产物,因此,充分优化试验参数、规范试验操作,才有助于构建可供比较的指纹图谱模式。

ISSR 标记由于引物中带有锚定碱基,既有高多态性又有较高稳定性,通过单个或多个引物组合使用,即能得到可靠的

结论。在一些其他大型海藻种质资源研究中,ISSR 方法已是常用的研究方法之一<sup>[12-14]</sup>,笔者所在实验室也用该方法评价了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、西施舌(*Coelomactra antiquata*)及大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等<sup>[15-17]</sup>海产经济动物的遗传资源状况,并结合应用 DNA 序列等标记技术,检测了 ISSR 方法的可靠性。笔者在探索简便易行的种质鉴定方法时,利用 ISSR 已得到多个条斑紫菜品系的独一指纹图谱<sup>[18]</sup>,这些 DNA 指纹标记,在资源的交换与引种等过程中可作为其品种身份信息的一个内容。

国家级紫菜种质库收集有大量野生紫菜种质资源,并选育获得多个优良种质材料,如何更有效地探究这些资源的遗传多样性,有选择地把优良的遗传变异性状引入到栽培品种中,DNA 指纹图谱的构建无疑将为这些种质的鉴定与利用提供帮助。目前,国际植物品种权保护联盟(UPOV)已将 DNA 指纹图谱鉴定纳入农作物品种 DUS 测试内容<sup>[19-20]</sup>。当然,在采用 ISSR 标记构建 DNA 指纹图谱时,应力求简化、规范试验操作程序及遗传分析方法,保证试验数据的稳定性和可重复性,使构建的指纹图谱更具有可操作性。

#### 参考文献:

- [1] 吴文婷,张磊,宋志民,等. 5 个紫菜属物种丝状体的微卫星初步遗传分析[J]. 南方水产科学,2012,8(4):29-36.
- [2] Kong F N, Mao Y X, Yang H, et al. Genetic analysis of *Porphyra yezoensis* using microsatellite markers[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2009,27(4):496-502.

傅江燕,徐 晟,夏 冰,等. 山桃醇腈酶基因 *PdHNL1* 的克隆、序列分析与原核表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):20-24.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.006

# 山桃醇腈酶基因 *PdHNL1* 的克隆、序列分析与原核表达

傅江燕,徐 晟,夏 冰,汪 仁

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

**摘要:**以山桃叶片为材料提取 RNA,反转录后得到 cDNA,通过 PCR 扩增得到 1 个山桃醇腈酶基因全长编码序列,并命名为 *PdHNL1*。*PdHNL1* 的开放阅读框为 1 737 bp,预测编码蛋白包含 539 个氨基酸。氨基酸序列比对结果表明,*PdHNL1* 编码的蛋白具有葡萄糖甲醇胆碱氧化还原酶的序列特征,与黑樱桃醇腈酶 PsHNL4 蛋白相似度为 92%,与桃假定的 HNL 蛋白相似度为 77%。通过将 *PdHNL1* 基因连接到原核表达载体 pET28(a) 上,并转化大肠杆菌 BL21(DE3)后,成功构建了原核表达重组菌株。SDS-PAGE 电泳结果显示,重组蛋白受 IPTG 诱导表达,分子量大小约为 62.4 ku,与已报道的其他蔷薇科植物的醇腈酶蛋白大小基本一致。

**关键词:**山桃;醇腈酶;基因克隆;原核表达

**中图分类号:**S662.101;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0020-05

利用酶作为催化剂用于合成单一对映体或直接分离特定手性异构体,被广泛应用于不对称合成领域。醇腈酶作为一种不对称催化手性反应的酶,自 20 世纪初在扁桃中发现以来,受到愈来愈多的关注<sup>[1]</sup>。它可逆地催化 HCN 和醛/酮类

化合物反应生成手性氰醇<sup>[2]</sup>,进而转化成为羟基化合物等多种手性中间体,并用于合成多种手性药物,从而克服了为得到纯手性化合物而采用光学拆分所带来的生产工序复杂、成本高等一系列问题<sup>[3-4]</sup>。此外,在植物体内,醇腈酶可催化氨基糖苷类化合物,反应生成碳基化合物和 HCN,而后者在植物防御草食类动物摄食或其他致病菌感染中起到作用,即植物的生氰作用<sup>[5-6]</sup>。

HNL 在自然界中是广泛存在的。据统计,有 3 000 ~ 12 000 种植物内含有 HNL。HNL 主要分为两大类:R 构型和 S 构型。目前,已分离纯化并进行酶活分析的 R 型 HNL 多来自于蔷薇科植物<sup>[7]</sup>,如扁桃、黑樱桃、梅、枇杷、西番莲等<sup>[8-13]</sup>;而 S 型 HNL 多来自于木薯、橡胶树、海檀木与高

收稿日期:2015-01-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301798);江苏省中国科学院植物研究所青年基金(编号:201201)。

作者简介:傅江燕(1990—),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事植物功能基因克隆及功能验证方面研究。Tel:(025)84347034;E-mail:happydeduck@126.com。

通信作者:汪 仁,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学方面研究。Tel:(025)84347111;E-mail:jswangren@aliyun.com。

- [3] Xie C T, Chen C S, Xu Y, et al. Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on sequence-related amplified polymorphism and simple sequence repeat markers[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 780-787.
- [4] 贾 威, 黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜 6 个品系的 SRAP 分析[J]. 水产学报, 2013, 37(10): 495-1501.
- [5] 孙 雪, 骆其君, 杨 锐, 等. 紫菜(*Porphyra*)遗传差异的 ISSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(2): 141-145.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [7] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
- [8] 崔灵英, 许 璞, 朱建一, 等. 四种紫菜叶状体的 ISSR 分子标记分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 371-377.
- [9] 袁昭岚, 黄鹤忠, 沈颂东, 等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(7): 9-14.
- [10] 陈昌生, 谢潮添, 纪德华, 等. 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 717-723.
- [11] Rohlf F J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1[M]. New York: Exeter Publications, 2000.

- [12] 李文红, 姚建亭, 王继成, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 241-247.
- [13] 刘晨临, 王秀良, 刘胜浩, 等. 2008 年黄海浒苔绿潮 ISSR 标记溯源分析[J]. 海洋科学进展, 2011, 29(2): 235-240.
- [14] 张 婷, 时 旭, 何建华, 等. 麒麟菜属和卡帕藻属海藻的 ISSR 初步分析[J]. 海洋学报, 2011, 33(3): 173-178.
- [15] 陈淑沁, 吉红九, 丁亚平, 等. 吕四渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR 遗传多样性分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 406-410.
- [16] 孙中响, 吉红九, 陈 葵, 等. 西施舌不同群体遗传多样性 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2010(8): 59-63.
- [17] 陈淑沁, 徐士霞, 张志勇, 等. 大黄鱼野生群体与养殖群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(12): 82-87.
- [18] 陈淑沁, 陆勤勤, 张美如, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) 10 个选育系的 ISSR 分析[J]. 天津农业科学, 2012, 18(5): 19-23.
- [19] 谢潮添, 陈昌生, 纪德华, 等. 坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 734-740.
- [20] 张肖娟, 孙振元. 植物新品种保护与 DUS 测试的发展现状[J]. 林业科学研究, 2011, 24(2): 247-252.