

高慧新,封毅,王孝勋,等. 褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):43-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.011

褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

高慧新,封毅,王孝勋,吴燕春,戴忠华,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+} 浓度等因素对简单重复序列间扩增 (ISSR) 反应体系进行优化。结果表明,褐苞薯蓣 ISSR-PCR 的 20 μ L 最佳反应体系为 *Taq* DNA 聚合酶 1.875 U, DNA 模板量 52.5 ng, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 引物浓度 0.437 5 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L, 10 \times *Taq* Buffer 2.0 μ L, 其余用 ddH₂O 补齐。

关键词:褐苞薯蓣;简单重复序列间扩增 (ISSR);单因素试验;正交设计

中图分类号: S632.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0043-03

褐苞薯蓣来源于薯蓣科薯蓣属植物褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill), 别称广山药、广西淮山, 根茎入药, 主产于广西桂平、玉林、灵山、陆川、平南等地, 野生于海拔 100~1 950 m 的山坡、路旁、山谷杂木或灌丛中, 我国南方各地也均有栽培。中医用其“补脾养胃, 生津益肺, 补肾涩精”; 壮医用其“调谷道气道水道, 补肺肾”^[1]。褐苞薯蓣在广西、福建、海南等地被作为山药地区习用品, 药用与食用由来已久^[2]。有研究发现, 褐苞薯蓣乙醇提取物各萃取层 (石油醚层、乙酸乙酯层和正丁醇层) 均表现出较好的抗炎和免疫调节活性^[3]。褐苞薯蓣产量大, 适应能力强, 占领了药材和食品市场上很重要的部分, 是一种重要的药用植物资源, 有研究的必要性。

ISSR 即简单重复序列间扩增 (inter simple sequence

repeat), 是近年应用较多的一种新型 DNA 分子标记技术, 它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 标记以其较低的成本、良好的稳定性及重复性、能较好地反映物种的遗传结构和遗传多样性变化等特点, 被视为理想的遗传标记方法^[4]。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, 旨在建立适合于褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应的最佳体系, 为褐苞薯蓣种质资源遗传多态性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 试验材料为褐苞薯蓣新鲜叶片, 采自广西中医药大学仙葫校区, 并由广西中医药大学药用植物教研室梁子宁副教授鉴定为薯蓣科薯蓣属植物褐苞薯蓣 (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill)。

1.1.2 试剂与仪器

1.1.2.1 试剂 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker (D2000)、5 \times 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。

1.1.2.2 仪器 Eppendorf 移液枪 (德国), 电子分析天平

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 广西中医药大学 2015 年度中药学优势学科建设课题 (编号: ZYX2015001); 2017 年杨世林教授团队骨干学员科研项目 (编号: CS17012); 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 (编号: J13162)。

作者简介: 高慧新 (1993—), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为中药品种鉴定与质量评价。E-mail: 2456658048@qq.com。

通信作者: 田慧, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药品种鉴定与质量评价。E-mail: 377244732@qq.com。

[3] Manifesto M M, Schlatter A R, Hopp H E, et al. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat gemplasm using molecular markers[J]. Crop Science, 2001, 41: 682-690.

[4] 李芳第, 王舰, 王芳, 等. 马铃薯种质资源遗传多样性分析的 AFLP 反应体系优化与引物筛选[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 179-185.

[5] 唐晓晶. DNA 分子标记在中药材鉴定中的应用研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2006.

[6] 陈巍, 郭秀珠, 黄品湖, 等. 浙南柚类地方资源遗传多样性分析和鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 643-646.

[7] Baon C D, Bailey C D. Taxonomy and conservation: a case study

from *Chamaedorea alternans*[J]. Annals of Botany, 2006, 98(4): 755-763.

[8] Deng Z Y, Zhang X Q, Wang X P, et al. Identification and molecular mapping of a stripe rust resistance gene from a common wheat line Qz180[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(2): 236-241.

[9] 王敖. 蒙古黄芪和膜荚黄芪居群遗传多样性研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.

[10] 钱丹, 黄璐琦, 崔光红, 等. 不同产地蒙古黄芪遗传关系的 SRAP 分析[J]. 中国中药杂志 2009, 34(4): 382-385.

[11] 雷永, 廖伯寿, 王圣玉. 花生 AFLP-银染体系的建立与优化[J]. 花生学报, 2003, 3(2): 301-305.

(赛多利斯 BSA224S),超纯水机(法国 MILIPORE),涡旋混合器(上海滬西 XW - 80A),高速冷冻离心机(德国 Sigma Sartorius),紫外分光光度计(日本岛津 UV1780),梯度 PCR 仪(Bio - red T100),电泳仪(Bio - red),凝胶成像系统(Bio - red, gel Doc EZ)

1.2 试验方法

1.2.1 褐苞薯蒺植物总 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 30 ng/ μ L 备用。

1.2.2 单因素条件考察 参照文献[5 - 7],设定本次试验 ISSR - PCR 基本反应体系组成为:总体积 20 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, DNA 模板量 90 ng, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 引物浓度 0.5 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L, 10 \times *Taq* buffer 2.0 μ L, 其余用 ddH₂O 补齐。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 34 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。以初步筛选出的引物 807(AGAGAGAGAGAGAGT)作为单因素及正交试验的引物。对影响 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 个浓度梯度,采取改变单一因素的方法,来确定该因素对 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,以电压 75 V 电泳 50 min。使用凝胶成像系统观察并采集图像。

表 1 单因素试验设计

水平	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(U)	DNA 模板量 (ng)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)
1	0.5	45	0.062 5	0.125	0.625
2	1.0	60	0.125 0	0.250	1.250
3	1.5	75	0.187 5	0.375	1.875
4	2.0	90	0.250 0	0.500	2.500
5	2.5	105	0.312 5	0.625	3.125
6	3.0	120	0.375 0	0.750	3.750

1.2.3 正交试验设计 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(表 2)。其基础反应体系和反应程序与单因素试验一致。

1.2.4 退火温度的优化 利用 PCR,以引物 807 的 T_m 值

表 2 正交试验设计

编号	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(U)	DNA 模板量 (ng)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)
1	1.750	30.0	0.125 0	0.375 0	1.500 0
2	1.750	37.5	0.187 5	0.437 5	1.687 5
3	1.750	45.0	0.250 0	0.500 0	1.875 0
4	1.750	52.5	0.312 5	0.562 5	2.062 5
5	1.875	30.0	0.187 5	0.500 0	2.062 5
6	1.875	37.5	0.125 0	0.562 5	1.875 0
7	1.875	45.0	0.312 5	0.375 0	1.687 5
8	1.875	52.5	0.250 0	0.437 5	1.500 0
9	2.000	30.0	0.250 0	0.562 5	1.687 5
10	2.000	37.5	0.312 5	0.500 0	1.500 0
11	2.000	45.0	0.125 0	0.437 5	2.062 5
12	2.000	52.5	0.187 5	0.375 0	1.875 0
13	2.250	30.0	0.312 5	0.437 5	1.875 0
14	2.250	37.5	0.250 0	0.375 0	2.062 5
15	2.250	45.0	0.187 5	0.562 5	1.500 0
16	2.250	52.5	0.125 0	0.500 0	1.687 5

(50 \pm 5) $^{\circ}$ C 为范围,自动生成 8 个温度梯度以优化退火温度。

2 结果与分析

2.1 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR - PCR 反应体系的影响

由图 1 可知, *Taq* DNA 聚合酶用量在 0.5、1.5 U 时,均无条带;在 1.0、2.5、3.0 U 时,虽有条带,但并不清晰,且拖尾严重;在 2.0 U 时,条带清晰明亮,故体系中 *Taq* DNA 聚合酶用量应在 2.0 U 左右。

2.2 DNA 模板量对 ISSR - PCR 反应体系的影响

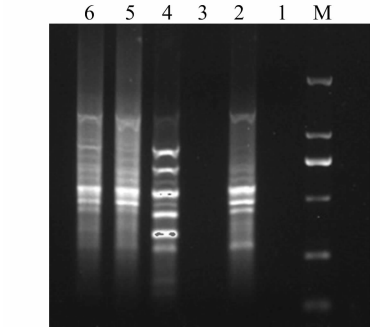
由图 2 可知, DNA 模板量在 45、105、120 ng 时均能显示清晰明亮的条带,在 60 ~ 90 ng 时,条带太亮不清晰,综合考虑到试验成本,故体系中的最佳 DNA 模板量应在 45 ng 左右,且不超过 60 ng。

2.3 dNTPs 浓度对 ISSR - PCR 反应体系的影响

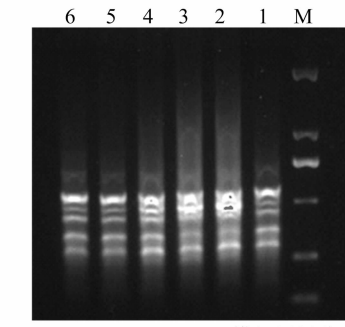
由图 3 可知, dNTPs 的浓度为 0.062 5、0.375 0 mmol/L 时,扩增出的条带少、不清晰;浓度在 0.125 0 ~ 0.312 5 mmol/L 时,扩增出的条带多且清晰稳定;故体系中 dNTPs 的浓度范围为 0.125 0 ~ 0.312 5 mmol/L。

2.4 引物浓度对 ISSR - PCR 反应体系的影响

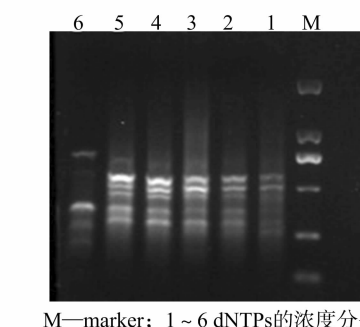
由图 4 可知,随着引物浓度的增加,扩增条带也逐渐增



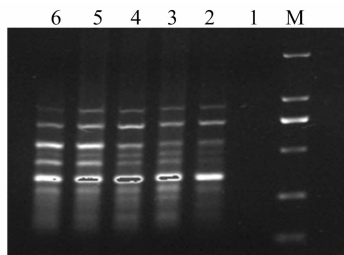
M—marker; 1 ~ 6 *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U
图1 不同用量 *Taq* DNA 聚合酶的 ISSR - PCR 反应结果电泳



M—marker; 1 ~ 6 DNA 模板用量分别为 45、60、75、90、105、120 ng
图2 不同用量 DNA 模板的 ISSR - PCR 反应结果电泳



M—marker; 1 ~ 6 dNTPs 的浓度分别为 0.062 5、0.125 0、0.187 5、0.250 0、0.312 5、0.375 0 mmol/L
图3 不同浓度 dNTPs 的 ISSR - PCR 反应结果电泳



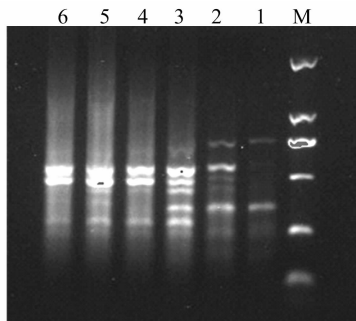
M—marker; 1~6 引物浓度分别为 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625、0.750 $\mu\text{mol/L}$

图4 不同浓度引物的 ISSR-PCR 反应结果电泳

强、清晰,在浓度达到 0.625 $\mu\text{mol/L}$ 时,条带特异性减弱,引物二聚体增多;故设定体系中引物浓度范围为 0.375 0 ~ 0.562 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

由图 5 可知,当 Mg^{2+} 浓度为 0.625、1.250 mmol/L 时,扩增条带少;浓度为 1.875 mmol/L 时,扩增条带增多且明亮清晰;浓度再增大扩增条带模糊;故体系 Mg^{2+} 浓度应在 1.875 mmol/L 左右。

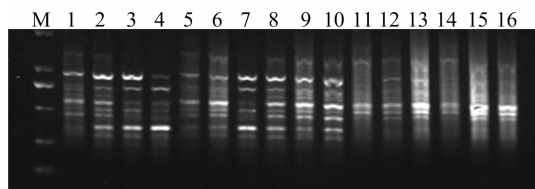


M—marker; 1~6 Mg^{2+} 浓度分别为 0.625、1.250、1.875、2.500、3.125、3.750 mmol/L

图5 不同浓度 Mg^{2+} 的 ISSR-PCR 反应结果电泳

2.6 正交试验

正交试验结果如图 6 所示,依据扩增条带的强弱和杂带的多少,对正交试验 PCR 结果进行直观分析。13 号、15 号和 16 号组合扩增条带太过明亮且背景弥散严重,不易辨识;11 号、12 号和 14 号组合扩增条带暗淡模糊,不易识别;1~10 号组合扩增出的条带数量多且清晰明亮,其中 8 号组合扩增条带多且带形清晰明亮,重复试验发现其扩增效果稳定。故褐苞薯蓣 ISSR-PCR 最佳反应体系为:20 μL 体系,其中 10 \times *Taq* Buffer 2.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1.875 U, DNA 模板量 52.5 ng, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 引物浓度 0.437 5 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L,其余用 ddH₂O 补齐。



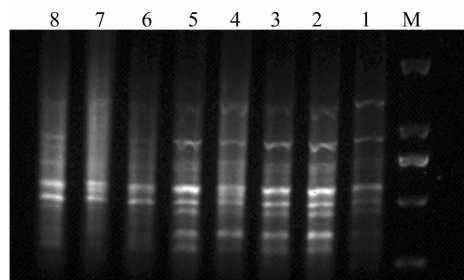
M—marker; 1~16 对应各编号试验

图6 正交试验结果

2.7 退火温度的优化

将退火温度设定在 45~55 $^{\circ}\text{C}$, PCR 仪自动生成 8 个温度梯度:55.0、54.2、52.9、51.2、48.9、46.9、45.7、45.0 $^{\circ}\text{C}$ 。由

图 7 可知,当温度在 52.9、51.2 $^{\circ}\text{C}$ 时,条带数量相对较多且清晰,故本次试验采用 52 $^{\circ}\text{C}$ 作为退火温度是合理的。



M—marker; 1~8 对应退火温度分别为 55.0、54.2、52.9、51.2、48.9、46.9、45.7、45.0 $^{\circ}\text{C}$

图7 不同退火温度 ISSR-PCR 反应结果电泳

3 讨论与结论

本试验主要从影响 PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA、dNTPs、引物、 Mg^{2+} 为考察点,建立并优化褐苞薯蓣的 ISSR-PCR 体系。在 PCR 体系中, *Taq* DNA 聚合酶浓度过高,会引起非特异性产物的扩增;模板 DNA 的纯度和用量都会对 PCR 扩增有影响;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,低浓度的 dNTPs 会导致反应速率下降,但可提高试验准确性;引物是保证 PCR 特异性的关键因素,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。

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,确立适用于褐苞薯蓣的 ISSR-PCR 反应体系。试验结果显示,5 个因素对褐苞薯蓣 ISSR-PCR 反应体系的影响大小为 *Taq* DNA 聚合酶 > Mg^{2+} > 引物 > DNA 模板 > dNTPs。

本试验选出的褐苞薯蓣最佳 20 μL ISSR-PCR 反应体系为:*Taq* DNA 聚合酶 1.875 U, DNA 模板量 52.5 ng, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 引物浓度 0.437 5 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L, 10 \times *Taq* Buffer 2.0 μL ,其余用 ddH₂O 补齐。

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[M]. 南宁:广西科技出版社,2008:43.
- [2] 高慧新,周敏,田慧,等. 广山药的现代研究概况[J]. 解放军药学报,2017,33(1):72-74.
- [3] 周彬. 褐苞薯蓣化学成分、药理活性及与薯蓣对比研究[D]. 天津:天津大学,2015.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 胡建斌,李静,李琼,等. 盾叶薯蓣 ISSR-PCR 扩增条件研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(1):105-109.
- [7] 尹莉,周天华,杨培君,等. 盾叶薯蓣品种的 ISSR 指纹图谱研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(26):24-26.