

泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化

贺佳 , 丁小余 , 褚必海 , 刘冬扬 , 丁鸽

(南京师范大学生命科学学院 , 江苏 南京 210097)

[摘要] 以四川泽泻为实验试材 , 采用改进的 CTAB 法提取了泽泻的高质量总 DNA 模板 , 克服了泽泻中所富含的酚类物质的影响 . 对泽泻 ISSR 反应体系中各个主要影响因子进行了优化和筛选 , 建立了标记位点清晰、稳定、重复性好、可用于泽泻 ISSR-PCR 分析的最适反应体系 , 它们是 25 μ L PCR 反应体系中 , 10 \times Taq 酶配套缓冲液 , 1U Taq DNA 聚合酶 , 1.8 ~ 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 100 μ mol/L dNTP , 0.3 μ mol/L 引物 , DNA 模板约 10 ~ 20 ng , 退火温度在 52 ~ 60 $^{\circ}C$, 为进一步研究泽泻居群的 ISSR 分子标记鉴别奠定了基础 .

[关键词] 泽泻 , ISSR 反应体系 , 建立与优化

[中图分类号] Q946 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0086-05

Establishment and Optimization of the Method of ISSR Fingerprinting Marker on *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep

He Jia , Ding Xiaoyu , Chu Bihai , Liu Dongyang , Ding Ge

(School of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China)

Abstract *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep of Szechwan is used as an experimental material. The improved method of CTAB is adopted to distill total DNA template of high quality and the infection that *Alisma orientalis* contains abundant kinds of hydroxybenzene has been conquered. ISSR-PCR reaction effects are tested and optimized. The optimal ISSR-PCR reaction system in *Alisma orientalis* is established : 25 μ L PCR reaction volume , 10 \times Taq buffer , 1.5 U Taq DNA polymerase , 1.8 ~ 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 100 μ mol/L dNTP , 0.3 μ mol/L primer and 10 ~ 20 ng template DNA. The appropriate annealing temperature is among 52 ~ 60 $^{\circ}C$. This article provides clear , reliable , abundant polymorphisms molecular markers suitable for authenticating the populations of *Alisma orientalis* .

Key words *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep , ISSR reaction system , establishment and optimization

泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep 为泽泻科泽泻属一年生草本植物 , 主产福建、四川、江西等地 . 药材分别称为“ 建泽泻 ”、“ 川泽泻 ”和“ 江泽泻 ” , 以福建、四川产者最为著名 , 其中又以建泽泻质量最佳 , 被载入中国道地药材的南药^[1] .

关于泽泻科植物的分类研究 , 前人已从核型分析、果皮及果实的微形态特征、花粉形态特征等几个不同方向进行了分类研究 , 作为泽泻不同属分类的依据^[2] . 关于泽泻药材的化学成分 , 彭国平等研究发现 : 2,3-乙酰泽泻醇 B 的含量可用作控制泽泻质量的指标成分^[3,4] . 随着分子生态学的迅猛发展 , 道地性药材的鉴别不仅可以根据道地性化学成分特征性指纹图谱 , 而且还可以根据 DNA 分子指纹标记 . 关于泽泻的分子标记方面的研究目前仅有道地药材建泽泻的 RAPD 研究^[5]和泽泻 18S - 26SrRNA 及其 ITS 片断的序列分析^[2,12] 篇报道 . 因此 , 在检测泽泻药材道地性时 , 需寻找更可靠的 DNA 分子指纹标记方法 .

ISSR (inter-simple sequence repeat) 是一种建立在 PCR 反应基础上的 DNA 分子标记 , 由 Zietkiewicz 等人于 1994 年创建 . 近年来 , ISSR 已成功用于植物遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制、分子生态学研究等

收稿日期 : 2005-10-20 .
基金项目 : 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2003101) .
作者简介 : 贺佳 , 女 , 1980— , 硕士研究生 , 主要从事分子生物学的学习与研究 . E-mail : zsusie_hj@msn.com
通讯联系人 : 丁小余 , 1965— , 教授 , 博士生导师 , 主要从事植物生物学的教学与研究 . E-mail : dlingxynj@263.net

领域^[6-14]. 该技术无需预知受试基因组序列,成本低,操作简单且稳定性好,被认为是非常理想的分子标记方法. 在利用 ISSR 方法研究泽泻的遗传差异时,我们发现改变 ISSR 反应的各因子会直接影响到 ISSR 试验结果的稳定性. 为此,必须对泽泻 ISSR 的反应体系进行优化,分析非特异性条带的产生原因,以建立泽泻 ISSR-PCR 反应的可靠体系,为深入开展泽泻居群道地性及其混淆品的差异研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep]材料采自我国泽泻的主要产区福建、四川,取其鲜叶或药用球茎进行硅胶干燥保存.

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP 均购自 Promaga 生物公司, DNA marker(100 – 2000 bp)购自南京天为时代科技有限公司, 76 条 ISSR 引物由上海生工生物公司合成.

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取及检测

改良的 CTAB 法提取 DNA. 将洗净处理过的样品中加液氮、1% PVP 研磨,加入约 650 μ L 的 CTAB 提取液(2% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl)(pH = 8.0), 20 mmol/L EDTA(pH = 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2% 的 β -巯基乙醇充分混合, 65 $^{\circ}$ C 温育 40 ~ 60 min. 加入与 CTAB 等体积的苯酚 – 氯仿 – 异戊醇(25:24:1)颠倒混匀, 6 500 r/min 离心 5 min 后, 取上清, 加入等体积的苯酚 – 氯仿 – 异戊醇重复一次. 再取上清, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA(–20 $^{\circ}$ C 2 h). 10 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 70% 酒精反复清洗 2 次后在超净台吹干, 于双蒸水中溶解(30 ~ 50 μ L). 纯化后采用分光光度计法定量检测其浓度, 并根据基因组 DNA 的浓度值将样品稀释至 20 ng/ μ L 用于 ISSR-PCR 分析.

1.3.2 ISSR-PCR 初始条件及程序

根据我们扩增铁皮石斛 ISSR 的反应体系, 同时参考有关 ISSR 分析的文献^[12-16], 泽泻 ISSR – PCR 初始 25 μ L 反应体系包含: 10 \times Taq 酶配套缓冲液 2.5 mmol/L MgCl₂, 160 μ mol/L dNTP, 0.4 μ mol/L 引物, 1 U Taq DNA 聚合酶, DNA 模板约 20 ng. 相应的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后是 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 补齐.

1.3.3 实验设计

本实验 DNA 模板量有以下 5 个梯度: 10, 20, 30, 40, 50 ng; Mg²⁺ 设立以下 6 个梯度: 1.0, 1.2, 1.5, 1.8, 2.0, 2.5 mmol/L; dNTP 设立以下 5 个处理: 60, 100, 120, 160, 200 μ mol/L; 引物设立以下 6 个处理: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μ mol/L; Taq DNA 聚合酶设立以下 5 个处理: 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 U; 引物的退火温度在理论退火温度的基础上设置, 每次设置 6 个温度梯度; 另外, 每一种组合都设立相应的阴性对照.

1.3.4 ISSR-PCR 产物鉴定

反应产物在含有 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 用 DL2000 的 DNA marker(100 – 2000 bp)作为相对分子质量标记, 以 5 V/cm 的电压电泳 2.5 h, 在紫外凝胶成像系统(UVP GDS – 8000)上观察并记录电泳结果.

2 结果与分析

以四川泽泻居群为模板, 用以上 ISSR-PCR 初始条件及程序进行引物初筛. 结果显示: 在引物库的 76 条引物中, 有 36 条引物具有扩增的多态性条带, 但 ISSR 的初始反应条件暴露出很多问题, 如: 条带不够清晰、拖尾严重、负对照中出现扩增条带等不理想结果.

本文通过设定影响泽泻 ISSR 反应的诸因子浓度, 建立并优化了泽泻 ISSR 的反应体系.

2.1 DNA 模板量和引物浓度的调整

在其它条件不变的情况下, 我们对比研究了 25 μ L 反应体系中模板用量在 10、20、30、40、50 ng 时, 44 号引物 ISSR 的扩增结果, 由图 1 可以看出, 当模板量 20 ~ 50 ng 时均有扩增条带, 且数目相对比较稳定. 此

外,我们还发现,当 DNA 模板不纯时,模板用量在 10 ng 时的扩增效果要好于模板用量在 20 ng 时的扩增效果.

2.2 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度的选择

本试验采取了两步优化法,在确定了 Mg^{2+} 和 dNTP 的有效浓度范围后,就 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度设计了互作组合浓度,希望找出一个合理的,能够扩增出清晰带型的浓度组合.

图 2 表明 Mg^{2+} 有效浓度范围在 1.5 ~ 2.0 mmol/L 之间,图 3 表明 dNTP 有效浓度在 100 ~ 200 μ mol/L 之间.(所用引物为 62 号)

如表 1 所示.当 Mg^{2+} 浓度在 1.5 ~ 2.0 mmol/L 之间,dNTP 浓度在 100 ~ 200 μ mol/L 之间时均有扩增条带,但条带的多少、真伪有明显差异;只有当 dNTP 的浓度为 100 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时可以得到清晰的条带,且没有非特异性扩增, Mg^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L 时效果最佳.(Mg^{2+} 浓度视具体引物而定)

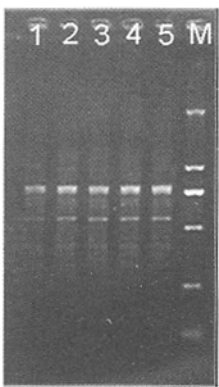


图 1 不同模板用量的 PCR 结果
注:1~5 泳道 PCR 反应的模板用量分别为 10,20,30,40,50 ng.

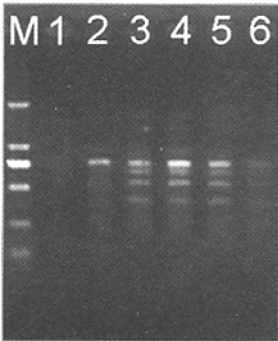


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度的 PCR 结果
1~6 泳道 PCR 反应的 Mg^{2+} 用量分别为 1.0,1.2,1.5,1.8,2.0,2.5 mmol/L.

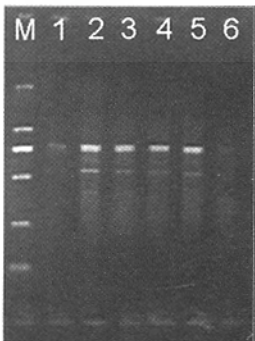


图 3 不同的 dNTP 浓度的 PCR 结果
1~5 泳道 PCR 反应的 dNTP 用量分别为 60,100,120,160,200 μ mol/L.

表 1 Mg^{2+} 、dNTP 互作组合浓度对 ISSR-CR 结果的影响

Mg^{2+} 的浓度	dNTP 的浓度							
	1.2 mmol/L		1.5 mmol/L		1.8 mmol/L		2 mmol/L	
	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照
100 mmol/L	-	-	+	-	++	-	++	-
120 mmol/L	+	-	+	-	++	+/-	++	-
160 mmol/L	+	+	+	-	++	+	++	+/-
200 mmol/L	-	-	+	+	++	++	++	++

注: + 表示有扩增条带, ++ 表示扩增条带多, +/- 表示扩增条带不稳定, - 表示无扩增条带.

2.3 引物浓度的调整

根据以往 PCR 试验所确定的引物浓度范围,我们设计 5 个浓度梯度,结果显示:在其他因素不变而 DNA 模板量为 20 ng 时,只有引物浓度(图 4,所用引物为 62 号)为 0.3 μ mol/L 时,扩增效果最佳;随着引物浓度的提高,扩增条带变得模糊.

2.4 Taq 酶的选择

在确定了 Mg^{2+} 、dNTP、模板量、引物浓度之后,我们设置了 5 个 Taq 酶浓度梯度.结果表明(图 5,所用引物为 44 号):在 25 μ L 反应体系中,加入 1 ~ 1.5 U Taq 酶都可以获得重复清晰的条带,以 1.5 U 时条带最清晰.但当 Taq 酶含量高于或等于 2 U 时,条带变得不清晰,背景开始模糊.

2.5 退火温度的调整

在进行退火温度的优化时,我们首先采用方法($T_m = 4(G + C) + (A + T)$)估算引物 - 模板对的 T_m 值,然后以 T_m 值为基准 2 $^{\circ}$ C 为间隔,上下浮动,从高于 T_m 值 6 $^{\circ}$ C 直到低于 T_m 值 6 $^{\circ}$ C 的一系列反应筛选出最佳退火温度.实验结果表明,大部分引物的最适退火温度与理论退火温度存在差异.例如本文中的 62 号

引物理论退火温度应为 54℃ ,而实验表明其最适退火温度应为 58℃ .

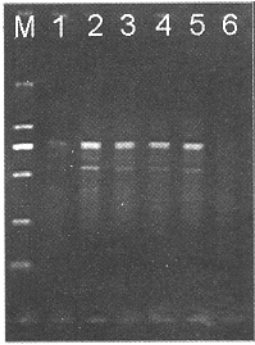


图 4 不同引物浓度的 PCR 结果

1~6 引物用量分别为 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 $\mu\text{mol/L}$

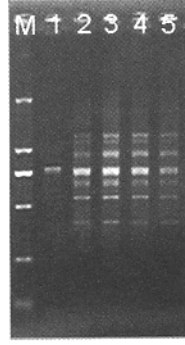


图 5 不同 Taq 酶用量的 PCR 结果

1~5 Taq 酶用量分别为 0.8 U, 1 U, 1.5 U, 2 U, 2.5 U

2.6 循环次数的调整

我们分别试验了 35、40、45 个循环 ,结果表明循环次数在 40 左右时条带强弱合适 ,清晰可辨.

最后我们随机选择了 2、4、26、29、45、46、60、64 号引物对此优化系统进行了检测 ,得到了背景清晰 ,多态性丰富稳定的 DNA 片段(图 6 ,退火温度 58℃).

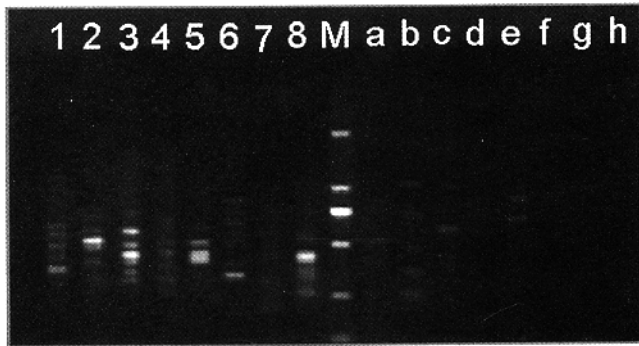


图 6 不同引物对四川泽泻的 PCR 扩增结果

1~8 管分别为引物 2、4、26、29、45、46、60、64 的扩增结果,a~h 是它们的阴性对照,即用蒸馏水代替 DNA 模板.

3 讨论

泽泻中含有较多的多酚类物质 ,一般对于新鲜的植物材料采用加入 β -巯基乙醇防止多酚类物质的氧化(褐变) ,但由于我们采用的干燥保存的叶片多酚类物质已被氧化 ,因此参照 Couchu^[17] 等的方法 ,可加入 1% PVP 分离已被氧化的多酚类 ,PVP 对抑制多酚氧化酶和细胞色素氧化酶的活性有很好的效果. 另外 ,由于泽泻的叶片较老 ,我们采用酚-氯仿-异戊醇作为抽提液 ,可使获得 DNA 溶液的颜色明显变浅.

ISSR 反应对模板浓度不太敏感 ,但我们在实验中发现 DNA 模板纯度对扩增的稳定性有较大影响. 在 DNA 不纯的情况下 ,应使用有效范围内的较低浓度 ,使抑制聚合酶活性的因子影响到最小^[10] . 所以我们根据不同的模板纯度 ,在实验过程中选用了 10~20 ng 不同用量.

引物与模板 DNA 结合的程度和结合量是影响 PCR 扩增产率和稳定性的主要因子. 实验表明 :引物浓度不同扩增片段大小存在差异. 引物浓度越大 ,扩增片段越小. 但引物浓度过高会增加非特异性扩增.

TaqDNA 聚合酶的用量是影响 ISSR 扩增结果的重要因素. 量少时产物合成效率低 ,量多容易产生非特异性产物且增加试验成本. 不同厂家生产的 Taq 酶性能上有差异 ,而且同一厂家不同批次的产品也存在一定的差异^[14,15] ,所以为增加可比性 ,在本实验中使用的是同一厂家同一批次的 Taq 酶.

Mg^{2+} 浓度对扩增结果也十分重要 ,PCR 反应中 , Mg^{2+} 浓度能影响 PCR 反应效率. 不同材料 ,不同引物的 Mg^{2+} 浓度需要通过试验来确定. 浓度过高 ,容易生成非特异性扩增产物 ;反之 ,浓度过低会降低扩增产率. 此外 ,由于 dNTP 直接螯合相应数量的 Mg^{2+} ,它们浓度的任何改变都会影响有效 Mg^{2+} 的浓度^[16,18] .

另外 ,同一物种 ,引物不同 ,其退火温度不同. 但即使是同一引物 ,对不同的物种其退火温度也不尽相

同. 为减少非特异性扩增,可在允许范围内适当提高引物的退火温度. 从理论上说,PCR 反应循环次数越多,扩增产率越高. 但反应时间过长,又会造成 DNA 谱带的降解. 在实验中应选择适合的循环次数.

因此,任何组分的量过多过少都会对实验结果造成严重的影响. 实验证明,在扩增结果相差不大的前提下,应尽可能选择药品使用量少、条带清晰的泳道. 最后,我们确立了适用于泽泻 ISSR 扩增的 25 μ L 反应体系为:10 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L KCl、8 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、pH 9.0、1.8~2.0 mmol/L MgCl_2 、Taq 酶 1 U、dNTP 100 μ mol/L、引物 0.3 μ mol/L、DNA 模板量约 10~20 ng(视模板纯度而定). 反应循环参数为:94℃ 预变性 5 min,然后是 94℃ 变性 45 s、52~60℃ 复性 45 s、72℃ 延伸 1.5 min,共 40 个循环后,72℃ 延伸 7 min 补齐.

[参考文献]

[1] 胡士林. 中国道地药材[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1989.

[2] 陈志彤、陈坚. 泽泻 18S-26SrRNA 及其 ITS 片段的克隆及序列分析[J]. 闽西职业大学学报,2004,22(2):111-115.

[3] 彭国平、楼凤昌. 泽泻化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(3):1-3.

[4] 彭国平、潘林梅、文红梅. 泽泻的对照品研究[J]. 南京中医药大学学报,2001,17(3):154-156.

[5] 胡珊梅、周涵韬. 道地药材建泽泻的 RAPD 研究[J]. 中草药,2002,33(2):161-162.

[6] Ammiraju J S,Dholakia B B,Santra D K,et al. Identification of inter simple sequence repeat(ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. Theor Appl Genet,2001,102(6):726-732.

[7] 何予卿、张宇、孙梅,等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123-127.

[8] Jin Y,Zhang W J,Fu D X,et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers[J]. Acta Bot Sin,2003,45(8):995-1002.

[9] Li H S,Chen G Z. Genetic diversity of sonneratia alba in China detected by inter-simple sequence repeats(ISSR)analysis[J]. Acta Bot Sin,2004,46(5):137-142.

[10] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报,2004,39(2):19-21.

[11] 宣继萍、章镇、房经贵,等. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):549-550.

[12] 乔玉山、章镇、房经贵,等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. 果树学报,2003,20(4):270-274.

[13] 周俊亚、宾晓芸,等. 罗汉果 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2004,22(3):81-84.

[14] 席嘉宾、郑玉忠、杨中艺. 地毯草 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 中山大学学报:自然科学版,2004,43(2):80-84.

[15] 张志红、谈风笑、何航航,等. 红树植物海漆 ISSR 条件的优化[J]. 中山大学学报:自然科学版,2004,43(2):63-67.

[16] Dieffenbach C W,Dveksler G S. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998.

[17] Couchu J A,Fritz P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics[J]. Plant Mol Bio l Rep,1990(8):8-12.

[18] 王培训、周联、赖小平. 分子生物学技术与中药鉴别[M]. 广州:世界图书出版公司,2002:6-7.

[责任编辑:孙德泉]