

温郁金ISSR- PCR 反应体系的建立及条件优化

汤晓闯², 王晓慧², 梁广¹, 姜程曦, 肖健, 李校堃^{2*}

(1. 温州医学院药学院, 浙江温州 325035; 2. 吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林长春130118)

摘要 [目的] 寻找一个可用于温郁金ISSR- PCR 的最适宜反应体系。[方法] 利用CTAB 法提取基因组DNA, 同时利用PCR 扩增技术和方法, 对引物、模板DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 聚合酶等反应条件进行优化。[结果] 反应体系的最佳条件是总体积为25 μ l, 其中 Mg^{2+} 浓度(25 mmol/L) 2.2 μ l, Taq 聚合酶(5 U/ μ l) 0.4 μ l, 引物浓度(20 μ mol/L) 1.5 μ l, 模板DNA(5 ng/ μ l) 1.5 μ l, dNTP(2.5 mmol/L) 2.2 μ l, 10 \times PCRbuffer 2.5 μ l; PCR 扩增程序为: 1 个循环的94 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性35 s, 相对应的引物退火温度退火1 min, 72 $^{\circ}$ C 复性1.5 min, 共36 个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。[结论] 该体系是适合温郁金ISSR- PCR 反应的最适宜体系, 具有省时、经济、简便以及扩增条带清晰而稳定等特点, 为今后温郁金遗传多样性的研究奠定了基础。

关键词 郁金; 体系优化; ISSR- PCR

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517- 6611(2008) 22- 09413- 03

Establishment of ISSR PCR Reaction System for *Curcuma wenyujin* and Its Conditions Optimization

TANG Xiao-chuang et al (Pharmacy College, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract [Objective] The research aimed to seek the optimum ISSR PCR amplification reaction system for *Curcuma wenyujin*. [Method] The genomic DNA was extracted by CTAB method. And the reaction conditions such as primers, template DNA, Mg^{2+} , dNTP, Taq polymerase were optimized by using PCR amplification technology and method. [Result] The optimum conditions of the reaction system were as follows: the total volume of 25 μ l, 2.2 μ l 25 mmol/L Mg^{2+} , 0.4 μ l 5 U/ μ l Taq polymerase, 1.5 μ l 20 μ mol/L primer, 1.5 μ l 5 ng/ μ l template DNA and 2.2 μ l 2.5 mmol/L dNTP, 2.5 μ l 10 \times PCR buffer. PCR amplification procedure was as follows: one cycle of pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 5 min; 36 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 35 s, annealing at the primer's annealing temperature for 1 min and renaturing at 72 $^{\circ}$ C for 1.5 min; Extending at 72 $^{\circ}$ C for 10 min finally. [Conclusion] This system is the optimum system for ISSR PCR reaction of *C. wenyujin*. It has the characteristics such as being fast, economic and simple and having clear and stable bands. This research laid the foundation for studying the genetic diversity of *C. wenyujin* in future.

Key words *Curcuma wenyujin*; System optimization; ISSR- PCR

姜科植物温郁金(*Curcuma wenyujin*) 是浙江省著名道地药材, 根茎干燥后为温莪术, 是我国常用名贵中药材, 其性味辛、苦、温, 归肝、脾经。具行气破血、消积止痛功效。含有挥发油、姜黄素类、有机酸、树脂和淀粉等^[1-2]。并且还是一种抗肿瘤、抗病毒、抗炎的重要药材^[3], 临床用量和工业化生产用量十分巨大。

简单重复序列区间扩增(ISSR) 是由Zietkiewicz 于1994 年建立^[4], 用锚定的微卫星DNA 为引物, 在SSR 序列的3 或5 端加锚2~4 个随机核苷酸, 在PCR 反应中, 锚定引物可以引起特定位点退火, 导致锚定引物互补间隔不太大的重复序列间DNA 片段进行PCR 扩增。ISSR 标记为显性标记, 具有较长的引物序列, 退火温度高, 表现出较好的稳定性^[5], 且结合位点丰富, 可以检测到基因组中多个位点的差异, 因此, 在植物遗传育种中有广阔的应用前景^[6]。近年来已迅速应用于植物亲缘关系、指纹图谱、遗传图谱、种质资源遗传多样性等方面的研究^[7-9]。

ISSR- PCR 分子标记技术并不是每个引物都适合于所有物种。同时, 不同引物要求的反应条件也各不相同, 因此对反应体系条件的筛选与优化十分重要。笔者对温郁金ISSR- PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、模板DNA 浓度、引物浓度、Taq 聚合酶量以及复性温度和反应次数进行优化, 以期建立一个较为稳定而可靠的反应体系, 为探索温郁金的遗传多样性分析奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

试验材料采自于不同居群的温郁金叶片。立即

基金项目 浙江省科技攻关重大项目(2005C13019); 温州市科技攻关重大项目(S2005B001)。

作者简介 汤晓闯(1982-), 男, 吉林长春人, 硕士研究生, 研究方向: 中药生物技术。

收稿日期 2008-05-14

密封, 放入冰桶内, 回到实验室后, 及时清洗, 并存放于-70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中, 备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA 的制备。 叶片用液氮研磨, 采用改良的CTAB 法提取^[10]。

1.2.2 DNA 样品的检测。 A_{260}/A_{280} 计算样品DNA 纯度, 均在1.7~1.9, 符合PCR 对DNA 纯度的要求。然后用1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和凝胶自动成像系统检测所提DNA 的完整性。DNA 浓度定为5 ng/ μ l, 于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存、备用。

1.2.3 ISSR 反应体系主要因素用量筛选。 将ISSR- PCR 反应体系的 Mg^{2+} 、dNTP、模板DNA、引物、Taq 聚合酶量以及退火温度等因素分别设置若干水平, 并进行优化筛选。PCR 扩增程序为: 1 个循环的94 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性35 s, 不同引物的退火温度1 min, 72 $^{\circ}$ C 复性1.5 min, 共36 个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延10 min。

25 μ l 反应终产物中, 吸取6 μ l 反应液与2 μ l 6 \times 加样缓冲液混合, 扩增产物在含0.5 μ g/ μ l 溴化乙锭(EB) 的1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为1 \times TAE, 电泳强度为5 V/cm, 电泳完毕, 凝胶成像系统下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 温郁金叶片基因组DNA 的质量 按上述方法所述对温郁金叶片DNA 进行抽提, 经1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪中分析结果见图1。结果显示温郁金DNA 分子量在15 kb 以上, 确定为基因组DNA, 提取的DNA 只有1 条带, 说明其具有良好的完整性, 经紫外分光光度计检测, 其 $OD_{260/280}$ 的值在1.8 左右, 可用作ISSR 的模板。

2.2 引物的筛选及退火温度的选择 退火温度对PCR 反应的影响非常明显, 退火温度过低导致非特异性扩增, 重复性降低^[10], 而温度过高条带较少, 可能导致许多反应多态性的

条带消失^[11];不同的引物其退火温度也各不相同。因此选择一个条带数较多且清晰、稳定性好的退火温度非常重要。从35条随机引物中筛选出16条引物能扩增出片断,对16条引物进一步检测发现,有5条能在所有的温郁金材料中扩增出片断多、亮度大的条带,可用于ISSR分析(表1)。

2.3 Mg²⁺ 浓度对ISSR-PCR 反应的影响 Mg²⁺ 是 Taq 聚合酶实现聚合反应所必须的一种二价阳离子,选择合适的 Mg²⁺ 浓度对ISSR 反应至关重要。作为 Taq 酶的辅助因子,它不仅影响 Taq 酶活性,还能与反应液中的dNTP、模板DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与PCR产物

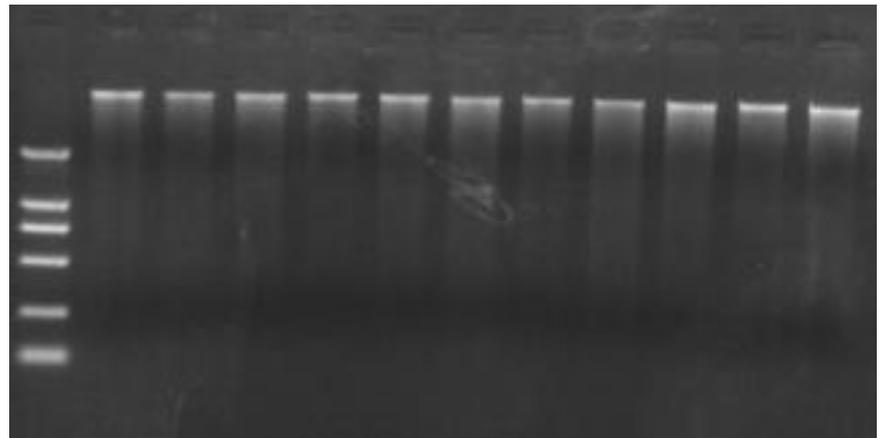


图1 部分温郁金叶片基因组 DNA 的质量

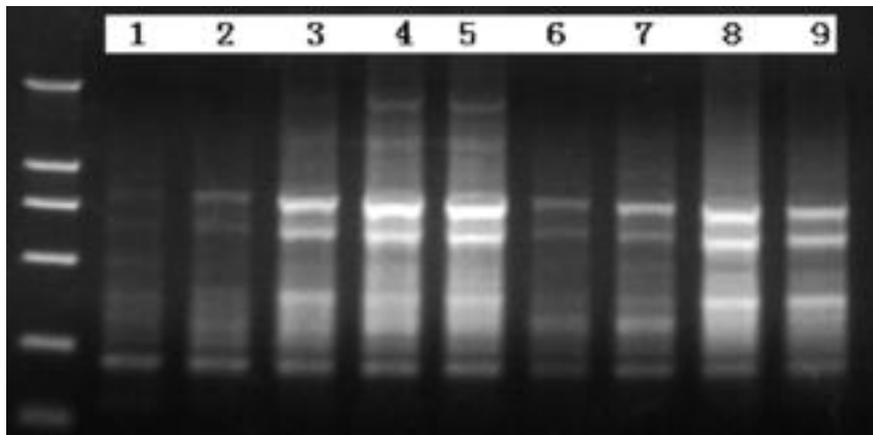
Fig.1 Quality of the genomic DNA from part leaves of *Crocus verucina*

表1 ISSR 扩增引物筛选结果

Table 1 Screening results of ISSR amplification primers

| 引物 Primers | 核苷酸碱基序列5-3 Nucleotide sequence from 5' end to 3' end | ISSR 标记数 ISSR marker number | 多态性标记数 Number of polymorphic markers | Tm 值 Tm value | 最适退火温度 Optimum annealing temperature |
|---------------|---|--------------------------------|---|------------------|---|
| 809 | AGAGAGAGAGAGAGAGG | 14 | 6 | 52 | 60 |
| 862 | ACACACACACACACACC | 16 | 10 | 52 | 63 |
| 861 | ACCACCACCACCACCACC | 8 | 8 | 60 | 63 |
| 868 | GAAGAAGAAGAAGAAGAA | 20 | 9 | 48 | 58 |
| 873 | GACAGACAGACAGACA | 7 | 3 | 48 | 59 |

的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[12]。扩增结果表明,Mg²⁺ 浓度过低扩增的条带数非常少;Mg²⁺ 浓度高于2.2 μ 时,扩增的条数减少,亮度也有所降低,部分条带没有出现或有些模糊。根据试验结果,Mg²⁺ 浓度确定为2.2 μ(图2)。



注:Mg²⁺(25 mmol/L) 浓度 1 μ; 1.5 μ; 1.8 μ; 2.0 μ; 2.2 μ; 2.5 μ; 2.8 μ; 3 μ; 3.3 μ。

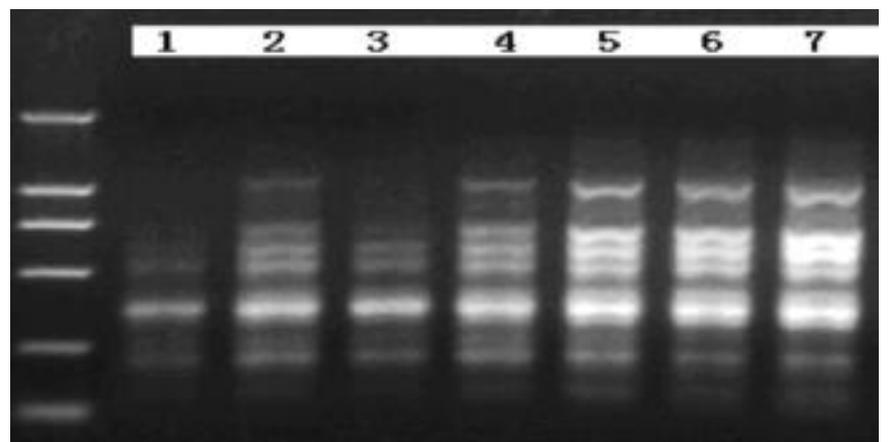
Note: Mg²⁺(25 mmol/L) concentration: 1 μ; 1.5 μ; 1.8 μ; 2.0 μ; 2.2 μ; 2.5 μ; 2.8 μ; 3 μ; 3.3 μ.

图2 Mg²⁺ 浓度梯度的ISSR 扩增结果

Fig.2 ISSR amplification results of Mg²⁺ concentration gradients

2.4 Taq 聚合酶浓度对ISSR-PCR 反应的影响 Taq 聚合酶的用量过高过低都会对PCR 产生不利的影响。过高不仅增加成本,还会造成非特异性的产物;过低则会使酶过早消耗完,产物结合的效率低^[13]。图3 为 Taq 聚合酶浓度优化的扩增结果,25 μ 反应体系中,Taq 聚合酶浓度为0.25~1.5 U 时,条带少且比较弱;Taq 聚合酶浓度为2~3 U 时,条带较多且亮度也很好。从经济角度和试验结果看,Taq 聚合酶浓度为2 U 最为合适。

2.5 引物浓度和模板 DNA 用量对ISSR-PCR 反应的影响 引物浓度和模板 DNA 用量也是影响PCR 反应的重要因素。由图4 可知,随着引物和模板浓度的增加,条带逐渐清晰。但当模板和引物浓度为11、12 和13 时,条带模糊,不易

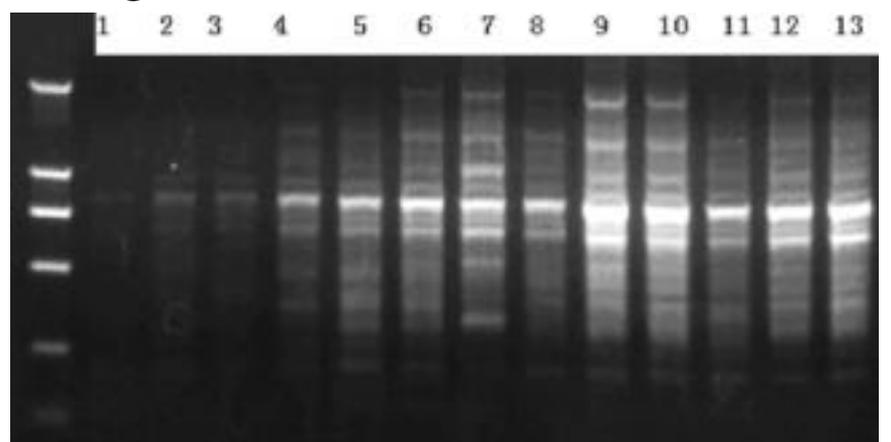


注: 0.25 U; 0.5 U; 1 U; 1.5 U; 2 U; 2.5 U; 3 U。

Note: 0.25 U; 0.5 U; 1 U; 1.5 U; 2 U; 2.5 U; 3 U.

图3 Taq 聚合酶浓度梯度的ISSR 扩增结果

Fig.3 ISSR amplification results of Taq polymerase concentration gradients



注:模板浓度和引物浓度分别为:1. 0.5,0.5;2. 0.5,1.0;3. 1.0,1.0;4. 1.0,1.0;5. 1.0,1.5;6. 1.5,1.0;7. 1.5,1.5;8. 1.5,2.0;9. 1.5,2.5;10. 2.0,1.0;11. 2.0,1.5;12. 2.0,2.0;13. 2.0,2.5。

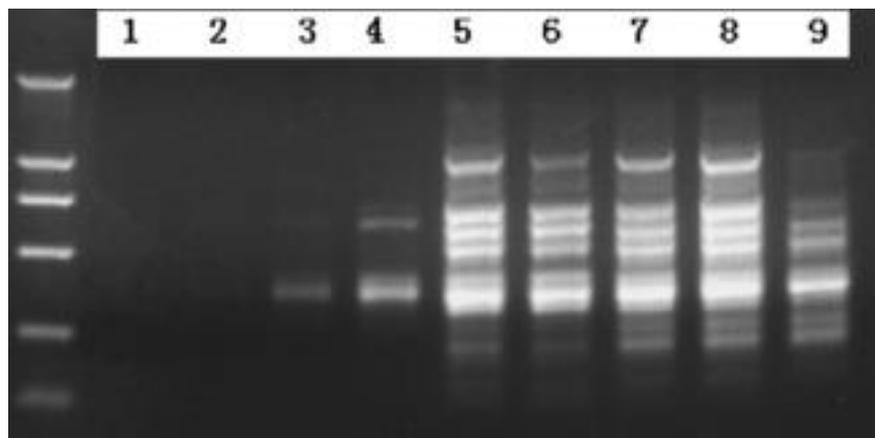
Note: The concentrations of templates and primers were as follows: 1. 0.5 and 0.5; 2. 0.5 and 1.0; 3. 1.0 and 1.0; 4. 1.0 and 1.0; 5. 1.0 and 1.5; 6. 1.5 and 1.0; 7. 1.5 and 1.5; 8. 1.5 and 2.0; 9. 1.5 and 2.5; 10. 2.0 and 1.0; 11. 2.0 and 1.5; 12. 2.0 and 2.0; 13. 2.0 and 2.5.

图4 引物和模板的ISSR 扩增结果

Fig.4 ISSR amplification results of templates and primers

做统计;当模板和引物浓度为9 和10 时,都能扩增出条带,但背景过高,当浓度过低时,条带数较少,且清晰度降低。最终确定模板DNA 用量和引物浓度分别为1.5 和1.5 μ 。

2.6 dNTPs 浓度对ISSR-PCR 反应的影响 dNTPs 是PCR 反应的原料。许多结果表明,dNTPs 浓度对PCR 扩增影响较大,其浓度过高时,会与 Mg^{2+} 螯合,抑制扩增反应或导致核苷酸错误掺入;过低又影响合成效率,甚至影响扩增效果。由图5 可知,当dNTPs 浓度过低或过高时,没有扩增产物或条带数较少,都不能扩增出较好的条带;当dNTPs 的浓度在2.2 ~ 3.0 μ 时,反应体系均能扩增出较好的条带,但从试验的稳定性来看,最后确定dNTPs 的浓度为2.2 μ 。



注:dNTPs(25 mmol/L): 1 μ ; 1.5 μ ; 1.8 μ ; 2.0 μ ; 2.2 μ ; 2.5 μ ; 2.8 μ ; 3.0 μ ; 3.3 μ 。

Nte:dNTPs(25 mmol/L): 1 μ ; 1.5 μ ; 1.8 μ ; 2.0 μ ; 2.2 μ ; 2.5 μ ; 2.8 μ ; 3.0 μ ; 3.3 μ 。

图5 dNTPs 浓度梯度的ISSR 扩增结果

Fig.5 ISSR amplification results of dNTPs concentration gradients

2.7 部分引物的筛选结果 用已经筛选好的引物对所有的温郁金材料进行扩增。从扩增结果图谱来看(图6、7),各个

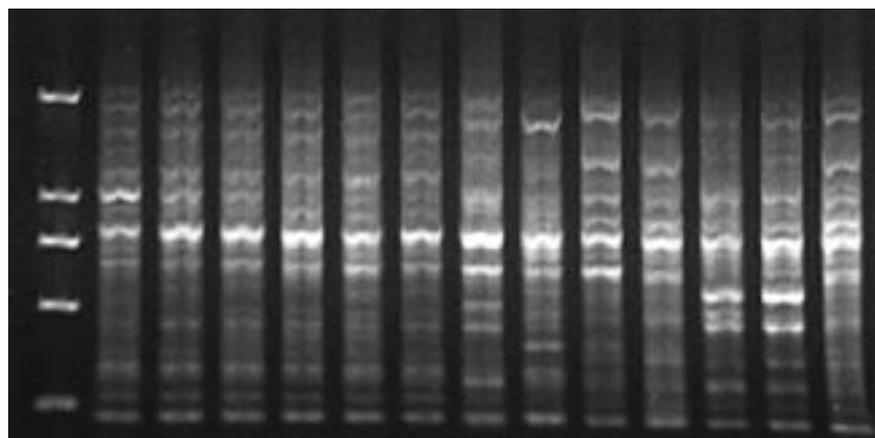


图6 引物809 的ISSR 扩增图谱

Fig.6 ISSR amplification pattern with Primer 809

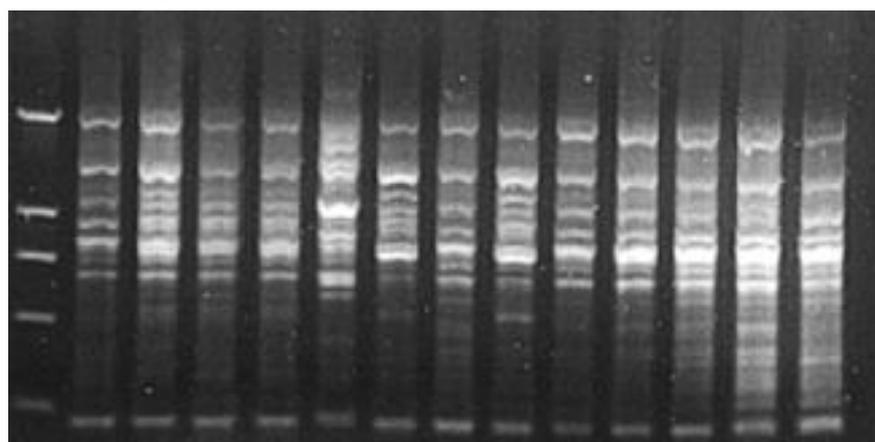


图7 引物873 的ISSR 扩增图谱

Fig.7 ISSR amplification pattern of Primer 873

样品间的差异既表现出了种内的遗传稳定性,又反映出了品种之间的遗传差异。

3 结论与讨论

(1)ISSR 分析具有简便、灵敏度高、不需要DNA 序列材料等优点,但不同材料适合的引物不同,因此在ISSR 多态性分析前需要筛选引物。该研究筛选出了5 条在温郁金材料上均能扩增出清晰条带的引物,为以后的试验打下了基础。

(2)ISSR 反应的影响因子包括模板DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 聚合酶等,这些因素之间也相互发生着作用。引物与模板结合后在Taq 酶作用下进行延伸,Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,受 Mg^{2+} 浓度影响,而 Mg^{2+} 又受dNTP 的拮抗作用^[14]。实践证明,在较为稳定的实验室环境中,采用上述反应体系,能够获得非常满意的PCR 扩增效果。该反应体系是否适合于其他药用植物基因组DNA 的分子标记分析,还有待于进一步研究。

(3)以温郁金为材料,建立了重复性好、分辨率高的ISSR 反应体系,即在25 μ 体系中, Mg^{2+} 浓度(25 mmol/L) 2.2 μ , Taq 聚合酶(5 U μ) 0.4 μ ,引物浓度(20 μ mol/L) 1.5 μ ,模板DNA(5 ng/ μ) 1.5 μ ,dNTP(2.5 mmol/L) 2.2 μ ,10 \times PCRbuffer 2.5 μ ;PCR 扩增程序为94 预变性5 min;94 变性35 s,相对应的引物退火温度退火1 min,72 复性1.5 min,共36 个循环;最后72 延伸10 min。

参考文献

- [1] CAO H, YOHJI S, HROICSH F, et al. Molecular analysis of medicinally used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and trnK gene sequences[J]. *Bd Pharm Bull*, 2001, 24(12): 1389 - 1394.
- [2] HUANG MT, MA W, PATRICIA Y, et al. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced tumor promotion and oxidized DNA based in mouse epidermis[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(1): 83 - 88.
- [3] 肖小河, 钟国跃, 舒光明, 等. 国产姜黄属植物的数值分类学研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(1): 15 - 24.
- [4] ZIEKIEWCZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176 - 183.
- [5] TAPAN K M. Assessment of genetic diversity of tea by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction[J]. *Euphytica*, 2002, 128: 307 - 315.
- [6] 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(1): 134 - 137.
- [7] 李进波, 江良荣, 李春海, 等. 水稻光温敏核不育系的ISSR 和SSR 遗传分析比较[J]. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 42 - 47.
- [8] 徐启江, 崔成日, 贾铁金. 洋葱种质资源遗传多样性的ISSR 分析[J]. *农业生物技术科学*, 2007(7): 126 - 130.
- [9] 金则新, 李钧敏, 李建辉. 木荷种群遗传多样性的ISSR 分析[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2007, 33(3): 271 - 276.
- [10] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列(ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. *热带亚热带学报*, 2003, 11(1): 15 - 20.
- [11] HANSEN M, HALDEN C, SALL T. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols[J]. *Hort Mil Bd Rep*, 1998, 16: 139 - 146.
- [12] SANCHEZ DE LA HOZ MP, DAVILA J A, LOARCE Y, et al. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplification to study genetic diversity in barley[J]. *Genome*, 1996, 39: 112.
- [13] 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.
- [14] 周俊亚, 宾晓云, 彭云涛, 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.
- [15] 张君毅, 郭巧生, 杭悦宇. 半夏ISSR PCR 反应体系的建立及条件优化研究[J]. *江苏农业科学*, 2007(2): 154 - 157.