

# 四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化

杨路存<sup>1,2</sup> 陈桂琛<sup>1</sup> 周国英<sup>1</sup> 宋文珠<sup>1</sup> 李春丽<sup>1,2</sup> 许璟琪<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 采用正交试验与单因素设计相结合的方法, 对四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应体系中的 4 种主要因素 ( $Mg^{2+}$ 、Taq DNA 聚合酶、dNTP 及引物) 进行优化筛选, PCR 结果用统计软件 SPSS16.0 分析。结果显示,  $Mg^{2+}$ 、Taq DNA 聚合酶、dNTP 这 3 因素的不同水平对 PCR 反应结果都有显著影响, 其中  $Mg^{2+}$  的浓度影响最大。筛选出各反应因素的最佳水平, 建立四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应的最佳体系 (25 LL) 为 3.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 250 Lmol/L dNTP, 0.6 Lmol/L 引物, 1U Taq DNA 聚合酶, 40 ng DNA, 21.5 LL 10 @buffer。这一体系的建立为今后利用 ISSR 技术进行四数獐牙菜遗传多样性分析以及物种保护奠定了技术基础。

**关键词:** 四数獐牙菜 ISSR-PCR 正交设计 体系优化

## Optimization for ISSR-PCR Reaction System in *Swertia tetraptera* Using Orthogonal Design

Yang Lucun<sup>1,2</sup> Chen Guichen<sup>1</sup> Zhou Guoying<sup>1</sup> Song Wenzhu<sup>1</sup> Li Chunli<sup>1,2</sup> Xu Jingying<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810001)

(<sup>2</sup>Graduate School of the Chinese Academy of Sciences Beijing 100039)

**Abstract** An orthogonal design combined with single factor experiment was applied to optimize ISSR (inter-simple sequence repeat)-PCR (polymerase chain reaction) amplification system of *Swertia tetraptera*. The effect of the four main reaction system elements ( $Mg^{2+}$ , Taq DNA polymerase, dNTP and primer) on ISSR-PCR were tested. The result of PCR analyzed by software SPSS16.0 showed that the different levels of  $Mg^{2+}$ , Taq DNA polymerase, dNTP had a significant effect on the PCR reaction result and the concentration of  $Mg^{2+}$  was the most effective factor to the result of PCR. A most suitable ISSR-PCR system for *S. tetraptera* containing 3.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 250 Lmol/L dNTP, 0.6 Lmol/L primer, 1U Taq DNA polymerase, 40 ng DNA template and 21.5 LL 10 @buffer in the total volume of 25 LL was established. The result could provide the basis for the analysis of diversity and protection of *S. tetraptera*.

**Key words:** *Swertia tetraptera* ISSR-PCR Orthogonal design System optimization

四数獐牙菜 (*Swertia tetraptera* Maxim) 是龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜亚族 (Subtribe Swertiinae) 獐牙菜属一年生草本植物, 为青藏高原特有种<sup>[1]</sup>。特有种负载着适应特殊环境的基因, 这些基因对物种的进化、新种的产生和物种的绝灭都具有重要意义。因此, 四数獐牙菜在青藏高原生物多样性保护方面具有重要的学术价值。同时, 四数獐牙菜是藏医广泛使用的治疗肝、胆疾病的药物之一<sup>[2]</sup>。近年来, 随着藏药生产的工业化, 使藏药材

的需求量越来越大, 加上日益强烈的人类活动干扰导致的森林片断化及生境的不断恶化, 其生存已经受到了严重的威胁。而目前对四数獐牙菜除在化学成分、解剖学和胚胎学等方面有过研究报道外<sup>[3-6]</sup>, 其它学科的研究尤其是对该物种在 DNA 水平上的遗传多样性等保护生物学的相关研究至今尚未见报道。

ISSR (inter-simple sequence repeats 简单重复序列区间扩增) 是 Zietkiewicz 等<sup>[7]</sup> 1994 年创建的新型

收稿日期: 201006218

基金项目: 国家中西部专项项目 (2001BA901A47)

作者简介: 杨路存, 女, 在读博士, 研究方向: 分子生态学; E-mail: qhyle2000@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈桂琛, E-mail: gcchen@mwjpb.ac.cn

分子标记技术,与 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphism DNA)、SSR 相比,ISSR 技术可以揭示更多的多态性,但比 SSR 技术简单,并具有更高的稳定性和重复性<sup>[8]</sup>。Jonsson等<sup>[9]</sup>的研究认为,在进行植物遗传多样性和保护遗传学的研究时,可优先考虑使用 ISSR。国内近年来在药用植物研究方面也开始采用此方法<sup>[10]</sup>。

由于 ISSR 是基于 PCR 的一种标记,易受多种因素的干扰,其最佳扩增条件在不同物种中各异,为了获得重现性、可靠性较高的结果,应先对各因子的最佳反应条件进行探索,建立一个合适的 ISSR2PCR 反应体系。目前,对 ISSR2PCR 反应体系建立及优化主要采用单因子试验或正交设计两种方法。正交试验设计具有均衡分散、综合可比及效应明确等特性,能最快找到最优水平组合。单因素试验虽然比较费时,但能对正交的优化组合起到进一步的微调作用。本研究以 CTAB 法提取的四数獐牙菜叶片 DNA 为模板,采用正交与单因素相结合的方法对 ISSR 反应体系进行优化,以建立适合四数獐牙菜 ISSR 反应的最佳体系,为今后研究四数獐牙菜地理种源的群体遗传多样性,进行系统的保护提供分子水平上的参考和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2008年8月,从青海省达日县(N 33b 48c 3610d E 99b 44c 5514d alt 3 952m)采集四数獐牙菜鲜嫩叶片,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存,并提取其 DNA 作为 PCR 扩增的模板。试验用于 ISSR2 PCR 反应的 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup> 和 dNTP 购自上海生物工程公司。选用的引物为 UBC825 其碱基序列为 ACA CAC ACA CAC ACA CT。

### 1.1.2 DNA 的提取

采用改良过的 CTAB<sup>[11]</sup>法提取基因组 DNA。用 0.18% 的琼脂糖电泳检测 DNA 质量, DNA 的浓度通过紫外分光光度计测定,并将 DNA 浓度稀释为 10 ng/LL, -20e 保存备用。

### 1.1.3 PCR 反应条件

在 PCR 仪上进行扩增,扩增程序为 94e 预变性 5 min, 然后进行以下 35 个循环: 94e 变性 45 s,

56e 退火 45 s, 72e 延伸 2 min, 35 个循环; 72e 延伸 7 min, 4e 终止反应保存。PCR 产物在 11% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 电极缓冲液为 1 × TBE; 用 100 bp Ladder DNA marker 作为标准相对分子量对照。溴化乙锭 (EB) 染色显带, 紫外光下 UV 凝胶成像系统观察并成像。

### 1.1.4 正交设计 PCR 体系

采用 L16 (4<sup>4</sup>) 正交试验设计<sup>[12]</sup>, 对影响 ISSR2 PCR 的主要因素, 包括 Taq DNA 聚合酶, dNTPs, 引物, Mg<sup>2+</sup> 浓度进行 4 因素 4 水平的筛选分析, 共 16 个处理, 每个处理 3 次重复, ISSR2PCR 各反应成分的因素水平及正交试验见表 1。反应体系中总体积为 25 LL, 包括 10 × buffer 215 LL, 其它各成分按照表 1 加样, 不足体积用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 LL。

表 1 PCR 反应的因素水平 L16 (4<sup>4</sup>) 正交试验设计

处理组合	影响因素			
	dNTPs (mmol/L)	引物 (Lmol/L)	Mg <sup>2+</sup> (nmol/L)	Taq 酶 (U/25 LL)
1	150	01.2	115	01.5
2	150	01.3	2.0	1.0
3	150	01.4	215	11.5
4	150	01.5	3.0	2.0
5	200	01.2	2.0	11.5
6	200	01.3	115	2.0
7	200	01.4	3.0	01.5
8	200	01.5	215	1.0
9	250	01.2	215	2.0
10	250	01.3	3.0	11.5
11	250	01.4	115	1.0
12	250	01.5	2.0	01.5
13	300	01.2	3.0	1.0
14	300	01.3	215	01.5
15	300	01.4	2.0	2.0
16	300	01.5	115	11.5

单因素试验是根据正交试验结果初步选出最佳体系, 在其它因子保持不变的情况下, 按一定梯度变化单个因子, 逐个筛选出各因子的最优扩增条件, 组成适合于四数獐牙菜的 ISSR2PCR 反应体系。4 因子浓度梯度处理见表 2。

表 2 各因子浓度梯度

影响因素	因素水平 (体系终浓度)				
	1	2	3	4	5
dNTPs(mmol/L)	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
引物 (Lmol/L)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Taq酶 (U /25 LL)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

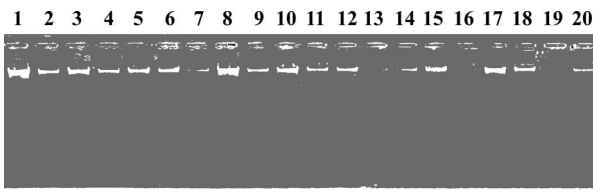


图 1 四数獐牙菜基因组 DNA 电泳检测

## 2 结果与分析

### 2.1.1 DNA 检测结果

琼脂糖凝胶电泳检测四数獐牙菜 DNA 质量, 试验结果如图 1。图 1 中 DNA 电泳带没有拖尾现象且图象较为清楚, 可知本次所提 DNA 纯度较高, RNA 和蛋白质含量较少或者没有。

### 2.1.2 正交试验结果的直观分析

参照何正文等<sup>[13]</sup>的方法, 根据 L16(4<sup>4</sup>)正交试验 PCR 产物电泳结果 (图 2), 按遗传多样性分析的要求, 将 16 个处理从高到低依次记分, 分数越高, 表示敏感性、特异性越好。四数獐牙菜的 3 次重复分别独立统计, 依处理顺序得到的四数獐牙菜样品的 3 次重复的分数分别记为: 1, 3, 7, 16, 12, 13, 11, 6, 8, 10, 2, 5, 14, 15, 9, 4, 2, 1, 9, 16, 12, 10, 8, 7, 6, 15, 4, 5, 14, 11, 13, 3, 3, 2, 9, 15, 14, 4, 6, 7, 13, 12, 5, 1, 16, 11, 8, 10。

M 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4 4 4 5 5 5 6 6 6 7 7 7 8 8 8 9 9 9 10 10 10 11 11 12 12 13 13 14 14 15 15 16 16 16



1- 16 处理代号, 参见表 1; M 100 bp ladderMarker

图 2 ISSR-PCR 正交试验结果

### 2.1.3 正交试验设计结果的方差分析

利用统计软件 SPSS 16.0 将上述独立记分结果进行方差分析, 结果见表 3。由 F 值可知, 在本试验设置的因素水平范围内, Mg<sup>2+</sup> 的量对反应结果影响最大, 引物的影响最小, 各因素水平变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为 Mg<sup>2+</sup>, Taq 酶, dNTP, 引物。Eta 平方值显示, 各因素对总变异的贡献顺序为 引物 > dNTP > Taq 酶 > Mg<sup>2+</sup>; 4 因素的观察效能均较高, 表明其检验效能也高, 无须增加样本量。统计分析结果 (表 3) 还显示出 Taq 酶及 Mg<sup>2+</sup> 水平间差异达到极显著水平, dNTP 水平间差异达到显著水平, 进一步进行因素内多重比较。

### 2.1.4 因素内各水平对 ISSR-PCR 结果的影响

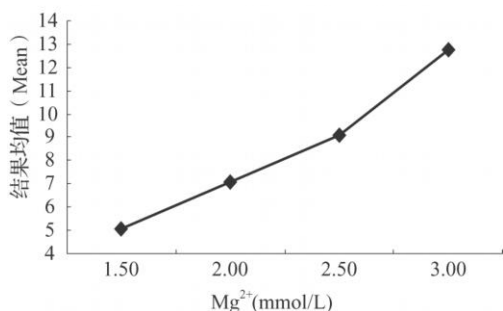
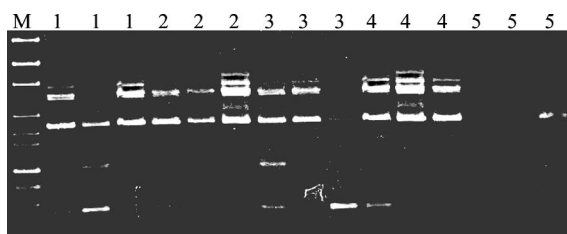
2.1.4.1 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 结果的影响 Mg<sup>2+</sup> 主要

是通过改变聚合酶的活性对 PCR 反应结果产生影响, Mg<sup>2+</sup> 各浓度水平对 PCR 结果的影响有差异, 表现为 1.5- 3.0 mmol/L 范围内, 反应结果均值随 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加呈正比例递增。多重比较分析结果 (图 3) 表明, Mg<sup>2+</sup> 的 2.0 mmol/L 与 2.5 mmol/L 水平间差异不显著, 其余每二者组合间的差异均达到显著水平。同时, 结合单因素试验的结果 (图 4), Mg<sup>2+</sup> 浓度较低时 (1.5- 2.5 mmol/L) 扩增产物带型较弱, 浓度为 3.0 mmol/L 时, 扩增条带较为清晰; 随浓度逐渐增大, 由于酶活性过高, 产生大量非特异性的弥散带, 甚至扩增产物消失。本试验确定 Mg<sup>2+</sup> 浓度在 3.0 mmol/L 时能保证聚合酶的适当活力, PCR 扩增效果良好。

表 3 四数獐牙菜 ISSR2PCR 反应各因素间方差分析

变异来源	自由度 df	方差 SS(0 型)	均方 MS	F 值	Sig	Eta平方	观察效能 (b)
校正模型	12	695.000 <sup>a</sup>	571.917	6.237	0.000	01681	1.000
截距	1	3468.000	3468.000	3731.477	0.000	01914	1.000
dNTP	3	110.000	361.667	31.949	0.016	01253	01787
引物	3	301.333	101.111	1.089	01367	0.085	01268
Taq酶	3	1691.667	561.556	6.091	0.002	01343	01939
Mg <sup>2+</sup>	3	385.000	1281.333	131.821	0.000	01542	1.000
误差	35	325.000	91.286				
总和	48	4488.000					
校正和	47	1020.000					

a R Squared=1681(Adjusted R Squared=1572); b Computed using alpha=.05

图 3 Mg<sup>2+</sup> 浓度与结果均值关系图图 4 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR2PCR 扩增效果的影响 (引物为 U825)

21412 Taq DNA 聚合酶浓度对 PCR 结果的影响  
Taq酶对 PCR 反应的影响在所选梯度范围呈正相关,即随着 Taq酶量增加,结果均值呈上升趋势(图 5)。Taq酶 015U 与 1.0U, 115U 与 2.0U 水平间差异不显著,其余每二者组合间的差异均达到显著水平。由反应结果均值与酶量的关系图以及对 Taq酶进行的单因子试验结果(图 6)可见,酶量过低,

PCR 反应的敏感性差,扩增的条带少,所能提供的信息少;酶量过高,则扩增反应的特异性降低,不利于条带的观察分析。中间的两个浓度则比较合适,二者对反应结果的影响差异不大,从经济的角度考虑,可选择 1.0U/25 LL 作为四数獐牙菜 ISSR2PCR 反应体系中酶的最佳浓度。

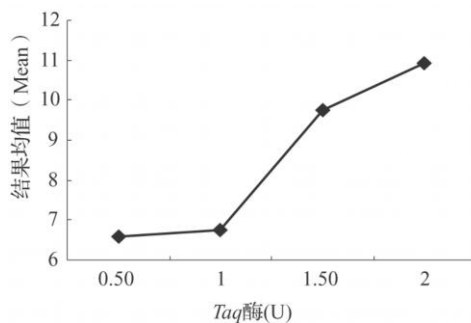


图 5 Taq 酶量与结果均值关系图

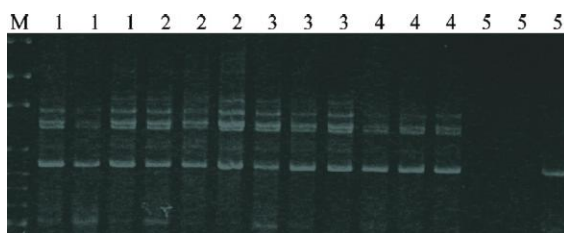


图 6 Taq 酶浓度对 ISSR2PCR 扩增效果的影响 (引物为 U825)

21413 dNTP 浓度对 PCR 结果的影响 dNTP 是 ISSR 扩增的底物, 其浓度直接影响扩增产物的合成。浓度过低则产率下降, 浓度过高则错误率增加, 并竞争  $Mg^{2+}$ , 从而影响 Taq 聚合酶的作用效率。多重比较结果显示 (图 7), dNTP 浓度对 PCR 反应结果的影响具有较明显的规律, 即在 0.12 mmol/L 与 0.125 mmol/L 水平上整体效果较好, 且具缓慢上升趋势, 在 0.15 mmol/L 与 0.13 mmol/L 水平上 PCR 结果则较差。本试验 5 个浓度梯度的单因素结果 (图 8) 显示, dNTP 浓度小于 0.12 mmol/L 时无扩增产物 (0.15 mmol/L) 或扩增产物带型较弱条带很弱; 在 0.125 mmol/L 与 0.13 mmol/L 浓度内条带明亮且多态性较高, 为理想的用量范围; 0.135 mmol/L 时虽然条带清晰, 但伴有个别非特异性扩增出现且较浪费 dNTP 原料。最后确定四数獐牙菜扩增反应中 dNTP 浓度为 0.125 mmol/L 较适宜。

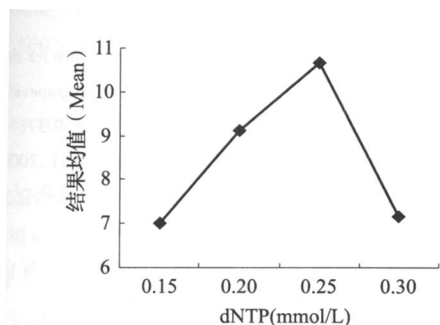


图 7 dNTP 浓度与结果均值关系图

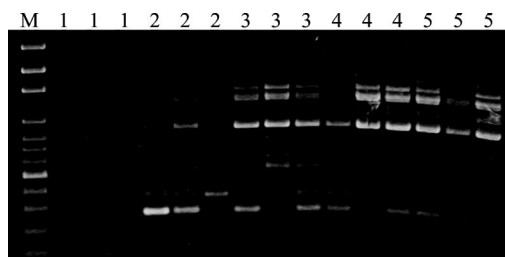


图 8 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响 (引物为 U825)

21414 引物浓度对 PCR 结果的影响 引物 0.12 Lmol/L、0.14 Lmol/L、0.16 Lmol/L、0.18 Lmol/L 水平间均无差异。根据引物不同浓度的单因素试验的结果 (图 9), 将引物浓度定为 0.16 Lmol/L。

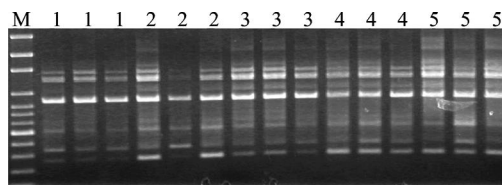


图 9 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响 (引物为 U825)

### 2.1.5 ISSR-PCR 体系稳定性的检测

选择 ISSR 引物 U825 对优化确立的四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测, 结果如图 10 所示。选用的引物 U825 对所检测的 1 个居群的 21 个四数獐牙菜个体都能扩增出清晰、重复性好的谱带, 表明优化确立的四数獐牙菜 ISSR-PCR 体系是稳定可靠的。

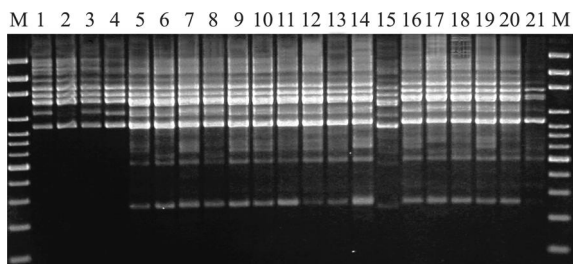


图 10 四数獐牙菜达日居群 21 个个体的扩增结果

## 3 讨论

由于 ISSR 分子标记技术基于 PCR 反应, 其扩增谱带虽较 RAPD 标记稳定, 但同样受反应条件和扩增程序变化以及物种不同的影响<sup>[14]</sup>。同时, 由于每个人在拟订因素水平时的差异以及方法的不同, 使不同因素对 ISSR-PCR 的影响大小亦有所不同。谢运海和张雷凡等<sup>[15, 16]</sup>的研究认为 Taq 酶的浓度变化对 PCR 影响最大, 古松等<sup>[10]</sup>的研究表明 PCR 对引物最为敏感, 而穆立蕾等<sup>[17]</sup>的研究结果显示 dNTP 对 PCR 的影响最大。经统计分析本试验结果显示  $Mg^{2+}$  对 PCR 的影响最大, 这与王彦华等<sup>[18]</sup>在不结球白菜 ISSR-PCR 扩增体系中的结果一致。此外, 大量的研究表明 ISSR-PCR 对 DNA 模板的要求并不严格<sup>[19-21]</sup>, 因此本试验中未将 DNA 浓度作为影响因素来考虑。

利用正交设计能迅速得到 ISSR2PCR 反应的最佳试验条件的组合,但该方法亦存在一定的局限性,如对试验结果本身优劣的判断依据带有主观上的成分,不能很好地估计试验误差,使各因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性。采用单因子试验可较为直观快速的得出该因子对试验结果的影响,但其忽视了各因子间的互作效应,就很难得到最佳的反应体系。本试验分别用两种方法分析影响四数獐牙菜 ISSR2 PCR 体系的因素,并综合分析优化反应体系,可在一定程度上有效克服两种方法各自的局限性,所得到的  $Mg^{2+}$ 、dNTP 最佳浓度是一致的,表明了试验的可信度;在另外两种成分 Taq 酶和引物最佳浓度的确定上,两种方法的结果存在差异,这可能与 PCR 反应的不稳定性有关,也可能是由于两者各自局限性所造成,所以在最佳因素水平的确定上,结合试验实际,综合了两种方法的结果,以尽可能地减少试验误差。最后采用最佳因素水平组合进行的 ISSR2PCR 扩增结果也较好,说明两种方法相结合能有效地保证试验的可靠性。

#### 4 结论

ISSR 分子标记技术基于 PCR 反应,其扩增结果受  $Mg^{2+}$  浓度、引物浓度、Taq 酶用量和 dNTP 浓度等诸多因素的影响。本研究利用  $L_{16}(4^4)$  正交试验设计结合单因素试验方法,对影响 ISSR2PCR 反应的主要因素进行优化筛选分析。结果显示,四数獐牙菜 ISSR 扩增时引物 UBC825 经优化后的理想扩增反应体系为: 25 LL 反应体系中,模板 DNA 40 ng, 3.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 250 μmol/L dNTP, 0.16 μmol/L 引物, 1U Taq DNA 聚合酶, 215 LL 10 @ buffer。该反应体系的建立将为后续试验和遗传分析奠定技术和理论基础。

#### 参考文献

[1] 何廷农, 刘尚武. 国产獐牙菜属的新分类群. 植物分类学报, 1980, 18(1): 75285

- [2] 杨永昌. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 1112112
- [3] 梁永欣, 林鹏程, 卢永昌, 等. 高效液相色谱法同时测定四数獐牙菜中 4 种有效成分含量. 安徽农业科学, 2006, 34(10): 216322164
- [4] 薛春迎, 刘建全, 何廷农. 四数獐牙菜的胚胎学及其系统学意义. 植物分类学报, 1999, 37(3): 2592263
- [5] 薛春迎, 刘建全, 廖志新, 等. 三种獐牙菜属植物花蜜腺的发育研究. 西北植物学报, 2001, 21(1): 1122116
- [6] 杨慧玲, 刘建全. 9 种 / 藏茵陈 0 原植物中 7 种有效化学成分的研究. 中草药, 2005, 36(8): 123321237.
- [7] Ziolkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994, 20: 1762183.
- [8] 何予卿, 张宇, 孙梅, 等. 利用 ISSR 标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 1232127
- [9] Jonsson BO, Jonsdottir IS, Cronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic sedge *Carex bigelowii*. *J Ecol*, 1996, 84: 4492459.
- [10] 古松, 蒋舜媛, 唐学芳, 等. 羌活和宽叶羌活简单重复序列区间扩增反应体系的正交优化. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 28922894
- [11] Wang XD, Wang ZP, Zou YP. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA isolation from leaves of wild grapevine dried with silica gel. *Plant Mol Biol Rep* 1996, 14(4): 3692373.
- [12] 盖钧镒. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [13] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 4032404.
- [14] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR2PCR 反应体系. 分子植物育种, 2005, 3(3): 4452450.
- [16] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜属植物种质资源 ISSR2PCR 反应体系的建立. 浙江林学院学报, 2007, 24(2): 1562161.
- [17] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴 ISSR2PCR 反应体系的建立与优化. 林业科学, 2006, 42(6): 26231.
- [18] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究. 西北植物学报, 2004, 24(5): 8992902
- [19] 潘坤, 王文泉, 吴翼, 等. 椰子 ISSR 体系优化. 中国农学通报, 2009, 25(4): 24229
- [20] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 桦树 ISSR2PCR 反应体系的优化. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91293
- [21] 曾黎辉, 洪自同, 许家辉, 等. 龙眼 ISSR 反应体系的建立和优化. 中国农学通报, 2007, 23(9): 1112113.