

云生毛茛 ISSR-PCR 体系优化与引物筛选

石琳^{1, 2} 胡延萍¹ 王建科^{1, 2} 王钧^{1, 2} 许小宁³ 李毅¹ 王莉¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省县镇企业技术组厂站, 西宁 810008)

摘要: 旨在建立稳定可靠的云生毛茛 ISSR-PCR 反应体系。采用正交试验设计方法, 对影响云生毛茛 ISSR-PCR 扩增结果的 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 五个因素进行优化筛选, 对反应程序进行优化, 建立适用于云生毛茛的最佳反应体系和扩增程序, 并对反应体系和扩增程序进行验证; 在此基础上筛选多态性好的 ISSR 引物, 采用梯度法筛选各个引物的最适退火温度。结果表明, 云生毛茛 20 μ L ISSR-PCR 的最佳反应体系为: 模板 DNA 30 ng, Mg^{2+} 1.95 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.04 U/ μ L, dNTP 0.150 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L; 最佳反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 49.6–60.6 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 下延伸 6 min。在优化的反应体系和反应程序条件下, 从 100 条 ISSR 引物中筛选获得 16 条 ISSR 扩增引物, 并确定了引物各自的最适退火温度。经过不同居群云生毛茛的验证, 证明优化后体系扩增条带清晰且重复性好, 可用于后续云生毛茛遗传多样性的研究。

关键词: 云生毛茛; ISSR-PCR; 正交实验设计; 体系优化; 引物筛选

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.09.010

Optimization of ISSR-PCR Reaction System on *Ranunculus nephelogenes* var. *nephelogenes* and Primer Selection

SHI Lin^{1, 2} HU Yan-ping¹ WANG Jian-ke^{1, 2} WANG Jun^{1, 2} XU Xiao-ning³ LI Yi¹ WANG Li¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Technology Extension Stations of Township Enterprises of Qinghai Province, Xining 810008)

Abstract: This work is aimed to establish a stable ISSR-PCR system for *Ranunculus nephelogenes* var. *nephelogenes*. A $L_{16} (4^5)$ orthogonal design was used to screen 5 main parameters (Mg^{2+} , dNTP, *Taq* DNA polymerase, primer, and template DNA); then the process of ISSR-PCR reaction was optimized, and consequently the optimal reaction system and amplifying procedure for *R. nephelogenes* var. *nephelogenes* was established; further, the optimized reaction system and amplifying procedure was verified. Results showed that the optimal concentrations in 20 μ L reaction mixture were template DNA 30 ng, Mg^{2+} 1.95 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.04 U/ μ L, dNTP 0.150 mmol/L, and primer 0.5 μ mol/L. The optimal reaction procedure was: pre-denaturalization for 5 mins at 94 $^{\circ}$ C, denaturalization for 20 s at 94 $^{\circ}$ C, renaturation for 1 min at 49.6–60.6 $^{\circ}$ C, followed by 38 cycles of extension for 100 s at 72 $^{\circ}$ C, and final extension for 6 min at 72 $^{\circ}$ C. Under the above optimized reaction system and procedure, 16 amplified primers were screened from 100 ISSR primers, and the optimal annealing temperature for each primer was determined. Verification in *R. nephelogenes* var. *nephelogenes* of different populations with the optimized ISSR system confirmed that bands amplified were clear and steady, thus the established ISSR-PCR could favor further studies on the genetic diversity of *R. nephelogenes* var. *nephelogenes*.

Key words: *Ranunculus nephelogenes* var. *nephelogenes*; ISSR-PCR; orthogonal design; optimization of system; primer selection

收稿日期: 2016-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300269), 青海 (应用) 基础研究计划项目 (2013-Z-756)

作者简介: 石琳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物生物技术; E-mail: silvia20@163.com

通讯作者: 王莉, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物遗传资源与繁育; E-mail: wangli@nwipb.cas.cn

云生毛茛 (*Ranunculus nephelogenes* var. *nephelogenes*) 为毛茛科 (*Ranunculaceae*) 毛茛属 (*Ranunculus* Linn.) 多年生草本, 生长于海拔 2 210–4 800 m 的高山草甸、沼泽草甸、河滩、湿地等处, 在我国主要分布于甘肃、青海、云南、四川、西藏和新疆等省区^[1]。同时云生毛茛是祁连山湿地主要的挺水植物之一, 在祁连山湿地水土保持和气候调节中占据重要地位。

目前对于云生毛茛的研究较少, 仅涉及药用价值、核型、繁育系统等研究。云生毛茛具有轻微毒性, 全草可入药, 有清热解毒, 利尿解表的功效^[2], 其中所含的毛茛黄酮有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理活性^[3, 4]; 毛茛苷类成分具有显著的抗炎、镇痛和抗心肌肥大等作用^[5, 6]; 开发和利用其药用价值前景广阔。聂谷华^[7]报道云生毛茛染色体数目为 32, 其核型公式 $2n = 4x = 32 = 16m + 10sm + 6st$, 核型类型 3B; 赵志刚等^[8-10]的研究认为云生毛茛为兼性无融合生殖, 性分配偏向雄性功能的分配, 并会随着自交率的增加而降低。

毛茛属中许多类群在形态上存在渐变性变化, 有些物种的分类学地位尚不确定。近年来, 分子生物学技术被应用于分类学中, Jensen 和 Hoot^[11]基于多个基因片段建立的系统树, 把毛茛科分成 3 个亚科: 黄连亚科、扁果草亚科和毛茛亚科。其中毛茛亚科包括 7 个族, 侧金盏花族单列为一族, 包括了美化草属、侧金盏花属和金莲花属 3 个属, 并认为侧金盏花族和毛茛族独立进化, 而且侧金盏花属和金莲花属的关系较近。Paun 等^[12]基于 ITS、*matK*、*trnK* 分子片段对毛茛属及其近缘类群的研究表明: 毛茛属的核心成员和水毛茛属近缘, 向外依次为角果毛茛属、碱毛茛属和鸦拓花属。尚未见利用分子标记技术研究云生毛茛遗传特征报道。

简单重复序列间扩增 (inter simple sequence repeat, ISSR) 分子标记技术是以简单序列重复标记 (simple sequence repeat, SSR) 标记为基础建立的第二代分子标记技术^[13], 利用基因组中存在的简单重复序列 SSR 设计引物, 在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1–4 个随机碱基, 以此作为 3' 或 5' 引物, 对两侧具有反向排列的 SSR 间的基因组片段进行扩增。与 SSR 相比, ISSR 技术具有无需预知研究对象的基因组序列、

无需设计专门引物、对 DNA 模板质量要求较低等优点, 广泛适用于不同植物的遗传多样性分析、种质鉴定、基因定位和比较基因组学研究等方向^[14-16]。利用 ISSR 技术对云生毛茛的遗传结构、遗传多样性进行分析, 将为研究祁连山湿地药用资源开发与保护提供重要实验依据。本研究以云生毛茛为研究对象, 在预实验基础上对影响 PCR 扩增结果的模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶及引物 5 个因子进行优化筛选, 以期建立适合于云生毛茛 ISSR 分子标记的 PCR 反应体系, 为后续深入研究云生毛茛遗传多样性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

样品于 2012 年采自青海省祁连山地区, 经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定为云生毛茛, 每个植株样品采集嫩叶, 迅速放入塑料自封袋中, 并加入硅胶干燥保存。凭证标本保存于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆 (采集号 2013001-2013002)。

本实验采用由加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 提供的 Set#9 引物序列^[17]作为 ISSR 扩增引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。经初步试验, 选用扩增片段清晰、多态性丰富的引物 UBC810 (5'-GAGAGAGAGAGAGAT-3') 作为建立反应体系的固定引物。实验中使用的 dNTP mixture、*Taq* DNA 聚合酶、10× Buffer、100 bp DNA Ladder、200 bp Ladder 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

C1000 Touch™ Thermal Cycler PCR 仪, 美国 Bio-Rad; Power Pac™ Universal 电泳仪, 美国 Bio-Rad; ChemiDoc™ MP 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad。

1.2 方法

1.2.1 云生毛茛基因组总 DNA 提取 采用改良 CTAB 法^[17]提取云生毛茛的基因组总 DNA。各取 3 μL DNA 样品, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测; 使用 Nano Drop 2000c 微量分光光度计测定 DNA 浓度、 A_{260} 和 A_{280} 值。DNA 纯度以 A_{260}/A_{280} 比值为标准进行评估。提取得到的云生毛茛基因组总 DNA 样品放入 -20℃ 冰箱保存。

1.2.2 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应体系优化 采

用正交设计法,设计以 Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、dNTP 浓度、引物用量、DNA 浓度为变量的五因素四水平正交实验(表1),研究各因素对扩增结果的影响。PCR 反应程序设置为:94℃预变性 5 min;94℃变性 20 s,58℃退火 1 min,72℃延伸 100 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 6 min。反应产物在

1.2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB)中电泳拍照。正交实验重复 2 次。参照何正文等的直观分析法^[18,19],对每一处理结果进行评分。依据条带清晰度、多态性、稳定性对各实验结果进行评分,特异性高、条带清晰、亮度最高的 16 分,最低 1 分。评分结果用 DPS 7.05 统计软件进行方差分析^[20]。

表 1 云生毛茛 ISSR-PCR 反应体系正交设计表

编号	$Mg^{2+}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/ $(\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1})$	dNTP/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	引物/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	模板 DNA/ng	评分结果	
						重复一	重复二
1	1.65	0.02	0.075	0.2	40	2	2
2	1.65	0.03	0.100	0.3	30	11	12
3	1.65	0.04	0.125	0.4	20	8	9
4	1.65	0.05	0.150	0.5	10	14	14
5	1.95	0.02	0.100	0.4	10	7	6
6	1.95	0.03	0.075	0.5	20	10	10
7	1.95	0.04	0.150	0.2	30	15	15
8	1.95	0.05	0.125	0.3	40	16	16
9	2.25	0.02	0.125	0.5	30	12	11
10	2.25	0.03	0.150	0.4	40	9	8
11	2.25	0.04	0.075	0.3	10	5	3
12	2.25	0.05	0.100	0.2	20	3	4
13	2.40	0.02	0.150	0.3	20	6	5
14	2.40	0.03	0.125	0.2	10	1	1
15	2.40	0.04	0.100	0.5	40	13	13
16	2.40	0.05	0.075	0.4	30	4	7

1.2.3 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应程序优化 设计 33、35、38、40 和 45 个扩增循环次数和 60 s、80 s、100 s、120 s 和 150 s 五个延伸时间,比较不同循环次数和延伸时间对 PCR 扩增结果的影响。

1.2.4 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增体系验证 以不同居群的云生毛茛基因组总 DNA 为模板,在优化得到的最佳反应条件下用引物 UBC810 进行 PCR 扩增,检验建立的扩增体系的稳定性。每个样品做两个重复。

1.2.5 引物筛选及其退火温度优化 应用以优化的反应体系与反应程序,选取一个云生毛茛基因组总 DNA 样品作为模板,分别与 100 条 ISSR 引物进行 PCR 扩增,选取扩增条带清晰、丰富、多态性好的引物作为云生毛茛 ISSR-PCR 扩增的最佳引物。再根据公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$,计算出各引物的理论退火温度 T_m 。在理论退火温度 T_m 值上下 1~3℃ 范围内,利用 PCR 仪自动生成的温度梯度进行 PCR

扩增,优化各引物的最佳退火温度。

2 结果

2.1 云生毛茛基因组总 DNA 提取结果

云生毛茛基因组总 DNA 凝胶电泳结果如图 1 所示,DNA 条带清晰明亮,无拖尾现象,说明所提取的云生毛茛基因组总 DNA 完整性好,无明显降解。微量分光光度计测得 DNA 样品浓度在 239~823 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 之间, A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8~2.0 之间,说明用改良 CTAB 法提取获得的 DNA 样品纯度较高,能够满足后续实验要求。

2.2 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应体系优化

云生毛茛正交实验电泳结果如图 2 所示,各因素不同浓度组合的扩增结果差异明显,其中实验 7 多态性位点多,且条带清晰明亮。对正交实验各处理扩增结果进行评分,评分结果,见表 1。

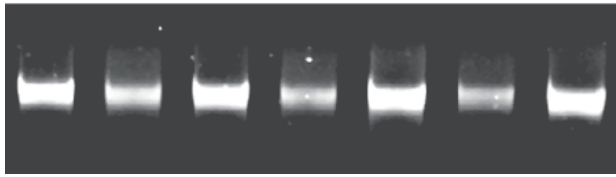


图1 云生毛茛基因组 DNA 电泳图

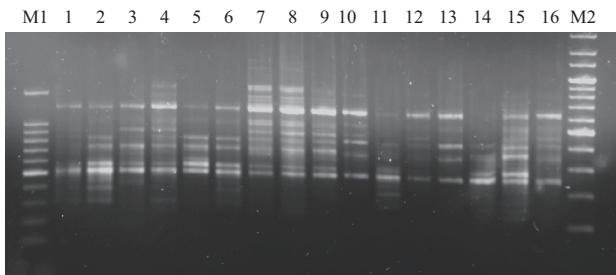


图2 云生毛茛正交实验电泳图

根据评分计算同一因素不同水平间极差 R 和平均值 X, 结果见表 2。极差值 R 越大, 说明该因素对扩增结果的影响越大; 平均值 X 最大的因素水平即为该因素的最佳浓度。表 2 中结果显示, 各因素对扩增结果的影响从大到小依次为引物 > Mg²⁺ > dNTP > DNA > Taq DNA 聚合酶; Mg²⁺ 和 DNA 水平 2、

Taq DNA 聚合酶水平 3、dNTP 和引物水平 4 最好, 即模板 DNA 30 ng, Mg²⁺ 1.95 mmol/L, Taq DN 聚合酶 0.04 U/μL, 引物 0.5 μmol/L, dNTP 0.150 mmol/L。

方差分析 (表 3) 结果显示, 各因素对实验结果均有影响, 且每个因素对扩增结果的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。F 值显示的各因素对扩增结果的影响从大到小依次为引物 > Mg²⁺ > dNTP > DNA > Taq DNA 聚合酶, 与极差法分析的结果一致。为确定每个因素的最适浓度水平, 对 5 个因素进行 Duncan 多重比较, 结果见表 4。

引物是影响云生毛茛 ISSR-PCR 扩增结果的最大因素, 本实验中当引物浓度为 0.5 μmol/L 时极差分析评分结果均值最大, 且与其它水平之间差异显著, 因此选择 0.5 μmol/L 为最佳引物浓度。

Mg²⁺ 对云生毛茛 ISSR-PCR 反应的影响仅次于引物, 本实验中当 Mg²⁺ 浓度为 1.95 mmol/L 时极差分析评分结果均值最大, 且与其它水平之间差异显著, 因此选择 1.95 mmol/L 为 Mg²⁺ 最佳浓度。

dNTP 是 ISSR-PCR 扩增反应的重要原料, 本实验中当 dNTP 浓度为 0.150 mmol/L 时评分结果均值最大, 且与其它水平之间差异显著。因此选择 0.150

表 2 云生毛茛正交实验直观分析结果

计算结果	Mg ²⁺	Taq DNA 聚合酶	dNTP	引物	模板 DNA
T1	72	51	43	43	79
T2	95	62	69	74	87
T3	55	81	74	58	55
T4	50	78	86	97	51
X1	9.0000	6.3750	5.3750	5.3750	9.8750
X2	11.8750	7.7500	8.6250	9.2500	10.8750
X3	6.8750	10.1250	9.2500	7.2500	6.8750
X4	6.2500	9.7500	10.7500	12.1250	6.3750
R	5.6250	3.7500	5.3750	6.7500	4.5000

注: T1-T4 为每一因素同一水平下的总和; X1-X4 为每一因素同一水平下的平均值; R 为极差

表 3 正交实验方差分析

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
Mg ²⁺	154.7500	3	51.5833	77.3750	0.0001**
Taq DNA polymerase	74.2500	3	24.7500	37.1250	0.0001**
dNTP	123.2500	3	41.0833	61.6250	0.0001**
Primer	200.2500	3	66.7500	100.1250	0.0001**
DNA	117.5000	3	39.1667	58.7500	0.0001**
Error	10.0000	15	0.6667		

注: ** 表示 0.01 水平差异极显著

表 4 各因素水平间 Duncan 多重比较

Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	均值	Taq DNA 聚合酶/(U·μL ⁻¹)	均值	dNTP/(mmol·L ⁻¹)	均值	Primer/(μmol·L ⁻¹)	均值	DNA/ng	均值
1.95	11.8750a	0.04	10.1250a	0.150	10.7500a	0.5	12.1250a	30	10.8750a
1.65	9.0000b	0.05	9.7500a	0.125	9.2500b	0.3	9.2500b	40	9.8750b
2.25	6.8750c	0.03	7.7500b	0.100	8.6250b	0.4	7.2500c	20	6.8750c
2.40	6.2500c	0.02	6.3750c	0.075	5.3750c	0.2	5.3750d	10	6.3750c

注:在 0.05 水平上,不同字母表示处理间差异显著,相同字母表示差异不显著

mmol/L 为 dNTP 的最佳浓度。

本实验中 DNA 含量为 30 ng 时极差分析评分结果均值最大,且与其它水平之间差异显著。因此选择 30 ng 为 DNA 的最佳用量。Taq DNA 聚合酶浓度对扩增结果影响最小,当 Taq DNA 聚合酶浓度为 0.04 U/μL 时,极差分析评分结果均值最大,与低浓度水平 1、2 间差异显著,但与高浓度水平 4 (0.05 U/μL) 无显著差异。因此从经济角度选择 0.04 U/μL 为 Taq DNA 聚合酶的最佳浓度。

综上分析结果确定云生毛茛 ISSR-PCR 最佳反应体系为:每 20 μL 反应体系模板 DNA 30 ng, Mg²⁺ 1.95 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.04 U/μL, 引物 0.5 μmol/L, dNTP 0.150 mmol/L。

2.3 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应程序优化

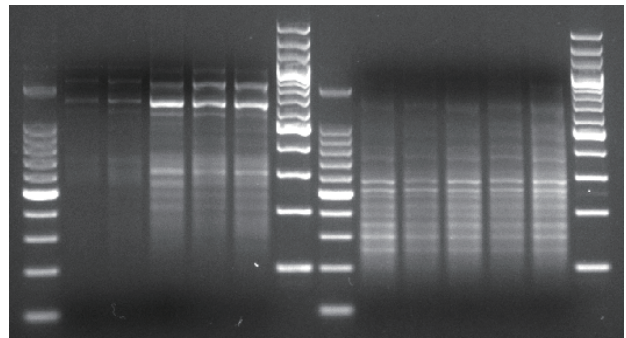
不同循环次数下云生毛茛 ISSR-PCR 扩增结果如图 3 所示,38 个循环的扩增可获得明亮清晰的条带,循环次数再增加,条带无明显变化,说明该扩增体系在 38 循环时到达平台期。

不同延伸时间下的云生毛茛 ISSR-PCR 扩增结果(图 3)显示,延伸时间在 60–80 s 之间时,条带丰富但比较模糊,延伸时间在 100–120 s 之间时条带丰富、清晰明亮,且扩增结果并没有明显差异,延伸时间在 150 s 时产生了非特异性条带。为了保证扩增结果同时减少扩增时间,本实验选择了 100 s 作为最适延伸时间。

2.4 云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应体系验证

采用优化所得的 ISSR-PCR 反应体系,引物 UBC810 与不同居群的云生毛茛基因组总 DNA 样品进行扩增反应,每个样品做两个重复。扩增结果如图 4 所示,不同居群样本在该体系下均能获得清晰丰富且重复性好的扩增条带,证明此体系稳定可靠,适合云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应。

M1 1 2 3 4 5 M2 M1 6 7 8 9 10 M2



1–5:循环次数依次为 33、35、38、40、45;6–10:延伸时间依次为 60 s、80 s、100 s、120 s、150 s; M1:100 bp DNA Marker、M2:200 bp DNA Marker

图 3 不同循环次数与不同延伸时间下的扩增结果

2.5 引物筛选及其退火温度优化

通过对 100 条引物的筛选,共得到 16 条 ISSR-PCR 扩增结果良好的引物。温度梯度 PCR 扩增结果(图 5)显示,退火温度对 PCR 扩增结果影响明显。退火温度为 52.2℃ 时扩增条带最丰富,明亮清晰,稳定性好,因此选择该温度为此引物的最适退火温度。16 条引物的序列及各自最适退火温度,见表 5。

3 讨论

ISSR 分子标记技术广泛应用于各种药用植物的种质鉴定与分类、遗传多样性分析等,比传统形态学、细胞学方法更加准确可靠,同时比基因测序等新技术手段更加方便经济。但 ISSR 扩增结果易受到 Mg²⁺、引物、dNTPs 及 Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 等因素的影响。建立精确的 ISSR-PCR 反应体系和反应程序,对保证 ISSR 实验结果的可靠性十分必要。

正交实验设计能用较少处理组合获得各因素不同水平对扩增结果的影响,考察不同因素对扩增结果的影响显著性。在本实验中扩增结果的直观分析结果表明不同因素的各水平组合对云生毛

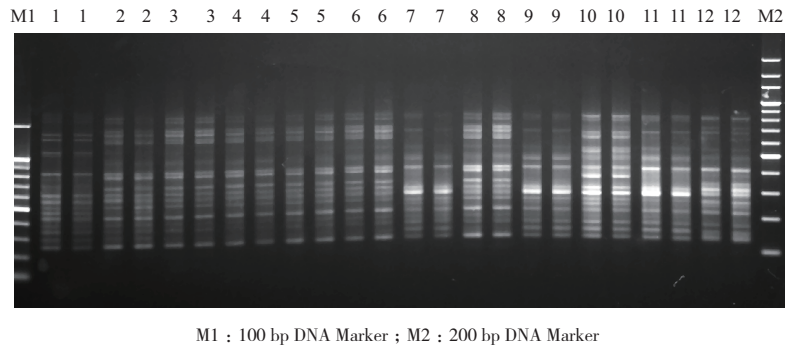
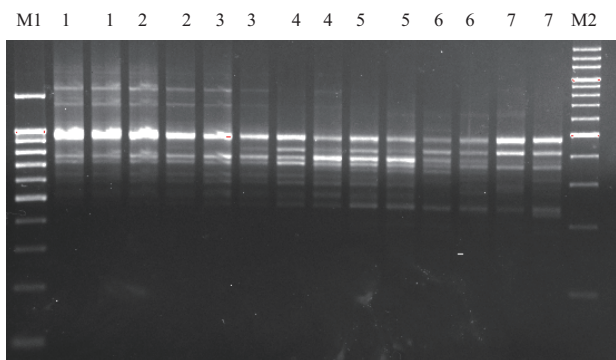


图 4 引物 UBC810 与不同云生毛茛个体的扩增结果



1-7: 退火温度依次为 49.1、50.1、52.2、55.3、59.1、62.3、64.1℃; M1: 100 bp DNA Marker; M2: 200 bp DNA Marker

图 5 引物 (UBC812) 不同退火温度下的扩增结果

表 5 筛选所得引物及其最适退火温度

引物	引物序列 (5'-3')	退火温度 /℃
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	54.2
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	54.2
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52.2
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52.2
813	CTCTCTCTCTCTCTC	49.6
817	CACACACACACACAAA	52.2
823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	54.2
825	ACACACACACACACACT	54.7
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	53.6
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	57.8
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	53.6
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	55.5
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	53.9
881	GGCTGGGCTGGGCTG	60.6
888	BDBCACACACACACACA	52.4
889	DBDACACACACACACAC	50.8

注: B= (C, G, T); Y= (C, T); D= (A, G, T)

茛 ISSR 扩增结果影响较大; 极差分析结果显示各因素对扩增结果的影响由大到小依次是: 引物 > Mg^{2+} > dNTP > DNA > Taq DNA 聚合酶; 方差分析结果与极差分析结果一致, 且每个因素对扩增结果均有极显著影响。

引物是影响云生毛茛 ISSR 扩增反应最大的因子, 引物浓度低会降低 ISSR 体系的扩增效率, 浓度过高则会引起错配和非特异性扩增, 并容易形成引物二聚体。该结论与杂交油菜^[21]的 ISSR 体系建立等研究结果一致。 Mg^{2+} 浓度过高, PCR 扩增反应特异性降低, 会出现非特异扩增, 浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶活性, 降低 ISSR 体系的扩增效率。 Mg^{2+} 对云生毛茛 ISSR-PCR 扩增结果同样有极显著影响, 但其影响力小于引物。而在黔产宽叶缬草^[22]、紫云英等^[23] ISSR 扩增体系中, Mg^{2+} 对扩增结果影响最大。说明在不同物种, 各影响因素对扩增结果影响不同。通过对影响扩增结果的主要因素进行优化筛选, 建立针对研究物种的最佳反应体系是十分必要的。优化获得的体系对不同样品均能获得清晰明亮, 丰富高, 重复性好的扩增结果, 证明该体系适合云生毛茛 ISSR-PCR 扩增。

同一引物在不同物种的 ISSR 扩增体系中最适退火温度也各不相同, 甚至差异巨大。如引物 UBC810 在本实验中对云生毛茛 ISSR-PCR 扩增反应的最适退火温度为 52.2℃, 而在瓜蒌^[24]的 ISSR-PCR 反应体系中, 最适退火温度为 53.6℃, 在长叶红砂^[25]的 ISSR-PCR 扩增体系中的最适退火温度为 48℃。因此应在理论退火温度的基础上, 针对不同物种对引物的退火温度进行适当的筛选与调整, 以期获得稳

定可靠的扩增图谱。

4 结论

采用正交实验设计,对实验结果进行直观分析、极差分析和方差分析,确定了模板 DNA、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、dNTP 五个主要因素对云生毛茛 ISSR-PCR 扩增的影响力大小及最佳用量,最终确定云生毛茛 ISSR-PCR 的最佳反应体系为:20 μ L 反应体系中,包含模板 DNA 30 ng, Mg^{2+} 1.95 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.04 U/ μ L, 引物 0.5 μ mol/L, dNTP 0.15 mmol/L;通过对循环次数和延伸时间的优化确立云生毛茛 ISSR-PCR 扩增的最佳反应程序,即为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 49.6–60.6 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 共 38 个循环;72 $^{\circ}$ C 下再延伸 6 min。验证实验表明,该体系稳定可靠,适于云生毛茛的 ISSR-PCR 扩增。

参考文献

- [1] 张胜邦, 卢学峰. 青海澜沧江源种子植物 [M]. 西宁: 青海民族出版社, 2012.
- [2] 卢学峰, 张胜邦. 青海野生药用植物 [M]. 西宁: 青海民族出版社, 2012.
- [3] 崔秀君. 小毛茛抗肿瘤有效部位的化学成分的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [4] 钟艳梅, 冯毅凡. 毛茛属药用植物中黄酮和内酯类成分的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42 (4): 825-828.
- [5] 王榕乐, 谭毓治. 毛茛总苷对血管紧张素 II 致心肌肥大的影响 [J]. 广东药学院学报, 2008, 24 (2): 154-156.
- [6] 王榕乐, 谭毓治, 罗绍宝. 毛茛总苷抗炎镇痛作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (2): 290-292.
- [7] 聂谷华, 廖亮, 方亮, 等. 国产毛茛属植物五种一变种的核型 [J]. 云南植物研究, 2007, 29 (3): 316-322.
- [8] 赵志刚, 杜国祯, 任青吉. 5 种毛茛科植物个体大小依赖的繁殖分配和性分配 [J]. 植物生态学报, 2004, 28 (3): 9-16.
- [9] 赵志刚, 杜国祯, 刘左军. 雌雄同花植物的性分配 [J]. 生态学报, 2005, 25 (10): 2725-2733.
- [10] 赵志刚, 杜国祯. 毛茛科植物交配系统的特征与花期资源分配对策 [J]. 兰州大学学报, 2003, 39 (5): 70-74.
- [11] Jensen U, Hoot SB, Johansson JT, et al. Systematics and phylogeny of the Ranunculaceae—revised family concept on the basis of molecular data [J]. *Pl Syst Evol*, 1995, 9 (Suppl): 273-280.
- [12] Paun O, Lehnebach C, Johansson JT, et al. Phylogenetic relationships and biogeography of *Ranunculus* and allied genera (*Ranunculaceae*) in the Mediterranean region and in the European Alpine System [J]. *Taxon*, 2005, 54: 911-930.
- [13] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [14] Godwin ID, Aitken EA, Smith LW. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1524-1528.
- [15] Moreno S, Martin JP, Ortiz M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm [J]. *Euphytica*, 1998, 101: 117-125.
- [16] Fang DQ, Krueger RR, Roose ML. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Amer Soc Horticult Sci*, 1998, 123: 612-617.
- [17] 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.
- [18] 贺石林. 中医科研设计与统计方法 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1989.
- [19] 何正文, 刘运生, 陈立. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23 (4): 403-404.
- [20] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统—实验设计、统计分析及模型优化 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [21] 彭秉玉, 胡延萍, 巩爱岐, 等. 杂交油菜 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 植物研究, 2010, 30 (5): 576-581.
- [22] 钱志瑶, 周道堂, 黄秀平, 等. 黔产宽叶缬草 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 生物技术通报, 2015, 31 (7): 69-75.
- [23] 孙清信, 陈坚, 张辉, 等. 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 5: 870-878.
- [24] 王真真, 韩琳娜, 郭庆梅, 等. 瓜蒌 ISSR-PCR 最佳反应体系的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40 (10): 2094-2096.
- [25] 王玉山, 张颖娟. 濒危植物长叶红砂 ISSR 扩增条件的优化与引物筛选 [J]. 内蒙古师范大学学报: 自然科学汉文版, 2008, 37 (3): 417-421.

(责任编辑 马鑫)