

## 黔产苦参 ISSR-PCR 反应体系正交优化研究

金燕, 龙庆德, 常楚瑞\*, 陆平祝, 王晓丽 (贵州医科大学, 贵州贵阳 550004)

**摘要** [目的] 确定适合苦参稳定的 ISSR-PCR 反应体系。[方法] 采用经典的 CTAB 法提取苦参新鲜幼嫩叶片 DNA; 针对  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板 DNA 和 *Taq* DNA 聚合酶进行正交设计  $L_{16}(4^5)$ , 优化黔产苦参 ISSR-PCR 反应体系。[结果] 最适 ISSR-PCR 反应体系为: 模板 DNA 90 ng、0.4  $\mu\text{mol/L}$  引物、2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、0.5 mmol/L dNTPs。[结论] 建立的苦参 ISSR-PCR 反应体系, 经过 19 份苦参样品检验, 证明该体系稳定可靠, 可用于苦参遗传多样性分析。

**关键词** 苦参; CTAB; ISSR-PCR 反应体系; 正交设计

**中图分类号** S567.5<sup>+</sup>3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)16-114-03

### Orthogonal Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Sophora flavescens* Ait.

JIN Yan, LONG Qing-de, CHANG Chu-ru<sup>\*</sup> et al (Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004)

**Abstract** [Objective] To select a suitable method of ISSR-PCR reaction system for *Sophora flavescens* Ait. [Method] Modified CTAB method was used to extract the genomic DNA from fresh young leaves of *S. flavescens*. The suitable ISSR-PCR reaction system was established by orthogonal design  $L_{16}(4^5)$  based on the  $Mg^{2+}$ , dNTPs, primer, template DNA and *Taq* DNA. [Result] The optimal conditions in 25  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR system were 90 ng DNA template, 0.4  $\mu\text{mol/L}$  primer, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.5 U *Taq* DNA Polymerase, and 0.5 mmol/L dNTPs. [Conclusion] The established ISSR-PCR reaction system is verified by 19 samples of *S. flavescens*, which verifies that this system is stable and reliable, and can be used for the analysis of genetic diversity of *S. flavescens*.

**Key words** *Sophora flavescens* Ait; CTAB; ISSR-PCR reaction system; Orthogonal test

苦参(*Sophora flavescens* Ait.)为豆科槐属植物,是我国常用的传统中药,全国各地均有分布。临床研究证实,苦参中含有多种化学成分,具有广泛的药理作用<sup>[1-2]</sup>,其临床主要用来治疗寄生虫病、细菌性疾病、乳糜尿、哮喘、心率失常、慢性乙型肝炎、肾小球肾炎、肝硬化腹水<sup>[3]</sup>、癌症、失眠症、躁狂症、皮肤病、妇科炎症(如痛经、白带、尿道炎)等。

近年来,随着分子生药学的推广,从分子水平上对中药材进行相关研究受到关注,方法也得以完善,为准确、科学地评价苦参种质资源提供了有利工具<sup>[4]</sup>。简单重复序列区间(ISSR)是1994年发展的一种基于微卫星系列的分子标记技术,用于检测简单重复序列(SSR)间DNA序列差异,具有不需要知道序列信息、简便、快捷、重复性好等特点,比随机扩增多态性DNA标记(RAPD)具有更高的可重复性和稳定性,该技术已经广泛应用于中药材遗传多样性与亲缘关系研究,并取得了较好的成效<sup>[5]</sup>。苦参的化学成分、提取工艺、药理、临床及农业应用等几个方面国内外的研究比较多<sup>[1-3]</sup>,苦参的分子生物学方面的研究还处于起步阶段。该试验采用经典溴化十六烷基三甲胺法(CTAB)法提取苦参DNA,针对ISSR-PCR反应体系  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板DNA和*Taq* DNA聚合酶这5个主要因素进行正交设计,优化黔产苦参ISSR-PCR反应体系,为苦参遗传多样性的研究奠定基础。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器。METTLER TOLEDO 电子天平[梅特勒-托利

多仪器(上海)有限公司], HH-Z 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司), TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂), DYY-2C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), 核酸蛋白分析仪(DU640型), BIO-RAD ChemiDoc XRS+ 化学发光成像仪(美国BIO-RAD), BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量PCR检测仪(美国BIO-RAD)。

**1.1.2 试剂。**  $\beta$ -巯基乙醇、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、液氮、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶、EDTA- $Na_2$ (乙二胺四乙二钠盐)、CTAB(溴化十六烷基三甲胺)、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、GoldView 核酸染料、6 $\times$  loading buffer、核糖核酸酶。

**1.1.3 试材。** 苦参由野外采收,经贵州医科大学药用植物学与生药学教研室常楚瑞老师鉴定为苦参(*Sophora flavescens* Ait.),将采收回来的苦参种植以备后续试验所需,以苦参新鲜幼嫩叶片为DNA提取的材料。

### 1.2 方法

**1.2.1 经DNA的提取与检测。** 根据文献[6]的CTAB法略做改进,提取苦参DNA,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的片段大小、降解情况及浓度。取8  $\mu\text{L}$  DNA原液,加2  $\mu\text{L}$  6 $\times$  loading Buffer,混匀后点入琼脂糖凝胶,100 V 恒压电泳40 min,凝胶成像仪上观察并拍照。

**1.2.2 核酸蛋白分析仪检测。** 取1  $\mu\text{L}$  DNA原液,用微量分光光度计测定提取DNA的 $A_{260/280}$ 值。 $A_{260/280}$ 应在1.80~2.00,低于1.80说明蛋白质、多糖和苯酚未除尽,高于2.00说明可能还含有RNA。

**1.2.3 单因素试验。** PCR反应体系总体积为25  $\mu\text{L}$ ,内含 $Mg^{2+}$ 浓度2 mmol/L、dNTPs浓度0.4 mmol/L、引物0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、模板DNA 30 ng、*Taq* DNA聚合酶1 U。PCR扩增程序为95  $^{\circ}\text{C}$  预变性5 min、95  $^{\circ}\text{C}$  变性30 s、58  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸60 s,35个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min<sup>[7]</sup>。扩增产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳检测,GoldView 核酸染料染色,在1 $\times$

**基金项目** 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合ZY字[2012]3004号);贵州省科技计划项目(黔科合重大专项字[2015]6009-2)。

**作者简介** 金燕(1987-),女,贵州六盘水人,初级药师,硕士,从事生药学研究。\*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事分子生药学、中草药质量标准及研发工作。

**收稿日期** 2016-04-20

TAE 缓冲液中 100 V 恒压电泳 40 min, 凝胶成像仪上观察并拍照。以预设反应体系为基础, 对模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$ 、

*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 这 5 个主要影响反应体系因素进行条件摸索, 预设的各因素浓度水平如表 1 所示。

表 1 苦参 ISSR-PCR 单因素试验水平

Table 1 Levels of ISSR-PCR single factor test of *S. flavescens*

水平 Level	模板 DNA Template DNA//ng	引物 Primer $\mu\text{mol/L}$	$Mg^{2+}$ mmol/L	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> polymerase//U	dNTP mmol/L
1	10	0.10	1.50	0.50	0.30
2	30	0.20	1.90	0.75	0.35
3	50	0.30	2.30	1.00	0.40
4	70	0.40	2.70	1.25	0.45
5	90	0.50	3.10	1.50	0.50
6	110	0.60	3.50	1.75	0.55
7	130	0.70	4.00	2.00	0.60

1.2.4 ISSR-PCR 反应体系的正交优化。通过预试验, 以模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 这 5 个主要影响反应体系因素<sup>[8-11]</sup>, 最适引物 UBC 881 (GGGTGGGGT-

GGGGTG) 进行正交试验, 每个因素选择 4 个水平, 设计因素水平 (表 2)。

表 2 ISSR-PCR 反应体系正交因素水平

Table 2 Orthogonal factors and levels of ISSR-PCR reaction system

水平 Level	A (模板 DNA) Template DNA//ng	B (引物) Primer// $\mu\text{mol/L}$	C ( $Mg^{2+}$ ) mmol/L	D ( <i>Taq</i> DNA 聚合酶) <i>Taq</i> polymerase//U	E (dNTPs) mmol/L
1	30	0.1	1.5	0.5	0.3
2	60	0.2	2.0	1.0	0.4
3	90	0.3	3.0	1.5	0.5
4	120	0.4	4.0	2.0	0.6

表 3  $L_{16}(4^5)$  正交设计试验

Table 3 The  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design test

编号 Code	A	B	C	D	E
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2
$k_1$	8.250	11.250	10.500	10.000	6.000
$k_2$	8.250	5.000	11.250	9.500	12.000
$k_3$	10.500	12.000	6.500	7.750	11.500
$k_4$	8.000	6.750	6.750	7.750	5.500
R	2.500	7.000	4.750	2.250	6.500

1.3 数据分析 依据扩增条带的多少、清晰度、亮度和杂带的有无对 PCR 扩增结果进行打分, 最低分 0 分, 最高分为 16

分。求出同因素不同水平间的极差值  $R$ , 对各因素不同水平均值  $K_i$  值制作 Excel 表进行数据分析, 确定各因素的最优用量和浓度水平。

## 2 结果与分析

2.1 DNA 检测 由图 1 可见, 经典 CTAB 法提取的 DNA 条带清晰, 分子量大小一致, 电泳条带较亮, 说明该方法提取 DNA 浓度较高, 其  $A_{260/280}$  为 1.8 ~ 2.0, DNA 浓度为 795 ~ 2 800  $\mu\text{g/mL}$ , 说明 CTAB 法提取的 DNA 质量较高, 可用于后续试验。

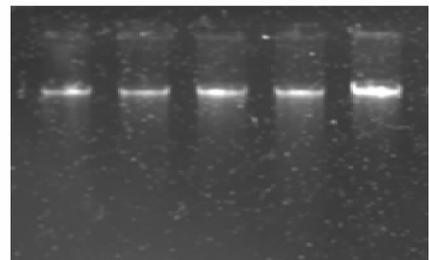


图 1 CTAB 法提取苦参 DNA 电泳图

Fig. 1 DNA electrophoretogram of *S. flavescens* by CTAB method

2.2 单因素试验 模板 DNA、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 在浓度范围内扩增的条带较多且清晰明亮。引物浓度在 0.1 和 0.3  $\mu\text{mol/L}$  时较其他浓度条带多, 扩增效果好。依据单因素试验结果, 选择扩增效果好的浓度范围, 重新划

分4个浓度梯度(表2),作为正交试验各因素的水平。

**2.3 ISSR 引物扩增检测** 从图2可看出,由于模板DNA、引物、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA聚合酶和dNTPs 5种影响因素组合的不同,扩增效果存在明显差异。4和14号没有扩增条带,8和10号有微弱的扩增,1、2、3、7、9、11和13号有明显的扩增,1、2、3、9、11和13号泳道有弥撒现象,9、11和13号扩增多态性较1、2、3和7号好,5、6、15、16号有明显的扩增,条带清晰可辨,但亮度较暗,因此综合扩增条带的数目、强弱清晰度和可分辨率等指标比较,12号因素水平组合(模板DNA 90 ng、0.4  $\mu$ mol/L引物、2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.5 mmol/L dNTPs)扩增的效果最好,条带相对较多且清晰。由表3可知,苦参ISSR-PCR体系中含因素影响从大到小依次为引物、dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、模板DNA、*Taq* DNA聚合酶,可见,引物影响最大,而*Taq* DNA聚合酶影响最小。最佳的ISSR-PCR反应体系为 $A_3B_3C_2D_1E_2$ ,即模板DNA 90 ng、0.3  $\mu$ mol/L引物、2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.4 mmol/L dNTPs,与电泳图的直观分析相比,只有引物和dNTPs浓度不一样,所以正交试样12号为最佳的ISSR-PCR反应条件。根据确定的ISSR-PCR反应体系对19份苦参样品检验,结果条带多且清晰明亮,证明该体系稳定可靠,可用于苦参遗传多样性分析。

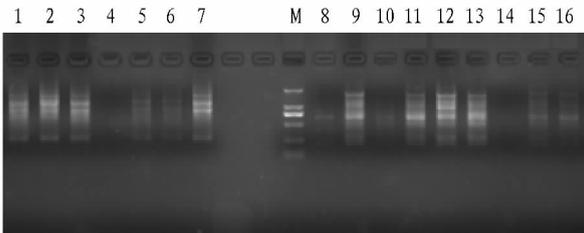


图2 正交设计ISSR-PCR反应体系扩增结果

Fig.2 Amplificated results of ISSR-PCR reaction system of orthogonal design

### 3 讨论与结论

苦参的化学成分主要有生物碱和黄酮类化合物,同时含有糖、酚和蛋白质等一些次生代谢物质,该试验以苦参新鲜幼嫩叶片为试验材料,用经典CTAB法对苦参进行DNA提取,结果提取的DNA质量较好,可以满足后续试验。

引物浓度会对PCR所扩增的带型产生明显的影响,浓度过低时PCR产率会大大降低,甚至不能扩增,浓度过高时

PCR所扩增的条带会变得模糊,还会产生新的位点,非特异性扩增增加; $Mg^{2+}$ 作为ISSR-PCR反应中的一个主要因素,其浓度的变化对整个PCR反应中的*Taq* DNA聚合酶的活性、引物的退火温度以及PCR扩增条带的特异性均有一定的影响;DNA模板量也是影响ISSR-PCR扩增效果的主要因素之一,模板量过低,无扩增产物或产物少而不稳定,量过高,又会导致扩增条带的模糊和非特异性产物的出现;酶的用量在PCR反应中也是一个重要的影响因素,浓度过低则不能扩增,浓度太高又会产生非特异性扩增且增加成本;dNTPs是PCR扩增反应中磷酸基团的主要原料,dNTPs的浓度对PCR反应有至关重要的影响,当dNTPs浓度较高(>200  $\mu$ mol/L)时,可加快PCR的反应速度,但同时也会增加碱基的错误掺入率与试验成本,当dNTPs浓度较低(<50  $\mu$ mol/L)时,则会导致PCR的产率下降,因此,dNTPs的浓度常控制在50~200  $\mu$ mol/L为最佳<sup>[11]</sup>。该研究通过ISSR-PCR反应体系的建立与优化,确定最适黔产苦参ISSR-PCR的反应体系为模板DNA 90 ng、0.4  $\mu$ mol/L引物、2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.5 mmol/L dNTPs。苦参ISSR-PCR反应体系的建立填补了国内苦参ISSR分子标记的空白,为利用分子标记技术研究苦参种质资源鉴定和遗传多样性等提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 蔡艳.苦参素药理作用研究进展[J].实用中医药杂志,2016,32(4):387-388.
- [2] 闫德祺,闰英男,阿力木·买买提,等.苦参活性成分的抗肿瘤作用机制研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(24):4776-4779.
- [3] 王景叶,马玉萍,恩替卡韦联合苦参素片治疗慢性乙型肝炎41例[J].陕西医学杂志,2009,38(10):1365-1367.
- [4] 段永红,渠云芳,王长彪,等.药用植物苦参SSR-PCR体系的优化与验证[J].中国农业大学学报,2014,19(5):95-100.
- [5] 李喜凤,邱天宝,张红梅,等.蒲公英遗传多样性的ISSR分析[J].中草药,2012,43(10):2025-2029.
- [6] 黄丽霞,罗静,李文超,等.不同方法从苦豆子中提取DNA的效果比较研究[J].宁夏农林科技,2009(3):8-9.
- [7] 任凤鸣,胡开治,刘燕琴,等.传统中药金钱草ISSR-PCR反应体系的正交优化研究[J].中国中药杂志,2014,39(12):2233-2238.
- [8] 阳翠,刘萍,刘姣蓉,等.苦豆子ISSR标记的遗传多样性分析[J].中草药,2013,44(10):1323-1327.
- [9] 王晓丽,张旭,王晓多.金樱子ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J].时珍国医国药,2015,26(3):634-635.
- [10] 李鸿雁,李志勇,师文贵,等.3种生态型野生扁蓿豆种质资源ISSR与SSR遗传多样性分析[J].草业学报,2012,21(5):107-113.
- [11] 张福生,郭顺星.金线莲ISSR反应体系的建立与优化[J].中草药,2011,42(1):137-142.
- [11] 翟红莉,刘寿柏,蔡真金,等.海南4个不同产地益智果挥发油成分的GC-MS分析[J].广东农业科学,2015(19):83-86.
- [12] 刘晓静.益智自然种群的演化和遗传多样性评价[D].海口:海南大学,2008:44,47-48,50,53.
- [13] WANG H Y, LIU X J, WEN M F, et al. Analysis of the genetic diversity of natural populations of *Alpinia oxyphylla* Miquel using inter-simple sequence repeat markers[J]. Crop Sci, 2012, 52:1767-1775.
- [14] 邹颖.益智(姜科)遗传多样性和遗传结构的研究[D].北京:中国科学院大学,2013:32,35,42-43.
- [15] SLATKIN M. Gene flow in natural populations [J]. Annual review of ecology and systematics, 1985, 4:393-430.

(上接第108页)

- [7] 莫定鸣.不同高良姜栽培种苗期耐阴性研究[D].湛江:广东海洋大学,2014:1-2,4.
- [8] 李斌,顾万春,卢宝明.白皮松天然种群种实性状表型多样性研究[J].生物多样性,2002,10(2):252-255.
- [9] 谢春平,方彦,方炎明.乌冈栎天然居群叶表型变异[J].四川农业大学学报,2011,29(2):191-198.
- [10] CHEN F, LI H L, TAN Y F, et al. Different accumulation profiles of multiple components between pericarp and seed of *Alpinia oxyphylla* capsular fruit as determined by UFLC-MS/MS [J]. Molecules, 2014, 19: 4510-4523.