

黑老虎 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化^{*}

唐健民, 漆小雪, 蒋运生, 熊忠臣, 邹 蓉^{**}

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006)

摘要:为建立和优化特色药食两用植物黑老虎(*Kadsura coccinea*)的 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序,通过正交和单因素试验研究 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA、退火温度及循环次数等因素对黑老虎 ISSR-PCR 反应体系扩增效果的影响。结果表明,在 20 μ L 的反应体系中,最佳扩增条件为 Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L、dNTPs 浓度 0.1 mmol/L、引物浓度 0.6 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶用量 1.50 U、模板 DNA 用量 45 ng,退火温度 50.4 $^{\circ}$ C,循环 40 次。这一优化体系的建立可为深入开展黑老虎种质资源遗传多样性研究奠定基础。

关键词:黑老虎 ISSR-PCR 正交设计 单因素试验 反应体系优化

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2020)04-0406-07

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20200924.008

0 引言

黑老虎(*Kadsura coccinea*)是五味子科南五味子属藤本植物,别名冷饭团、过山龙藤,生于江西、福建、湖南、广东、广西、四川、贵州、云南等地。黑老虎茎、叶一年四季青绿,可用于绿廊、凉亭等园林配置^[1]。其果型为聚合果,果大有光泽,表面纹理像菠萝,垂吊如灯笼,具有较高的观赏价值。黑老虎根可入药,活血行气,消肿止痛,治疗胃病,亦常用于妇科^[2]。目前,市场上对黑老虎的关注度越来越高,而野生资源的过度采挖,致使黑老虎种群生存情况不容乐观^[3]。国内外关于黑老虎化学成分、药理作用、挥

发油成分、栽培技术的研究较多^[4-13],但有关其遗传多样性的研究并不多见。为准确揭示黑老虎遗传多样性,急需建立其特定的多样性检测体系。ISSR 是一种建立在 PCR 技术基础上的 DNA 分子标记,具有操作方便、低成本、遗传多态性高等特点,已广泛应用于种质资源鉴定、遗传多样性分析等研究领域^[14-18]。每一个物种的 ISSR-PCR 反应体系最适宜的条件不同,黑老虎的最适宜条件需进一步摸索。本文运用正交设计及单因素试验相结合的方法,对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶用量、DNA 模板用量、扩增程序中退火温度及循环次数等黑老虎 ISSR-PCR 反应体系的关键参数进行系统研究,以期建立并优化黑老虎的 ISSR-PCR 反应

^{*} 桂林市科技计划(20160223-1),广西科技攻关项目(桂科 AB18221091),中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY1949013),广西科技基础和人才专项(桂科 AD17129022)和广西植物功能物质研究与利用重点实验室项目(ZRJJ2018-10)资助。

【作者简介】

唐健民(1988—),男,助理研究员,主要从事药用植物学和保护生物学研究。

【**通信作者】

邹 蓉(1982—),女,副研究员,主要从事药用植物学和保护生物学研究,E-mail:175183030@qq.com。

【引用本文】

唐健民,漆小雪,蒋运生,等.黑老虎 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].广西科学,2020,27(4):406-412.

TANG J M, QI X X, JIANG Y S, et al. Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Kadsura coccinea* [J]. Guangxi Sciences, 2020, 27(4): 406-412.

体系,为其遗传多样性评价等深入研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料于 2018 年 9 月采自广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所种质资源圃,采集生长良好、色泽亮丽、健康无虫害的新鲜叶片 2—3 片,保存于冰盒带回实验室后用液氮冷冻。样品经广西植物研究所漆小雪研究员鉴定为黑老虎(*Kadsura coccinea*)叶片。

1.2 仪器及药品

药品试剂:ISSR 引物、dNTPs、 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶、 $10\times$ PCR buffer、DNA Marker S、琼脂糖,以上试剂都购于卓一生物技术有限公司。

实验仪器:PCR 仪(美国 BIO-RAD 伯乐公司),DYCP-34 型电泳槽(北京市六一仪器厂),TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),UVP 凝胶成像系统,CDYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), $-20^{\circ}C$ 冰箱, $-4^{\circ}C$ 冰箱。

1.3 方 法

1.3.1 黑老虎植物基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法对黑老虎植物基因组 DNA 进行提取。用浓度为 2% 的琼脂糖凝胶电泳检验所提取基因组 DNA 的质量和完整性,用紫外分光光度计检测基因组 DNA 的纯度和浓度。

1.3.2 ISSR-PCR 反应体系正交试验

不同的物种有各自最佳的 ISSR 反应体系,要建立一个适于黑老虎的 ISSR 反应体系需要先对该体系进行优化。运用正交方案进行初步的筛选,随后利用单因素设计针对性地统一优化,优化的内容包括 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶用量、DNA 模板用量、PCR 扩增循环次数、退火温度等。

采用正交设计试验确定每个因素中扩增效果最好的条件。正交试验主要包括设计 Mg^{2+} 、引物、Taq DNA 聚合酶、DNA、dNTPs 这 5 个试验因素的梯度差。每一个因素都设计 4 个浓度梯度差,如表 1、表 2 所示。为避免偶然性发生,每个浓度设置 3 个重复。除此之外,这 4 个浓度梯度系列中,每个体系都加入 $2.5\ \mu L$ $10\times$ PCR Buffer,最后用灭菌后的 ddH_2O 补足至 $20\ \mu L$ 。本次选用的引物为 866(序列为 $5'$ -CTC CTC CTC CTC CTC CTC- $3'$)。退火温度为 $54^{\circ}C$ 。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors				
	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Tap DNA 聚合酶 Tap DNA polymerase (U)	DNA (ng)
1	1.0	0.1	0.2	0.5	10
2	1.5	0.2	0.4	1.0	30
3	2.0	0.4	0.6	1.5	50
4	2.5	0.5	0.8	2.0	70

表 2 ISSR-PCR 正交试验 $L_{16}(4^5)$

Table 2 Orthogonal test for ISSR-PCR $L_{16}(4^5)$

编号 Number	因素 Factors				
	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Tap DNA 聚合酶 Tap DNA polymerase (U)	DNA (ng)
1	1.0	0.1	0.2	0.5	10
2	1.5	0.1	0.4	1.0	30
3	2.0	0.1	0.6	1.5	50
4	2.5	0.1	0.8	2.0	70
5	1.5	0.2	0.2	1.5	70
6	1.0	0.2	0.4	2.0	50
7	2.5	0.2	0.6	0.5	30
8	2.0	0.2	0.8	1.0	10
9	2.0	0.4	0.2	2.0	30
10	2.5	0.4	0.4	1.5	10
11	1.0	0.4	0.6	1.0	70
12	1.5	0.4	0.8	0.5	50
13	2.5	0.5	0.2	1.0	50
14	2.0	0.5	0.4	0.5	70
15	1.5	0.5	0.6	2.0	10
16	1.0	0.5	0.8	1.5	30

PCR 扩增程序:在 $94^{\circ}C$ 条件下预变性 5 min, $94^{\circ}C$ 条件下变性 30 s, $54^{\circ}C$ 条件下退火 50 s, $72^{\circ}C$ 条件下延伸 5 min, $4^{\circ}C$ 保存。扩展结束后将 PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳 1.0—1.5 h,用溴化乙锭染色 20—25 min,随后采用 UVP 凝胶电泳成像系统拍照备注保存。

1.3.3 ISSR-PCR 反应单因素试验设计

在正交试验基础上进行单因素试验。每个因素设计的水平如下: Mg^{2+} 浓度为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L;dNTPs 浓度为 0.1,0.2,0.3,0.4,

0.5, 0.6 mmol/L; 引物浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{mol/L}$; Taq DNA 聚合酶用量为 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 U; DNA 模板用量为 15, 30, 45, 60, 75, 90 ng。

1.3.4 ISSR-PCR 反应程序的优化

根据正交试验及单因素试验结果, 进一步确定反应体系后, 继续对退火温度以及循环次数进行优化。退火温度设置为 $(T_m \pm 5)^\circ\text{C}$, 如 $(51 \pm 5)^\circ\text{C}$, 那么 PCR 仪自动形成 12 个温度梯度: 46.0, 46.3, 47.0, 48.0, 49.2, 50.4, 51.6, 52.8, 54.0, 55.0, 55.7, 56.0 $^\circ\text{C}$ 。循环次数设置为 25, 30, 35, 40, 45, 50 次。以上处理重复 2 次, 避免偶然性存在。

1.3.5 ISSR 反应体系的验证

从黑老虎提取的 DNA 中随机选取 2 个样品, 用前期试验确定的反应体系对样品进行扩增, 以此检验扩增效果的稳定性。利用正交试验以及单因素试验确定的 ISSR-PCR 反应体系对引物进行筛选, 从黑老虎的 DNA 样品中随机选择出 2 个样品作为 ISSR-PCR 反应体系的模板, 对 100 条引物进行 PCR 扩增, 从扩增效果好的条带中, 选择出条带明亮、清晰、重复性好的引物进行 ISSR 分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 反应体系正交试验结果

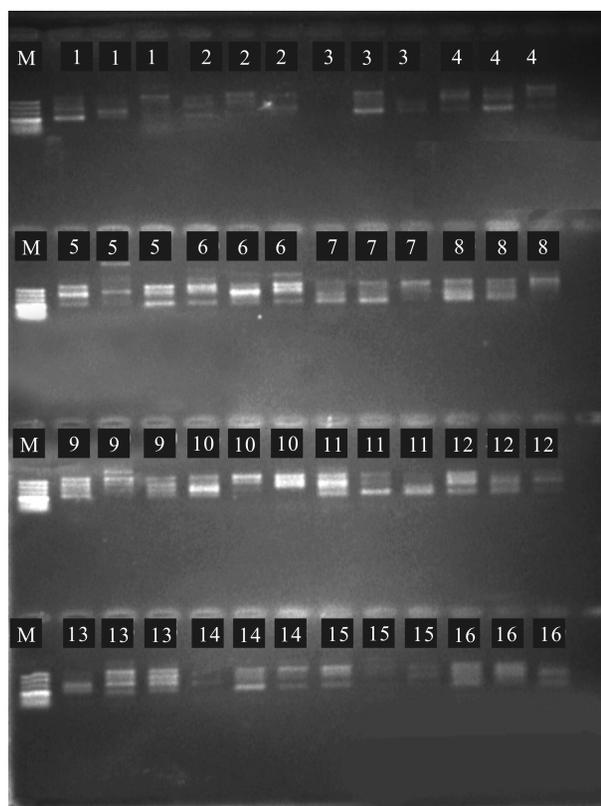
由 ISSR-PCR 正交试验结果(图 1)可知, 组合 3, 14, 15 部分重复没有条带出现, 这些组合扩增效果最差。组合 1, 2, 4, 7, 8, 9, 12, 16 有条带, 但是条带不明显, 模糊不清, 很难辨别。组合 5, 6, 10, 11, 13 具有清晰明亮的条带, 组合 5 的条带最具有层次性, 清晰可辨, 且 3 次重复具有正态性, 因此选择该组合作为单因素试验点样的基础。

2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

由图 2 可以看出, Mg^{2+} 浓度低时 ISSR-PCR 扩增效果较差, 条带模糊不清晰或缺失。随着 Mg^{2+} 浓度的加大, 条带越来越清晰; 当浓度为 2.5 mmol/L 时, 条带较为清晰, 亮度最高。因此, 选择 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 作为下一步研究的条件。

2.3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

dNTPs 对 ISSR-PCR 的影响如图 3 所示。在 20 μL 体系中, dNTPs 浓度为 0.10 mmol/L 时, 条带最清晰; 提高 dNTPs 浓度, 扩增条带清晰度呈现下降趋



1—16 分别对应正交试验组合 1—16

1—16 correspond to orthogonal test combinations 1—16 respectively

图 1 ISSR-PCR 正交试验扩增结果

Fig. 1 Amplification results of ISSR-PCR orthogonal test

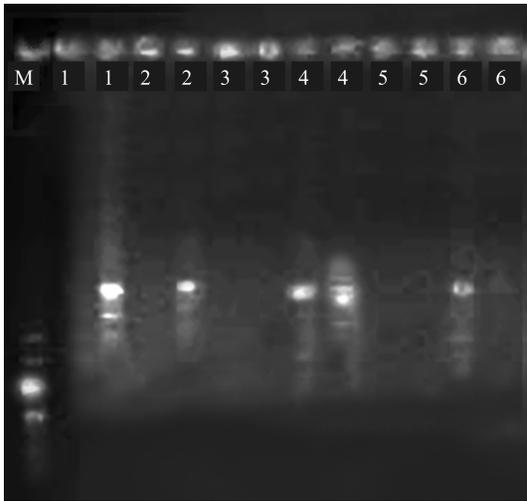


1—6 对应的 Mg^{2+} 浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

1—6 correspond to Mg^{2+} concentration of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L

图 2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 2 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR-PCR amplification



1—6 表示 dNTPs 浓度分别为 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 mmol/L

1—6 represents dNTPs concentration of 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 mmol/L

图3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 3 Effect of dNTPs concentration on ISSR-PCR amplification

势。因此,选择 dNTPs 浓度为 0.10 mmol/L 作为下一步试验的条件。

2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

不同的引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响如图 4 所示,引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时最适合 ISSR-PCR 反应体系的扩增。其余条带的情况则表明,在 20 μL 体系时,其他的引物浓度不利于黑老虎的 PCR 扩增。故选择引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 进行下一步试验。

2.5 Taq DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Taq DNA 聚合酶的用量会影响扩增产物,用量多则成本高,且容易扩增出非特异性产物,但用量少又会导致产物合成的效率低^[16]。如图 5 所示,在 20 μL 体系里, Taq DNA 聚合酶用量为 0.25—1.00 U 时,几乎没有产物出现; Taq DNA 聚合酶用量为 1.50 U 时(编号 4),条带清晰、亮度高,故选择 1.50 U 作为下一步试验的 Taq DNA 聚合酶用量。

2.6 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

如图 6 所示,编号 1,2,5,6 产物所扩增的条带不够清晰明亮,背景模糊不清,表明生成的产物较少,因此模板 DNA 用量为 15,30,75,90 ng 时,ISSR-PCR 扩增效果差。编号 3 的产物条带明亮清晰,故选择 45 ng 模板 DNA 用量进行下一步的试验。



1—6 表示引物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{mol/L}$

1—6 represents primer concentration of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{mol/L}$

图4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 4 Effect of primer concentration on ISSR-PCR amplification



1—6 表示 Taq DNA 酶用量分别为 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 U

1—6 represents Taq DNA polymerase dosage of 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 U

图5 Taq DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 5 Effect of Taq DNA polymerase dosage on ISSR-PCR amplification

2.7 退火温度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

退火温度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响如图 7 所示,部分组合没有条带产生,表明该退火温度不适合黑老虎 ISSR-PCR 的扩增。退火温度在 50.4 $^{\circ}\text{C}$ 时,条带的强度高,清晰明亮,副带也清晰,因此该引物的最佳退火温度确定为 50.4 $^{\circ}\text{C}$,其他引物的退火

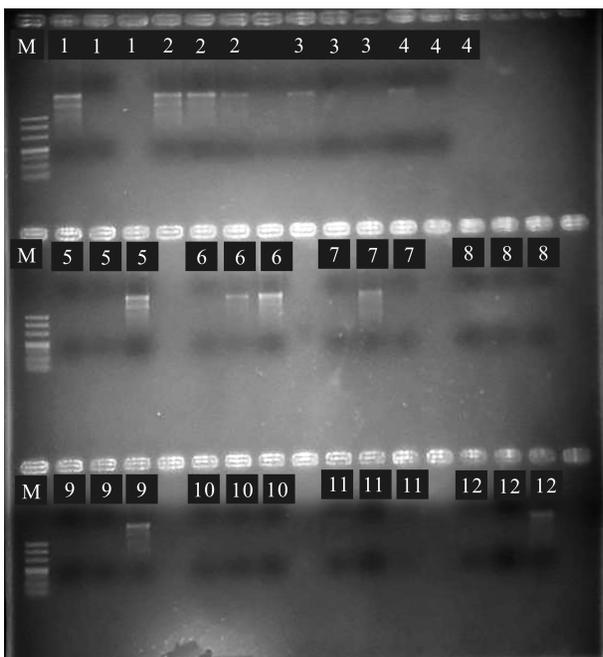


1—6 表示模板 DNA 用量分别为 15,30,45,60,75,90 ng

1—6 represents template DNA dosage of 15,30,45,60,75,90 ng

图 6 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 6 Effect of template DNA dosage on ISSR-PCR amplification



1—12 代表退火温度分别为 46.0,46.3,47.0,48.0,49.2,50.4,51.6,52.8,54.0,55.0,55.7,56.0℃

1—12 represents annealing temperature of 46.0,46.3,47.0,48.0,49.2,50.4,51.6,52.8,54.0,55.0,55.7,56.0℃

图 7 退火温度对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

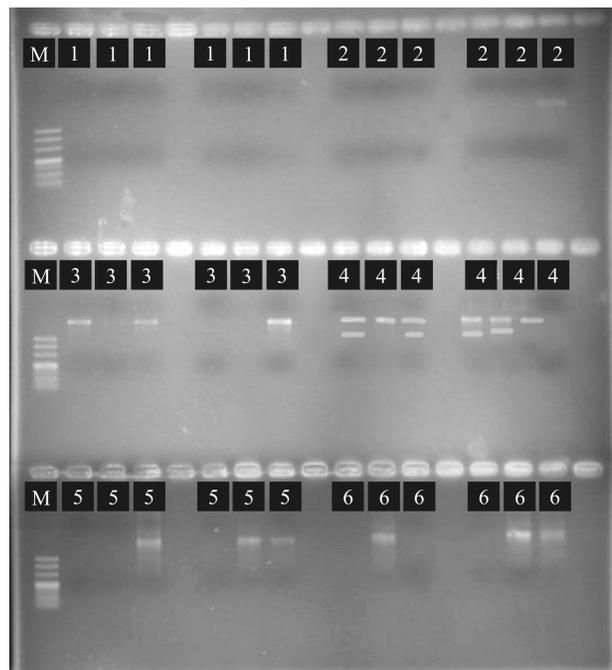
Fig. 7 Effect of annealing temperature on ISSR-PCR amplification

温度也采用同样的退火温度梯度进行筛选。

2.8 循环次数对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

循环次数对 ISSR-PCR 扩增效果的影响如图 8

所示,一共有 6 个循环组合,每个循环组合设立了 6 次重复试验。循环次数为 25,30 次时没有条带出现,表明该循环次数扩增效果不佳。循环次数为 35,45,50 次时有些许的条带出现,但条带模糊不清晰,强度弱,层次不分明,扩增产物较少,故不选择。循环次数为 40 次时,扩增产物较多,条带清晰,层次分明,强度高,条带的数目也明显更多。故而 40 次为最佳循环次数。



1—6 表示循环次数为 20,25,30,35,40,45 次

1—6 represents cycle times of 20,25,30,35,40,45

图 8 循环次数对 ISSR-PCR 扩增效果的影响

Fig. 8 Effect of cycle times on ISSR-PCR amplification

3 讨论

单独采用单因素试验仅考虑单个因素不同水平对试验结果的影响,忽视了各个因素之间的相互作用,在优化试验组合时,会一定程度上降低最佳反应水平的可靠程度^[19-20]。正交试验设计考虑多个因素水平的相互作用,利用最少的组合数考察因素和水平对结果的影响程度,得出最佳组合。本试验先用正交试验进行初步筛选,再通过单因素试验进行优化,极大地减少了试验次数和时间,快速建立黑老虎的 ISSR-PCR 反应体系。试验结果显示,黑老虎 ISSR-PCR 反应体系对 Mg^{2+} 浓度要求严格,浓度过低时无法扩增出条带。这可能是由于反应体系中其他因素对 Mg^{2+} 较为敏感,如 Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶的必需激活剂,体系中 Mg^{2+} 浓度过高,会出现 Taq DNA

聚合酶扩增出的特异性产物浓度降低,浓度过低会降低酶的效率。 Mg^{2+} 可与其他因素结合,最终影响PCR扩增的效率和特异性。由以上的正交试验和单因素试验结果可知,在20 μ L ISSR-PCR反应体系中,黑老虎的最佳反应条件为 Mg^{2+} 浓度为2.5 mmol/L、dNTPs浓度为0.1 mmol/L、引物浓度为0.6 μ mol/L、Taq DNA聚合酶用量为1.50 U、模板DNA用量为45 ng。扩增程序为在94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,50.4 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,以上3个步骤循环40次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。本试验首次研究建立黑老虎ISSR-PCR反应体系,并获得稳定可靠结果,可以适应于其他黑老虎品种,为今后黑老虎遗传多样性和遗传结构研究奠定基础。

参考文献

- [1] 胡照明,张文康,朱庆生,等.中华本草:第二册[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 龙世林,高渐飞,杨红梅,等.不同地区冷饭团单株雌花占比调查初报[J].耕作与栽培,2015(3):39-40.
- [3] 梁忠厚,范适,宋光桃,等.黑老虎的研究进展[J].湖南生态科学学报,2017,4(3):52-56.
- [4] 李贺然.黑老虎及胡桃枝皮的化学成分研究[D].北京:中国协和医科大学,2006.
- [5] LIU J S, QI Y D, LAI H W, et al. Genus *Kodsura*, a good source with considerable characteristic chemical constituents and potential bioactivities [J]. *Plytomedicine*, 2014, 21(8):1092-1097.
- [6] 谢玮,张贤贤,平永良.黑老虎果实化学成分和生理活性研究进展[J].农产品加工,2017(1):71-72,74.
- [7] 张海平,覃秀顺,蒋振华.特色水果黑老虎的栽培技术[J].果树实用技术与信息,2019(11):24-25.
- [8] 刘涛,韦茜,吴小波,等.野生水果冷饭团的研究现状及开发利用前景[J].安徽农业科学,2009,37(23):10971-10972.
- [9] 石焱芳,陈海玲.黑老虎的药理活性成份研究进展[J].海峡药学,2013,25(7):67-69.
- [10] 付玉嫔,司马永,祁荣频,等.木质藤本植物黑老虎的居群结构与动态[J].东北林业大学学报,2015,43(9):23-29,51.
- [11] 吴智涛.冷饭团特性及其栽培技术[J].中国园艺文摘,2012(6):190-192.
- [12] 卢圣栋.现代分子生物试验技术[M].第2版.北京:中国协和医科大学出版社,1999:458-463.
- [13] 邹喻苹,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,2001:36-41,68.
- [14] 赵孟良,韩睿,李莉,等.菊芋ISSR-PCR反应体系的建立[J].西南农业学报,2012(25):243-246.
- [15] 吴春妍,杨冠松,张爱丽,等.甜菜树ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J].西南农业学报,2014,27(6):2574-2579.
- [16] 周俊亚,宾晓芸,彭云滔,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.
- [17] 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[J].西北植物学报,2004,24(5):899-902.
- [18] 李长春,阳天泉,戴余军,等.正交设计优化莲藕ISSR-PCR反应体系研究[J].北方园艺,2011(1):121-123.
- [19] 向巧彦,黄夕洋,李虹,等.广西药用植物两面针遗传多样性的ISSR分析[J].广西科学,2014,21(5):541-549. DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20140504.011.
- [20] 史艳财,邹蓉,朱成豪,等.极小种群喙核桃ISSR-PCR反应条件的建立与优化[J].广西科学院学报,2020,36(1):78-82. DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20200317.011.

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Kadsura coccinea*

TANG Jianmin, QI Xiaoxue, JIANG Yunsheng, XIONG Zhongchen, ZOU Rong

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

Abstract: In order to establish and optimize ISSR-PCR reaction system and amplification procedure of the characteristic medicinal and edible *Kadsura coccinea*, the effects of Mg^{2+} , dNTPs, primers, Taq DNA polymerase, template DNA, annealing temperature and number of cycles on the amplification of ISSR-PCR reaction system of *K. coccinea* were studied by orthogonal and single-factor experimental design methods. The results showed that in a 20 μ L reaction system, the optimal reaction system was the system with Mg^{2+} of 2.5 mmol/L, dNTPs of 0.1 mmol/L, primer of 0.6 μ mol/L, Taq DNA polymerase dosage of 1.50 U and template DNA dosage of 45 ng. The annealing temperature was 50.4 $^{\circ}$ C, and the cycle was 40 times. The establishment of this optimization system can lay a foundation for further research on genetic diversity of *K. coccinea* germplasm resources.

Key words: *Kadsura coccinea*, ISSR-PCR, orthogonal design, single factor test, optimization of reaction system

责任编辑:符支宏



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>