

珍稀濒危植物永瓣藤 DNA 提取与 ISSR 条件优化

谢国文, 张金杏*, 郑燕玲, 彭晓瑜

(广州大学 生命科学院, 广州 510006)

摘要: 以硅胶干燥叶片为材料, 研究永瓣藤 DNA 的提取方法, 并对影响简单重复序列区间分子标记反应的各项条件进行了优化。建立了永瓣藤 ISSR 的优化反应体系和程序, 即在 20 μ L 反应体系中, 含 20 ng 模板 DNA、2.375 mmol/L Mg^{2+} 、0.15 mmol/L dNTPs、1.5 U Taq DNA 聚合酶、225 nmol/L 随机引物; 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 15 s、48~50 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。本研究为进行永瓣藤种群遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 永瓣藤; 珍稀濒危植物; DNA 提取; ISSR

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)06-0817-04

DNA extraction and optimization of ISSR reaction system for rare and endangered plant *Monimopetalum chinense*

XIE Guo-Wen, ZHANG Jin-Xing*, ZHENG Yan-Ling, PENG Xiao-Yu

(College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In the present study, DNA of *Monimopetalum chinense* was extracted from the silica gel dried leaves. The optimized reaction system and programme of inter simple sequence repeats (ISSR) for *M. chinense* are as follows: the reactions were performed in a volume of 20 μ L containing 20 ng of template DNA, 2.375 mmol/L Mg^{2+} , 0.15 mmol/L dNTPs, 1.5 U Taq DNA polymerase, 225 nmol/L primer; thermal cycling was programmed by 1 cycle for 5 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles for 15 s at 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 48~50 $^{\circ}$ C and 1 min at 72 $^{\circ}$ C, and finally, by 1 cycle for 10 min at 72 $^{\circ}$ C, stored at 4 $^{\circ}$ C.

Key words: *Monimopetalum chinense*; rare and endangered plant; DNA extraction; ISSR

ISSR (Inter simple sequence repeats) 简单重复序列区间分子标记是由 Zietkiewicz 等 (1994) 创建的一种新的分子标记技术, 它具有 DNA 用量少、技术要求低、多态性水平高、成本低廉, 可在一般实验室进行基因组指纹图谱构建; 同时检测多个 SSR 座位; 保证了 PCR 扩增的可重复性等优点。ISSR 标记已广泛用于遗传多样性分析、绘制 DNA 指纹图谱、品种鉴定、进化及分子生态学等领域的研究 (李文表等, 2006; 余艳等, 2003)。

永瓣藤 (*Monimopetalum chinense*) 为我国长江中下游南部中亚热带向北亚热带过渡的生态环境中

残存的卫矛科单种属植物。本属的现代分布范围为赣北、皖南和鄂东南, 即 114 $^{\circ}$ 30'~118 $^{\circ}$ 10' E, 28 $^{\circ}$ 30'~30 $^{\circ}$ 10' N。分布区域狭窄, 是本地起源的单型特有属。数量稀少, 分布狭窄, 只局限生长在皖赣鄂接壤地带, 并呈间断分布状态, 被列为国家二级濒危保护植物 (傅立国等, 1989), 收入《中国植物红皮书》 (傅立国等, 1992)。目前, 对永瓣藤的研究仅限于生态、生物学特性、形态解剖、细胞学等方面 (谢国文等, 1998a, b, 1999; 廖军, 1995), 至今还未研究过永瓣藤的分子系统关系及进化历程。本研究利用硅胶干燥的永瓣藤叶片进行 DNA 提取方法和 ISSR 条

收稿日期: 2006-07-03 修回日期: 2007-01-29

基金项目: 国家自然科学基金 (30470146, 39460011); 广州大学重点科研项目 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470146, 39460011); Key Item of Scientific Research Foundation of Guangzhou University]

作者简介: 谢国文 (1957-), 男, 江西莲花人, 教授, 从事植物系统进化、生物多样性和保育生态学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence)

件的优化,为进一步探讨该珍稀濒危保护植物的遗传多样性提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

在永瓣藤的分布区域安徽、江西和湖北三省选择代表性居群,根据居群的大小,每个居群随机选取了 12~21 个个体,为研究该濒危物种遗传多样性作好前期工作。每个居群分单株取新鲜叶片,分别用变色硅胶进行快速干燥,带回实验室于室温下保存。

1.2 方法

(1)DNA 提取及扩增:采用改进后的 CTAB 微量法(Doyle,1991;葛颂等,1994)从经硅胶干燥的叶片中提取总 DNA。PCR 反应在 PTC-200(MJ Research)PCR 仪上进行。从购自于加拿大哥伦比亚大学的 100 个引物(UBC set No. 9)中筛选出效果好的引物用于 PCR 扩增并进行 ISSR-PCR 反应体系的优化。(2)ISSR 反应产物的检测:PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色后检测多态性。PCR 产物均在含溴化乙锭(ethidium bromide, 0.1 $\mu\text{g/mL}$)的 1.5% 琼脂糖凝胶中,以 $0.5 \times \text{TBE}$ 为电泳缓冲液电泳分离,用上海生工生物工程有限公司 100bp 的 DNA ladder(100~1 000 bp)作为分子量标记,最后用紫外成像系统(Lab Works Software Version 3.0;UVP,Upland,CA91786,USA)成像并记录结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

采用改进后的 CTAB 微量法从经硅胶干燥的叶片中提取总 DNA,全部样品都成功提取出 DNA。经用 0.8% 的琼脂糖胶电泳、紫外成像系统下检测 DNA,所提取的 DNA 都为一清晰明亮的主带(图 1)。进一步从永瓣藤 ISSR-PCR 扩增试验结果看,应用优化的反应体系提取的 DNA 都能扩增出清晰、稳定的条带,达到了 ISSR-PCR 反应的要求。

2.2 永瓣藤 ISSR-PCR 反应体系的优化

由于 ISSR 作为一种重复性好的分子标记,常用于遗传多样性的检测。进行研究时,不同的物种要求的反应条件不尽相同,许多因素都会影响 PCR 反应的质量和重复性(邹喻苹等,2001)。

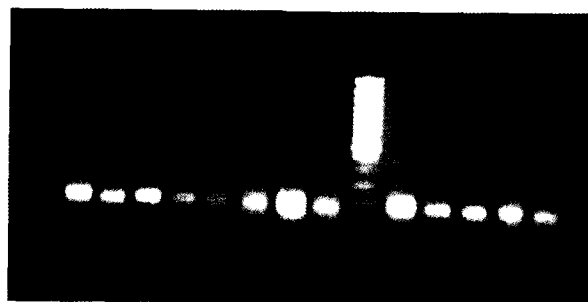


图 1 DNA 琼脂糖胶电泳检测

Fig. 1 Result of DNA agarose electrophoresis

表 1 ISSR 引物序列与适宜的退火温度

Table 1 Sequence of ISSR primers and opportune annealing temperature

引物 Primer	序列 Sequence (5' to 3')	退火温度(°C) Annealing temperature
808	AGA GAG AGA GAGAGA GC	49
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	48.5
811	GAG AGA GAG AGA GAG AG	49
835	AGA GAG AGA GAG AGA GC	49.5
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	50
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYC	50
876	GAT AGA TAG ACA GAC A	49
880	GGA GAG GAG AGG AGA	48
889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	49.5
890	VAV GTG TGT GTG TGT GT	49

2.2.1 模板 DNA 的质量与浓度 进行 ISSR-PCR DNA 最适浓度的筛选时,选取较为通用的 4 个引物(810,811,835,857),在 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时,用不同浓度的 DNA(5、10、20、50、100 ng/ μL)作模板进行扩增。结果显示当模板 DNA 浓度为 20 ng/ μL 时可得到较好的扩增式样。引物 810,811,835,857 分别产生 6,5,6,4 条清晰的带谱。

2.2.2 引物和 Mg^{2+} 的浓度 筛选出多态性高、谱带清晰、重复性好的引物用于居群遗传多样性的研究是整个研究最关键的一步。在本研究中,ISSR-PCR 的引物筛选出了 10 种(表 1)经试验得出浓度为 180 nmol/L 较佳。为确定反应的最佳 Mg^{2+} 浓度,以 Mg^{2+} 终浓度为 1.5、1.8、2.0、2.375、2.75、3.0、3.5 mmol/L,DNA 为 20 ng,退火温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 进行了扩增,结果发现当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 和 2.375 mmol/L 的时候,引物 810,811,835,857 都能扩增出良好的式样。

2.2.3 dNTPs 和 Taq 酶的用量 经试验在永瓣藤 ISSR-PCR 中 dNTPs 浓度以 0.15 mmol/L 较合适。

本实验设置 1、1.2、1.5、1.8、2.0、2.5 U 六个 Taq 酶(上海生工生物工程有限公司生产)含量梯度,1.5 U 时能够得到最佳效果。

以上试验表明,永瓣藤 ISSR-PCR 反应组分的最优组合见表 2。

表 2 永瓣藤 ISSR-PCR 反应组分的最优组合
Table 2 Optimum combination of content for ISSR-PCR reaction of *M. chinense*

PCR 组分 Content for PCR	每个反应 所需含量 Volume (μL)	每个组分的 作用浓度 Concentration
Buffer (Mg ²⁺ free)	2	10×
Formamide	0.4	2%
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.5	2.375 mmol
dNTPs (10 mmol/L)	0.5	0.15 mmol
Taq 酶 (5 U/μL)	0.3	1.5 U
Primer	0.5	225 nmol
Template DNA	0.8	20 ng
ddH ₂ O	16.1	—

表 3 永瓣藤 ISSR-PCR 的反应程序
Table 3 Optimum ISSR-PCR program of *M. chinense*

程序 Program	变性 Denature	退火 Annealing	复性 Extention	循环次数 Cycles
首轮循环	94℃	—	—	1
后续循环	94℃ 15 s	48~50℃ 45 s	72℃ 1 min	3
末轮循环	—	—	72℃ 10 min	—

2.3 永瓣藤 ISSR-PCR 反应程序的优化

2.3.1 退火温度 ISSR 引物有不同的 GC 百分含量,确定一个合适的退火温度非常重要。退火温度是影响扩增特异性的主要原因之一,不同的退火温度与时间可以导致扩增产物大小上的差异,ISSR-PCR 扩增,退火温度明显影响扩增谱带式样(姜静等,2003)。而有些研究者则认为,不论引物组成如何均采用 50~52℃退火温度,也能获得清晰的谱带(邹喻苹等,1998)。

退火温度过低,扩增特异性差,杂带较多,背景

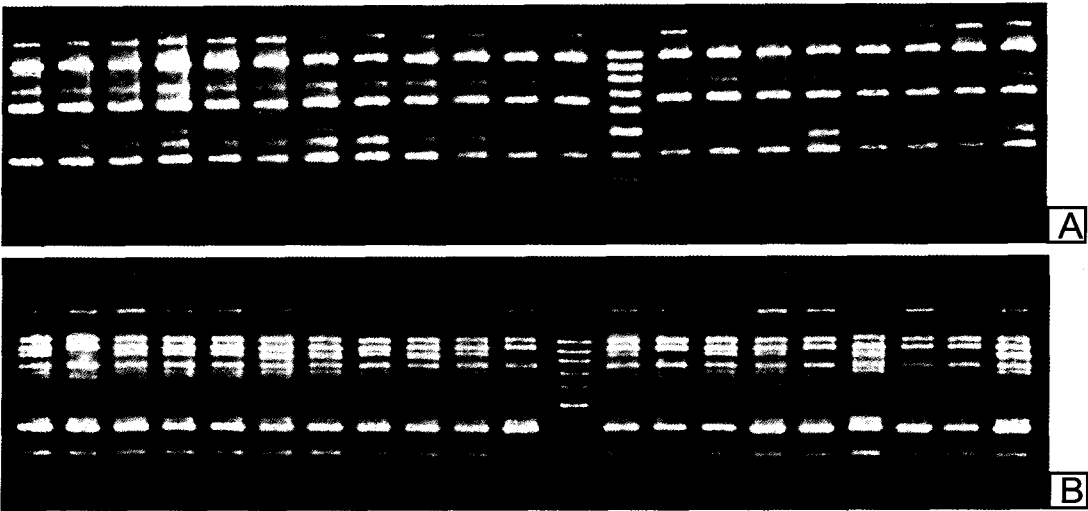


图 2 部分 ISSR 引物在永瓣藤中得到的扩增产物
Fig. 2 ISSR amplification products generated from *M. chinense* genomic DNA
A,B. 分别为引物 810,835 的扩增结果。A. with primer 810; B. with primer 835. 100 bp ladder DNA marker.

模糊;退火温度过高,引物与模板结合差,电泳条带弱,甚至没有扩增。对其他引物进行梯度 PCR,也得到同样结果。退火温度越高,扩增的特异性越高。在选择最佳退火温度时,如扩增结果相近,宜选择较高退火温度,以提高反应的特异性(穆立蕾等,2006)。

本试验根据永瓣藤 ISSR-PCR 反应的最佳体系,先根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛,选择能看到清晰条带的引物进行退火温度的确定。从 100 个 ISSR 引物中筛选出扩增稳定、重复性强的引物用于 PCR 扩增,再针对筛选出的引物逐个进

行梯度退火试验,确定引物的最佳退火温度(表 1)。由于有些 ISSR-PCR 的引物在 50℃时有弱带的存在,因此,将退火温度设置了以下 6 个梯度对 100 个引物进行筛选:52、51、49.5、49、48.5、48℃。经过反复试验筛选出了 10 个在 48~50℃扩增效果良好的引物用于下一步的研究,它们分别是:808,810,811,835,842,857,876,880,889,890(表 1)。

2.3.2 循环次数 当永瓣藤 ISSR-PCR 循环次数为 30 次时,DNA 不能够得到充分的扩增,扩增带少而模糊;而循环次数为 35 次时,带型清晰、稳定,故

PCR 循环次数确定为 35 次达到最佳效果(表 3)。

2.4 永瓣藤 ISSR-PCR 扩增效果

应用优化好的反应体系和程序,即在 20 μL 反应体系中,含 20 ng 模板 DNA, 2.375 mmol/L Mg^{2+} , 0.15 mmol/L dNTPs, 1.5U Taq DNA 聚合酶, 225 nmol/L Primer; 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 而后进行 35 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 48~50 $^{\circ}\text{C}$ 退火(退火温度随引物而定, 表 1) 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物扩增好后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 以备进行永瓣藤种群遗传多样性研究用。部分引物扩增的结果见图 2。

本研究承蒙葛学军, 王德莲等先生的热情帮助, 谨此致谢!

参考文献:

- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社
- 葛颂, 洪德元. 1994. 遗传多样性及其检测方法[M]//钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社: 123—140
- 傅立国. 1989. 中国珍稀濒危植物[M]. 上海: 上海教育出版社: 97—98
- 傅立国, 金鉴明. 1992. 中国植物红皮书(第 1 册)[M]. 北京: 科学出版社
- Doyle J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[C]//Hewitt G M, Johnston A(eds). Molecular Techniques in Taxonomy. Germany, Berlin: Springer, 283—293
- Jiang J(姜静), Yang CP(杨传平), Liu GF(刘桂丰), et al. 2003. Optimization for the reaction system of birch ISSR-PCR(桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志), 22(3): 91—93
- Li WB(李文表), Zhou XY(周先叶), Li Y(李勇), et al. 2006. Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei*(棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(2): 204—208
- Liao G(廖军). 1995. A study on the chromosome number of *Monimopetalum chinense*(永瓣藤植物染色体数研究)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), 17(2): 189—190
- Mu LQ(穆立蔷), Liu YN(刘赢男), Feng FJ(冯富娟), et al. 2006. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis*(紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), 42(6): 26—31
- Rehder A. 1926. *Monimopetalum*, a new genus of Celastraceae [J]. *J Arnold Arboretum*, VII(4): 233—234
- Xie GW(谢国文), Tan CM(谭策民). 1998a. A study on the biological features of *Monimopetalum chinense*, a rare and endemic species in China(中国珍稀特有植物永瓣藤生物学特性的研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 15(3): 29—33
- Xie GW(谢国文), Sun YG(孙叶根). 1998b. Study on ecological characters of *Monimopetalum chinense*, a rare and endangered species in China(中国稀危植物永瓣藤生态学特征研究)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志), 17(4): 18—21
- Xie GW(谢国文), Wen L(文林). 1999. Distribution status and conservation of *Monimopetalum chinense*(永瓣藤的分布现状及其保护)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), 7(1): 15—19
- Yu Y(余艳), Chen HS(陈海山), Ge XJ(葛学军). 2003. Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers(简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 11(1): 15—19
- Zou YP(邹喻苹), Cai ML(蔡美琳), Wang XD(王晓东), et al. 1998. RAPD analysis of germplasm in ancient "Taizi lotus" and modern Chinese lotus(古代"太子莲"及现代红花中国莲种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 40(2): 163—168
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20: 176—183

《广西植物》被评为“中国精品科技期刊”并获得 “中国科协精品科技期刊工程(项目)”资助

据中国科协学会学术部(科协学发[2007]162号)文,关于下达 2007 年度中国科协精品科技期刊工程项目的通知。为带动我国科技期刊质量的整体提高,促进国际交流与合作,提高中国科技期刊在国际上的地位和市场竞争力,推进实施精品科技期刊战略、科教兴国战略、人才强国战略。中国科协在国家财政部的大力支持下,组织实施了中国精品科技期刊工程,支持一批学术期刊成为我国学科或专业领域的领衔期刊,成为在同学科领域内的世界知名科技期刊。根据评审结果,全国有 110 种科技期刊入选,其中 A 类 5 项, B 类 40 项, C 类 65 项。《广西植物》入选为 C 类,成为 2007 年广西唯一入选并受资助的期刊。