

红树植物海漆 ISSR 条件的优化^{*}

张志红¹, 谈凤笑¹, 何航航¹, 吴令辉¹, 钟才荣², 施苏华¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 东寨港国家级自然保护区, 海南 海口 571129)

摘要: 在利用 ISSR 分析对海漆 *Excoecaria agallocha* 的遗传多样性进行了研究。为获得清晰、重复性的 ISSR 扩增结果, 对影响 ISSR-PCR 的多个因素, 包括 DNA 的提取、模板浓度、Taq 酶的选择与用量、 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度等进行了比较、优化, 确定了海漆 ISSR-PCR 分析最适宜的扩增条件: 10 μ L PCR 反应体积中, 1 $\times$ Taq 酶配套缓冲液 (10 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 0.6~0.7 U Taq DNA 聚合酶 (上海申能博彩生物科技有限公司), 0.2 μ mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5~2.0 mmol/L $MgCl_2$, 10 ng 模板 DNA。

关键词: 海漆 *Excoecaria agallocha*; ISSR; 优化; 红树植物

中图分类号: Q503; Q946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 02-0063-04

海漆 *Excoecaria agallocha* 隶属大戟科 Euphorbiaceae 海漆属 *Excoecaria*, 是重要的红树林树种, 传统的药用植物, 其叶和茎可提取抗 HIV 的活性物质^[1]。研究其分子水平的遗传变异, 将为红树林生态系统的重建和发展, 生物多样性保护及红树林资源的可持续利用提供重要的理论依据。简单重复序列区间扩增多态 DNA (ISSR) 分析是建立在 PCR 反应基础上的一种新的分子生物学技术, 由 Zietkiewicz^[2] 等于 1994 创建, 它结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 具有 RAPD 操作简单, 所需 DNA 量少, 不需预知研究对象的基因组序列等优点, 并具有 SSR 的稳定性^[3]。因此, ISSR 近年来已迅速应用于品种鉴定、种质资源和遗传多样性的研究, 并作为构建遗传图谱的工具^[4,5]。

ISSR 技术虽然原理简单, 但随着 PCR 条件的变化, 会出现不同的扩增结果, 影响其扩增的主要因素有: DNA 的模板浓度、Taq 酶的选择和含量、 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度。本研究详尽探讨了 ISSR 实验的优化条件, 建立了重复性好、结果清晰而稳定的海漆 ISSR 实验参数, 为深入研究红树植物海漆种群的遗传变异和规律奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海漆样品采集于日本冲绳岛、中国沿海、泰国和新加坡。叶片置于变色硅胶中干燥保存。合计

23 个居群, 420 个个体。

1.2 实验仪器与药品

FastPrep 植物组织破碎仪 (FastPrep[®] FP220, 美国 Qbiogen); Hoefer DyNA Quant 200 荧光仪; PCR 扩增仪 (Biometra pc 48, 德国); DF-1D 型恒压恒流电泳仪 (北京东方仪器公司), DYY-II 型水平电泳槽 (北京六一仪器厂), 凝胶分析系统; 100 个 ISSR 引物购自加拿大大不列颠哥伦比亚大学 (University of British Columbia, Set No. 9, No. 801~900); 100 bp DNA Ladder Plus 购自 MBI Fermentas; Taq polymerase 选用上海申能博彩生物科技有限公司产品; dNTP 购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 DNA 的提取及检测

采用改进后的 CTAB 微量 Fastprep 法, 提取总 DNA。该法与过去的 CTAB^[9] 法的不同之处在于不需要用液氮研磨植物叶片, 而采用 Fastprep 植物组织破碎仪代替手工操作, 仅需要极微量的植物叶片或组织。在 Fastprep 仪上震荡 45 s, 仪器参数为 Speed 6。所获总 DNA 以 Hoefer (DyNA Quant200) 荧光仪和紫外分光光度计定量检测其浓度。以 $w=1.2\%$ 琼脂糖凝胶电泳 (0.5 $\times$ TBE) 检测所提取 DNA 的质量。根据基因组 DNA 浓度值将样品稀释至 20 ng/ μ L 用于 ISSR 分析。

1.4 ISSR 反应

聚合酶链式反应 (PCR) 扩增体系: 10 μ L PCR

^{*} 收稿日期: 2003-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070053, 30230030); 广东省自然科学基金资助项目 (001223); 教育部博士点基金资助项目 (20010558013)

作者简介: 张志红 (1967 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 施苏华; E-mail: lssssh@zsu.edu.cn

反应体积中, 0.6 ~ 0.7 U Taq DNA 聚合酶, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 ~ 2.0 mmol/L MgCl_2 , 10 μg 模板 DNA。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s $\rightarrow$ 52 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 38 循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 12 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。PCR 扩增产物以 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶电泳 (0.5 $\times$ TBE) 分离, EB 染色, 自动凝胶成像仪观察拍照。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取

本实验提取的 DNA 呈白色或无色絮状沉淀, 电泳显示 DNA 完整, 无明显降解 (见图 1)。用紫外分光光度计测定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的光吸收比值 (A_{260}/A_{280}) 为 1.90 ~ 1.95。结果显示改进后的 CTAB 微量 Fastprep 法是一种简单快速、效率高的基因组 DNA 提取方法。

所提取的海漆总 DNA 经浓度测定后用于 SSR 扩增。通过反复实验和对比不同条件和比例的 SSR PCR 反应体系, 从 100 个引物中共筛选出扩增条带清晰、重复性好的 10 个引物作为正式扩增的引物。结果表明优化后的 PCR 反应体系中海漆 23 个居群、420 个个体均可扩增出明显条带。图 2 为 J39 号 DNA 样品经 SSR 引物 811、814、835、844、848、856、857、864、868、880 扩增出多态性条带。

DNA 质量的好坏直接关系到后续工作的成功与否。有关植物 DNA 提取方法繁多, 目前应用最广的是 Doyle et al. 1987 年提出的 CTAB 法^[9]。我们采用改进后的 CTAB 微量 Fastprep 法, 剔除了传统的液氮冷冻条件下人工研磨破碎植物材料, 在室温下以 Fastprep 植物组织破碎仪机械研磨, 一个人一小时可粉碎近 80 个样品, 大大提高了工作效率, 同时得率高, 只需微量样品 (20 ~ 30 mg) 即可获得 40 ~ 60 μg 的总 DNA, 满足 600 ~ 900 次的 PCR 扩增, 是一种省时省力的植物总 DNA 提取方法。同时利用机械研磨, 避免了人工研磨样品破碎程度不同, DNA 产率不一致的问题, 后者会导致 PCR 反应是需要逐个调模板质量浓度的烦琐操作, 这一改进使 ISSR 技术的规模化、标准化快速分析成为可能。在此改进的提取方法中, 用硅胶干燥的叶片和组织比用新鲜叶片提取操作更易, 因此更适合于异地采集和硅胶干燥样品的保存和提取。

2.2 模板质量浓度

模板质量浓度是影响 ISSR PCR 扩增的最重要因素之一。本研究对比了 8 种不同的模板质量浓度, 即用于 PCR 反应的模板 DNA 质量浓度分别为

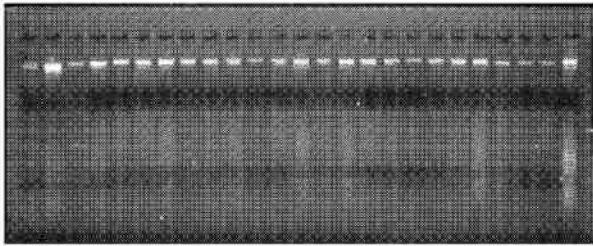


图 1 日本居群部分个体的总 DNA (稀释 40 倍)

Fig. 1 Total DNA of some samples from japan ($\times 40$)

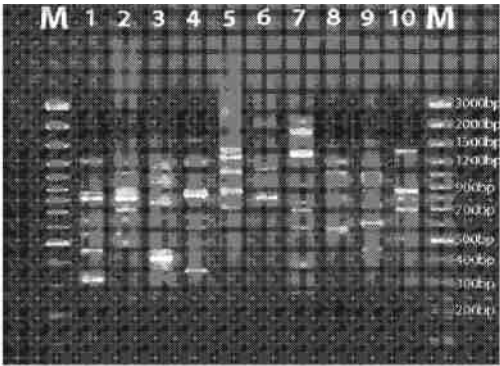


图 2 引物 811、814、835、844、848、856、857、864、868、880 扩增 J₃₉ 号样品基因组 DNA 结果

Fig. 2 Amplification of genomic DNA of sample J₃₉ with primers 811、814、835、844、856、857、864、868、880

2.5、5、10、20、30、40、50、60 ng μL 。图 3 显示了不同模板质量浓度以引物 811 扩增的 SSR 结果。从图中看出, 模板 DNA 的量对 SSR 结果有显著影响, 模板 DNA 的质量浓度为 2.5 ng μL 时无扩增, 在 5 ~ 50 ng μL 时均扩增出基本相同的带型, 60 ng μL 扩增的 SSR 谱带反而减少。余艳等^[6] 利用 ISSR 研究沙冬青遗传多样性的结果与我们的结果相似。在检测海漆遗传多样性研究中, 我们采用的 DNA 模板质量浓度为 10 ng μL 。

2.3 Taq 酶

在 ISSR PCR 反应体系中, TaqDNA 聚合酶直接影响扩增反应的成功与否。实验表明, 当其他反应条件一致时, 对同一样品使用不同厂家的 Taq 酶, PCR 扩增的条带数目明显不同。如图 4, 我们采用加拿大真达公司生产的 Taq 酶和本实验室自制的 Taq 酶分别对样品 BHCL08、BHCL09 进行 SSR PCR 扩增, 结果表明, 本实验室自制的 Taq 酶扩增的片段数目多于加拿大真达公司生产的 Taq 酶。说明不同厂家从不同菌株上分离的 TaqDNA 聚合酶可能在性能上有些差异, 从而导致扩增结果的不同。因此, 在实验过程中, 要尽量使用同一厂家同一批次

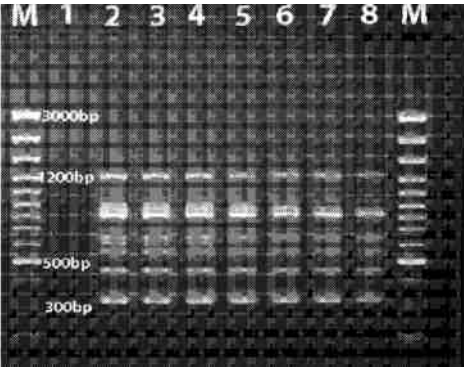


图 3 不同模板 DNA 质量浓度 ISSR 扩增结果

Fig 3 the results of ISSR amplification using different concentration template DNA
1—8: PCR 反应的模板 DNA 质量浓度分别为 2, 5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ng/μL
M: 100 bp ladder plus DNA marker

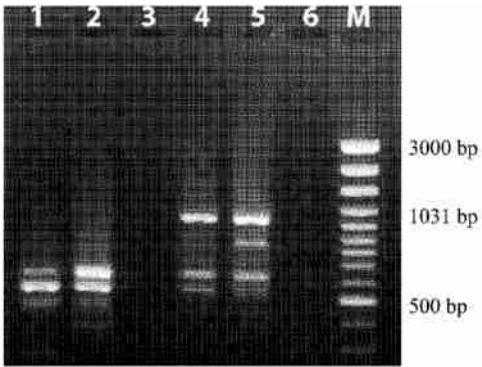


图 4 不同厂家 TaqDNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响 (引物 809)
Fig 4 The ISSR results using different TaqDNA polymerase
1—3 为加拿大真达公司产物
(1 为样品 BHCL08, 2 为样品 BHCL09, 3 为负对照);
4—6 为本实验室自制的产物
(4 为样品 BHCL08, 5 为样品 BHCL09, 6 为负对照);
M: 相对分子质量标准

的 TaqDNA 聚合酶。陈永久等^[7]在对懒猴和冬虫夏草 RAPD-PCR 研究中也报道了相似的结果。我们对比设置了 0.25、0.5、0.75、1.0 U Taq 酶含量梯度。结果表明, 0.25 U 酶量过低, 产物的合成效率下降, 无扩增产物出现; 0.5~0.75 U 可以得到重复的清晰条带, 无非特异性扩增; 1.0 U 酶量过大, 虽也能得到扩增产物, 但出现非特异性扩增, 同时扩增产物主带相连, 模糊难以辨认。因此, 在海漆 ISSR-PCR 实验中, Taq 酶(上海申能博彩生物科技有限公司)的使用量为 0.5~0.6 U 最佳。

2.4 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度

Mg²⁺ 浓度是 ISSR-PCR 的一个主要变化因素。作为 Taq 酶的辅助因子, Mg²⁺ 浓度不仅影响 Taq 酶活性, 还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[8]。本试验对所采用的每个引物设置了 Mg²⁺ 浓度梯度比较, 即 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L (表 1)。结果表明, 不同的引物对反应系统中的 Mg²⁺ 浓度要求不同; 在 ISSR-PCR 反应液中,

Mg²⁺ 浓度为 1.0 mmol/L 时, 无扩增产物出现; 浓度 1.5~2.0 mmol/L 能得到清晰稳定的条带, 且无非特异性扩增; 浓度 2.5、3.0 mmol/L 虽也能得到扩增条带, 但条带变少, 且具有非特异性扩增。因此, Mg²⁺ 浓度我们采用 1.5 或 2.0 mmol/L, 视具体引物而定。这与在一般的 PCR 反应中, 1.5~2.0 mmol/L Mg²⁺ 较合适^[9]是一致的。

dNTP 是 ISSR-PCR 反应的原料。为了确定最适 dNTP 的加入量, 我们对比设置了 0.12、0.16、0.20 mmol/L 浓度梯度 (Mg²⁺ 浓度设定为 2.0 mmol/L)。结果表明, dNTP 浓度 0.20 mmol/L 能得到背景清晰的条带, 且无非特异性扩增; 0.16 mmol/L 虽也无非特异性扩增, 但所得产物背景模糊, 条带辨认比较困难; 0.12 mmol/L 除所得产物背景模糊外, 同时也有非特异性扩增。对这一现象我们认为是因为 dNTP 浓度低, 结合 Mg²⁺ 的量少, 导致游离 Mg²⁺ 的浓度增加, 从而出现非特异性扩增。因此, 选择 dNTP 的浓度为 0.20 mmol/L。

表 1 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 结果的影响¹⁾
Tab 1 The ISSR results of different Mg²⁺ concentration

引物	1.0 mmol/L		1.5 mmol/L		2.0 mmol/L		2.5 mmol/L		3.0 mmol/L	
	J ₃₉	Nega	J ₃₉	Nega	J ₃₉	Nega	J ₃₉	Nega	J ₃₉	Nega
811	—	—	++	—	++	—	++	+/-	+	+
857	—	—	++	—	++	+	++	+	+	+
880	—	—	++	—	++	—	++	+/-	+	+

1) J₃₉: DNA 模板; Nega: 阴性对照 (没加模板); ++: 表示扩增效率高; +: 表示有扩增产物; +/-: 表示扩增产物不稳定; —: 表示无扩增产物

3 结 论

综上所述，影响 ISSR 结果的因素很多，为了利用这一分子标记进行遗传多样性分析，获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱，提高分析的准确性，我们有必要对其影响因子进行优化，筛选出最适宜的 ISSR 条件。红树植物海漆 ISSR PCR 分析较适宜的扩增条件是：10 μL PCR 反应体积中，1×Taq 酶配套缓冲液（10 mmol/L Tris·HCl，pH 9.0，50 mmol/L KCl，0.1% Triton X-100），0.6~0.7 U Taq DNA 聚合酶（威佳科技有限公司），0.2 μmol/L 引物，0.2 mmol/L dNTP，1.5~2.0 mmol/L MgCl₂，10 ng 模板 DNA。利用此优化系统，选用 811 引物（GAGAGAGAGAGAGAC），对日本居群的 23 个个体进行 ISSR PCR 扩增，能得到清晰、多态性高的 ISSR 带谱，并具有较好的重复性（图 5）。

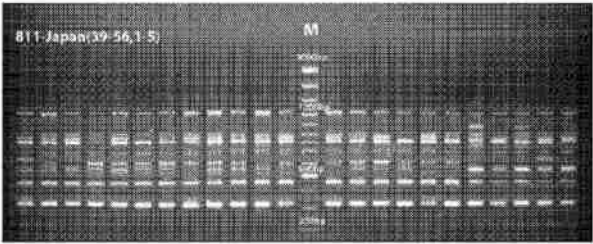


图 5 优化的 ISSR-PCR 系统对日本居群 23 个体扩增的 ISSR 带型（引物 811）

Fig 5 ISSR profiles of 23 Japan samples obtained by using optimal ISSR-PCR system (Primer 811)

参考文献:

[1] ERICKSON K L, BEUTLER J A, CARDELLINA J H, et al. A novel phorbol ester from *Excoecaria agallocha*[J]. J Nat

Prod. 1995, 58(5): 769—72.
[2] ZIETIEWIEZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176—183.
[3] 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[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 123—127.
[4] GILBERT J E, LEWIS R V, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 1125—1131.
[5] BORNET B, GORAGUER F, JOLY G, Blanchard. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs)[J]. Genome, 2002, 45: 481—484.
[6] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15—19.
[7] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究[J]. 动物学杂志, 1997, 18(2): 221—227.
[8] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993. 7—14.
[9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
[10] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem. Bull. 1987, 19: 11—15.
[11] 李钧敏, 金则新, 柯世省. 濒危植物七子花 RAPD 条件的优化[J]. 植物学通报, 2002, 19(4): 452—456.
[12] 宣继萍, 章 镇. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 549—550.

Optimization of ISSR Analysis for *Excoecaria agallocha* L.

ZHANG Zhi hong¹, TAN Feng xia¹, HE Hang hang¹, WU Ling hui¹, ZHONG Cai rong², SHI Shu hua¹
(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Dongzhai gang National Nature Reserve, Hainan 571129, China)

Abstract: *Excoecaria agallocha* L. is a medical mangrove plant of Euphorbiaceae. The factors which affect the ISSR analysis in the study of the genetic diversity of *E. agallocha*, such as genomic DNA extraction, concentrations of template DNA, Taq DNA polymerase, Mg²⁺ and dNTP, etc were examined. The optimal ISSR PCR conditions in our experiments were as the following: 1×Taq buffer (10 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 10 ng template DNA, 0.6~0.7 U Taq DNA (produced by Shenneny Bocai Company), 0.2 μmol/L primer, 1.5~2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTP. The length of amplification gave clear and reproducible banding patterns. The length of bands ranged from 200 to 2 500 bp and exhibited a high level of polymorphism.

Key words: *Excoecaria agallocha* L.; ISSR; optimization; mangroves