

文章编号: 1674 - 7054(2010) 02 - 0183 - 04

女贞 ISSR 分子标记的引物筛选

李传代

(海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘 要: 利用 60 个 ISSR 引物 ,对来自不同地域的 12 份女贞种质材料进行 PCR 扩增 ,筛选出 12 个多态性丰富、条带清晰且重复性良好的、适合于所有女贞种质材料进行 ISSR 分析的有效引物。筛选出的 12 个有效引物对 12 份女贞种质材料进行 ISSR - PCR 扩增 ,均可获得带型丰富和清晰可辨的 DNA 指纹图谱 ,共扩增出 228 条 DNA 谱带 ,其中 210 条为多态性带 ,占总扩增带数的 92.1% ,平均每个引物扩增出 19 条谱带。本试验筛选的 12 条引物可以有效地应用于女贞种质资源材料的 ISSR 分析。

关键词: 女贞; ISSR 标记; 引物筛选

中图分类号: S571.1; Q 781

文献标志码: A

女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.) 系木犀科女贞属常绿灌木或小乔木植物 ,其果实、种子、树皮、叶、根均可入药 ,且毒性较低^[1]。女贞苦丁茶是木犀科苦丁茶的主要种类之一 ,作为代茶饮料性味凉、苦后回甘 ,除了具有生津止渴功效外 ,还具有多种药用价值和保健作用^[2]。女贞果实(即女贞子) 中含有多种五环三萜类、皂苷、多糖、油酸及微量元素等多种化学成分^[3]。女贞在临床上主要治疗眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、慢性支气管炎、冠心病、高脂血症、高血糖、肝炎等多种疾病^[4-5]。目前 ,有关女贞的研究仅集中在化学成份和药用功效等方面的研究 ,而对于女贞种质资源遗传多样性等方面的研究尚未见报道。ISSR (Inter-simple Sequence Repeats ,内部简单重复序列) 分子标记是由 Ziet kiewicz E 等^[6]人于 1994 年创建的 ,是在 SSR 基础上发展起来的一项新的标记技术 ,已在多种动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性分析等研究方面得到应用^[7]。但在女贞种质资源中的应用仍是空白。因此 ,采用 ISSR 分子标记技术 ,从分子水平上探讨女贞种质资源间的亲缘关系及遗传多样性 ,对女贞今后的育种工作及品种鉴定等具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料 本实验从海南大学苦丁茶种质资源库定植的 100 余份女贞种质材料中 ,任选不同地域的 12 份植株 ,取其嫩芽作为供试材料 ,各份种质材料的编号和采集地如表 1 所示。

表 1 供试材料及来源

编 号	产 地	编 号	产 地
NZ - 001	云南省永善县溪落渡镇甘河村	NZ - 023	贵州省台江县城
NZ - 002	贵州省湄潭县	NZ - 027	贵州省扎佐县贵州省林业学校
NZ - 007	云南省昆明市	NZ - 028	云南省西畴县法斗乡
NZ - 009	湖南省祁东县白鹤乡	NZ - 029	江西省南昌市
NZ - 011	贵州省贵阳市植物园	NZ - 046	湖南省祁东县白鹤铺镇高原村高原组
NZ - 013	湖南省祁东县步云桥镇双江村对塘组	NZ - 097	南京农业大学校园

收稿日期: 2010 - 04 - 21

作者简介: 李传代(1980 -) ,男 ,海南海口人 ,海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 电热恒温水浴锅 ,台式离心机 ,低温冰箱 ,移液器 ,紫外分光光度计 ,icycler™ Thermal Cycler 型 PCR 仪 ,DYY - III 型稳压稳流电泳仪 ,DYY - III 型电泳槽 ,Gel Doc XR 型凝胶成像系统等。

1.2.2 试剂 Lambda DNA /Hind III + EcoR I Markers , $6\times$ loading buffer , $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Rnase A ,Taq DNA polymerase 和 $4\times$ dNTP mix 均购自上海申能博彩生物科技有限公司; 100 bp plus DNA ladder 购自中科瑞泰(北京) 生物科技有限公司; 引物序列参照哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列 ,委托上海生工生物工程技术有限公司合成; 琼脂糖购自 Spanish ,其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 取新鲜的女贞嫩叶约 0.5 g ,采用改良后的 CTAB 法^[8] 提取女贞的基因组 DNA。提取物用 150 μL 去离子水溶解 ,核酸蛋白仪测定 DNA 的浓度和纯度 ,并用 $w=0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性 , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 ISSR - PCR 反应体系的设计 PCR 扩增反应体系各组分参数为: $10\times$ buffer 2.5 μL ,2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs ,Taq 酶 1.5 U ,引物 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,DNA 模板 40 ng ,最后用灭菌 ddH_2O 补足至 25 μL 。ISSR - PCR 基本扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s , $52\sim62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 120 s ,进行 35 个循环 ,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。本实验选常用的 60 条 ISSR 引物(引物序列见表 2) ,在每个引物的理论退火温度 [$T_{\text{m}}=4(\text{G}+\text{C})+2(\text{A}+\text{T})$] 附近范围内 ,每隔 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别设置 6 个不同的退火温度梯度 ,按上述 ISSR 基本反应条件进行实验。扩增产物以 $w=1.5\%$ 的琼脂糖凝胶(含 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EB) 电泳($0.5\times$ TBE 缓冲液 ,电压 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$) 1.5 ~2.0 h ,以 100 bp plus DNA ladder 作标准分子质量参照物 ,Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统照相并作记录。

表 2 试验所用引物及其序列

引 物	碱基序列(5'~3')	引 物	碱基序列(5'~3')	引 物	碱基序列(5'~3')
ISSR - 002	GTGTCGTGCGTGCCGTGC	UBC - 830	TGTGTCGTGTCGTGTCG	UBC - 868	GAAGAAGAAGAAGAA
UBC - 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC - 831	ATATATATATATATATYA	UBC - 869	GTTCGTGTCGTGTCG
UBC - 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC - 832	ATATATATATATATATYC	UBC - 870	TGCTGCTGCTGCTGC
UBC - 813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	UBC - 833	ATATATATATATATATYG	UBC - 871	TATTATTATTATTAT
UBC - 814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	UBC - 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC - 872	GATAGATAGATAGATA
UBC - 815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	UBC - 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	UBC - 873	GACAGACAGACAGACA
UBC - 816	CACACACACACACACAT	UBC - 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	UBC - 874	CCCTCCCTCCCTCCCT
UBC - 817	CACACACACACACACAA	UBC - 837	TATATATATATATATART	UBC - 875	CATGCATGCATGCATG
UBC - 818	CACACACACACACACAG	UBC - 838	TATATATATATATATARC	UBC - 876	GATAGATACATACATA
UBC - 819	GTGTGTGTGTGTGTGTA	UBC - 839	TATATATATATATATARG	UBC - 877	TGCATGCATGCATGCA
UBC - 820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	UBC - 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	UBC - 878	GGATGGATGGATGGAT
UBC - 821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	UBC - 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	UBC - 879	CTTCACTTCACTTCA
UBC - 822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	UBC - 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	UBC - 880	GGAGAGGAGAGGAGA
UBC - 823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	UBC - 843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	UBC - 881	GGGGTGGGGTGGGGT
UBC - 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	UBC - 844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	UBC - 882	VBVATATATATATATAT
UBC - 825	ACACACACACACACACT	UBC - 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	UBC - 883	BVBTATATATATATATA
UBC - 826	ACACACACACACACACC	UBC - 846	CACACACACACACACART	UBC - 884	HBHAGAGAGAGAGAGAG
UBC - 827	ACACACACACACACACG	UBC - 847	CACACACACACACACARC	UBC - 886	VDVTCTCTCTCTCTCTC
UBC - 828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	UBC - 848	CACACACACACACACARG	UBC - 887	DVDTCCTCTCTCTCTCTC
UBC - 829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	UBC - 849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	UBC - 891	HVHTGTGTGTGTGTGTC

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测 经过提取的女贞基因组 DNA 呈米白色絮状或无色透明沉淀 ,电泳结果呈均一条带 ,说明提取的 DNA 较纯 ,完整性好 ,蛋白质、多糖和酚类等杂质基本去除(图 1) 。采用紫外分光光度法测定其浓度 ,结果表明 ,提取的 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 均在 1.90 左右 ,纯度较高(见表 3) ,符合 ISSR - PCR 的要求。

表 3 12 份女贞不同种质材料基因组 DNA 的紫外分光光度分析

编 号	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	ρ(DNA) / (mg · L ⁻¹)	编 号	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	ρ(DNA) / (mg · L ⁻¹)
NZ - 001	0.1001	0.0535	1.87	500.5	NZ - 023	0.1338	0.0675	1.98	669.0
NZ - 002	0.0882	0.0471	1.87	441.0	NZ - 027	0.0568	0.0289	1.97	284.0
NZ - 007	0.0720	0.0392	1.84	360.0	NZ - 028	0.0937	0.0486	1.93	468.5
NZ - 009	0.0849	0.0451	1.88	424.5	NZ - 029	0.1002	0.0512	1.96	501.0
NZ - 011	0.1129	0.0593	1.90	564.5	NZ - 046	0.0889	0.0451	1.97	444.5
NZ - 013	0.0878	0.0460	1.91	439.0	NZ - 097	0.1183	0.0620	1.91	591.5

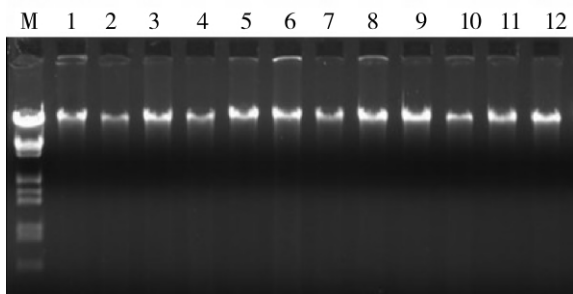


图 1 女贞 12 份种质材料基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

1 ~ 12 泳道分别为 NZ - 001 ,NZ - 002 ,NZ - 007 ,NZ - 009 ,NZ - 011 ,NZ - 013 ,NZ - 023 ,NZ - 027 ,NZ - 028 , NZ - 029 ,NZ - 046 及 NZ - 097

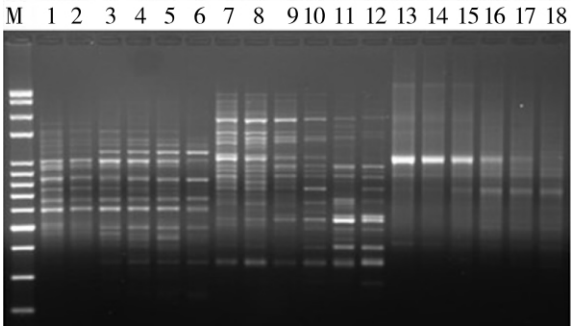


图 2 预备实验结果

泳道 1 ~ 6 为引物 UBC - 811 ,退火温度分别为 48.6 , 50.7 ,52.6 ,54.6 ,56.7 和 58.6 ℃; 泳道 7 ~ 12 为引物 UBC - 873 ,退火温度分别为 47.6 , 49.4 ,51.7 ,53.6 ,55.4 和 57.7 ℃; 泳道 13 ~ 18 为引物 UBC - 891 ,退火温度分别为 47.6 ,49.4 ,51.7 ,53.6 ,55.4 和 57.7 ℃.

2.2 不同引物退火温度的确定及其筛选 退火温度有时候并不严格等于其 T_m 值 ,而是在 T_m 值附近波动。在 PCR 反应中 ,过低的温度在保证模板与引物结合的同时 ,也使得模板与引物之间未完全配对的位点得到扩增 ,产生了所谓的错误扩增。因此 ,在允许的温度范围内 ,较高的温度会提高反应的特异性 ,减少非特异性产物的生成。

图 2 表明 ,引物 UBC - 811 ,退火温度在 48.6 ℃ 和 50.7 ℃ 时 ,扩增条带数少 ,产物模糊 ,有拖尾现象 ,在 58.6 ℃ 时扩增条带虽然清晰 ,但条带数少 ,在 52.6 ,54.6 ,56.7 ℃ 时 ,扩增的条带较多且主带清晰 ,但以 56.7 ℃ 时扩增效果最佳; 引物 UBC - 873 ,退火温度在 47.6 ℃ 和 49.4 ℃ 时 ,背景模糊不清 ,弱带较多 ,说明温度太低非特异性条带多 ,相反 ,退火温度过高则会造成产物量减少 ,从 55.4 ℃ 和 57.7 ℃ 扩增产物可以发现一些条带逐渐减少 ,所以 ,此引物的反应温度范围应该在 51.7 ~ 53.6 ℃ 之间 ,考虑到提高退火温度可提高反应的特异性 ,所以 ,选择 53.6 ℃ 作为最佳退火温度 ,以期待获得较稳定的扩增结果; 引物 UBC - 891 ,在 47.6 ~ 57.7 ℃ 温度范围内 ,随着温度的升高 ,条带从较亮一条到模糊不清 ,且有拖尾现象。为提高扩增的特异性 ,最后确定引物 UBC - 811 和 UBC - 873 可用于以后的分析实验 ,其相应的退火温度分别为 56.7 ℃ 和 53.6 ℃。本实验关于退火温度及引物筛选的试验结果详见表 4。

2.3 ISSR 指纹图谱及扩增产物的多态性 从ISSR扩增条带统计结果可知(表 4) ,每条引物可扩增出 15 ~ 22 条多态性带 ,平均每个引物扩增的带数为 19 条。12 条 ISSR 引物共产生 228 条扩增带 ,其中多态性条带 210 条 ,占总扩增条带数的 92.1 % ,均能扩增出清晰可辨的 DNA 指纹图谱 ,片段长度大约在 200 ~ 2 000 bp 之间 ,扩增产物多态性较高。图 3 为引物 UBC - 811 对其中 12 份供试女贞种质材料的 ISSR - PCR 扩增图谱。

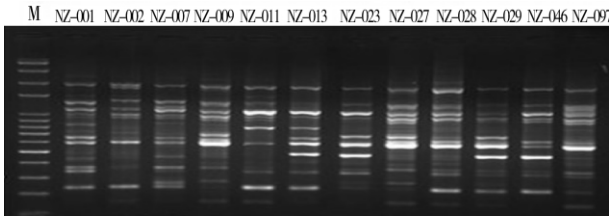


图 3 引物 UBC - 811 的扩增结果

表 4 筛选引物退火温度及其多态性

引 物	序列(5'to 3')	退火温度/℃	扩增带数/条	多态性带/条	多态位点/%
ISSR-02	GTGCGTGCGTGCGTGC	62.0	21	19	90.5
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	56.7	18	17	94.4
UBC-814	CTCTCTCTCTCTCTA	54.4	15	13	86.7
UBC-815	CTCTCTCTCTCTCTG	54.2	20	18	90.0
UBC-823	TCTCTCTCTCTCTCC	55.3	20	19	95.0
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	56.4	18	16	88.9
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAYC	56.4	17	15	88.2
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAYG	58.6	20	18	90.0
UBC-844	CTCTCTCTCTCTCTRC	58.6	22	21	95.5
UBC-845	CTCTCTCTCTCTCTRG	56.4	16	15	93.8
UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAA	52.2	19	17	89.5
UBC-873	GACAGACAGACAGACA	53.6	22	22	100.0
Total			228	210	92.1
Mean			19	17.5	-

3 结 论

研究表明,ISSR 标记技术操作简单、成本低、快速灵敏、检测多态能力强、所需 DNA 模板的量少,已经广泛应用于植物品种鉴定、遗传图谱和遗传多样性等方面的研究^[9]。运用 ISSR 技术时,DNA 纯度和浓度必须符合其扩增要求,选择合适 DNA 提取方法,对筛选适合特定物种的引物是非常必要的。对于引物的退火温度,从理论上说,退火温度高,特异性强,但温度过高,引物不能与模板牢固结合,扩增效率下降;退火温度低,产量高,但过低会造成引物与模板错配。因此,为减少非特异性扩增,可在允许范围内适当提高引物的退火温度。本试验用 12 条引物共获得 228 条扩增条带,其中多态性条带 210 条(占 92.1%),说明女贞保留了丰富的遗传多样性,这类代茶植物是苦丁茶育种难得的未变异的基因宝库,对苦丁茶育种有重大意义和经济价值。

总之,通过引物的适合筛选,可以应用 ISSR 标记技术快速、准确地分析女贞不同居群之间以及同一居群内不同种质材料的遗传多样性及其亲缘关系,可在基因组水平上进一步了解女贞遗传变异水平,并进一步明确其亲缘关系,从而为保护女贞种质资源的遗传多样性、品种鉴定以及杂交育种等研究领域提供分子生物学依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 年版一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 31.

[2] 刘国民. 中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况[J]. 贵州科学, 2003, 21(1-2): 69-77.

[3] 张兴辉, 石力夫. 中药女贞子化学成分的研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(3): 333-334.

[4] 李阳, 孙文基. 女贞子的药理作用研究[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(5): 58.

[5] 张振明, 葛斌, 许爱霞, 等. 女贞子多糖的抗衰老[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(2): 108.

[6] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994(20): 176-183.

[7] 韩晓颖, 梁英海, 王亚军, 等. 基于 ISSR 标记的伏山楂起源及分类地位研究[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(2): 164-167.

[8] 陈永华, 相阳, 张冬林, 等. 4 种不同广玉兰基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(3): 45-48.

[9] 冯伟林, 蔡为明, 金群力, 等. ISSR 分子标记分析杏鲍菇菌株遗传差异研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(1): 47-49.

- 2002 , 124: 4974 – 4975.
- [27] SWATLOSKI R P , ROGERS R D , HOLBREY J D. Dissolution and processing of cellulose using ionic liquids [P]. US 6 , 824 599 , 2004.
- [28] TURNER M B , HOLBREY J D , SPEAR S K , *et al.* Production of bioactive cellulose films reconstituted from ionic liquids [J]. *Biomacromolecules* 2004 5: 1379 – 1384.
- [29] SWATLOSKI R P , HOLBREY J D , MEMON S B , *et al.* Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids [J]. *Chem. Commun.* 2004 21: 668 – 669.
- [30] WU J , ZHANG J , ZHANG H , *et al.* Homogeneous Acetylation of Cellulose in a New Ionic Liquid [J]. *Biomacromolecules* , 2004 5: 266 – 268.
- [31] 任强 , 武进 , 张军 , 等. 1 – 烯丙基 – 3 – 甲基咪唑室温离子液体的合成及其对纤维素溶解性能的初步研究 [J]. *高分子学报* , 2003(3) : 448 – 450.

Progresses of Cellulose Solvent

XU Tian-jun , FENG Yu-hong , PANG Su-juan

(Key Laboratory of Ministry of Education for Application Technology of Chemical Materials in Hainan Superior Resources ,
College of Materials and Chemical Engineering , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: As biomass and reproduction resources for sustainable development , cellulose has been paid more and more attentions. Because of its high polymerization and crystallites degree , cellulose is difficult to dissolve in common solvents. The development of new solvent , especially new ionic liquid solvent , provided some new ways to solve the problem in recent years. In this paper , different solvent systems of cellulose were introduced , and the research existing condition , dissolve mechanism , application perspectives as new dissolvent for environmental protection were compared , whose purpose was to provide references for modification and decoration of cellulose and development of more cellulose materials with new functions.

Key words: cellulose; organic solvent; hydrosolvent; acid solvent; ionic liquid

(上接第 186 页)

Primer Screening in the Study on *Ligustrum lucidum* Ait. with ISSR Markers

LI Chuan-dai

(Agricultural College , Hainan University , Haikou 570228 , China;)

Abstract: 50 ISSR primers were used in the ISSR-PCR amplification for 12 germplasm materials of *Ligustrum lucidum* Ait. from different areas , and 12 effective ISSR primers which were suitable for all gerplasm materials of *Ligustrum lucidum* Ait. were selected out , which were used in the ISSR-PCR amplification for 12 germplasm materials of *Ligustrum lucidum* Ait. The results indicated that 228 distinct DNA bands are obtained , and 210 bands are polymorphic , which amount to 92.1% of the total bands amplified. Averagely , 19 bands could be obtained with each primer. The 12 primers selected could be effectively applied to ISSR analysis of the germplasm materials of *Ligustrum lucidum* Ait.

Key words: *Ligustrum lucidum* Ait. ; ISSR marker; primer screening