

药用植物苦参 SSR-PCR 体系的优化与验证

段永红¹ 渠云芳 王长彪² 毕红园² 王玉庆¹ 孙毅^{2,3*} 杨武德^{1*}

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西省农业科学院 生物技术研究中心, 太原 030031;

3. 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 太原 030031)

摘要 为有效利用 SSR-PCR 技术对药用植物苦参进行遗传多样性分析, 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 对影响苦参 SSR-PCR 体系的 5 个因素 (Taq 酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTP、引物) 在 4 个水平上进行优化, PCR 结果用 DPS 数据处理软件分析, 筛选出各因素的最佳水平, 建立适宜苦参 SSR-PCR 的反应体系和扩增程序, 并选用内蒙古苦参对该体系进行稳定性验证。结果表明: 在 10 μ L 的苦参 SSR-PCR 体系中, 模板 DNA 的用量为 20.0 ng, Taq DNA 聚合酶的用量为 0.2~0.6 U, Mg^{2+} 的浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.1 mmol/L, 引物的浓度为 0.6 μ mol/L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存。选用 12 份苦参 DNA 对该体系进行稳定性验证, 该体系具有较高的扩增稳定性, 可用于药用植物苦参 SSR 标记的研究。

关键词 苦参; SSR; 优化; 正交设计

中图分类号 S 567

文章编号 1007-4333(2014)05-0095-06

文献标志码 A

Optimization and testing for the SSR-PCR system of *Sophora flavescens* medicinal plant

DUAN Yong-hong¹, QU Yun-fang¹, WANG Chang-biao², BI Hong-yuan²,
WANG Yu-qing¹, SUN Yi^{2,3*}, YANG Wu-de^{1*}

(1. College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau of Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031, China)

Abstract The SSR molecular markers were used for analysing genetic diversity of *Sophora flavescens* medicinal plant, which was helpful for comprehensive evaluating germplasm resources of *Sophora flavescens*. The orthogonal design $L_{16}(4^5)$ on *Sophora flavescens* SSR-PCR system of 5 elements (Taq enzyme, Mg^{2+} , template DNA, dNTP, primers) in the four levels was optimized. The result of PCR was analyzed by software DPS, filtering out the best level of response factors established for the SSR-PCR Pinus reaction. An optimal 10 μ L volumes SSR-PCR system consisted of template DNA was 20.0 ng, Taq DNA polymerase was 0.2–0.6 U, Mg^{2+} was 2.5 mmol/L, dNTPs was 0.1 mmol/L and primer was 0.6 μ mol/L. PCR procedures was pre-denaturation for 3 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 94 $^{\circ}$ C, anneal for 45 s at 56 $^{\circ}$ C, extension for 1 min at 72 $^{\circ}$ C, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 min, then stored at 4 $^{\circ}$ C. Total DNA of 12 *Sophora* from different origin were tested to amplify by SSR markers, which verified the robustness of the system. The results showed that the system had high amplification stability, it can be used to study the *Sophora* medicinal plant SSR markers.

Key words *Sophora flavescens*; SSR; optimization; orthogonal design

收稿日期: 2013-11-10

基金项目: 山西省科技攻关项目(20130311004-3); 山西省财政支农项目(2011NYGX-05); 中国博士后基金项目(112118); 山西农业大学博士科研启动经费(xb2011011)

第一作者: 段永红, 副教授, 博士, 主要从事植物分子育种的研究, E-mail: duanyonghongok@163.com

通讯作者: 孙毅, 研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究, E-mail: sunyi692003@163.com

杨武德, 教授, 博士, 主要从事旱作栽培与农业生态研究, E-mail: sxaywd@126.com

苦参(*Sophora flavescens* Ait)为豆科槐属植物,是我国传统药用植物^[1],以根入药,始记载于《神农本草经》,列为中品,具有清热利尿、燥湿杀虫的功效^[2-3]。临床研究证实,苦参的主要活性成分是苦参碱和氧化苦参碱。它们具有抗病毒、消炎、抗心律失常、抗癌等多种药理作用,在治疗疾病方面有重要的应用价值^[4]。苦参除用于中药配方外,还是制药工业中的常用制剂。随着相关药品的开发,苦参的市场需求量日益增加,造成苦参野生资源越来越少,同时由于人工种植的粗放导致人工种植区苦参质量参差不齐,严重影响了苦参的产量和质量^[5]。研究苦参种质资源的遗传多样性,明晰它们的遗传基础,有助于筛选优良种源,增强用药的安全性和效能。对苦参种质资源的利用、保存和评价具有重要的理论意义和实践价值。

近年来,随着生物技术的不断涌现、更新,DNA分子标记技术在药用植物领域的应用逐步扩大,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。其中,SSR标记(Simple Sequence Repeat)技术具有数量丰富、等位变异高、共显性、检测简单及结果稳定可靠等优点^[6],现已普遍应用于遗传多样性分析、基因定位、亲缘关系分析和指纹图谱构建等领域^[7]。由于SSR标记是基于PCR反应的一种标记,因此其反应条件易受许多因素的干扰,

如模板DNA、*Taq* DNA聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs和引物浓度等都能影响SSR-PCR扩增的结果。为保证扩增结果的准确性和稳定性,有必要对其反应体系进行优化。

正交设计是一种用于多因素多水平的试验方法,它是从全面试验(单因子试验)中挑选出部分有代表的点进行试验,这些点具有“均匀分散”和“整齐可比”的特点,通过较少的试验次数全面反映各因子的情况。已有一些中药材将正交设计应用于PCR体系的优化^[8-12],诸如药用植物天门冬^[9]、东方百合^[10]、益智^[11]、柴胡^[12]等,但苦参正交设计优化PCR体系的报道很少。本试验拟采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 方法对苦参SSR-PCR反应体系的5因素(*Taq* DNA聚合酶、 Mg^{2+} 、模板DNA、dNTPs和引物的浓度)在4水平上进行优化,并用DPS数据处理软件对结果进行了较为详细的分析,以期建立一个较为完整可靠的苦参SSR-PCR反应体系。为苦参遗传多样性分析和种质资源的开发利用提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我国12个不同地理种源的苦参种子(表1),播种于山西农业大学,采摘苦参当年生嫩叶片,用液氮研磨后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

表1 苦参试验材料

Table 1 Research materials of *Sophora flavescens*

序号 No.	来源 Origin of materials	序号 No.	来源 Origin of materials
1	内蒙古赤峰	7	山西安泽
2	陕西眉县	8	山西长子
3	甘肃成县	9	山西黎城
4	四川雅安	10	陕西商洛
5	四川重庆	11	吉林省吉林市
6	吉林通化	12	内蒙古敖汉旗

1.2 试剂和引物

用于SSR-PCR反应的*Taq*聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、 $10\times$ PCR Buffer等均购自上海生物工程有限公司。从NCBI公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)下载了211条苦参EST

序列,采用CAP3软件进行EST拼接,从而获得Unigene,通过Auto SSR软件对Unigene进行SSR位点搜索,选择具有SSR位点,且串联重复长度大于15 bp的Unigene,用PRIMER 3.0软件设计SSR引物,共设计出65对苦参EST-SSR引物,该引物由上

海生物工程公司合成。经初步筛选,选用通用性强、条带清晰的引物 DYH 032 作为本次正交试验的引物,其序列为: F: 5'-CGTTTTTCTATCTCATGGCCC-3' R: 5'-TCATATGTATGGCGCAACC-3'。

1.3 基因组 DNA 提取及浓度纯度检测

采用改良的 CTAB 法^[12]提取苦参总 DNA,在核酸蛋白检测仪 (SXABRC, eppendorf-Biophotometer)上测定 DNA 样本的浓度及不同波长处的吸收值。用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的质量。置于 -20 °C 下保存备用。

1.4 苦参 SSR-PCR 反应体系正交试验设计

在 PCR 反应中,影响反应的 5 个主要因素是 *Taq* 聚合酶、Mg²⁺、dNTP、引物和 DNA 模板。为确定它们在 PCR 反应中的最佳水平,采用正交设计 L₁₆(4⁵)进行试验^[13-14],针对这 5 个因素,每个因素设 4 个水平(表 2)、2 次重复,共 32 个 PCR 管,按设计方案(表 3)加样,其中 DNA 模板选用山西黎城苦参 DNA,每管还加入 1 μL 的 10×PCR Buffer(终浓度为 1×PCR Buffer),其余用超纯水补足,反应体系总体积为 10 μL。

表 2 PCR 反应的因素及水平

Table 2 Factors and levels of PCR reaction system

因素 Factors	水平(体系终浓度) Levels(Final concentration)			
	1	2	3	4
<i>Taq</i> polymerase / (U/10 μL)	0.2	0.6	1.0	1.4
Mg ²⁺ / (mmol/L)	1.0	1.5	2.0	2.5
dNTP / (mmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4
Primer / (μmol/L)	0.3	0.4	0.5	0.6
DNA template / (ng/10 μL)	20.0	30.0	40.0	50.0

表 3 PCR 反应因素水平 L₁₆(4⁵) 正交试验设计

Table 3 L₁₆(4⁵) orthogonal design of the factors and levels for PCR reaction system

处理组合 Treatment combination	因素及水平 Factors and levels				
	<i>Taq</i> polymerase / (U/10 μL)	Mg ²⁺ / (mmol/L)	dNTP / (mmol/L)	Primers / (μmol/L)	Template DNA / (ng/10 μL)
1	0.2	1.0	0.1	0.3	20
2	0.2	1.5	0.2	0.4	30
3	0.2	2.0	0.3	0.5	40
4	0.2	2.5	0.4	0.6	50
5	0.6	1.0	0.2	0.5	50
6	0.6	1.5	0.1	0.6	40
7	0.6	2.0	0.4	0.3	30
8	0.6	2.5	0.3	0.4	20
9	1.0	1.0	0.3	0.6	30
10	1.0	1.5	0.4	0.5	20
11	1.0	2.0	0.1	0.4	50
12	1.0	2.5	0.2	0.3	40
13	1.4	1.0	0.4	0.4	40
14	1.4	1.5	0.3	0.3	50
15	1.4	2.0	0.2	0.6	20
16	1.4	2.5	0.1	0.5	30

1.5 PCR 扩增及其产物的检测

PCR 扩增反应在 EDC-810 型基因扩增仪上进行,反应程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。以 DL2000 Marker 为对照,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.05 μg/mL)检测,在电泳仪上于 120 V 恒压下电泳 40 min,在 SYN 型凝胶成像仪上观察并照相。参照何正文等^[15]的方法,依据扩增条带的敏感性和特异性进行计分,分数

越高,表示扩增带的敏感性、特异性越好。

1.6 最佳反应体系的验证

从设计的苦参 SSR 引物中,随机选取引物 DYH 033 (F: 5'-GATGGACTTTTCGTACGGTCT-3' R: 5'-TACACACGAGAAACCATTC-3'),对 12 个不同地理种源的苦参 DNA 进行扩增,同时选取 10 对引物(表 4)对内蒙古苦参 DNA 进行扩增,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,以验证优化的苦参 SSR-PCR 反应的稳定性。

表 4 SSR 引物序列

Table 4 SSR primer sequences

引物编号 Primer No.	上游序列 Forward sequences	下游序列 Reverse sequences	退火温度 Annealing temperature
DYH 06	AATACGAAATGACTCTCGGC	CTCAGTTTTCAACCAACCGT	58
DYH 07	ACTGAAGCTGGCTTACTTGC	TCCCATAACATAGGCTCACA	57
DYH 12	AGCAGGATCCGAAGTATCTG	CTTTGGCAGCTAATCCTCTC	57
DYH 18	CAGAAAGGAAAGGATCAAGG	TGACATGTAGAATGGGACTC	56
DYH 19	CATCCCTCTGCAGTAAATC	GAGAACATCGTTGTCCATCA	57
DYH 20	CCATCGTCTCATGTCCTA	GATGTGACGACAAAGGTGAA	57
DYH 26	CTCTACGCCGATACACCTTT	CATTCTCTGGGCTGAAGAGT	57
DYH 28	GAAGCCATCTTGTGATTCC	AGCTGTTGGATATGGGACAT	57
DYH 40	GGATCTGAGCGGAATTTTG	CGCATCAGCCTCATTTTAAG	58
DYH 42	GGATGGTGGCTGAGTAAAAT	GCTTAAACTCAGCGGGTAGT	57

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果分析

根据正交设计的 16 个处理组合(表 3)都没有扩增出分子量小于 100 bp 的引物二聚体。2、11 号处理组合扩增效果较差,条带模糊,不易观察;而 1、4、6、8 号处理组合扩增的条带较亮,目的条带清晰易观察(图 1(a))。根据电泳图,结合遗传多样性分析的要求,将扩增条带数量丰富、清晰度高、背景低的产物记为 16 分,无扩增条带或条带较少、清晰度差的记为 1 分。2 次电泳结果分别独立打分统计。图 1(a)中 1~16 处理组合得到的分数分别记为:

15、2、12、16、6、13、9、14、8、3、1、7、5、4、11、10;图 1(b)中 1~16 处理组合得到的分数为:15、4、8、16、10、13、9、14、7、6、1、2、3、5、12、11。从 2 次重复的结果来看,各个处理组合的反应都具有较高的一致性。

对不同因素与水平的电泳评分平均值和极差进行计算分析(表 5),极差 R 的大小可以反应各因素影响程度的高低,如果 R 越大,就表明该因素对结果影响越大。因此,该扩增体系中对结果影响的大小顺序依次是 Taq 聚合酶、引物、 Mg^{2+} 、DNA 模板、dNTP。其中, K_i 为每一因素水平下的数据平均值,反映了各因素不同水平对反应体系的影响情况,均值越大说明反应水平越好。

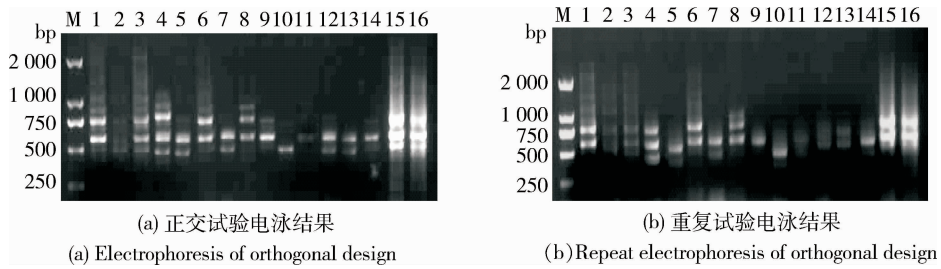


图 1 SSR-PCR 正交试验电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of SSR-PCR orthogonal design

表 5 正交设计直观分析

Table 5 Intuitive analysis of orthogonal design

结果 Results	因素 Factors				
	<i>Taq</i> polymerase/(U/10 μ L)	Mg ²⁺ /(mmol/L)	dNTP/(mm/L)	Primers/(μ mol/L)	Template DNA/(ng/10 μ L)
K ₁	11.000	8.625	9.875	8.250	11.250
K ₂	11.000	6.250	6.750	5.500	7.500
K ₃	4.375	7.875	9.000	8.250	7.875
K ₄	7.625	11.250	8.375	12.000	7.375
R	6.625	5.000	3.125	6.500	3.857

2.2 最佳反应体系稳定性检测

为了检测上述试验筛选出来的最优反应体系的扩增效果,选用引物 DYH033 应用上述体系对苦参不同地理种源的 12 个苦参 DNA 进行扩增,每份 DNA 样品均能扩增出清晰且特异性较高的条带(图 2)。同时,随机挑选 10 对引物对内蒙古苦参 DNA 进行 SSR-PCR 扩增,也获得了清晰可读的多态性条带(图 3)。说明该体系具有较好的稳定性和重复性,适用于药用植物苦参遗传多样性的 SSR 标记分析。

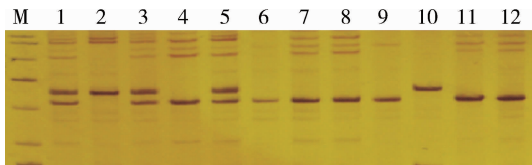


图 2 最佳体系的 12 个苦参材料电泳图

Fig. 2 Best system electrophoresis map of 12 *Sophora flavescens* materials

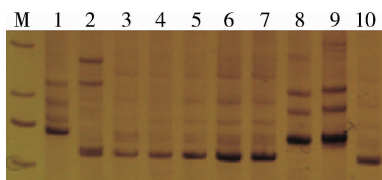


图 3 内蒙古苦参的电泳图

Fig. 3 Electrophoresis map of *Sophora flavescens* from Neimenggu

3 讨论

近年来,关于 SSR-PCR 反应体系优化的报道很多,苦荞^[16]、云南松^[17]、山东鹅观草^[18]、梨^[19]以及树莓^[20]等植物都筛选出最优化的 SSR-PCR 反应体系,但至今未见苦参的相关报道。PCR 扩增效果易受 Mg²⁺ 浓度、*Taq* 酶用量、dNTPs 浓度、引物浓度和模板 DNA 用量等多个因素的影响,每个因素都与 PCR 反应效率、反应结果密切相关。模板浓度过高会使引物与 dNTPs 过早耗尽,结果不稳定。引物浓度过高会引起错配和非特异性产物扩增,易形成引物二聚体。*Taq* 酶浓度过高也极易产生非特异性扩增产物,增加试验成本。同时,*Taq* 酶是 Mg²⁺ 依赖性酶,对 Mg²⁺ 浓度变化非常敏感,而 dNTPs 分子中磷酸基团能与 Mg²⁺ 定量地结合,降低 Mg²⁺ 浓度^[17]。PCR 反应是一个多因素控制的综合反应体系,PCR 反应体系的优化是进行 PCR 反应的关键所在,有必要优化反应体系提高特异性产物,减少非特异性产物,获得高效的 PCR 反应结果。有部分研究者采用单因素梯度试验法优化反应体系,需要进行多次的梯度试验,不仅耗费时间、增加成本,而且不能反映各因素间的互作关系。而本试验采用的正交设计根据正交性从全因子试验中挑选出部分有代表性的因子进行试验,能快速找到最优组合,同时可分析不同因素对试验结果的影响,是

一种经济、高效的试验设计方法^[21],已有一些中药材将正交设计应用于 PCR 体系的优化^[8-12]。

本研究采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计表在 4 个水平上对影响苦参 SSR-PCR 扩增效果的 5 个因子进行了优化,发现 *Taq* 聚合酶浓度的影响最显著, Mg^{2+} 浓度的影响次之。这一结果与杨旻等^[12]、欧立军等^[9]的研究结果基本一致;而与丁信誉等^[10]、刘晓静等^[11]的研究结果不同,他们认为对 PCR 反应影响最大的是 Mg^{2+} 浓度;刘晓静等^[11]的研究中 *Taq* 聚合酶浓度影响排第三。尽管天门冬、东方百合、益智、柴胡、苦参都属于药用植物,但由于材料间的差异,在 PCR 反应中 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶用量、dNTPs 浓度、引物浓度和模板 DNA 用量这 5 个因子的影响力也是有差异的,为达到最佳的扩增效果以及节约成本,有必要对苦参的 SSR-PCR 扩增体系进行优化。用本研究确定的最优反应体系和引物 DYH033 对 12 份苦参 DNA 进行扩增,条带清晰、重复性好、多态性高,表明该反应体系适用于苦参 SSR 标记分析,这将为用 SSR 标记揭示苦参资源的遗传多样性、构建遗传图谱等奠定基础。

4 结 论

本研究中,影响药用植物苦参 SSR-PCR 扩增的 5 个因子从大到小的影响力排序结果为 *Taq* 酶 > 引物 > Mg^{2+} > 模板 DNA > dNTPs。适用于苦参 SSR-PCR 的最适反应体系(10 μ L)为:*Taq* DNA 聚合酶 0.2~0.6 U、引物 0.6 μ mol/L、 Mg^{2+} 2.5 mmol/L、模板 DNA 20 ng 以及 dNTPs 0.1 mmol/L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,56 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

参 考 文 献

- [1] 楼之岑,秦波.常用中药材品种整理和质量研究[M].北京:北京大学医学出版社,1995:343-376
- [2] 郭吉刚,关扎根.苦参生物学特性及栽培技术研究[J].山西中医学院学报,2005,6(2):45-47
- [3] 战渤玉,李东霞,高明.苦参的现代研究进展[J].中医药信息,2009,26(1):23-24
- [4] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等.苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J].中药新药与临床药理,2012,23(3):369-373
- [5] 李双桂,何莎,白成科.苦参种子催芽及秋水仙素诱导多倍体研究[J].种子,2009,28(5):24-27
- [6] Zhang C Y, Chen X S, He T M, et al. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang revealed by SSR markers[J]. Tree Genet Genomes, 2007, 34(10):947-955
- [7] 邹喻萍,葛蒨,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,2001:103-107
- [8] 李亚慧,黄丛林,董然.菊花 SSR-PCR 反应体系的建立和优化[J].北方园艺,2012(13):127-131
- [9] 欧立军,颜旺,廖亚西,等.天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J].中草药,2011,42(2):353-357
- [10] 丁信誉,邱师,席梦利,等.东方百合 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J].南京林业大学学报:自然科学版,2012,36(5):42-46
- [11] 刘晓静,王文泉,郭凌飞.益智 ISSR-PCR 反应体系建立与优化[J].生物技术,2008,18(3):33-37
- [12] 杨旻,胡继鹰,陈科力,等.综合评分法优化柴胡 RAPD-PCR 反应体系[J].中成药,2008,30(5):722-726
- [13] 袁志发,周静芋.试验设计与分析[M].北京:高等教育出版社,2000:292-303
- [14] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002:12-19
- [15] 何正文,刘运生,陈立华,等.正交设计直观分析优化 PCR 条件[J].湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404
- [16] 高帆,张宗文,吴斌.中国苦荞 SSR 分子标记体系构建及其在遗传多样性分析中的应用[J].中国农业科学,2012,45(6):1042-1053
- [17] 刘芸君,王仕玉,郭凤根,等.岩白菜 ISSR-PCR 反应体系的优化[J].生物技术,2012,22(1):52-55
- [18] 彭程,刘全兰,王洪光,等.山东鹅观草 SSR-PCR 反应体系的优化和验证[J].生物学杂志,2012,29(2):91-94
- [19] 毕红园,王长彪,段永红,等.采用正交设计法优化梨 SSR-PCR 体系[J].生物技术通报,2013(5):111-115
- [20] 张玉平,潘清华,金万梅,等.树莓 SSR 反应体系的优化及应用[J].中国农业大学学报,2011,16(6):58-63
- [21] 续九如,黄智慧.林业试验设计[M].北京:中国林业出版社,1995:71-74