

皱边石杉内生真菌 ISSR-PCR 反应条件的优化

史云峰^{1a}, 禹利君^{2,3*}, 刘仲华^{2,3}, 黄璜^{1b*}, 胥锦桦^{2,3}, 朱楠楠^{2,3}

(1.湖南农业大学 a.东方科技学院; b.农学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 3. 茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以从皱边石杉中分离纯化出的99株内生真菌DNA为材料, 优选出10条ISSR引物(UBC842、UBC848、UBC850、UBC856、UBC861、UBC864、UBC868、UBC873、UBC880、UBC887)的最适退火温度, 并对其进行ISSR-PCR反应体系单因素试验及正交试验优化, 建立皱边石杉内生真菌ISSR-PCR的优化反应体系, 即25 μL反应体系中, 10×PCR Buffer(Mg²⁺浓度为2.0 mmol/L)2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L)0.6 μL, 引物(10 pmol/μL)2.0 μL, Taq E(1 U/μL)1.5 μL, DNA模板(10 ng/μL)3 μL, 无菌ddH₂O 15.4 μL。以UBC873引物对99株内生真菌基因组DNA进行PCR扩增, 初步获知皱边石杉内生真菌资源的遗传多样性非常丰富。

关键词: 皱边石杉; 内生真菌; 内部简单重复序列; 正交试验

中图分类号: S58; Q75 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)04-0398-06

Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for endophytic fungi of *Huperzia crispata*

SHI Yun-feng^{1a}, YU Li-jun^{2,3*}, LIU Zhong-hua^{2,3}, HUANG Huang^{1b*}, XU Jin-hua^{2,3}, ZHU Nan-nan^{2,3}

(1. a. College of Orient Science and Technology; b. College of agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha 410128, China; 3. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Changsha 410128, China)

Abstract: DNAs were extracted from 99 endophytic fungi isolated from *Huperzia crispata* and the best annealing temperatures of 10 primers (UBC842, UBC848, UBC850, UBC856, UBC861, UBC864, UBC868, UBC873, UBC880 and UBC887) were determined for optimization of ISSR-PCR amplification of endophytic fungi from *Huperzia crispata* through single factor test and orthogonal design. The result showed that the optimal ISSR-PCR reaction volume was 25 μL, containing 2.5 μL of 10×PCR Buffer (2.0 mmol/L Mg²⁺), 0.6 μL of dNTPs (10 mmol/L), 2.0 μL of primer (10 pmol/μL), 1.5 μL of Taq E (1U/μL), 3 μL of template DNA (10 ng/μL) and 15.4 μL of aseptic ddH₂O. PCR using primer UBC873 conducted on 99 endophytic fungi showed that the genetic polymorphism for endophytic fungi of *Huperzia crispata* was abundant.

Key words: *Huperzia crispata*; endophytic fungi; inter simple sequence repeat (ISSR); orthogonal design

石杉科植物含有治疗老年性痴呆症的特效药物成分石杉碱甲。若能从其内生真菌中获得可产石杉碱甲的菌株, 有望解决老年性痴呆病人的用药需求。

对石杉科植物内生真菌的研究起步较晚, 主要集中在对其菌种的分离、纯化和形态学初步鉴定^[1-3], 对其内生真菌进行相关分子标记的研究尚少。内部简

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(11JJ3040); 湖南省大学生科技创新研究项目(DFCXS201003)

作者简介: 史云峰(1970—), 男, 湖南永顺人, 博士研究生, 副教授, 主要从事药用作物信息学研究, shiyf@hunau.net; *通信作者, yulijunhn@yahoo.cn, hh863@126.com

单重复序列(inter simple sequence repeat, ISSR)结合了随机引物扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记技术的优点,无需知道基因组序列信息, DNA 用量少,稳定性好,多态性高,已广泛应用于分子标记辅助育种^[4-5]、植物病原菌进化与亲缘关系分析^[6]、遗传多样性分析、遗传作图、基因定位等^[7-9]。ISSR 反应易受 *Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTPs、引物及退火温度的影响,不同物种的试验参数均有差异。以皱边石杉(*Huperzia crispata*)内生真菌的 DNA 为材料,对其 ISSR-PCR 反应体系进行单因素试验及正交试验优化,旨在建立稳定、可靠的 ISSR-PCR 反应体系,为后期从分子水平对皱边石杉内生真菌进行分类鉴定、种群遗传结构分析及种质资源的优选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜皱边石杉样品采自湖南湘西自治州永顺县小溪原始次生林国家自然保护区,从中分离纯化的 99 株内生真菌保存于湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心。

Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、Marker 购自上海生工生物工程技术有限公司。根据加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, UBC)公布的植物病原基因真菌 DNA 的 ISSR 引物信息,由南京金斯特科技有限公司合成引物。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

发酵培养内生真菌获菌丝体。将菌丝体用无菌超纯水洗净作为 DNA 提取材料。采用氯化苄改良法,结合超声破壁处理提取 DNA^[10-11]。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量与纯度。将所提取的 DNA 与标准 DNA 进行浓度比较,稀释至 30 ng/ μ L 备用。

1.2.2 ISSR 引物筛选

将 99 株内生真菌 DNA 随机混合后分成 10 份,根据各 ISSR 引物 T_m 值将 100 条引物分成 10 组,

探索各引物退火温度。采用 Biometra T-Gradient Thermoblock PCR 仪对混合 DNA 样本进行 PCR 扩增,从 100 条 ISSR 引物中筛出谱带清晰、多态性高的引物。

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系的参数优化

对 25 μ L ISSR-PCR 反应体系分别设定 5 个 DNA 模板浓度(10、20、30、40、50 ng/(25 μ L)), 5 个 *Taq* DNA 聚合酶浓度(1.0、1.5、2.0、2.5、3 U/ μ L), 6 个 Mg^{2+} 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L), 5 个 dNTPs 浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)。基础 ISSR-PCR 扩增体系为 25 μ L。基础反应体系中含 10 \times PCR Buffer(Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L)2.5 μ L, dNTPs(10 mmol/L)0.5 μ L, 引物(10 pmol/ μ L)1.25 μ L, *Taq* E(1U/ μ L)1.25 μ L, DNA 模板(10 ng/ μ L)2.5 μ L, 无菌 ddH₂O 17 μ L。对照以 ddH₂O 代替模板 DNA。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 适宜温度(最适退火温度因引物而异)下退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 2 h, 于自动凝胶成像系统进行观察,照相。

1.2.4 ISSR-PCR 正交试验设计

在单因素优化条件的基础上,采用正交设计 $L_9(3^4)$ 对影响 ISSR-PCR 反应的 DNA 模板浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度 4 个因素,各设置 3 个水平试验,共 9 个处理,每个处理设置平行反应(表 1),以建立最优 PCR 反应体系。

表 1 ISSR-PCR 反应因素的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design for the factors and levels of ISSR-PCR reaction

序号	<i>Taq</i> DNA 聚合酶浓度/ (U·(25 μ L) ⁻¹)	Mg^{2+} 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	dNTP 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	DNA 模板浓度/ (ng·(25 μ L) ⁻¹)
1	1.5	1.0	0.4	10
2	2.0	1.5	0.6	10
3	3.0	2.0	0.8	10
4	1.5	1.5	0.8	20
5	2.0	2.0	0.4	20
6	3.0	1.0	0.6	20
7	1.5	2.0	0.6	30
8	2.0	1.0	0.8	30
9	3.0	1.5	0.4	30

2 结果与分析

2.1 不同参数对 ISSR-PCR 反应结果的影响

2.1.1 引物最适退火温度的确定

对初步筛选出的 41 条 ISSR 引物进行适宜退火温度探索。退火温度取决于引物的长度、浓度和引物的碱基组成,在各引物 T_m 值低 5 °C 的温度上、下各浮动 7.5 °C。设定 12 个退火温度梯度,进行 PCR 扩增,确定 10 条稳定好、多态性高 ISSR 引物的适宜退火温度。这 10 条引物分别为 UBC842、UBC848、UBC850、UBC856、UBC861、UBC864、UBC868、UBC873、UBC880、UBC887(表 2)。

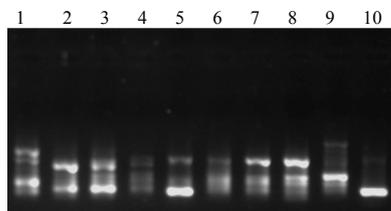
表 2 10 条用于 ISSR-PCR 扩增引物的退火温度
Table 2 Ten ISSR primers for ISSR-PCR amplification and their annealing temperatures

引物	序列(5'→3')	退火温度/°C
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAYG	50
UBC 848	CACACACACACACARG	41
UBC 850	GTGTGTGTGTGTGYC	46
UBC 856	ACACACACACACACYA	41
UBC 861	ACCACCACCACCACC	61
UBC 864	ATGATGATGATGATG	47
UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAA	46
UBC 873	GACAGACAGACACA	47
UBC 880	GGAGAGGAGAGAGA	41
UBC 887	DVDTCTCTCTCTCTC	40

D 代表 A、G、T 中的任一个碱基; V 代表 A、C、G 中的任一个碱基。

2.1.2 适宜 DNA 模板浓度的确定

由图 1 可知, 25 μ L 反应体系中, 模板 DNA 为



1~5 分别为引物 UBC856 在 20、30、40、50、60 ng DNA 模板条件下的电泳图谱; 6~10 分别为引物 UBC848 在 20、30、40、50、60 ng DNA 模板条件下的电泳图谱。

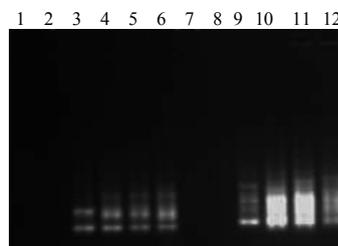
图 1 引物 UBC856 和 UBC848 在不同 DNA 模板浓度下的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of PCR products amplified using primers UBC856 and UBC848 with different concentrations of DNA template

20~60 ng, UBC856、UBC848 均可扩增出清晰的 DNA 条带。模板量增加对扩增结果的影响不明显。因 DNA 在使用过程中经历冻融后会发生部分降解, 为节约模板用量, 并获得清晰的扩增条带, 本扩增体系中选择 DNA 模板 30 ng。

2.1.3 适宜 Mg^{2+} 浓度的确定

从图 2 可知, 选用 UBC848、UBC856 引物进行 Mg^{2+} 浓度探索, 当 Mg^{2+} 浓度分别为 0.5~3.0 mmol/L 时, 反应结果差异显著; 当 Mg^{2+} 浓度低于 1.5 mmol/L 时均无明显扩增条带, 可见, Mg^{2+} 浓度过低, *Taq* 酶的作用效率低, 不能有效扩增; Mg^{2+} 浓度过高, 可能会产生非特异性扩增, 导致条带弥散。图 2 中 11、12 泳道泛白拖尾主要是在电泳载样时枪头对点样孔有轻微的戳破, 样品没有全部沉入点样孔底部, 部分样品留在琼脂糖凝胶表层, 导致带型不是非常集中。以 Mg^{2+} 浓度相对较低, 且能扩增出丰富的特异性条带为选择标准, UBC848、UBC856 引物的适宜 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L。



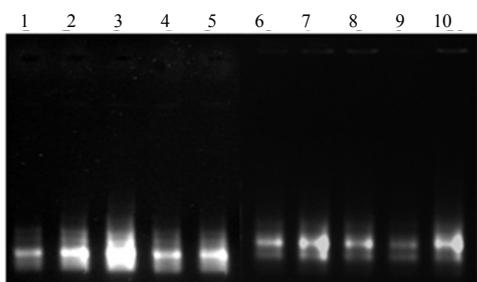
1~6 分别为引物 UBC856 在 Mg^{2+} 浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 条件下的电泳图谱; 7~12 分别为引物 UBC848 在 Mg^{2+} 浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 条件下的电泳图谱。

图 2 引物 UBC856 和 UBC848 在不同 Mg^{2+} 浓度下的电泳结果
Fig.2 Electrophoresis of PCR products amplified using primers UBC856 and UBC848 with different Mg^{2+} concentrations

2.1.4 适宜 *Taq* 酶浓度的确定

由图 3 可知, 在 *Taq* 酶浓度为 1.0~3.0 U/ μ L 和 UBC856、UBC848 在 *Taq* 酶浓度分别为 1.5、2.0 U/ μ L 时, 可扩增出清晰的 DNA 多态性条带; 当 *Taq* 酶浓度为 1.0 U/ μ L 时, 2 条引物扩增出的条带均较弱, 不太清晰; 当 *Taq* 酶浓度为 2.5 U/ μ L 时, 其扩增条带呈减弱趋势。可见, 在该反应体系中, *Taq* 酶浓度为 1.5~2.0 U/ μ L 是适宜的。从节

约试剂成本角度考虑,选取 1.5 U/ μ L 为 *Taq* 酶适宜浓度。



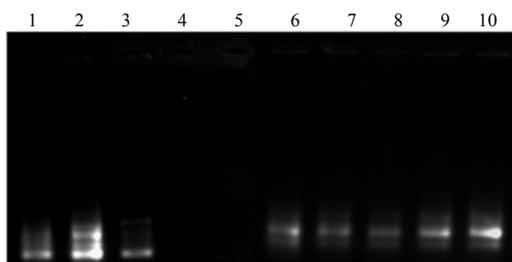
1~5分别为引物UBC856在1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U/ μ L *Taq* 酶浓度的电泳图谱;6~10分别为引物UBC848在1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U/ μ L *Taq*酶浓度下的电泳图谱。

图 3 引物 UBC856 和 UBC848 在不同 *Taq* 酶浓度下的电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products amplified using primers UBC856 and UBC848 with different concentrations of *Taq* polymerase

2.1.5 适宜 dNTPs 浓度的确定

dNTPs 作为 PCR 反应的原料,浓度太低会使扩增反应不完全,从而降低 PCR 产物的产量;浓度过高会对 Mg^{2+} 产生抑制作用,影响 *Taq* 酶活力,造成浪费。从图 4 可知:当 dNTPs 浓度为 0.2~1.0 mmol/L 时,反应结果差异显著;dNTPs 浓度为 0.4~0.6 mmol/L 时可得到较清晰的扩增条带。若 dNTPs 浓度继续加大,UBC856 号引物的条带消失。UBC856



1~5分别为引物UBC856在0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L dNTPs条件下的电泳图谱;6~10分别为引物UBC848在0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L dNTPs条件下的电泳图谱。

图 4 引物 UBC856 和 UBC848 在不同 dNTPs 浓度下的电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products amplified using primers UBC856 and UBC848 with different concentrations of dNTPs

引物在 dNTPs 浓度 0.4、0.6 mmol/L 扩出的条带带型一致,但条带亮度有差异,主要是 UBC856-2 泳道在电泳载样时枪头对点样孔有轻微的戳破,部分样品留在琼脂糖凝胶表层,带型有些弥散。

2.2 ISSR-PCR 最优反应体系的建立

根据 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对皱边石杉内生真菌菌丝体 DNA 混合模板进行 ISSR-PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测。由图 5 可知,以 7 号处理进行扩增,其平行样重复好,多态性条带最丰富。25 μ L ISSR-PCR 扩增体系为:10 \times PCR Buffer(Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L)2.5 μ L, dNTPs(10 mmol/L)0.6 μ L, 引物(10 pmol/ μ L)2.0 μ L, *Taq* E(1 U/ μ L)1.5 μ L, DNA 模板(10 ng/ μ L)3 μ L, 无菌 ddH₂O 15.4 μ L。

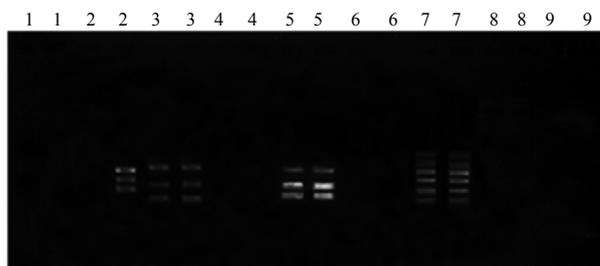


图 5 ISSR-PCR 优化体系电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis for the optimized ISSR-PCR reaction system

2.3 UBC873 引物对 99 株内生真菌 ISSR-PCR 扩增结果的验证

以 UBC873 引物对 99 株内生真菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。按照形态学初步归类比对结果,将相似性较高菌株的 ISSR-PCR 产物邻接点样,扩增产物大小为 200~2 000 bp(图 6)。从图 6 可知:皱边石杉内生真菌资源间的 ISSR 多态性水平较高,其中 1 号和 2 号、46 号和 52 号、63 号和 64 号、43 号和 44 号、35 号和 42 号这 5 对菌株菌丝体 DNA 的 ISSR 指纹图谱几乎一致,可初步推定这 5 对菌株中各有 1 个重复菌种,其他均为亲缘关系或远近的不同菌种。由此可知,皱边石杉内生真菌资源遗传多样性非常丰富。

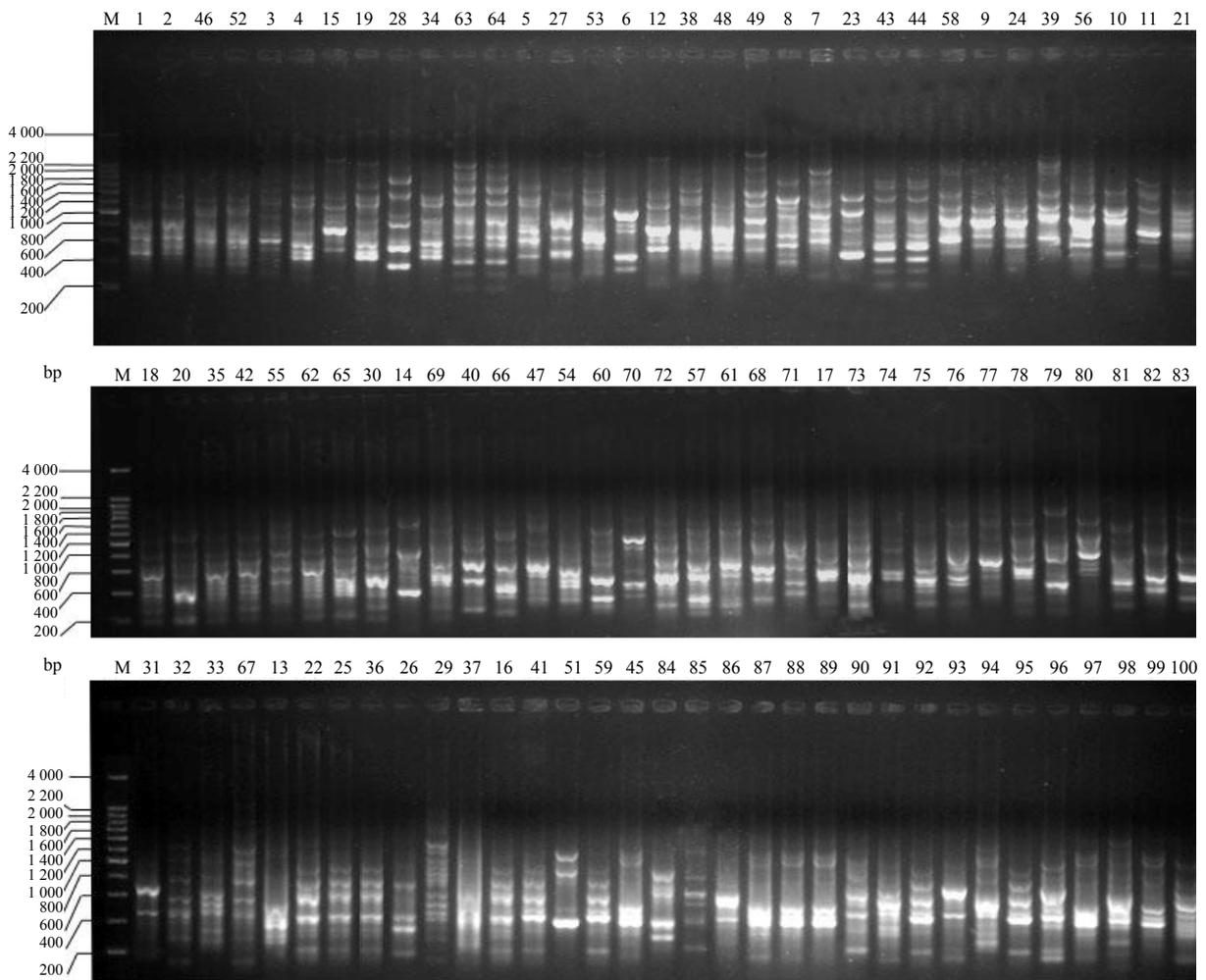


图6 引物 UBC873 对 99 株内生真菌的扩增结果

Fig.6 Amplification results for 99 endophytic fungi strains of *Huperzia crispata* using primer UBC 873

3 结论与讨论

确定 ISSR-PCR 反应的适宜退火温度是决定试验成败的前提。引物退火温度不仅与引物序列有关,还与物种 DNA 的序列密切相关^[12-13]。通常引物退火温度比引物的 T_m 值低 5°C 左右。本试验中,为快速确定 100 条 ISSR 引物的最适退火温度,根据其 T_m 值将引物分成 10 组,在各引物 T_m 值低 5°C 的温度上、下各浮动 7.5°C ,设定 12 个温度梯度,并将 99 个 DNA 模板随机混合,进行合适引物及其最佳退火温度筛选,确定了 UBC842、UBC848、UBC850、UBC856、UBC861、UBC864、UBC868、UBC873、UBC880 及 UBC887 等 10 条稳定性好、多态性高的 ISSR 引物作为皱边石杉内生真菌 ISSR

分析的合适引物。

在建立皱边石杉内生真菌 ISSR-PCR 扩增优化体系的过程中,参照植物病原菌 ISSR 扩增的反应体系^[6, 8, 14]来确定 ISSR 基础反应体系,在此基础上进行模板 DNA 浓度、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶浓度、dNTPs 浓度的单因素试验和正交试验,得到最优反应体系 (25 μL):10 \times PCR Buffer(Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L)2.5 μL , dNTPs(10 mmol/L)0.6 μL ,引物(10 pmol/ μL)2.0 μL , *Taq* E(1U/ μL)1.5 μL ,DNA 模板(10 ng/ μL)3 μL ,无菌 ddH₂O 15.4 μL 。以此优化的扩增体系,选用 UBC873 引物对 99 株内生真菌进行扩增验证,获得了良好的结果,可供后续皱边石杉内生真菌的遗传多样性及遗传图谱构建研究参考。

参考文献:

- [1] Wang Y, Zeng Q G, Zhang Z B, et al. Isolation and characterization of endophytic(huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, 38(9): 1267-1278.
- [2] 鞠鏊,王峻,潘胜利.4种石杉科植物中产生石杉碱甲的内生真菌的分离及初步鉴定和 HPLC 测定石杉碱甲的含量[J].复旦学报:医学版,2009,36(4):445-449.
- [3] 范铁芳,史云峰,杨培迪,等.皱边石杉内生菌 J060918 产四草酸钾的发酵条件[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(4):409-412.
- [4] 郑海燕,粟建光,戴志刚,等.利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证[J].中国农业科学,2010,43(17):3499-3510.
- [5] 王海飞,关建平,马钰,等.中国蚕豆种质资源 ISSR 标记遗传多样性分析[J].作物学报,2011,37(4):595-602.
- [6] 张培培,梁晨.番茄叶霉病菌 ISSR-PCR 体系的建立[J].菌物研究,2010,8(2):107-114.
- [7] Raina S N, Rani V, Kojima T, et al. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut(*Arachis hypogaea*)cultivars and wild species[J]. Genome, 2001, 44(5): 763-772.
- [8] 于红梅,林英任,陈莉,等.皮下盘菌属种内及种间遗传多样性的 ISSR 分子标记[J].微生物学杂志,2009,29(2):12-16.
- [9] Curlevski N J, Chambers S M, Anderson I C, et al. Identical genotypes of an ericoid mycorrhiza-forming fungus occur in roots of *Epacris pulchella*(Ericaceae) and *Leptospermum polygalifolium*(Myrtaceae) in an Australian sclerophyll forest[J].FEMS Microbiol Ecol, 2009, 67(3): 411-420.
- [10] 禹利君,史云峰,范铁芳,等.皱边石杉基因组总 DNA 保存期间的质量检测分析[J].生物技术通讯,2007,18(4):635-637.
- [11] 史云峰,禹利君,胥锦桦,等.皱边石杉内生真菌 DNA 快速有效提取的研究[J].中国农学通报,2012,28(6):183-188.
- [12] Nazrul M I, Yin-Bing B. ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclonal of *Agaricus bisporus*[J]. Curr Microbiol, 2010, 60(2): 92-98.
- [13] 孙立夫,裴克全,张艳华,等.法国蜜环菌 *Armillaria gallica* 菌株遗传多样性的 ISSR 分析[J].菌物学报,2011,30(5):686-694.
- [14] 赵云福,刘翠,梁晨,等.白粉寄生孢 ISSR-PCR 体系的建立及遗传多样性的初步分析[J].菌物学报,2010,29(5):653-664.

责任编辑:王赛群