

· 基础研究 ·

利用 ISSR 分子标记的特征条带鉴别正毛化橘红[△]胡珊¹, 杨志业², 邬龙怡¹, 李华², 计周正^{2*}

(1. 广州市香雪制药股份有限公司, 广东 广州 510663;

2. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180)

[摘要] 目的: 在 ISSR 分子标记方法的基础上找到属于正毛化橘红的 PCR 特征条带或特征条带组合来建立鉴别正毛化橘红种苗的方法。方法: 在 50 条 ISSR 引物中筛选合适的引物对三个品种的化橘红叶片样品进行 PCR 扩增及电泳条带分析, 寻找正毛化橘红的特征条带或条带组合, 并对 80 份化橘红叶片样品进行验证。结果: 寻找到了两个引物的特征条带组合可以用来鉴别正毛化橘红种苗, 建立了正毛化橘红种苗分子鉴定方法。结论: 本文建立的基于 ISSR 分子标记的 PCR 特征条带组合的方法可以用来快速准确的鉴别正毛化橘红种苗。

[关键词] ISSR 分子标记; 正毛化橘红; 特征条带

Identification of Zhengmao Citri Grandis Exocarpium by ISSR Molecular Markers

HU Shan¹, YANG Zhi-ye², WU Long-yi¹, LI Hua², JI Zhou-zheng^{2*}

(1. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Limited by Share Ltd, Guangzhou 510663, China;

2. Guangdong institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] **Objective:** The study aims at establishing an identification method of Zhengmao Exocarpium Citri Grandis by seeking out the characteristic PCR band or bands combination belonging to Zhengmao Citri Grandis Exocarpium based on ISSR molecular markers. **Methods:** Proper primers were screened out for PCR, electrophoresis and cluster analysis within 50 ISSR primers. The characteristic PCR band or bands combination belonging to Zhengmao Citri Grandis Exocarpium were sought out and 80 leaf samples of Citri Grandis Exocarpium were validated. **Results:** The characteristic PCR bands combination of two primers were sought out to identify Zhengmao Citri Grandis Exocarpium and the molecular identification method was established. **Conclusion:** The established method of characteristic PCR bands combination based on ISSR molecular markers can be used to identify Zhengmao Citri Grandis Exocarpium quickly and accurately.

[Keywords] ISSR Molecular Markers; Zhengmao Citri Grandis Exocarpium; characteristic bands

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180131003

化橘红为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* ‘To-mentosa’ 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮^[1], 具有散寒、燥湿、消痰等功效, 用于风寒咳嗽, 喉痒痰多^[2]。化橘红为广东化州道地药材, 根据其果实表面绒毛的有无、多少分为大致正毛化橘红、副毛化橘红和光青化橘红, 品质和功效以正毛化橘红最优^[3-5]、副毛化橘红次之、光青化橘红最差, 假西洋品种是外观介于正毛和副毛之间、功效介于副毛和光果的一个较特殊品种, 而正毛化橘红和非正毛化橘红的种苗在外观形态非常相似, 运用传统方法很难准确区分。以生物分

子的多态性为基础的遗传标记, 即 DNA 水平的分子标记如 RAPD、ISSR 分标记^[6-7]等, 相对于传统形态标记具有巨大优势, 为解决品种混乱和品种优劣问题提供了一种新的手段。本文在 ISSR 分子标记的基础上建立了一种利用 PCR 特征条带组合来鉴别正毛化橘红种苗的方法, 该方法快速、简便且准确性高, 只需要少量样本即可实现正毛化橘红种苗的鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料来源

研究实验: 正毛化橘红、副毛化橘红、光青

[△] [基金项目] 广东省中医药局科研项目(2017041)

* [通信作者] 计周正, 主管药师, 研究方向: 中药材质量控制; E-mail: 867892097@qq.com

化橘红等样品均来自广东省化州市和茂名市,并经广东省药品检验所杨志业副主任中药师鉴定。其中正毛化橘红样品 8 份,副毛化橘红 5 份,假西洋品种 3 份,光青化橘红 2 份。采集其新鲜叶片并用硅胶快速干燥,采样时间为 2016 年 5 月,样品信息见表 1。

表 1 研究实验样品的来源及品种

样品编号	采集地	化橘红品种
SN1	广东化州河西天鹅岭	副毛化橘红
SN2	广东化州河西天鹅岭	正毛化橘红
SN3	广东化州河西天鹅岭	副毛化橘红
SN4	广东化州河西天鹅岭	假西洋品种
SN5	广东化州河西天鹅岭	光青化橘红
SN6	广东化州河西天鹅岭	正毛化橘红
SN7	广东化州河西天鹅岭	正毛化橘红
SN8	广东化州河西卜儿岭	正毛化橘红
SN9	广东化州河西卜儿岭	副毛化橘红
SN10	广东化州河西卜儿岭	正毛化橘红
SN11	广东化州河西卜儿岭	假西洋品种
SN12	广东化州河西卜儿岭	正毛化橘红
SN13	广东化州平定镇	副毛化橘红
SN14	广东化州平定镇	光青化橘红
SN15	广东化州平定镇	正毛化橘红
SN16	广东茂名	副毛化橘红
SN17	广东茂名	正毛化橘红
SN18	广东茂名	假西洋品种

验证实验:2017 年 5 月在广州市香雪制药股份有限公司的化州橘红种植基地随机选择已挂果的部分正毛化橘红、副毛化橘红、假西洋品种和光青化橘红共 80 棵,品种信息经广东省药品检验所杨志业副主任中药师鉴定,其中正毛化橘红 24 株,副毛化橘红 21 株,假西洋品种 23 株,光青化橘红 12 株。采集其叶片并做好其编号和品种信息记录,具体情况见表样品信息详见表 2。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、10 × Taq 缓冲液、dNTPs [普洛麦格(北京)生物技术有限公司];PCR 扩增引物 [生工生物工程(上海)股份有限公司];化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器

5418 型高速离心机(Eppendorf,德国);C1000

表 2 验证实验化橘红样品的品种情况

序号	品种	序号	品种
1	假西洋	41	假西洋
2	副毛	42	正毛
3	正毛	43	正毛
4	副毛	44	副毛
5	假西洋	45	副毛
6	副毛	46	正毛
7	光青	47	假西洋
8	假西洋	48	假西洋
9	正毛	49	副毛
10	假西洋	50	假西洋
11	副毛	51	正毛
12	正毛	52	正毛
13	副毛	53	正毛
14	正毛	54	正毛
15	假西洋	55	正毛
16	假西洋	56	副毛
17	正毛	57	正毛
18	副毛	58	假西洋
19	正毛	59	光青
20	副毛	60	假西洋
21	假西洋	61	副毛
22	副毛	62	假西洋
23	副毛	63	光青
24	正毛	64	光青
25	副毛	65	光青
26	正毛	66	光青
27	正毛	67	副毛
28	正毛	68	正毛
29	副毛	69	副毛
30	假西洋	70	光青
31	假西洋	71	正毛
32	假西洋	72	光青
33	假西洋	73	正毛
34	副毛	74	正毛
35	副毛	75	光青
36	假西洋	76	光青
37	正毛	77	光青
38	光青	78	假西洋
39	假西洋	79	副毛
40	假西洋	80	假西洋

Touch™ with 48/48 Fast Reaction 型 PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国); Gel Doc™ XR + 型凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国)

1.4 方法

1.4.1 DNA 提取与检测 采用天根植物基因组试剂盒提取所有样品的基因组 DNA。用微量紫外核酸仪检测 DNA 浓度和纯度。将合格样品 DNA 浓度稀释至 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后置于 -20°C 保存备用。

1.4.2 ISSR 分子标记的引物筛选及 PCR 扩增 PCR 反应体系: $10 \times \text{buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

$1.5 \mu\text{L}$, dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, 引物 ($10 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 1.5 U , DNA 模板 50 ng , 用纯水补足 $25 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 94°C 5 min , 94°C 45 s , 55°C 45 s , 72°C 1.5 min , 35 个循环, 72°C 10 min ; 电泳条件: 取 $10 \mu\text{L}$ PCR 产物与 $1 \mu\text{L}$ 上样缓冲液混匀, 于 $1 \times \text{TAE}$ 、 $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 30 min , 用凝胶成像系统照相存盘, 每个处理重复 2 次。对 50 条 ISSR 引物进行分析, 筛选出条带清晰、多态性好的 ISSR 引物, 并用筛选到的引物对 SN1 ~ SN18 的 DNA 模板进行 PCR 扩增和电泳, 每个处理重复 2 次。

1.4.3 PCR 扩增的条件优化 选用 L16(5^4) 正交试验设计(表 3), 对 Mg^{2+} 、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合

酶、引物和 DNA 用量进行 5 因素 4 水平的正交试验。以正毛化橘红 SN2 样本的 DNA 为模板, 引物 827 作为扩增引物, 反应总体积 $25 \mu\text{L}$, 含有 $10 \times \text{PCR Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, 每个处理重复 2 次。

1.4.4 验证实验 以 2017 年 5 月采集的化橘红(表 2)叶片 DNA 为样品进行验证实验, 在正交实验的基础上选择最优的 PCR 体系进行扩增反应, 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 45 s , 55°C 退火 45 s , 72°C 延伸 90 s , 35 个循环; 72°C 延伸 10 min , 最后 4°C 保存。扩增反应结束后, 取 $10 \mu\text{L}$ 扩增产物加入 $1 \mu\text{L}$ $10 \times \text{loading buffer}$ 用 1.0% 琼脂糖凝胶, 于 $1 \times \text{TAE}$ 、 $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 30 min , 凝胶成像仪下拍照。每个处理重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

将提取的所有样品的基因组 DNA 在超微量紫外分光光度计下测量其浓度和纯度, 得到其 A260/A280 均在 $1.8 \sim 2.0$ 之间, 说明 DNA 纯度较高, 符合 PCR 技术要求。

2.2 正毛化橘红特征条带分析及引物选择

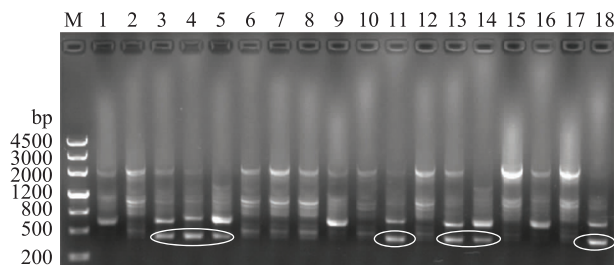
在 50 条 ISSR 随机引物筛选过程中发现引物 818 和 827 有不同于其他引物的特征条带, 其组合能够鉴别正毛化橘红。引物序列: 818——CACACACACACACACAG, 827——ACACACACACACACACG。

图 1 和图 2 分别为 ISSR 随机引物 818 和 827 的电泳图谱, 第 1 ~ 18 泳道对应的样品分别为表 1 中 SN1 ~ SN18。图 1 中第 3 ~ 5、11、13、14、18 泳道在 $200 \sim 500 \text{ bp}$ 之间接近 500 bp 处有一条条带(白线圈出的条带), 而其他泳道没有, 这 7 个泳道对应的化橘红样品分别是 SN3 副毛、SN4 假西洋、SN5 光青、SN11 假西洋、SN13 副毛、SN14 光青和 SN18 假西洋, 其他泳道为正毛化橘红和部分副毛化橘红, 说明正毛化橘红是没有这一特征条带的。图 2 中第 2、3、6 ~ 8、10、12、13、15、17 泳道在 $200 \sim 500 \text{ bp}$ 之间接近 500 bp 处有明显的条带(白线圈出的条带), 而其他泳道没有, 这 10 个泳道对应的化橘红样品分别为 SN2 正毛、SN3 副毛、SN6 正毛、SN7 正毛、SN8 正毛、SN10 正毛、SN12 正毛、SN13 副毛、SN15 正毛、SN17 正毛, 说明假西洋品种、光果、部分副毛化橘红没有这一特征条带。综合引物 818 和 827 的电泳图谱可

表 3 PCR 反应正交体系浓度表

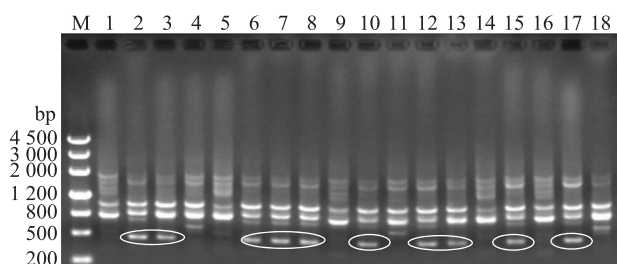
因素 组别	Mg^{2+} $/\mu\text{L}$	dNTP $/\mu\text{L}$	Taq $/\text{U} \cdot 25\mu\text{L}^{-1}$	引物 $/\mu\text{L}$	DNA $/\text{ng} \cdot 25\mu\text{L}^{-1}$
1	1.0	0.3	0.5	0.5	20
2	1.5	0.5	1.0	0.7	20
3	2.0	0.7	1.5	0.9	20
4	2.5	0.9	2.0	1.1	20
5	1.0	0.5	2.0	0.9	35
6	1.5	0.3	1.5	1.1	35
7	2.0	0.9	1.0	0.5	35
8	2.5	0.7	0.5	0.7	35
9	1.0	0.7	1.0	1.1	50
10	1.5	0.9	0.5	0.9	50
11	2.0	0.3	2.0	0.7	50
12	2.5	0.5	1.5	0.5	50
13	1.0	0.9	1.5	0.7	65
14	1.5	0.7	2.0	0.5	65
15	2.0	0.5	0.5	1.1	65
16	2.5	0.3	1.0	0.9	65

以看出,正毛化橘红的标记为(0,1),即正毛化橘红 DNA 用引物 818 扩增没有最下方的条带,用 827 扩增有最下方的条带;副毛化橘红的标记为(0,0)或(1,1),光果和假西洋品种的标记为(1,0)。因此通过 818 和 827 这两个引物的特征条带能够将正毛化橘红筛选出。



注:泳道 1~18 分别对应表 1 中的样品 SN1~SN18。

图 1 引物 818 的电泳图谱

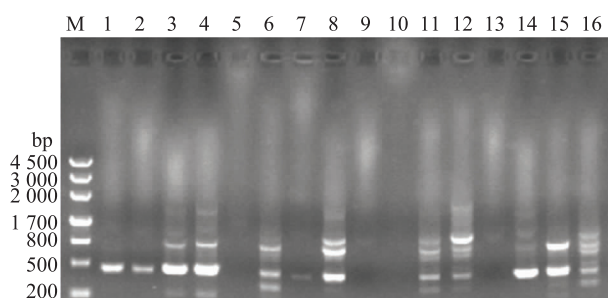


注:泳道 1~18 分别对应表 1 中的样品 SN1~SN18。

图 2 引物 827 的电泳图谱

2.3 PCR 体系优化

使用正毛化橘红 SN2 的 DNA 模板、引物 827 对 PCR 反应体系进行优化的电泳结果见图 3,本方法是采用特征条带来鉴别正毛化橘红,因此特征条带明显、杂带少是关键。条件 3、4、6、8、11、12、15、16 这八个条件杂带较多,而条件 1 和条件 2 因其 DNA 模板浓度太低可能存在潜在的不稳定性,综合各个条件的重复性和稳定性,最终选择条件 14,即 PCR 反应体系为 $10 \times \text{buffer } 2.5 \mu\text{L}$, $\text{MgCl}_2 (25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$



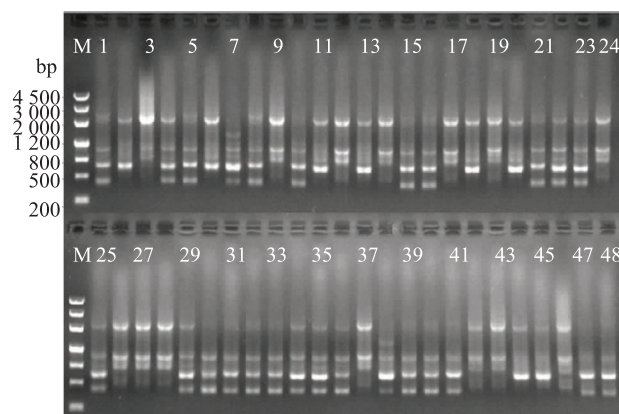
注:泳道 1~16 分别为表 3 中 1~16 组不同 PCR 反应体系。

图 3 正交体系优化电泳图谱

$1.5 \mu\text{L}$, $\text{dNTPs} (10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) 0.7 \mu\text{L}$, 引物 $(10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) 0.5 \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 2.0 U , DNA 模板 65 ng 。用该条件对引物 818 进行 PCR 扩增,其特征条带也非常清晰,只是其他条带稍多。为了使本研究建立的方法更加简便,对引物 818 和 827 采用同样的 PCR 扩增体系。

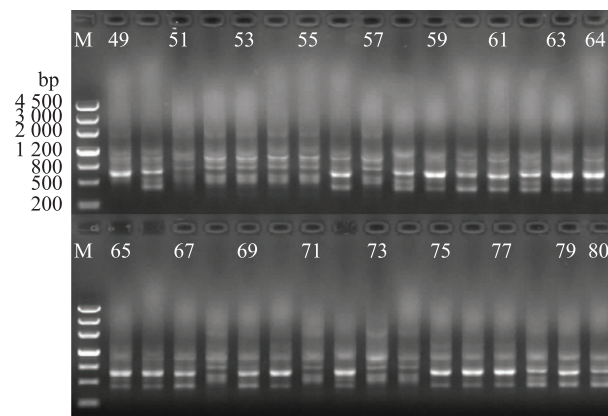
2.4 验证实验

图 4-图 7 分别为表 2 的化橘红 DNA 模板采用引物 818 和 827 扩增的电泳图谱,Marker 右侧的泳道从左到右依次为表 2 的编号从小到大的顺序。将所有样品的 818 和 827 特征条带进行统计,有特征条带记为 1,无特征条带记为 0,结果见表 4。由表可知,所有正毛化橘红的标记均为(0,1),副毛化橘红的标记为(0,0)或(1,1),光果和假西洋品种的标记为(1,0)。由电泳图谱可知,所有正毛化橘红在 $200 \sim 500 \text{ bp}$ 之间均无 818 的特征条带,均有 827 的特征条带,说明通过 818 和 827 这两个引物的特征条带能够将正毛化橘红鉴别出。



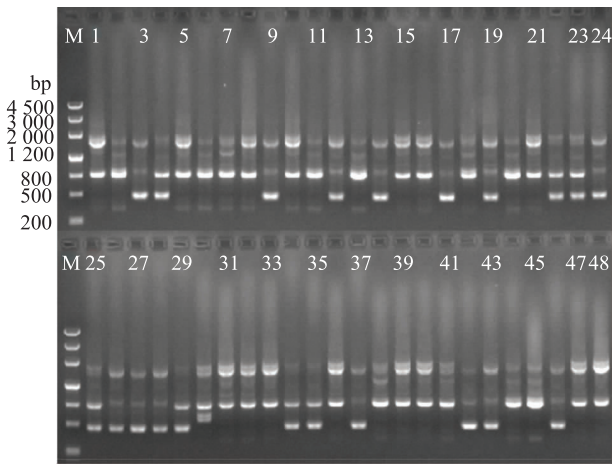
注:泳道 1~48 分别对应表 2 中的样品 1~48。

图 4 化橘红的引物 818 的电泳图谱-1



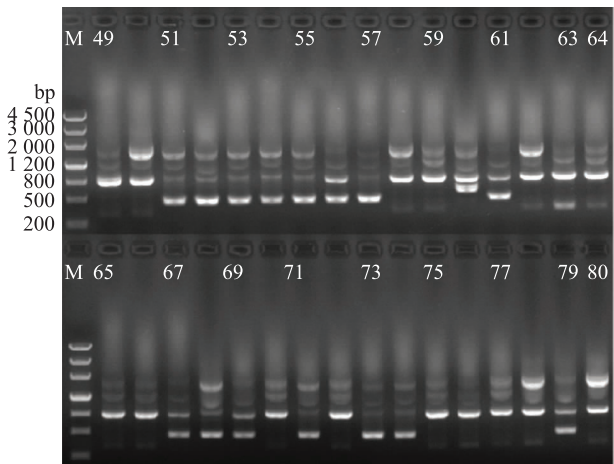
注:泳道 49~80 分别对应表 2 中的样品 49~80。

图 5 化橘红的引物 818 的电泳图谱-2



注：泳道 1~48 分别对应表 2 中的样品 1~48。

图 6 化橘红的引物 827 的电泳图谱-1



注：泳道 49~80 分别对应表 2 中的样品 49~80。

图 7 化橘红的引物 827 的电泳图谱-2

3 讨论

ISSR 分子标记技术因其具有稳定、多态性高、简便易操作及不受环境因素影响等优势，已被广泛应用到药用植物种质资源鉴定、亲缘关系分析及道地性研究，并取得良好效果^[8]。张春等^[9]利用 ISSR

分子标记技术对药用当归及其混伪品进行鉴别，找到了当归及其混伪品间的特异鉴别引物，为建立稳定的当归质量评价体系提供了技术支持。魏艺聪等^[10]采用 ISSR 标记分析草珊瑚的 DNA 指纹图谱，结果证实 ISSR 分子标记可以有效辨别 18 份受试草珊瑚样品。ISSR 分子标记的后期实验数据处理一般

表 4 化橘红的品种及特征条带情况

序号	品种	818	827	序号	品种	818	827	序号	品种	818	827	序号	品种	818	827
1	假西洋	1	0	21	假西洋	1	0	41	假西洋	1	0	61	副毛	1	1
2	副毛	0	0	22	副毛	1	1	42	正毛	0	1	62	假西洋	1	0
3	正毛	0	1	23	副毛	1	1	43	正毛	0	1	63	光青	1	0
4	副毛	1	1	24	正毛	0	1	44	副毛	0	0	64	光青	1	0
5	假西洋	1	0	25	副毛	1	1	45	副毛	0	0	65	光青	1	0
6	副毛	0	0	26	正毛	0	1	46	正毛	0	1	66	光青	1	0
7	光青	1	0	27	正毛	0	1	47	正毛	0	1	67	副毛	1	1
8	假西洋	1	0	28	正毛	0	1	48	假西洋	1	0	68	正毛	0	1
9	正毛	0	1	29	副毛	1	1	49	副毛	0	0	69	副毛	1	1
10	正毛	0	1	30	副毛	1	0	50	正毛	0	1	70	光青	1	0
11	副毛	0	0	31	假西洋	1	0	51	正毛	0	1	71	正毛	0	1
12	正毛	0	1	32	假西洋	1	0	52	正毛	0	1	72	光青	1	0
13	副毛	0	0	33	假西洋	1	0	53	正毛	0	1	73	正毛	0	1
14	正毛	0	1	34	副毛	1	1	54	正毛	0	1	74	正毛	0	1
15	假西洋	1	0	35	副毛	1	1	55	正毛	0	1	75	光青	1	0
16	副毛	1	0	36	假西洋	1	0	56	副毛	1	1	76	光青	1	0
17	正毛	0	1	37	正毛	0	1	57	正毛	0	1	77	光青	1	0
18	副毛	0	0	38	光青	1	0	58	假西洋	1	0	78	假西洋	1	0
19	正毛	0	1	39	假西洋	1	0	59	光青	1	0	79	副毛	1	1
20	副毛	0	0	40	假西洋	1	0	60	假西洋	1	0	80	假西洋	1	0

采用聚类分析方法,得到聚类分析图谱,但缺乏统一标准^[8],因此在生产推广应用上收到限制。本研究是在 ISSR 分子标记技术的基础上找到正毛化橘红的特征条带组合,建立了通过 2 条引物鉴别正毛化橘红的 PCR 方法,并且进行了大量样品的验证。该方法快速简便且准确,且无需通过聚类分析,直接根据特征条带来鉴别正毛化橘红,可以应用于化橘红种植基地的种苗筛选中,得到品质最好的正毛化橘红种苗,为优质化橘红种苗的筛选提供技术支持。

由于 ISSR 标记利用的是非特异引物,其扩增条带的稳定性是相对的,因此在进行 PCR 时需要严格保证各项条件一致才能得到较稳定的电泳条带,最理想的结果是将其转化为采用特异引物对扩增的 SCAR 分子标记。在本研究中已经找到正毛化橘红的特征条带组合(特征标记),下一步可考虑将 ISSR 标记中的特异性条带回收、克隆和测序,设计特异引物对,转化成 SCAR 标记,以建立更加稳定的分子鉴定方法。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北

京:中国医药科技出版社,2015:75.

- [2] 林海丹,苏薇薇. 化橘红的研究进展[J]. 中药材,2001,24(8):608-610.
- [3] 陈新,黎健智. 毛橘红与光橘红的鉴别[J]. 中药材,2001,24(6):409-410.
- [4] 张秀明,陈志霞,林励. 毛橘红与光橘红的化痰及抗炎作用比较研究[J]. 中药材,2004,27(2):122-123.
- [5] 林励,李向明,万建义,等. 化橘红药材质量评价、监测与应用研究[J]. 中国现代中药,2010,12(8):21-26.
- [6] 林励,欧剑锋,肖凤霞,等. 化橘红种质资源的随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 广州中医药大学学报,2008,25(4):350-354.
- [7] 邓锋,莫结丽,陈浩桢. 采用 ISSR 分子标记法鉴别道地药材化橘红[J]. 广东药学院学报,2009,25(5):455-458.
- [8] 任梦云,陈彦君,张盾,等. ISSR 标记技术在药用植物资源中的研究进展及应用[J]. 生物技术通报,2017,33(4):63-69.
- [9] 张春,朱烨,何颖,等. 基于内部简单重复序列(ISSR)分析的当归分子鉴定[J]. 中国药学杂志,2014,49(10):812-816.
- [10] 魏艺聪,林培玲,陈莹,等. 采用 ISSR 标记分析草珊瑚的 DNA 指纹图谱与其品质相关性[J]. 中草药,2014,45(11):1620-1624.

(收稿日期 2018-01-31)