

玫瑰 SCoT-PCR 反应体系优化及引物筛选

王 玉¹, 赵 兰 勇¹, 申 宏 伟², 齐 宇¹, 石 良 红¹, 吴 迪¹

(1. 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271018; 2. 日照市园林绿化养护中心, 山东 日照 276800)

摘 要:以玫瑰为试材, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计和单因素试验 2 种方法, 研究模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 Taq 酶 5 个因素对玫瑰 SCoT-PCR 反应体系的影响, 建立最优化的反应体系并筛选合适引物。结果表明: 模板 DNA 浓度为 $1.50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Mg^{2+} 浓度为 2.00 mmol/L , dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L , 引物浓度为 $0.70 \mu\text{mol/L}$, Taq 酶用量为 0.50 U 时, 可建立玫瑰 SCoT-PCR 最佳反应体系, 并筛选出 20 条扩增条带清晰、多态性丰富的 SCoT 引物。反应体系的优化及引物的筛选, 为日后利用 SCoT 分子标记技术对玫瑰进行相关研究提供理论依据和技术支持。

关键词:玫瑰; SCoT-PCR; 正交设计; 单因素试验; 体系优化; 引物筛选

中图分类号:S 685.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0091-06

玫瑰(*Rosa rugosa*)作为蔷薇属重要的应用植物资源^[1-3], 目前对其的研究已涉及繁殖栽培技术^[4]、品种分类^[5]及孢粉学^[6]等方面。近几年, 随着分子水平研究的不断深入, RAPD^[7-8]、AFLP^[9]、ISSR^[10-11]、SRAP^[12]等分子标记技术逐渐应用到对玫瑰种质遗传多样性、亲缘关系及玫瑰品种鉴定等研究当中。但这些分子标记扩增得到的位点一般与目标性状距离较远, 所得结果与目标有一定偏差, 因而限制了它们的应用^[13]。

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)标记是 Collard 等^[14]于 2009 年提出的一种新型目的基因分子标记。该标记兼具 RAPD 和 ISSR 的优点^[15], 除可作为对 ISSR 和 RAPD 的有效补充之外, 更能利用该分子标记有效跟踪性状^[16]。该分子标记目前已应用于芒果^[17]、罗汉松^[18]、铁皮石斛^[19]、番木瓜^[20]及野生白灵菇^[21]等植物, 但尚无在玫瑰上的应用。该试验以玫瑰为试材, 建立玫瑰 SCoT-PCR 的最优反应体系并筛选出合适引物, 以期为后期研究玫瑰杂交新品系间遗传多样性和亲缘关系提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为‘紫枝玫瑰’、‘北京单白’和‘唐红’3 个玫瑰品种及 9 个玫瑰杂交新品系的幼嫩叶片, 采样后经

硅胶干燥处理, 放于 -20°C 冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

田间试验于 2013 年在山东农业大学玫瑰种质资源圃进行, 室内试验在山东农业大学花卉研究所进行。

1.2.1 玫瑰基因组 DNA 提取 采用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取供试材料 DNA, 并用核酸定量分析仪和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测模板 DNA 的浓度和质量。将其稀释至所需浓度后于 -20°C 保存。

1.2.2 SCoT-PCR 扩增程序及产物检测 扩增反应程序参考 Collard^[14]的程序略做修改: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 复性 2 min, 35 次循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 放于凝胶成像系统下观察记录试验结果。

1.2.3 正交实验设计 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验优化反应体系, 对影响反应体系的模板 DNA 浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq 酶用量等 5 个因素设置 4 水平(表 1)共 16 个试验组合(表 2), 重复 3 次。除表中各成分外, 每个处理中加入 $2 \mu\text{L}$ $10\times$ PCR Buffer, 补加 ddH_2O 至反应总体积为 $20 \mu\text{L}$ 。所用模板材料为‘唐红’, 引物为 SC24。

1.2.4 单因素试验设计 根据表 1 中各因素的 4 个水平对 5 个因素逐一优化, 即设置某个因素不同浓度水平处理, 而其它因素浓度固定: 模板 DNA 浓度为 $1.50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Mg^{2+} 浓度为 2.00 mmol/L , dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L , 引物浓度为 $0.70 \mu\text{mol/L}$, Taq 酶用量为 0.50 U 。

1.2.5 反应体系稳定性检测及多态性引物筛选 以 SC20、SC25 和 SC32 3 条引物利用已优化的体系对‘紫枝玫瑰’和‘北京单白’的基因组 DNA 进行扩增, 并用 SC25 对选取的 9 个玫瑰杂交新品系进行扩增试验, 检测该反

第一作者简介:王玉(1990-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物造景。E-mail: 532836481@qq.com.

责任作者:赵兰勇(1960-), 男, 山东临朐人, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为园林植物种质资源与花卉栽培及园林景观设计。E-mail: sdzly369@163.com.

基金项目:山东省农业良种工程资助项目(鲁科农字(2009)103号)。

收稿日期:2014-07-14

应体系的稳定性及对玫瑰杂交新品系的适用性。参照 Collard 等^[14]所合成的 36 条引物,以‘唐红’基因组 DNA 为模板按优化好的体系筛选出多态性引物。

表 1 玫瑰 SCoT-PCR 影响因素与浓度梯度设置
Table 1 Factor and gradient concentration settings of *R. rugosa* SCoT-PCR

梯度水平 Gradient Level	模板 DNA 浓度 Template DNA concentration /(ng · μL ⁻¹)	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration /(mmol · L ⁻¹)	因素 Factor dNTPs 浓度 dNTPs concentration /(mmol · L ⁻¹)	引物浓度 Primer concentration /(μmol · L ⁻¹)	Taq 酶用量 Taq DNA polymerase dosage/U
1	1.00	1.50	0.20	0.50	0.50
2	1.50	2.00	0.25	0.60	1.00
3	2.00	2.50	0.30	0.70	1.50
4	2.50	3.00	0.35	0.80	2.00

表 2 玫瑰 SCoT-PCR 反应体系 L₁₆(4⁵) 正交实验设计
Table 2 L₁₆(4⁵)orthogonal design of *R. rugosa* SCoT-PCR

水平 Level	模板 DNA 浓度 Template DNA concentration /(ng · μL ⁻¹)	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration /(mmol · L ⁻¹)	因素 Factor dNTPs 浓度 dNTPs concentration /(mmol · L ⁻¹)	引物浓度 Primer concentration /(μmol · L ⁻¹)	Taq 酶用量 Taq DNA polymerase dosage/U
1	1.00	1.50	0.20	0.50	0.50
2	1.00	2.00	0.25	0.60	1.00
3	1.00	2.50	0.30	0.70	1.50
4	1.00	3.00	0.35	0.80	2.00
5	1.50	1.50	0.25	0.70	2.00
6	1.50	2.00	0.20	0.80	1.50
7	1.50	2.50	0.35	0.50	1.00
8	1.50	3.00	0.30	0.60	0.50
9	2.00	1.50	0.30	0.80	1.00
10	2.00	2.00	0.35	0.70	0.50
11	2.00	2.50	0.20	0.60	2.00
12	2.00	3.00	0.25	0.50	1.50
13	2.50	1.50	0.35	0.70	1.50
14	2.50	2.00	0.30	0.50	2.00
15	2.50	2.50	0.25	0.80	0.50
16	2.50	3.00	0.20	0.60	1.00

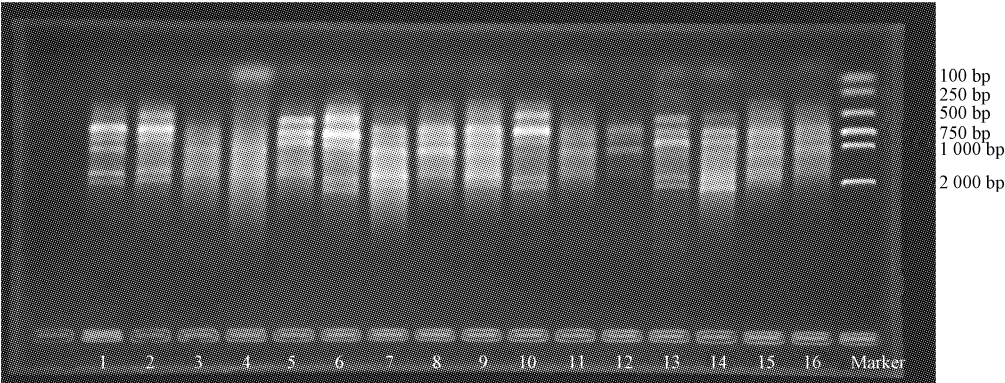
2 结果与分析

2.1 玫瑰 SCoT-PCR 反应体系正交实验分析

由图 1 可知,试验设计的 16 个体系组合均可扩增出条带。其中,体系 3 和 4 条带不明显,出现弥散;体系 11、12、15、16 效果好于 3、4,但条带数量少且亮度弱,特异

性条带不明显;体系 1、2、6、10、13、14 扩增效果较好,经对比发现体系 10 扩增出的条带丰富,亮度高,特异性条带明显,因此认为体系 10 是该试验中最佳的处理组合。

参照何正文等^[22]的正交直观分析法,依据电泳条带的强弱、多少及背景颜色等给图 1 中 16 个体系组合打



注:Marker 为 DL 2 000 marker,下同;1~16 组合编号同表 2。
Note;Marker DL 2 000 marker,the same below;1—16 code is the same as table 2.

图 1 玫瑰 SCoT-PCR 正交实验设计电泳结果(引物 SC24)

Fig. 1 Electrophoresis result of orthogonal design of *R. rugosa* SCoT-PCR reaction with the primer SC24

分,效果最好的给 16 分,最差的给 1 分。取 3 次重复打分的平均值进行直观分析,求出每个因素在同一水平下的得分总和(T)和平均值(X),并求得同因素不同水平间的极差(R)。均值大小代表各因素各个水平间的差异,极差的大小则代表某因素对该试验的影响程度^[23]。根据表 3 中各因素 R 值的大小可知,Mg²⁺ 的 R 值最大,对试验的影响最大,其次为 Taq 酶用量、模板 DNA 浓度和引物浓度,而 dNTPs 浓度的影响最小。结合图 2 的折线

变化和表 3 中的 X 值分析可知,各因素在不同水平上,试验效果不同,X 越大,则该因素反应水平越好。因此,模板 DNA 浓度和 Mg²⁺ 浓度以各自的水平 2 为最好,dNTPs 浓度以水平 4 最好,引物浓度以水平 3 最好,Taq 酶用量以水平 1 最好,由此可得玫瑰 SCoT-PCR 最佳反应体系为模板 DNA 浓度为 1.50 ng/ μ L,Mg²⁺ 浓度为 2.00 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L,引物浓度为 0.70 μ mol/L,Taq 酶用量为 0.50 U。

表 3 正交实验体系计算结果

Table 3 Calculation result of orthogonal design

项目 Item	因素 Factor				
	模板 DNA 浓度 Template DNA concentraion	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration	dNTPs 浓度 dNTPs concentration	引物浓度 Primer concentration	Taq 酶用量 Taq DNA polymerase dosage
T ₁	26.00	43.00	35.00	36.00	40.00
T ₂	39.00	56.00	29.00	28.00	37.00
T ₃	33.00	21.00	32.00	40.00	33.00
T ₄	38.00	16.00	40.00	32.00	27.00
X ₁	6.50	10.75	8.75	9.00	10.00
X ₂	9.75	14.00	7.25	7.00	9.25
X ₃	8.25	5.25	8.00	10.00	8.50
X ₄	9.50	4.00	10.00	8.00	6.50
R	3.25	10.00	2.75	3.00	3.50

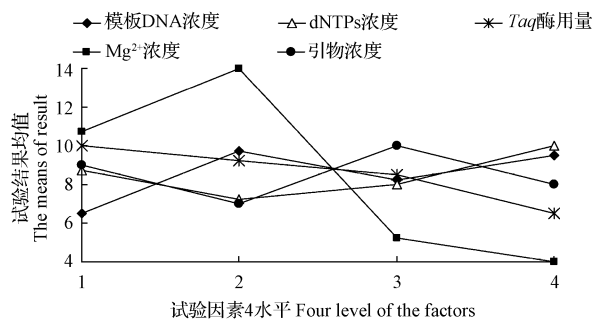


图 2 玫瑰 SCoT-PCR 正交实验设计各因素均值与结果关系

Fig. 2 Relationship between factors and the result of orthogonal design of *R. rugosa* SCoT-PCR reaction

2.2 单因素试验各因素对玫瑰 SCoT-PCR 扩增效果的影响

DNA 浓度过低时可能扩增不出条带或条带过弱不

利于分析,而浓度过高时则易出现非特异性扩增^[24]。由图 3 可知,当模板浓度为 1.5 ng/ μ L 和 2.0 ng/ μ L 时,条带较为清晰,扩增效果较好。考虑到节约性,20 μ L 体系中模板 DNA 的浓度为 1.5 ng/ μ L 时最合适。

Mg²⁺ 是 Taq 酶活性所必需的,对反应有显著影响,浓度过低,酶的活力降低;浓度过高,则易产生非特异性扩增^[25]。由图 3 可看出,Mg²⁺ 浓度在 2.0~3.0 mmol/L 时,均有清晰条带产生。兼顾节约及扩增效果,20 μ L 体系中 Mg²⁺ 浓度以 2.0 mmol/L 为宜。

dNTPs 作为 PCR 反应的原料,直接影响试验结果。当 dNTPs 浓度为 0.2~0.3 mmol/L 时,扩增条带数量少,易弥散,且扩增效果不稳定;dNTPs 浓度提高至 0.35 mmol/L 时,条带数量多,清晰度好,亮度高,因此,选择 0.35 mmol/L 为 dNTPs 最适反应浓度。

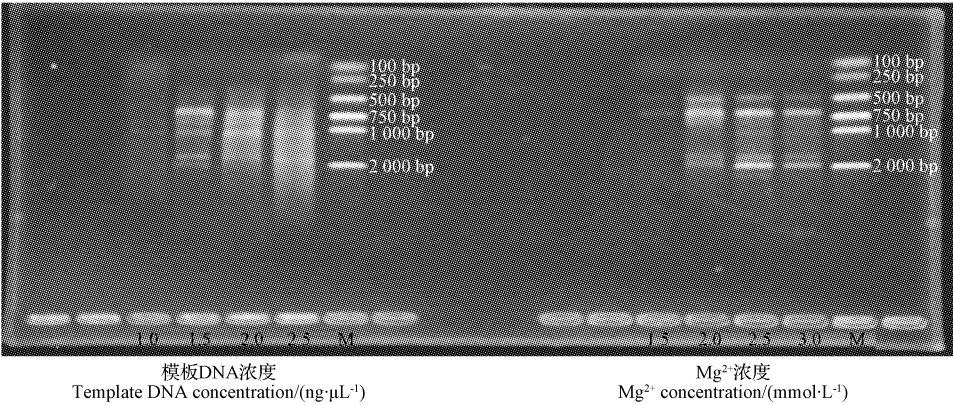


图 3 模板 DNA 浓度和 Mg²⁺ 浓度对玫瑰 SCoT-PCR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of template DNA and Mg²⁺ concentration on *R. rugosa* SCoT-PCR amplification

引物浓度在一定范围内升高,反应特异性降低;反之,特异性增加^[25]。从图4可知,引物浓度较低时扩增条带较弱,当引物浓度在0.6~0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增效果较好,因此选择0.7 $\mu\text{mol/L}$ 为最适宜的引物浓度。

Taq 酶用量对玫瑰 SCoT-PCR 扩增效果的影响如

图4所示,*Taq* 酶用量的变化对扩增效果的影响不大,4种处理方式都可得到较为清晰的电泳条带。考虑到扩增条带的亮度、特异性及节约性,20 μL 体系中 *Taq* 酶用量为0.5 U。

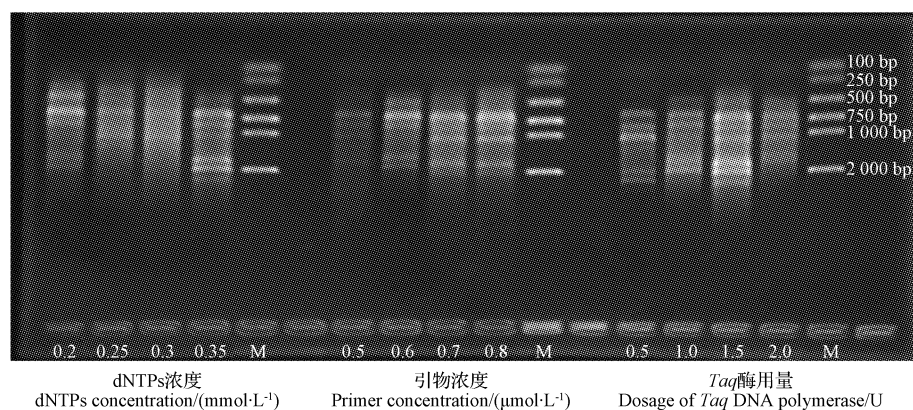


图4 dNTPs 浓度、引物浓度和 *Taq* 酶用量对玫瑰 SCoT-PCR 反应的影响

Fig. 4 Effect of dNTPs, primer concentration and dosage of *Taq* polymerase on *R. rugosa* SCoT-PCR reaction

2.3 SCoT-PCR 反应体系稳定性的检验

以3条不同的引物 SC20、SC25 和 SC32 利用优化过的反应体系对‘紫枝玫瑰’和‘北京单白’2个品种的基因组 DNA 进行扩增,由图5可知,不论使用相同引物应用到同一品种或使用同一引物应用到不同品种均可扩增出清晰可辨、多态性丰富的条带,可有效地反映不同品种间的遗传差异性,表明该优化体系稳定,适用于玫瑰

SCoT-PCR 分析。

因该体系将被应用在玫瑰杂交新品系的研究当中,因而特选取了9个玫瑰杂交新品系 DNA 为模板以 SC25 为引物进行扩增,以检测该体系在玫瑰杂交新品系上的适用性和稳定性。由图5可知,不同杂交品系均有清晰稳定且多态性丰富的条带出现,表明该体系适用于玫瑰杂交新品系的 SCoT-PCR 分析。

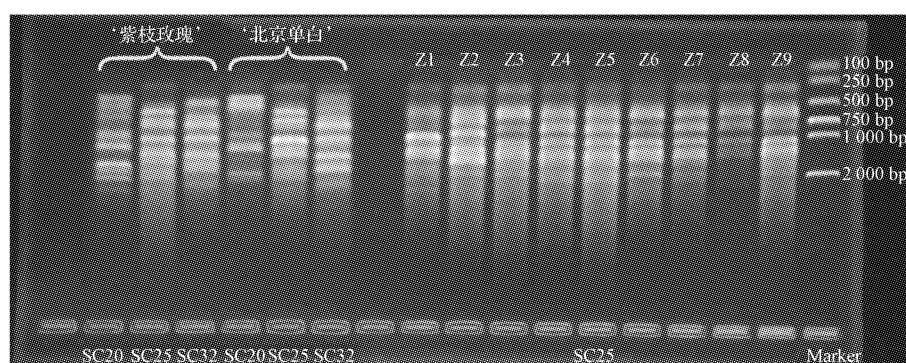


图5 SC20、SC25、SC32 对‘紫枝玫瑰’和‘北京单白’的扩增效果及 SC25 对9个玫瑰杂交新品系的扩增效果

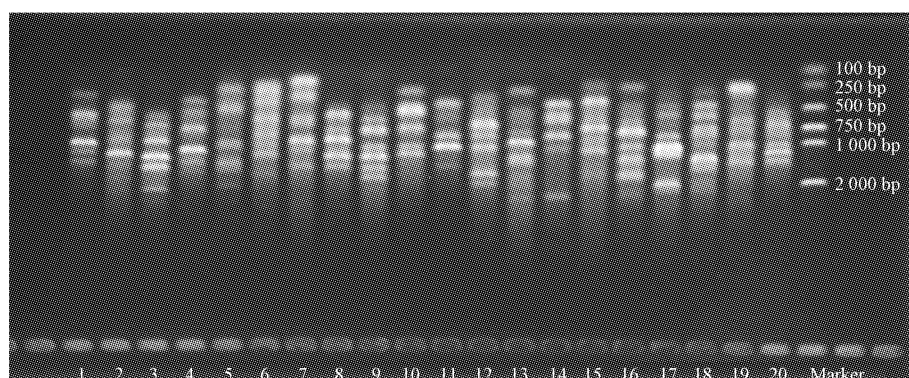
Fig. 5 Result of SCoT-PCR amplification on ‘Zizhimeigui’ and ‘Beijingdanbai’ with SC20, SC25 and SC32 and on 9 *R. rugosa* hybrids with SC25

2.4 引物筛选

运用优化好的玫瑰 SCoT-PCR 反应体系,以‘唐红’基因组 DNA 为模板,对已有的36条引物进行筛选,从图6可以看出,所有引物均可扩增出清晰可辨的条带,每条引物扩增得到的条带数3~12条不等,其中有20条引物能扩增出清晰且多态性丰富的条带,占全部引物的55.6%。

3 讨论与结论

SCoT 分子标记作为一种新型的标记基因标记技术,具有操作简单、重复性好、多态性丰富等特点,能更好地应用于物种遗传多样性和亲缘关系的研究^[26]。PCR 反应体系是一个复杂的反应体系,受到多种因素的影响,扩增程序中的温度、时间、循环数及反应体系中各种试剂的浓度等都会对扩增结果产生影响^[27]。虽然



注:1~20 分别为引物;SC2,SC3,SC4,SC11,SC12,SC14,SC15,SC16,SC17,SC19,SC21,SC24,SC25,SC27,SC29,SC32,SC33,SC34,SC35,SC36。

Note:1—20 primer;SC2,SC3,SC4,SC11,SC12,SC14,SC15,SC16,SC17,SC19,SC21,SC24,SC25,SC27,SC29,SC32,SC33,SC34,SC35,SC36。

图6 优化后的玫瑰 SCoT-PCR 反应体系筛选出的 20 条引物

Fig. 6 The screened 20 primers based on the optimized *R. rugosa* SCoT-PCR system

SCoT 已在多个物种上应用,但因材料不同各自 PCR 反应体系也有较大差异,因此要保证玫瑰 SCoT-PCR 反应体系的适用性、稳定性和重复性,有必要对影响扩增反应的模板 DNA 浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度和 *Taq* 酶用量 5 个主要因素进行优化^[28]。

该试验选用正交实验设计和单因素试验相结合的方法建立玫瑰最优 SCoT-PCR 反应体系。正交实验设计能综合考察 PCR 反应体系中各因素的交互作用,在减少工作量的前提下较快获得理想的试验效果。但该方法也具有一定的局限性,在直观分析过程中,由于受主观影响因素较大,不同人对条带清晰度、特异性和多态性等判断标准不同,因此评判结果存在较大差异。单因素试验能够逐一优化各个因素,各因素在不同水平下的扩增效果对比显著,容易选定该因素的最佳反应浓度。但当一个因素变化而固定其它因素时,需要参考相近物种以确定其它因素的适宜浓度,但不能保证各组分最佳浓度的组合就是最佳反应体系;而且单因素试验也不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用^[29]。因此,该试验结合这 2 种方法的试验结果进行分析,互为补充,相互印证,以期建立玫瑰 SCoT-PCR 最佳的反应体系。

试验通过直观分析表明,各因素对玫瑰 SCoT-PCR 反应体系的影响程度大小依次为: Mg^{2+} 浓度>*Taq* 酶用量>模板 DNA 浓度>引物浓度>dNTPs 浓度,这与徐宗大等^[12]优化的玫瑰 SRAP-PCR 反应体系所得结果存在差异,说明不同的分子标记技术在同类材料上所适用的反应条件也有不同。结合单因素试验发现,在一定范围内, Mg^{2+} 浓度对该反应体系的影响最大,这与前人在牡丹^[15]、芥菜^[30]和草莓^[31]上的研究结果一致;但 2 种方法也有差异,正交实验结果显示 *Taq* 酶对扩增结果的影响程度要高于模板 DNA 浓度,在单因素试验中,当模板 DNA 浓度为 1.0 ng/ μ L 时,几乎无明显条带;而 *Taq* 酶在 4 种浓度设定下的扩增效果差异不明显。原因可能

是正交实验设计体现更多的是各因素间的交互作用,而单因素试验则体现更多的是单因素的作用效果。因此,在建立优化玫瑰 SCoT-PCR 反应体系时,先通过正交实验初步确定各因素合适的浓度范围,再通过单因素试验逐一优化,综合分析和比较,最终确定玫瑰 SCoT-PCR 最适反应体系^[23]。

该试验建立并优化了玫瑰 SCoT-PCR 最佳反应体系(20 μ L):模板 DNA 浓度为 1.50 ng/ μ L, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L,引物浓度为 0.7 μ mol/L,*Taq* 酶用量为 0.5 U。并利用不同的玫瑰种质和引物验证了该体系的稳定性及有效性。初步筛选出 20 条符合多态性要求的 SCoT 引物,为后期玫瑰杂交新品系的遗传多样性分析、亲缘关系鉴定及目的基因的有效选择提供理论基础和技术支持。

参考文献

- [1] Sezai E, Rose (*Rosa* spp.) germplasm resources of Turkey [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005, 52: 787-795.
- [2] Von M B, Weber W E, Debener T. Identification of molecular markers linked to Rdr1, a gene conferring resistance to blackspot in roses [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101: 977-983.
- [3] 于晓艳,赵兰勇,丰震,等. 22 份国产玫瑰资源的自交亲和性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3236-3242.
- [4] 王新刚,赵兰勇,丁一鸣,等. 不同品种玫瑰扦插技术研究[J]. 北方园艺, 2012(8): 72-74.
- [5] 杨明,赵兰勇. 山东平阴玫瑰种质资源调查研究及类型划分[J]. 中国园林, 2003(7): 61-64.
- [6] 王文莉,赵兰勇. 玫瑰花粉形态学及生活力研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [7] 陈向明,郑国生,孟丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 78-80.
- [8] 武蕾. 平阴玫瑰栽培品种种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [9] 冯立国. 玫瑰野生种质资源评价及其与栽培种质亲缘关系的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [10] 高蕾,姚雷. 9 个油用玫瑰品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(5): 449-452.

- [11] 杨帆,曾丽,叶康,等. 17 份蔷薇属植物的亲缘关系的形态学和 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2011, 31(2): 193-198.
- [12] 徐宗大,赵兰勇,张玲,等. 玫瑰 SRAP 遗传多样性分析与品种指纹图谱构建[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1662-1669.
- [13] 陆才瑞,喻树迅,于雯雯,等. 功能型分子标记 (ISAP) 的开发及评价[J]. 遗传, 2008(30): 1207-1216.
- [14] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biology Reports, 2009, 27(1): 86-93.
- [15] 侯小改,王娟,贾甜,等. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 92-96.
- [16] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点目的基因标记技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [17] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38: 1176-1184.
- [18] 韦泳丽,何新华,罗聪,等. 罗汉松遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 广西植物, 2012, 32(1): 90-93.
- [19] 高岭,何尚国,何仁峰,等. 兰属植物目标起始密码子 (SCoT) 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 1-7.
- [20] 杨祥燕,蔡元保,黄秋伟,等. 番木瓜主栽品种 SCoT 指纹图谱构建与遗传变异分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1756-1761.
- [21] 赵梦然,陈强,黄晨阳,等. 中国野生白灵菇遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2475-2482.
- [22] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [23] 李强,苏二虎,高聚林,等. 大豆 SCoT 分子标记技术体系的优化、验证及检测[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(5): 491-498.
- [24] 司鹏,戴洪义,薛华柏,等. 苹果 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 168-173.
- [25] 袁长青,李平,李君文. PCR 反应条件的优化[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 255-256.
- [26] 熊发前,蒋菁,钟瑞春,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用[J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2055-2061.
- [27] 赵瑞强,高燕会,章晓玲,等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 核农学报, 2012, 26(4): 648-655.
- [28] 时剑,童再康,黄华宏,等. 中国石蒜 SSR 体系的建立及性状对应分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(3): 571-578.
- [29] 杨云水,李续娥,吴红伟. 正交试验法在 PCR 反应优化中的应用[J]. 生物数学学报, 2005, 20(2): 202-206.
- [30] 龙治坚,王莹,韩国辉,等. 芥菜 SCoT 分析体系的建立与优化[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(4): 20-25.
- [31] 秦国新,何桥,梁国鲁,等. 草蓼属植物 SCoT 分析体系的建立及优化[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 393-397.

Optimization for SCoT-PCR System and Primer Selection of *Rosa rugosa*

WANG Yu¹, ZHAO Lan-yong¹, SHEN Hong-wei², QI Yu¹, SHI Liang-hong¹, WU Di¹

(1. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; 2. Garden Virescence and Maintenance Center of Rizhao, Rizhao, Shandong 276800)

Abstract: Taking *Rosa rugosa* as material, $L_{16}(4^5)$ orthogonal design test and single factor experiment were applied for optimizing five factors (DNA template, Mg^{2+} , dNTPs, primer and *Taq* DNA polymerase) in the SCoT-PCR reaction system of *Rosa rugosa*, and primers were screened in order to establish the best reaction system of *Rosa rugosa*. The results showed that the best SCoT-PCR system for *Rosa rugosa* included 1.5 ng/ μ L DNA, 2.00 mmol/L Mg^{2+} , 0.35 mmol/L dNTPs, 0.70 μ mol/L primer, and 0.50 U *Taq* DNA polymerase and 20 primers were screened which had abundant and clear polymorphism bands. The optimized SCoT-PCR system and the screened primers provided a theoretical basis and technical support for the further study on *Rosa rugosa* with SCoT-PCR.

Keywords: *Rosa rugosa*; SCoT-PCR; orthogonal design; single factor experiment; system optimization; primer screening

欢迎订阅 2015 年《农业科技通讯》

农业部主管 中国农业科学院主办 全国农业核心期刊

刊号:ISSN1000-6400 CN11-2395/S 邮发代号:2-602 月刊 每月 17 日出版 单价:15.00 元 全年:180.00 元
全国各地邮局及本刊编辑部均可订阅

展示优良品种 荟萃科技成果 聚合实用技术

本刊及时报道种植业最新研究成果,尤其是种子方面的新品种、新技术。侧重大田,兼顾园艺,是种植业者首选刊物。

主要栏目:人物风采、专题论述、试验研究、粮食作物、经济作物、蔬菜、果树、西甜瓜、林木花卉、市场信息等。内容翔实、信息量大、技术实用。

地址:100081 北京中关村南大街 12 号《农业科技通讯》编辑部 电话:010-82109664 82109665 82106276
传真:010-82109664 E-mail: tongxuna@126.com