

DOI:10.11937/bfyy.201512023

温郁金 SCoT-PCR 反应体系的正交优化

陈 喆, 冯尚国, 王 振, 何仁锋, 姜梦莹, 王慧中

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江省药用植物种质改良和质量监控重点实验室, 浙江 杭州 310036)

摘 要:以温郁金为试材,运用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计在 5 个水平上对影响温郁金 SCoT-PCR 反应的模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq 酶和引物 5 个因素进行优化试验,对 PCR 结果进行极差分析。建立并优化温郁金的目标起始密码子多态性-聚合酶链式反应(SCoT-PCR)体系,以为温郁金的遗传多样性分析及分子鉴定等研究提供技术支持。结果表明:建立了温郁金 SCoT-PCR 的最佳反应体系(20 μ L):引物 0.8 μ mol/L,dNTPs 0.4 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L,Taq 酶 0.5 U,模板 DNA 40 ng,且确定各因素对温郁金 SCoT-PCR 反应效果的影响大小依次为:dNTPs>Taq 酶>引物> Mg^{2+} >模板 DNA,其中 dNTPs 对体系影响最大。优化的温郁金 SCoT-PCR 反应体系在多个温郁金品种遗传多样性研究中得到了验证,结果表现出良好的稳定性、重复性和多态性丰富等特点,可用于今后温郁金品种遗传多样性分析、系统发育分析、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种等研究。

关键词:温郁金;SCoT-PCR;体系优化;正交设计

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0084-07

温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)属姜科姜黄属多年生草本植物,主要产于浙江瑞安,是著名的浙八味之一。目前已广泛应用于临床,具有活血止痛、行气解郁、凉血、利胆退黄的功效,实际中主要用

于治疗闭、痛经、胸腹胀痛、刺痛,热病神昏,癲发狂,黄疸尿赤等症^[1]。近些年研究证明,温郁金还具有调节免疫功能、抑制中枢神经、改善血液流变性、抗自由基损伤等作用^[2],同时温郁金的挥发油、姜黄素类成分具有显著的抗癌活性和保肝等作用^[3]。因此研究温郁金的遗传多样性具有重要的意义,建立温郁金分子标记技术及其体系优化是分析温郁金品种遗传多样性分析、系统发育研究、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种研究等的研究基础。

诸如 RAPD^[4]、ISSR^[5]等分子标记在温郁金遗传多样性研究中已经有了初步应用,这些研究为温郁金资源的遗传多样性分析、分子鉴定等研究奠定了一定的基础。但是它们都是传统意义上的随机 DNA 分子标记,同时扩增非编码区域,且普遍存在重复性差等缺陷,使得这类分子标记在应用上存在误差,因而限制了它们的

第一作者简介:陈喆(1989-),女,硕士研究生,研究方向为药用植物系统发育。E-mail:8chenzhe@sina.com.

责任作者:王慧中(1962-),男,教授,博士生导师,现主要从事药用植物遗传资源等研究工作。E-mail:whz62@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070298,30870180);浙江省科技计划资助项目(2008C12081);浙江省自然科学基金资助项目(LQ13H280006);浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室开放资助项目(201304);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(ZX13005002067);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(ZX1305002007)。

收稿日期:2015-03-19

Abstract: By microscopic measurement and *in vitro* germination, pollen morphology and germination characteristics of three triploid germplasms of peaches were observed and analysed, to contrast that of the same origin of diploid of peaches. The results showed that, for triploid, the size and shape of pollen varied between a large scale, no regular mode of the distribution of pollen grain sizes could be drawn, pollen minor diameter mode proportion of triploid ranges in 20.0%—40.0%, far lower than that of diploid, which was 66%—76%; the pollen germination rate of triploid was low, only 4.08%—17.52%, while that of diploid was up to 60.8%—75.8%. Thirdly, most of germinated pollens of diploid peaches were the ones with $(67.1 \pm 7.1) \times 10^3 \mu m^3$ as their volume, While those of triploid '10-15-23', '10-15-16' were larger pollens in volume $(95.3 \pm 7.1) \times 10^3 \mu m^3$.

Keywords: triploid; peach; pollen

应用范围。

2009年,国际水稻研究所成员 Collard 和 Mackill 从水稻上开发出了一种新的分子标记,即目标起始密码子多态性标记^[6](Start codon targeted polymorphism, SCoT)。其原理是根据植物基因中的 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性来设计单引物,扩增产生偏向候选功能基因区。该标记技术有效整合了 RAPD 和 ISSR 标记技术的优点,具有操作简单、引物通用性高、低成本、高多态性、遗传信息丰富等优点,同时能够有效产生与性状连锁的标记,作为目的基因标记具有有效跟踪目的性状的优点^[7],从而能够快速构建与性状的分子关联。目前,SCoT 标记技术已成功在玄参(*Figwort Root*)^[8]、药用菊花(*Flos Chrysanthemi*)^[9]、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch)^[10]、甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)^[11]、石蒜(*Lycoris radiata* (L'Her.) Herb)^[12]、铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)^[13]等多种植物的遗传多样性分析研究中得到初步应用,而有关 SCoT 标记技术在温郁金遗传多样性研究中尚鲜见报道。

现以温郁金为试材,利用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计试验,针对模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶、引物 5 个因素在 5 个梯度上对 SCoT-PCR 反应体系进行优化,建立多态性高、重复性好且稳定的温郁金的目标起始密码子多态性-聚合酶链式反应(SCoT-PCR)反应体系;优化温郁金的 SCoT-PCR 反应体系,旨在将该优化的体系进一步应用于温郁金的品种鉴定和系统分类,以期进一步对温郁金种质资源遗传多样性评价、亲缘关系研究及遗传资源道地性保护提供技术支持,为实现最大限度的保存温郁金遗传多样性的策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为温郁金,采摘自广西和温州,共 5 个居群、10 个样本:广西鲜黄温郁金 1-1、广西鲜黄温郁金 1-2、广西鲜黄温郁金 2-1、广西鲜黄温郁金 2-2、广西鲜黄温郁金 3-1、广西鲜黄温郁金 3-2、温州温郁金 1-1、温州温郁金 1-2、温州温郁金 2-1 和温州温郁金 2-2 分别编号为 1~10。SCoT-PCR 反应中所用到的 2 U/ μ L *Taq* 酶、10 mmol/L dNTPs、20 mmol/L Mg^{2+} 、10×PCR buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 100 mmol/L KCl, 1% Triton X-100, pH 8.8) 均订购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, D 15 000+2 000 Marker 和 DL 2 000 Marker 均购自于 TIAN GEN 公司,引物序列参考 Collard 等^[6],引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 按照《分子生物学实验指

导》^[14]教材上提取植物 DNA 的步骤,结合 Ezup 柱基因组 DNA 抽提试剂盒(购自上海生物生工)提取得到温郁金的基因组 DNA,并用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其 DNA 的纯度及完整性。同时用紫外可见分光光度计(BioSpec-nano)检测 DNA 的浓度和纯度,而后稀释 DNA 样品浓度至 25 ng/ μ L,置于-20℃保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 反应体系正交设计 以提取的 10 份温郁金材料的 DNA 为模板,从 SCoT 引物中随机挑选一个引物进行后续试验,以 SCoT-22(5'-AACCATGGC-TACCACCAC-3')为引物,在方差分析的基础上,对影响温郁金 SCoT-PCR 反应效果的 5 个因素(模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶、引物)分别设置了 5 个水平(表 1),选用 $L_{25}(5^6)$ 正交表对温郁金 SCoT-PCR 反应进行正交优化试验(表 2)。其中每个处理的 PCR 扩增体系总

表 1 温郁金 SCoT-PCR 反应体系中的因素与水平

Table 1 Factor and level of SCoT-PCR system for *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling

因素 Factor	水平 Level				
	1	2	3	4	5
$Mg^{2+}/(mmol \cdot L^{-1})$	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
dNTPs/ $(mmol \cdot L^{-1})$	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase/U	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
引物 Primer/ $(\mu mol \cdot L^{-1})$	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
模板 DNA Template DNA/ng	10	20	30	40	50

表 2 SCoT-PCR 反应因素水平正交实验设计 $L_{25}(5^6)$

Table 2 $L_{25}(5^6)$ orthogonal design for factors and levels of SCoT-PCR reaction

试验号 Test number	Mg^{2+} / $(mmol \cdot L^{-1})$	dNTPs / $(mmol \cdot L^{-1})$	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase /U	引物 Primer / $(\mu mol \cdot L^{-1})$	模板 DNA Template DNA/ng
1	1.0	0.1	0.25	0.2	10
2	1.0	0.2	0.5	0.4	20
3	1.0	0.3	1.0	0.6	30
4	1.0	0.4	1.5	0.8	40
5	1.0	0.5	2.0	1.0	50
6	1.5	0.1	0.5	0.6	40
7	1.5	0.2	1.0	0.8	50
8	1.5	0.3	1.5	1.0	10
9	1.5	0.4	2.0	0.2	20
10	1.5	0.5	0.25	0.4	30
11	2.0	0.1	1.0	1.0	20
12	2.0	0.2	1.5	0.2	30
13	2.0	0.3	2.0	0.4	40
14	2.0	0.4	0.25	0.6	50
15	2.0	0.5	0.5	0.8	10
16	2.5	0.1	1.5	0.4	50
17	2.5	0.2	2.0	0.6	10
18	2.5	0.3	0.25	0.8	20
19	2.5	0.4	0.5	1.0	30
20	2.5	0.5	1.0	0.2	40
21	3.0	0.1	2.0	0.8	30
22	3.0	0.2	0.25	1.0	40
23	3.0	0.3	0.5	0.2	50
24	3.0	0.4	1.0	0.4	10
25	3.0	0.5	1.5	0.6	20

体积均为 20 μL , 共同的处理是含有 2.0 μL 不含 Mg^{2+} 的 10 \times PCR buffer, 不足部分用 ddH₂O 补足, 每个处理重复 2 次。

1.2.3 SCoT-PCR 扩增及检测 PCR 扩增是在 Eppendorf AG 22331 Hamburg 型 PCR 扩增仪上完成, 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 35 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 引物 T_m 值复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 永久保存。扩增反应结束后, 取 6 μL PCR 产物与 1 μL 的 6 \times Loading buffer 混合均匀, 在 1 \times TAE 缓冲系统下, 在含有溴化乙锭 (EB) 的 1.0% 琼脂糖凝胶中进行凝胶电泳, 电压为 150 V, 电泳结束后, 利用紫外凝胶成像仪进行拍照保存。

1.2.4 SCoT 最佳反应体系的稳定性和通用性检测 用筛选得到的 18 个 SCoT 引物对 10 份温郁金材料进行 PCR 扩增, 并以 10 份温郁金材料对 18 个引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳上进行检测以验证该优化的 SCoT-PCR 反应体系的稳定性和适用性。

1.3 数据分析

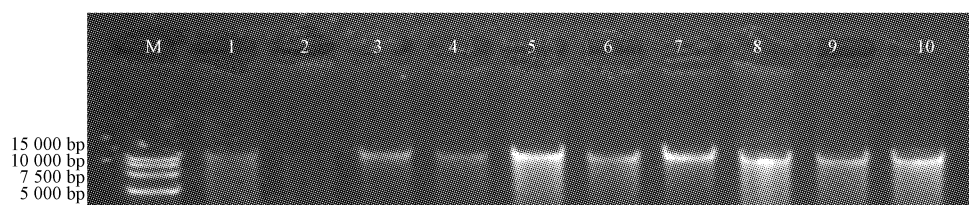
参照何正文等^[15]和姜小凤等^[12]的方法对电泳结果进行评分, 主要依据有: 电泳条带的多少、清晰度、分散

度以及背景颜色等, 评分的规则是: 最差的扩增结果记最低分; 条带多态性最高、清晰度最好、分散性强和背景颜色少的最佳扩增结果记最高分。根据评分结果进行直观分析, 在假设不存在交互作用的情况下, 试验每因素下各水平的平均值能够反映影响因素各水平对反应体系的影响情况, 因此该研究首先根据电泳平均得分求出每因素下各水平的总和 T_i , 各列各水平重复 5 次, 然后求出每因素下各水平的均值 K_i , 用以反映因素各水平影响的大小; 最后求出同一因素不同水平间平均值的极差 R , 极差 R 值越大, 则该因素影响越显著; 为更好地估计试验误差, 利用 SPSS 18.0 对得到的结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 温郁金 DNA 电泳结果

提取好的 10 份温郁金 DNA 样品在紫外荧光分光光度计上检测其含量, 浓度为 27.64~137.73 ng/ μL 不等, 取 1.5 μL 温郁金 DNA 母液与 1 μL 6 \times Loading Buffer 混匀, 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳上检测 DNA 的浓度和纯度, 结果参见图 1。



注: 1~10 分别为 10 个温郁金样品; M: D 15 000+2 000。

Note: 1-10 means the 10 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling samples respectively; M: D 15 000+2 000 marker.

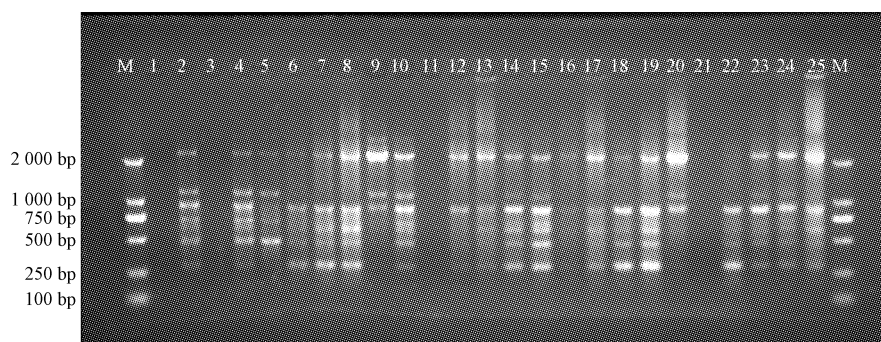
图 1 10 份温郁金材料 DNA 电泳检测

Fig. 1 DNA electrophoresis detection of 10 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling samples

2.2 正交设计电泳结果评分

将表 2 正交设计的 25 个处理进行 PCR 扩增, 并在

1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 以 4 号 DNA 样本和 SCoT-22 引物为例的电泳结果如图 2 所示, 结果表明在



注: 1~25 处理代号参见表 2; M: DL 2 000。

Note: 1-25 treatment number and treatment was showed in table 2; M: DL 2 000 marker.

图 2 温郁金 SCoT-PCR 反应体系正交实验电泳

Fig. 2 Electrophoretogram of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling SCoT-PCR orthogonal design

5个水平上5种因素的不同组合对试验影响差异明显,其中2、4、15等处理扩增条带相对明亮、清晰,多态性也相对较高。据此进行3次独立打分统计,得分依次为:1、14、1、15、6、7、8、9、9、12、1、3、5、12、13、2、4、8、11、6、1、7、10、8、5;1、14、1、15、8、7、8、10、9、11、1、3、5、11、13、2、5、8、11、7、1、7、10、12、4;1、14、1、15、7、7、8、8、9、13、1、3、5、13、13、2、6、8、11、5、1、7、9、10、3。从3次重复的评分来看,结果的一致性较好。将3次的评分取平均值,根据平均得分结果进行直观和方差分析。取3次评分的平均值,在假设不存在交互作用的情况下进行直观分析,求各因素各水平的平均值的总和,记为: T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 ;由于各因素各水平均重复了5次,故可求出各水平的均值 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 、 K_5 ;用各列最大平均值减去最小平均值所得各列的极值 R 。 R 越大,说明该因素对PCR扩增结果的影响越大。分析极差 R 可知,dNTPs的量对反应结果影响最大,模板DNA浓度的影响最小。

2.2.1 PCR正交设计直观分析 由表3正交设计直观分析结果可知,dNTPs的浓度对该反应结果影响最大,模板DNA浓度影响最小,各因素水平的变化对温郁金SCoT-PCR反应的影响依次为:dNTPs>Taq酶>引物> Mg^{2+} >模板DNA。

表3 正交设计直观分析结果

Table 3 Intuitive analysis results of orthogonal design

水平 Level	Mg^{2+} (mmol·L ⁻¹)	dNTPs (mmol·L ⁻¹)	Taq 酶 Taq polymerase (U)	引物 Primer (μmol·L ⁻¹)	模板DNA Template DNA/ng
T_1	38	12	40	29	38
T_2	45	37	52	43	36
T_3	34	33	26	29	28
T_4	32	57	33	45	40
T_5	32	42	27	35	39
K_1	7.6	2.4	8.0	5.8	7.6
K_2	9.0	7.4	10.4	8.6	7.2
K_3	6.8	6.6	5.2	5.8	5.6
K_4	6.4	11.4	6.6	9.0	8.0
K_5	6.4	8.4	5.4	7.0	7.8
R	2.6	9.0	5.2	3.2	2.2

注: T_i 表示任一列上水平号为 $I(i=1,2,3,4\text{ 或 }5)$ 时,所对应的试验结果之和。 K_i ; $K_i=T_i/s$, s 为任一列上各水平出现的次数, K_i 表示任一列上因素取水平 i 时所得试验结果之和。 R 表示极差。

Note: T_i ; when $i=1,2,3,4$, or 5 , Corresponding to the sum of the test results. K_i ; $K_i=T_i/s$, s represent the frequency on any lie, K_i represent when $K_i=i$, the sum of the test results. R represent range.

2.2.2 PCR正交设计方差分析 试验过程中不可避免地存在误差,而直观分析中的极差不能很好的估计误差,因此,利用SPSS 18.0软件对结果进行了方差分析。从表4可以看出,校正模型显著性 P 值为0.169,说明各

因素对温郁金SCoT-PCR反应的结果影响不显著,其中dNTPs对试验影响最大,模板DNA浓度的影响最小,PCR各因素对该体系的影响主次程度与直观分析结果(图3)一致。总体表明试验误差对该试验影响较小,试验结果可行、可信。

表4 温郁金SCoT-PCR反应体系正交设计方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal design of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling SCoT-PCR

变异来源 Variance source	III型平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	显著性 Significant
校正模型 Corrected model	414.400a	20	20.720	2.748	0.169
截距 Intercept	1310.440	1	1310.440	173.798	0.000
Mg^{2+}	24.160	4	6.040	0.801	0.583
dNTPs	212.560	4	53.140	7.048	0.042
Taq 酶 Taq polymerase	113.360	4	28.340	3.759	0.114
引物 Primer	45.760	4	11.440	1.517	0.348
模板 DNA Templet DNA	18.560	4	4.640	0.615	0.675
误差 Error	30.160	4	7.540		
总计 Total	1755.000	25			
校正的总计 Corrected total	444.560	24			

注:可决系数 $R=0.915$ (调整的可决系数 $R=0.488$)。

Note: R squared=0.915(adjusted R squared=0.488).

2.3 5个因素的综合优化结果

从表3和表4直观分析和方差分析结果可知,dNTPs浓度对温郁金SCoT-PCR扩增结果的影响最大。当dNTPs浓度为0.4 mmol/L时,PCR扩增结果达到最佳。dNTPs是PCR扩增的原料,其浓度大小直接影响扩增产物的多少,随着dNTPs浓度的增大,PCR结果亦呈现出增强的趋势,而当浓度过高(大于0.4 mmol/L)时,dNTPs富余,在加快反应速度的同时,也增加了碱基的错误掺入率即错配率和试验成本,未能使PCR扩增结果得到进一步的提高。因此,该试验选择峰值0.4 mmol/L作为该体系最佳反应水平。

当Taq酶浓度为0.5 U时,PCR扩增产物的浓度达到最佳。当Taq酶浓度过低时,PCR产物很少,甚至没有,而当Taq酶浓度过高时,增加了错配率,亦使得试验结果不理想。综合考虑PCR扩增效果和成本消耗,该试验选择Taq酶用量为0.5 U作为最佳反应水平。

引物浓度为0.8 μmol/L时,得到的PCR结果较理想,结合该次正交实验的电泳结果图1可以发现,当引物浓度为较低浓度为0.2 μmol/L时,扩增谱带少或无且条带弱(详见图1的第1号处理和第15号处理);而浓度过大时(如超过0.8 μmol/L),不仅增加了引物二聚体形成的机率,同时背景加强削弱了遗传多态性特异条带

的鉴别分析(详见图 1 的第 11 号处理和第 22 号处理)。因此,从 PCR 效果和试验经济节约等角度考虑,该试验引物浓度选择 $0.8 \mu\text{mol/L}$ 为最佳反应水平。

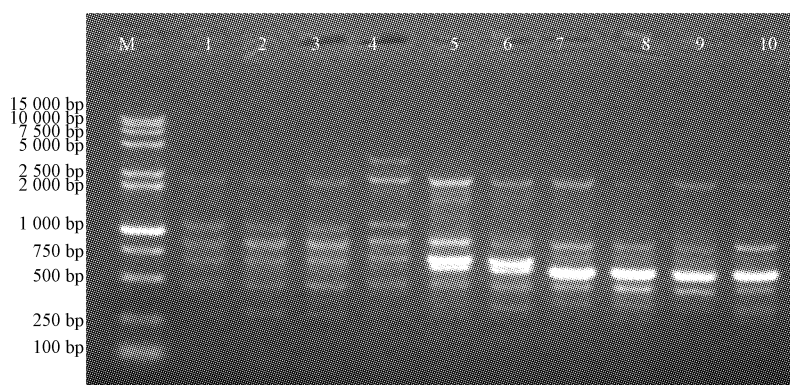
Taq 酶的活性需要一定量的游离的 Mg^{2+} 的激活,当 Mg^{2+} 浓度过低,未能达到较好地激活 *Taq* 酶的活性的作用,致使 PCR 效果不佳;而当其浓度过高时,就会出现非特异性扩增,同样会使 PCR 效果不理想。综合 PCR 扩增效果和成本因素,选择峰值 1.5 mmol/L 作为该试验的最佳反应水平。

当模板 DNA 浓度为 40 ng 时,PCR 扩增结果最佳,模板 DNA 在温郁金 SCoT-PCR 体系中的影响不显著且影响最小,由此可知温郁金 SCoT-PCR 对模板 DNA 浓度

敏感度不高,从节约材料和扩增效果等因素综合考虑,最终确定最佳反应水平为 $20 \mu\text{L}$ 体系中含 40 ng 模板 DNA。

2.4 优化的 SCoT-PCR 反应体系稳定性和适用性检测

根据已建立的温郁金 SCoT-PCR 最佳反应体系,以筛选得到的引物对所有样本进行检测,并以所有的样本对筛选得到的引物进行检测。其中,引物 SCoT-22 对 10 份温郁金材料进行的 PCR 扩增结果见图 3,4 号样本材料(即广西鲜黄温郁金 2-2)对 18 个 SCoT 引物进行的 PCR 扩增结果见图 4。结果表明,各体系均能扩增出多态性丰富、相对清晰的电泳条带。说明该优化的温郁金 SCoT-PCR 反应体系是可行、可信的,可以进一步应用于温郁金的分子遗传学研究。

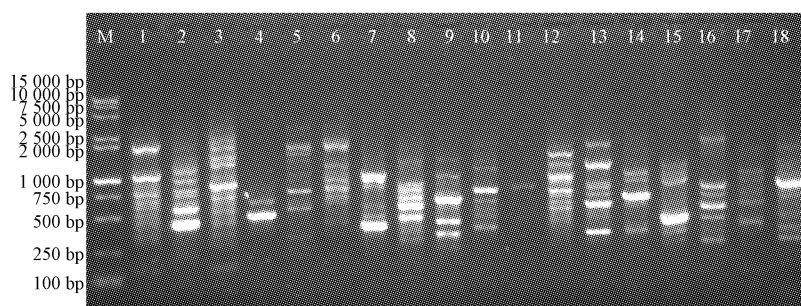


注:1~10 分别为 10 个温郁金样品;M:D 15 000+2 000。

Note:1—10 means the 10 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling samples respectively;M:D 15 000+2 000 marker.

图 3 对温郁金 DNA 样品稳定性检测的扩增结果

Fig. 3 Electrophoretogram result of stability detection of the DNA of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling



注:1~18 分别为 18 个 SCoT 引物;M:D 15 000+2 000。

Note:1—18 means the 18 SCoT primers respectively;M:D 15 000+2 000 marker.

图 4 18 个 SCoT 引物进行检测的扩增结果

Fig. 4 Electrophoretogram result of the detection of the 18 SCoT primer

3 讨论与结论

分子标记技术有效弥补了形态学标记、生化标记等基因表达型标记的多态性位点少,对环境因素较敏感等缺点^[16],且克服了植物生长时期和组织特异性等的影响,故而在分子生物学研究方面的应用越来越广泛。

随着功能基因组学的发展,分子标记已从传统的随机或匿名性标记向目的基因标记和功能性标记转变。SCoT 分子标记作为一种新型的基因分子标记,不仅具有操作简便、稳定性和重复性高、成本较低、引物通用性强等特点,而且其单引物产生的标记能够有效地与目标性

状连锁^[17],因此,它被有效地运用于各类样品的遗传多样性分析、目的基因表达差异的研究等方面。而另一方面,SCoT 分子标记技术受 PCR 反应体系中的多个因素综合影响,为保证温郁金 SCoT-PCR 试验结果的稳定性和可靠性,有必要针对反应体系的主要影响要素进行优化^[18],为进一步深入的研究奠定基础。从已成功在多种植物^[19-24]中应用的 SCoT-PCR 反应体系可知,不同试材的 SCoT-PCR 反应体系各因素的最佳浓度和影响主次也存在差异,韩国辉等^[22]得出 5 个因素对枇杷(*Eriobotrya japonica*) SCoT 分子标记正交优化的影响排序为:dNTPs>Mg²⁺>模板 DNA>引物>Taq 酶;姜小凤等^[12]得出 5 个因素对石蒜(*Lycoris radiata* (L'Her.) Herb) SCoT 分子标记正交优化的影响排序为:Mg²⁺>Taq DNA 聚合酶>引物>dNTPs>模板 DNA 浓度;赵瑞强等^[25]对铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) SCoT 分子标记正交优化发现最显著影响因素为 Taq 酶,所以需要针对不同的研究材料设计不同的 SCoT-PCR 反应体系。dNTPs 是 PCR 扩增的原料,其浓度大小直接影响扩增产物的多少,PCR 扩增产物浓度随着 dNTPs 浓度的增大而增多,而当浓度过高时,dNTPs 富余,在加快反应速度的同时,也增加了碱基的错误掺入率(即错配率)和试验成本,未能使 PCR 扩增结果得到进一步的提高;Taq 酶并未直接参与反应,因而其浓度对 PCR 扩增结果没有直接的关系;PCR 扩增需要引物的结合才得以反应,因而,一定程度上,PCR 扩增产物浓度引物浓度会随着引物浓度的增大而增加,但超过一定的阈值后,会引起引物的非特异性结合,导致反而削弱了遗传多态性的鉴定;Taq 酶的活性需要一定量的游离的 Mg²⁺的激活,当 Mg²⁺浓度过低,未能达到较好地激活 Taq 酶的活性的作用,致使 PCR 效果不佳;而当其浓度过高时,就会出现非特异性扩增,同样会使 PCR 效果不理想;由于 PCR 的高效性,所以对模板 DNA 的量要求不高,试验证明 PCR 扩增结果对模板 DNA 的浓度不敏感。因此可推知,在一定程度上确定最佳的反应体系是成功应用 SCoT-PCR 标记技术的前提。

目前,作为重要的分子标记技术,SCoT 标记尚未在温郁金研究中存在相关报道。同时温郁金作为一味重要的中草药,它所含的挥发性成分具有良好的抗癌活性,主要有:莪术呋喃烯(curzerene)、莪术酮(curzerenone)、莪术醇(curcumol)、莪术烯醇(curcumemol)等^[26],因而人工种植面积逐年增加,以致如今,市场上的温郁金多为人工栽培品种。然而由于人工栽培时间过长,温郁金种质发生了退化,使一些优良性状丢失而使其重要的化学成分含量减少,因此人工栽培温郁金品质参差不齐,导

致市面上以次充好现象时有发生,而 SCoT 分子标记作为一种目前比较先进的分子标记技术可以较快的分析温郁金遗传多样性,并帮助育种专家通过种间差异,筛选出具有优良性状的品种,节省资源。因此该标记在温郁金的应用中有较好的优越性,可以为进一步研究温郁金的遗传学特征奠定基础。

该研究利用正交设计在 5 个水平上对影响温郁金 SCoT-PCR 反应的 5 个主要因素进行优化试验,并对 PCR 结果进行了极差分析。该方法有效节约了人力、物力,同时综合考虑试验中各个因素,避免了单因素试验过程中产生的误差,使试验结果更趋于科学、合理^[27]。但试验中存在 PCR 反应的稳定性以及个人对电泳谱带主观打分等试验误差的局限性,因此,该试验结合了方差分析,进一步减少试验误差,有效提高了试验结果的可信度。该试验首次建立了稳定性好、分辨率高的温郁金 SCoT-PCR 反应体系:在总反应体积为 20 μ L 的体系中,DNA 模板 40 ng,引物 0.8 μ mol/L,dNTPs 0.4 mmol/L,Mg²⁺ 1.5 mmol/L,Taq 酶 0.5 U。综合直观分析和方差分析可知:各因素对温郁金 SCoT-PCR 反应体系的影响均不显著,其中 dNTPs 对试验影响最大,各因素对其影响大小依次为:dNTPs>Taq 酶>引物>Mg²⁺>模板 DNA。同时该研究采用 5 个不同地域来源的 10 个不同温郁金材料对优化的反应体系进行了稳定性和适用性验证,试验结果理想,均扩增出理想的多态性条带。表明了优化的温郁金 SCoT-PCR 反应体系可以为后期温郁金的分子生物学研究提供参考,可以进一步应用于温郁金物种亲缘关系和系统分类、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种等方面的研究。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 广州:广州科技出版社, 2005:144-145.
- [2] 李洁,张岱州,高丽霞. 中药郁金的现代研究概况[J]. 内蒙古中医药, 2001,20(1):37-38.
- [3] 汤淙淙,秦坤良,黄可新. 温郁金茎叶化学成分及抗肿瘤活性[J]. 温州医学院学报,2007,37(2):110-113.
- [4] 王晓慧. 温郁金 RAPD-PCR 反应体系建立及条件优化[J]. 北方园艺,2008(4):226-229.
- [5] 汤晓闻. 温郁金 ISSR-PCR 反应体系的建立及条件优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(22):9413-9415.
- [6] 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 Biol Rep, 2009, 27(1):86-93.
- [7] 张君玉,郭大龙,龚莹,等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化[J]. 果树学报,2011,28(2):209-214.
- [8] 陈大霞,张雪,王钰,等. 应用 SCoT 标记分析玄参种质资源的遗传多样性[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2368-2372.
- [9] 何仁锋,冯尚国,陈喆,等. 药用菊花 SCoT-PCR 反应体系的正交优

- 化[J]. 核农学报, 2014, 28(10): 1781-1789.
- [10] 秦国新. 草莓属植物 SCoT 分析体系的建立及优化[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 393-397.
- [11] 苏亚春. 甘蔗 SCoT-PCR 反应体系优化与[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 810-818.
- [12] 姜小凤, 高燕会, 童再康, 等. 石蒜属植物 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(3): 444-452.
- [13] 徐旭栋, 蒋瑞彬, 蓝小明, 等. 人工栽培铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报), 2013, 28(7): 2123-2125.
- [14] 王慧中. 分子生物学实验指南[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 2-3.
- [15] 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(7): 403-404.
- [16] 王春侠, 仇敬运. DNA 分子标记技术在遗传育种中的应用[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2007, 9(3): 17-20.
- [17] 苏亚春, 凌辉, 王恒波, 等. 甘蔗 SCoT-PCR 反应体系优化与多态性引物筛选及应用[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 810-818.
- [18] 宣朴, 邓婧, 陈新, 等. 苦瓜 ISSR 扩增条件优化的研究[J]. 核农学报, 2006, 20(3): 215-217.
- [19] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 SCoT-PCR 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 8(5): 970-974.
- [20] 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.
- [21] 韩国辉, 汪卫星, 向素琼, 等. 多倍体枇杷 SCoT 分析体系的建立与优化[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 433-437.
- [22] 夏玲, 秦永华, 刘成明, 等. 荔枝 SCoT-PCR 反应体系的建立及其在遗传分析中的作用[J]. 果树学报, 2014, 30(13): 147-156.
- [23] 李丕睿, 蒋甲福, 陈素梅, 等. 菊属植物 SCoT 分子标记技术在遗传多样性分析中的应用[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2015-2025.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Wang Y H, Xu L, Ren W M, et al. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin* [J]. Phytomedicine, 2012, 19(4): 364-368.
- [27] Ahmad M G, Peter P, Zsolt P, et al. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers(SCOT, ISSR, RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato[J]. American Journal of Potato Research, 2011, 88(3): 226-237.

Orthogonal Optimization of Start Codon Targeted Polymorphism System in *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling

CHEN Zhe, FENG Shang-guo, WANG Zhen, HE Ren-feng, JIANG Meng-ying, WANG Hui-zhong

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Zhejiang Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement and Quality Control of Medicinal Plants, Hangzhou, Zhejiang 310036)

Abstract: Taking *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling as test material, the $L_{25}(5^6)$ orthogonal design was applied to optimize the five factors (template DNA, Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase and primer concentration) of SCoT-PCR amplification system at five concentration levels, and range analysis was conducted on the PCR results. The SCoT-PCR (start codon targeted polymorphism-polymerase chain reaction) system was established and optimized, in order to provide technical support for the research of the genetic diversity and molecular identification in *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling. The results showed as follows: a total volume of 20 μ L system included 0.8 μ mol/L primer, 0.4 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.5 U *Taq* DNA polymerase and 40 ng templates DNA. The effective degree order of the factors on the SCoT-PCR was as below: dNTPs > *Taq* DNA polymerase > primer > Mg^{2+} > template DNA. The key factor affecting the SCoT-PCR system was the concentration of dNTPs. Furthermore, the optimal reaction system was used to verify with multiple varieties *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling samples, which showed good stability, repeatability and abundant polymorphism. It was proved to be suitable for the analysis of genetic diversity and phylogenetic, the establishment of genetic maps, gene localizations and molecular mark assisted breeding researches in *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling in future.

Keywords: *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; Start codon targeted polymorphism-polymerase chain reaction (SCoT-PCR); system optimal design