

粉枝莓 SCoT 分子标记的 PCR 反应体系建立

袁 雷¹, 刘 瑜², 钟政昌², 解 博², 曹东星²

(1. 西藏农牧学院 科研处, 西藏 林芝 860000; 2. 西藏农牧学院 食品科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘 要:以粉枝莓为试材,以改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 为模板,从引物、dNTPs、 Mg^{2+} 浓度以及退火温度 4 个因素,对 SCoT-PCR 反应体系进行了优化,以建立适合粉枝莓 SCoT-PCR 最佳扩增体系。结果表明:SCoT-PCR 反应体系的最佳条件为 dNTPs $0.125\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 $0.15\text{ }\mu\text{L}$ 、引物 $1.0\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Mg^{2+} $0.625\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、模板 40 ng 、反应体积 $20\text{ }\mu\text{L}$ 、退火温度为 $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。该优化体系扩增的产物条带清晰,稳定性高。

关键词:粉枝莓;SCoT;优化

中图分类号:S 663.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0109-03

粉枝莓(*Rubus biflorus* Buch)是蔷薇科悬钩子属植物中的一种落叶性野生果木,在西藏的分布主要集中于拉萨、林芝等地^[1]。其果实味甜,橘红色,营养成分含量丰富,远高于普通水果,除可生食外,也可以酿酒,制作果汁、果酱等,具有较高的开发利用价值^[2]。目前,对粉枝莓的研究主要集中在资源调查、营养成分和活性成分分析方面^[3-5],而关于粉枝莓遗传多样性研究尚鲜见报道。因此,开展粉枝莓遗传多样性研究,不仅可为这一野生果树资源的应用和推广提供理论依据,使其能更广泛地应用于农业生产,而且有助于对优异基因资源进行深入的评价、挖掘和利用,提高果实产量和改善品质。

目标起始密码子多态性标记(SCoT)具有操作简单、多态性高、重复性好、引物通用性强等优点,且能有效产生与性状连锁的标记^[6]。目前,SCoT 标记已广泛应用于枇杷^[7]、葡萄^[8]、梨^[9]等资源的种质资源和遗传多样性分析。为此,该研究以粉枝莓为试材,建立并优化了粉枝莓 SCoT-PCR 反应体系,以期粉枝莓资源的遗传多样性分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试粉枝莓于 2015 年 8 月采自西藏自治区林

芝市色季拉山。野外采集健康无病害幼嫩叶片,放于硅胶中干燥封存,运回实验室后放于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。该试验所用的 SCoT 引物参照 COLLARD 等^[6]的报道,由华大基因科技有限公司负责合成。*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 混合液、 $10\times$ PCR buffer (Mg^{2+} free)购自 NEB 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 粉枝莓植物基因组 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法^[10]。DNA 浓度和质量通过分光光度计测定,并取适量样品于 0.8% 的琼脂糖电泳检测,其余 DNA 样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 反应体系的优化 PCR 反应体系的优化参照李晓晖等^[11]、姜小凤等^[12] SCoT 遗传分析的结果,反应体系确定为 $20\text{ }\mu\text{L}$,先以预扩增较好的引物 SC2($5'$ -CAACAATGGCTACCACCC- $3'$)作为粉枝莓基因组 DNA 扩增体系建立的初选引物,*Taq* 酶($5\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.15\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 40 ng ^[13]。以此为基础将引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、退火温度 4 个影响因素进行优化设计(表 1)。

1.2.3 PCR 扩增与扩增产物的检测 PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $50\sim 56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min(35 个循环), $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,在凝胶成像系统成像。

1.2.4 反应体系稳定性检测 以最佳 SCoT 反应体系为基础,采用 SC35($5'$ -CATGGCTACCACCGCCCC- $3'$)

第一作者简介:袁雷(1982-),男,硕士,副教授,研究方向为天然产物。E-mail:249901708@qq.com.

基金项目:西藏自治区自然科学基金资助项目(2015ZR-13-30);西藏野生特色生物资源开发平台建设资助项目(PT2015-01)。

收稿日期:2016-09-28

表 1 粉枝莓 SCoT-PCR 扩增体系
各成分优化试验设计

Table 1 Optimum design of components for SCoT-PCR
reaction of *Rubus biflorus* Buch

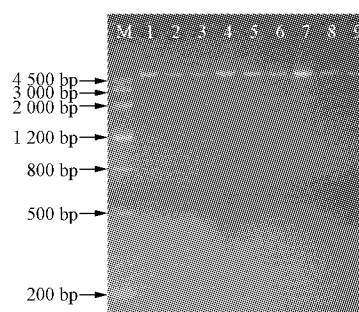
序号 No.	引物 Primer/ μL	dNTP / μL	Mg^{2+} /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
1	1.0	0.25	0.00	56
2	1.0	0.25	0.25	56
3	1.0	0.25	0.50	56
4	1.0	0.50	0.00	56
5	1.0	0.50	0.25	56
6	1.0	0.50	0.50	56
7	2.0	0.25	0.00	56
8	2.0	0.25	0.25	56
9	2.0	0.25	0.50	56
10	2.0	0.50	0.00	56
11	2.0	0.50	0.25	56
12	2.0	0.50	0.50	56
13	1.0	0.25	0.00	53
14	1.0	0.25	0.25	53
15	1.0	0.25	0.50	53
16	1.0	0.50	0.00	53
17	1.0	0.50	0.25	53
18	1.0	0.50	0.50	53
19	2.0	0.25	0.00	53
20	2.0	0.25	0.25	53
21	2.0	0.25	0.50	53
22	2.0	0.50	0.00	53
23	2.0	0.50	0.25	53
24	2.0	0.50	0.50	53
25	1.0	0.25	0.00	51
26	1.0	0.25	0.25	51
27	1.0	0.25	0.50	51
28	1.0	0.50	0.00	51
29	1.0	0.50	0.25	51
30	1.0	0.50	0.50	51
31	2.0	0.25	0.00	51
32	2.0	0.25	0.25	51
33	2.0	0.25	0.50	51
34	2.0	0.50	0.00	51
35	2.0	0.50	0.25	51
36	2.0	0.50	0.50	51

引物对 8 份随机选择的粉枝莓样品进行扩增,检测反应体系的稳定性。

2 结果与分析

2.1 粉枝莓基因组 DNA 的检测

用改良 CTAB 法提取粉枝莓基因组 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.67~1.98;电泳检测结果(图 1)显示,样品 DNA 为一条清晰完整的条带,没有明显的拖尾,也没有 RNA 条带。结果表明,所提的 DNA 纯度较高,可用于 SCoT 体系的优化及后续试验。



注: M. DNA Marker; 1~9 为随机选取的粉枝莓材料基因组 DNA。

Note: M. DNA Marker; 1—9. Randomly selected 9 materials of *Rubus biflorus* genomic DNA.

图 1 粉枝莓基因组 DNA 电泳分析

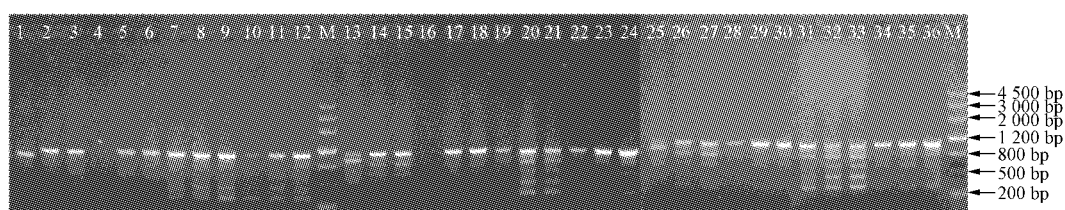
Fig. 1 Electrophoretic analysis for genomic
DNA of *Rubus biflorus* Buch

2.2 粉枝莓 SCoT-PCR 反应体系优化结果

由图 2 可知,36 个处理中除 16 号处理外,其它均有谱带产生,32 号和 33 号扩增谱带清晰、多态性高,基本符合 ISSR 分析的要求。最终选取 33 号处理作为最佳扩增体系,即 SCoT-PCR 20 μL 反应体系中, dNTPs 0.125 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μL , 引物 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 0.625 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 40 ng, 退火温度 51 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 SCoT 体系稳定性检测

通过对 8 份随机选择的粉枝莓样品进行扩增,

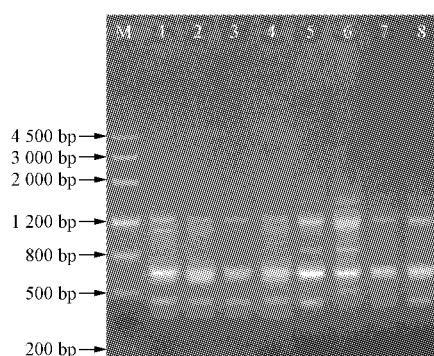


注: M. DNA Marker; 1~36. 粉枝莓 SCoT-PCR 反应体系 36 个处理组合。

Note: M. DNA Marker. 1—36. Randomly selected 36 treatments of SCoT-PCR reaction system.

图 2 粉枝莓 SCoT-PCR 反应体系扩增结果

Fig. 2 Amplification result of SCoT-PCR reaction system for *Rubus biflorus* Buch



注:M: DNA Marker;1~8 为随机选取粉枝莓材料基因组 DNA。

Note:M: DNA Marker;1—8. Randomly selected 8 materials of *Rubus biflorus* genomic DNA.

图3 8份粉枝莓样品 SCOT-PCR 扩增结果(引物 SC35)

Fig.3 SCOT-PCR results of 8 specimens with SC35

由图3可知,8份样品均得到有效扩增,扩增所得条带清晰,所建立的粉枝莓 SCOT 反应体系稳定。

3 结论与讨论

SCOT 标记技术均具有较高的多态性,已广泛应用于物种遗传多样性研究。但是,反应体系、物种等条件对 SCOT 标记的 PCR 扩增结果有较大影响^[14]。虽然已有多种植物的 SCOT-PCR 体系优化研究^[15],为相应物种的遗传多样性等研究提供了参考。但目前关于粉枝莓 SCOT-PCR 体系建立的研究尚鲜见报道,因此,在利用 SCOT 分子标记分析粉枝莓遗传多样性之前,对 SCOT-PCR 反应体系进行优化是非常必要的。该研究参照经典 PCR 反应体系,从引物、dNTPs、 Mg^{2+} 浓度以及退火温度 4 个因素,对 SCOT-PCR 反应体系进行了优化。最终确定 SCOT-PCR 20 μ L 最佳反应体系中,dNTPs 0.125 mmol \cdot L⁻¹,Taq DNA 聚合酶 0.15 μ L,引物 1.0 μ mol \cdot L⁻¹, Mg^{2+} 0.625 mmol \cdot L⁻¹,模板 40 ng,退火温度 51 $^{\circ}$ C。

稳定性试验显示,SC35 对 8 份粉枝莓样品均能扩增出清晰、丰富的条带,表明优化后的 SCOT-PCR 反应体系稳定可靠,可用于粉枝莓资源的遗传多样性分析。

参考文献

- [1] 倪志诚,西藏经济植物[M].北京:科学技术出版社,1990:308-310.
- [2] 李维林,蒋振军,蒋续银.粉枝莓资源开发利用研究[J].中国水土保持,1994(6):37-39.
- [3] 康淑荷.粉枝莓根挥发油化学成分研究[J].西北民族大学学报(自然科学版),2007,28(65):27-29.
- [4] 康淑荷,师永清,杨彩霞.粉枝莓根中的三萜及甾体化合物[J].中药材,2008,31(11):1669-1671.
- [5] 康淑荷,郑尚珍.粉枝莓中的两种新黄酮成分[J].药学报,2007,42(12):1288-1291.
- [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: 86-93.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 和世玉,牛建新,马建江.梨 SCoT-PCR 反应体系的优化及‘库尔勒香梨’营养系变异鉴定[J].果树学报,2016,33(11):1337-1346.
- [10] 李金璐,王硕,于婧,等.一种改良的植物 DNA 提取方法[J].植物学报,2013,48(1):72-78.
- [11] 李晓晖,黎颖菁,黄荣韶,等.凉粉草遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 分析[J].西南农业学报,2012,25(5):1834-1840.
- [12] 姜小凤,高燕会,童再康,等.黄春红石蒜属植物 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] 秦国新,何桥,梁国鲁,等.草莓属植物 SCoT 分析体系的建立及优化[J].果树学报,2012(3):393-397.
- [14] 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.
- [15] 蔡元保,杨祥燕,陈显国,等.澳洲坚果 SCoT 反应体系的建立及应用[J].热带亚热带植物学报,2013,21(3):253-258.

SCoT-PCR Reaction System for *Rubus biflorus* Buch

YUAN Lei¹, LIU Yu², ZHONG Zhengchang², XIE Bo², CAO Dongxing²

(1. Office of Scientific Research Administration, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi, Tibet 860000; 2. College of Food Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi, Tibet 860000)

Abstract: *Rubus biflorus* Buch was used as test material, total genomic DNA was extracted by using improved CTAB method. The factors including primers, dNTPs, Mg^{2+} and annealing temperature were studied to establish optimized SCoT-PCR reaction system to ensure the stability of SCoT for *Rubus biflorus* Buch. The results showed that the optimized reaction system of SCoT-PCR was consisted as follows, in the total reaction system with amount of 20 μ L, there were 0.125 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 0.15 μ L Taq DNA polymerase, 1.0 μ mol \cdot L⁻¹ primers, 0.625 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} , 40 ng template DNA, respectively. The optimal annealing temperature was 51 $^{\circ}$ C. The findings suggested that the products' bands were clear with high stability.

Keywords: *Rubus biflorus* Buch; SCoT; optimization