

# 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选

侯小改<sup>1</sup>, 王娟<sup>1</sup>, 贾甜<sup>1</sup>, 张钰乾<sup>2</sup>, 侯娟<sup>2</sup>, 李嘉珏<sup>3</sup>

(1. 河南科技大学 农学院 河南 洛阳 471003; 2. 河南科技大学 林学院 河南 洛阳 471003; 3. 中国洛阳国家牡丹基因库 河南 洛阳 471011)

**摘要:** 以牡丹基因组 DNA 为模板, 采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计对影响目标起始密码子多态性-聚合酶链式反应 (SCoT-PCR) 的五因素( *Taq* 酶用量、 $Mg^{2+}$  浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度和引物浓度) 进行优化试验, 建立了优化的牡丹 SCoT-PCR 反应体系:  $Mg^{2+}$  2.50 mmol/L、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.60  $\mu$ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.50 U、模板 DNA 1.00 ng/ $\mu$ L、 $1\times$  PCR-Buffer, 总体积 20.00  $\mu$ L。比较各因素对扩增反应的结果, 其中以  $Mg^{2+}$  浓度的影响最大, DNA 模板用量的影响最小。运用牡丹 17 个品种验证了该体系稳定可靠, 并从 36 个 SCoT 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性丰富的 24 个引物。这一体系的建立及多态性引物的筛选为今后利用 SCoT 标记技术对牡丹进行相关研究提供了科学依据。

**关键词:** 牡丹; SCoT-PCR; 反应体系; 正交设计; 引物筛选

**中图分类号:** S567.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)05-0092-05

## Orthogonal Optimization of SCoT-PCR System and Primer Screening of Tree Peony

HOU Xiao-gai<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>, JIA Tian<sup>1</sup>, ZHANG Yu-qian<sup>2</sup>, HOU Juan<sup>2</sup>, LI Jia-jue<sup>3</sup>

(1. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

3. Luoyang National Peony GeneBank, Luoyang 471011, China)

**Abstract:** The orthogonal design table of  $L_{16}(4^5)$  was used to optimize the five factors( *Taq* DNA polymerase,  $Mg^{2+}$ , DNA template, dNTPs and primer concentrations) of SCoT-PCR( start codon targeted polymorphism) system in tree peony. The results showed that the optimized system was as follows: a total volume of 20  $\mu$ L including 1.0 ng/ $\mu$ L DNA template, 0.50 U *Taq* polymerase, 0.60  $\mu$ mol/L primer, 2.50 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.25 mmol/L dNTPs and 1 PCR Buffer. Each factor had different effect on the results. The concentration of  $Mg^{2+}$  was the key factor affecting the SCoT-PCR system. The optimized SCoT-PCR system was tested on seventeen peony genus, and the result was stable and reliable. From the 36 primer combinations tested, Twenty-four were selected with clear band patterns and abundant polymorphism. The optimized SCoT-PCR system and polymorphism primer combinations provided the basis for further research on *Paeonia suffruticosa*.

**Key words:** SCoT-PCR; Reaction system; Orthogonal design; Primers screening

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 是多年生落叶灌木, 为芍药科(Paeoniaceae) 芍药属(*Paeonia* L.) 牡丹组(*Sect. Mouton* DC.) 植物, 具有很高的观赏价值和药用价值。其栽培历史悠久, 在长期驯化栽培、自然及人工选择下, 形成了丰富的遗传变异。各地还大量存在着同物异名、同名异物和品种混乱等现

象, 给品种区分和育种工作带来诸多困难。而分子标记技术可有效地应用于品种鉴定, 同时也可指导育种工作。目前, 分子标记技术应用在牡丹种及品种间亲缘关系研究、遗传多样性分析及杂交后代鉴定等多方面, 主要有 RAPD、AFLP、ISSR、SRAP 等技术<sup>[1-4]</sup>, 但它们都是传统意义上的随机 DNA 分子标

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(31070620); 河南省重大科技攻关项目(091100110100); 河南省重点科技攻关项目(092102110024); 洛阳市科技攻关项目(0802017A)

作者简介: 侯小改(1966-), 女, 河南焦作人, 教授, 博士, 主要从事园艺植物栽培生理、生物技术等方面的研究。

记,或是扩增非编码区域,或随机在基因组中扩增,扩增位点一般与目标性状基因位点距离较远,因而限制了它们的应用<sup>[5]</sup>。随着功能基因组学和生物信息学的发展,目的基因分子标记越来越受到研究者重视,因其本身可能是目的基因的一部分或与目的基因紧密连锁,这样通过对某个分子标记筛选即能对性状进行筛选,从而加速育种进程。为此,建立一种简单、有效和实用的目的基因分子标记技术对牡丹遗传育种研究有着重要意义。

目标起始密码子多态性(Start codon targeted polymorphism, SCoT)分子标记是 Collard 和 Mackill 在水稻上提出的基于单引物扩增反应(Single primer amplification reaction, SPAR)的目的基因分子标记方法,在水稻上已被证实非常有效<sup>[6]</sup>。此标记结合 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点:操作简单、成本低廉、多态性丰富,能有效产生与性状联系标记,有利于辅助育种;引物设计简单,并且引物可以通用等。

表 1 供试牡丹材料品种及类型

Tab.1 The cultivars and types of *Paeonia suffruticosa* L. used in this study

编号 No.	品种名称 Cultivar name	类型 Type	编号 No.	名称 Cultivar name	类型 Type	编号 No.	名称 Cultivar name	类型 Type
1	洛阳红	中原品种	7	雀好	江南品种	13	银百合	西北品种
2	十八号	中原品种	8	西施	江南品种	14	红冠玉珠	西北品种
3	首案红	中原品种	9	七蕊	西南品种	15	杨山牡丹	野生种
4	豆绿	中原品种	10	岛大臣	日本品种	16	狭叶牡丹	野生种
5	姚黄	中原品种	11	盛宴	美国品种	17	卵叶牡丹	野生种
6	珊瑚台	中原品种	12	醉杨妃	西北品种			

1.3 SCoT 反应体系的优化

采用  $L_{16}(4^5)$  正交表设计,对反应体系中的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、*Taq* 酶和 DNA 模板 5 种影响因素设置 4 个水平(表 2)共 16 个组合(表 3),重复 3 次,总反应体系为 20  $\mu$ L。体系优化所用材料和引物分别是洛阳红和 SC23。反应程序为:94℃ 预变性

SCoT 标记不仅可以作为 ISSR 和 RAPD 的有效补充,而且是一种能跟踪性状的新的分子标记<sup>[5]</sup>,但目前尚未见有 SCoT 标记在牡丹上应用的研究报道。因此,本试验以牡丹为试材,试图建立并优化牡丹 SCoT-PCR 反应体系,为研究牡丹的遗传多样性和亲缘关系提供更多参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料取自洛阳国家牡丹基因库(表 1),选用无病虫害的牡丹幼嫩真叶,洗净后用液氮处理,置于 -40℃ 保存备用。

1.2 DNA 模板的提取

用改良 CTAB 法提取 DNA,参照王佳等<sup>[7]</sup>的方法。紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量。稀释至所需浓度后,-20℃ 保存。

5 min;94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 复性 2 min,34 次循环;最后 72℃ 延伸 8 min,4℃ 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,经 Ultrapower™ 核酸燃料染色后,英国 UVItec 公司的 BTS-20M 型 GenGenius 凝胶成像分析系统上采集图像。

表 2 牡丹 SCoT-PCR 反应优化的因素与水平

Tab.2 Factors and levers of peony SCoT-PCR optimization reaction

水平 Levels	因素 Factors				
	模板 DNA 用量	$Mg^{2+}$ 浓度	dNTPs 浓度	引物浓度	<i>Taq</i> 聚合酶用量
	/(ng/ $\mu$ L) Template DNA dosage	/(mmol/L) $Mg^{2+}$ concentrations	/(mmol/L) dNTPs concentrations	/( $\mu$ mol/L) Primmer concentrations	/U <i>Taq</i> polymerase Dosage
1	1.00	1.50	0.25	0.40	0.50
2	1.50	2.00	0.30	0.50	1.00
3	2.00	2.50	0.35	0.60	1.50
4	2.50	3.00	0.40	0.70	2.00

1.4 反应体系稳定性验证及多态性 SCoT 引物筛选

对优化好的体系,选用引物 SC24 对 17 个牡丹品种 DNA 进行扩增试验,以检测反应体系的稳定

性。并根据上述试验结果最佳 SCoT-PCR 反应体系,参照 Collard 和 Mackill 的所用引物<sup>[6]</sup>,用洛阳红品种为材料进行多态性引物的筛选。

表 3 牡丹 SCoT-PCR 反应因素水平  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计  
Tab.3  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design of the factors and levers of peony SCoT-PCR reaction

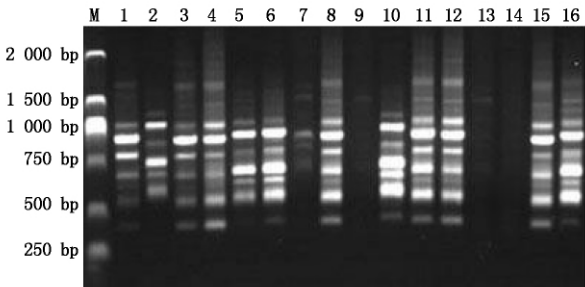
水平 Levels	因素 Factors				
	模板 DNA 用量 /( ng/ $\mu$ L)	Mg <sup>2+</sup> 浓度 /( mmol/L)	dNTPs 浓度 /( mmol/L)	引物浓度 /( $\mu$ mol/L)	Taq 聚合酶用量/U Taq polymerase
	Template DNA dosage	Mg <sup>2+</sup> concentrations	dNTPs concentrations	Primer concentrations	dosage
1	1.00	1.50	0.25	0.40	0.50
2	1.00	2.00	0.30	0.50	1.00
3	1.00	2.50	0.35	0.60	1.50
4	1.00	3.00	0.40	0.70	2.00
5	1.50	1.50	0.30	0.60	2.00
6	1.50	2.00	0.25	0.70	1.50
7	1.50	2.50	0.40	0.40	1.00
8	1.50	3.00	0.35	0.50	0.50
9	2.00	1.50	0.35	0.70	1.00
10	2.00	2.00	0.40	0.60	0.50
11	2.00	2.50	0.25	0.50	2.00
12	2.00	3.00	0.30	0.40	1.50
13	2.50	1.50	0.40	0.60	1.50
14	2.50	2.00	0.35	0.40	2.00
15	2.50	2.50	0.30	0.70	0.50
16	2.50	3.00	0.25	0.50	1.00

2 结果与分析

2.1 牡丹 SCoT 反应体系的正交优化分析

正交试验设计 SCoT-PCR 反应体系 选取 SC23 作为扩增引物 ,以牡丹品种洛阳红 DNA 模板进行扩增 ,并对扩增产物进行电泳检测( 图 1) 。本研究参照何正文等<sup>[8]</sup> 和谢云海等<sup>[9]</sup> 的直观分析法和对电泳条带的打分方法 ,依据电泳条带的多少、清晰度及背景颜色给图 1 的 1~16 处理打分。在假设不存在交互情况下 ,取 3 次得分的平均值进行直观分析 ,求出每个因素同一水平下的得分总和及平均值 ,用最大平均值减去最小平均值求出同因素不同水平间的级差 R ,R 大小反应该因素对试验结果影响的程度 ,R 越大说明该因素对试验结果影响越大( 表 4) 。用 Excel 作图分析( 图 2) ,从 R 值可知 ,在试验范围内 ,Mg<sup>2+</sup> 的 R 值最大 ,说明 5 个因素中的 Mg<sup>2+</sup> 对反应

体系结果影响最大 ,其次为引物浓度、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合酶用量 ,而 DNA 模板量影响最小。



M. DNA Marker DL2000 bp; 1~16. 组合编号。  
M. DNA Marker DL2000 bp; 1~16. Treatment No. ,  
treatments as showed in Tab. 3.

图 1 牡丹 SCoT-PCR 正交试验设计  
 $L_{16}(4^5)$  电泳结果( 引物 SC24)

Fig.1 Result of  $L_{16}(4^5)$  orthogonal  
design products electrophoresis of peony  
SCoT-PCR reaction with the primer SC24

表 4 牡丹 SCoT-PCR 反应正交试验  $L_{16}(4^5)$  结果均值  
Tab.4 The mean result of  $L_{16}(4^5)$  PCR orthogonal design of peony SCoT-PCR reaction

水平 Levels	因素 Factors				
	模板 DNA Template DNA	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物 Primer	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase
1	10.25	5.75	11.25	6.50	11.50
2	10.25	8.25	11.50	9.25	7.00
3	10.00	11.75	6.75	11.75	9.75
4	6.75	11.50	7.75	9.75	9.00

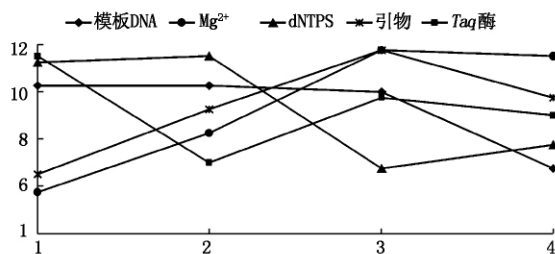


图2 牡丹 SCoT-PCR 正交试验设计  $L_{16}(4^5)$  各因素与结果均值关系

Fig. 2 Relationship between factors and the mean of result of  $L_{16}(4^5)$  PCR orthogonal design of peony SCoT-PCR reaction

由图1可以看出,各因素不同浓度组合形成的反应体系,扩增结果差异性较大。在16个组合中,3个处理(处理9,13,14)几乎无扩增条带,其他组合均有可见条带且主带明显,处理1,2,7扩增条带很弱且带较少。通过对扩增谱带特异性和敏感度即谱带多少、亮度的强度、背景的深浅和有无弥散现象对 SCoT-PCR 扩增结果进行综合性评价,结果筛选出条带数量丰富、清晰度高、特异性条带和非特异性条带之间的差异明显的处理11为最优组合,其次为组合3和组合15。 $Mg^{2+}$ 浓度过低会降低 Taq 酶的活性,使扩增条带减少,过高会引起特异性扩增。当  $Mg^{2+}$ 浓度为1.50 mmol/L和2.00 mmol/L时,组合(9,13,14)几乎无扩增条带。当其浓度在2.50 mmol/L时扩增效果较好(组合3,11,15),当浓度在3.00 mmol/L时,结果均值下降,不及浓度2.50 mmol/L,因此  $Mg^{2+}$ 浓度为2.50 mmol/L为宜。如图2所示, Taq DNA 聚合酶浓度对 SCoT 体系的影响不大。4个梯度(0.50,1.00,1.50,2.00 U)均扩增出了较好的带型,各梯度用量下谱带扩增效果较一致。结合图1发现,浓度大时带型较亮但会有模糊现象,分离界限不够清晰,且酶量过多易产生非特异性扩增,产生高的错配率,从经济因素考虑, Taq DNA 聚合酶适宜浓度为0.50 U。

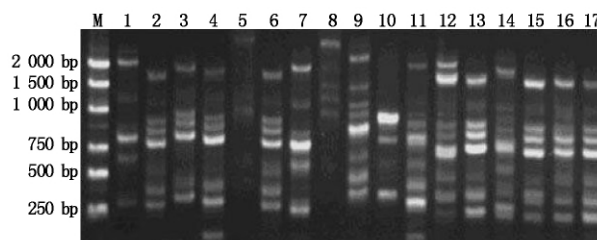
dNTPs 在处理9,13,14中的用量水平较高(0.35 mmol/L和0.40 mmol/L),尽管其他组合处于合适水平,但几乎无扩增结果,说明高浓度的 dNTPs 不利于扩增。由图2可知,随着 dNTPs 浓度的增加,结果均值呈现先增后降的趋势,而后直线下降,其浓度为0.25,0.30 mmol/L时无显著差异。因此,低浓度 dNTPs 有利于扩增。结合图1发现, dNTPs 浓度分别为0.35 mmol/L和0.40 mmol/L,尽管其他组合处于合适水平,但几乎无扩增结果(处理9,13,14), dNTPs 浓度高时,错误渗入率会大大增加,也可导致酶活性下降(处理13,14)。dNTPs

浓度处于较低两个水平(0.25,0.30 mmol/L),其差异不明显,结果均值几乎相同,从经济角度考虑, dNTPs 浓度为0.25 mmol/L较适宜。

引物浓度的0.40,0.50,0.60,0.70  $\mu$ mol/L 4个水平间差异显著,浓度过高会增加引物间形成二聚体的机会。因此应选用峰值0.60  $\mu$ mol/L为反应的最佳水平。

适宜的样本量是保证扩增的前提,样本量过多会增加非特异性扩增产物,由图2可知,当模板浓度为(1.00,1.50,2.00 ng/ $\mu$ L)时,曲线趋于平滑,说明 SCoT 反应体系对模板 DNA 浓度敏感度不太高。结合图1发现,当模板浓度为2.50 ng/ $\mu$ L组合(13,14)无扩增产物,且曲线呈现下降趋势。因此,选取1.00 ng/ $\mu$ L为最佳反应水平。

综合以上分析,最终确定反应总体积20.00  $\mu$ L的 SCoT-PCR 最优组合为:  $Mg^{2+}$ 为2.50 mmol/L,引物为0.60  $\mu$ mol/L, Taq 酶为0.50 U, dNTP 为0.25 mmol/L,模板为DNA为1.00 ng/ $\mu$ L。

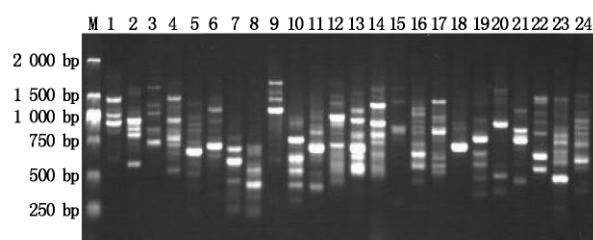


M. DNA Marker DL2000; 1~17. 分别对应表1中各品种。

M. DNA Marker DL2000; 1~17. Refer to the cultivars in Tab. 1.

图3 引物 SC24 对 17 个牡丹品种的 SCoT-PCR 扩增

Fig. 3 SCoT-PCR amplification of 17 Tree Peony germplasms by using primer SC24



M. DNA Marker DL2000; 1~24. 分别为引物 SC2、SC3、SC7、SC11、SC12、SC13、SC14、SC15、SC16、SC18、SC19、SC22、SC23、SC24、SC25、SC28、SC29、SC30、SC31、SC32、SC33、SC34、SC35、SC36; 每个反应所用的材料都是洛阳红品种。

M. DNA Marker DL 2000; 1~24. SC2, SC3, SC7, SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, SC18, SC19, SC22, SC23, SC24, SC25, SC28, SC29, SC30, SC31, SC32, SC33, SC34, SC35, SC36; Experimental material: Luoyanghong.

图4 优化后的牡丹 SCoT-PCR 反应体系在 24 个引物中的验证结果

Fig. 4 The verification results of 24 primer based on the optimized peony SCoT-PCR system

2.2 SCoT-PCR 反应体系稳定性验证及引物的筛选  
应用上述优化后的反应体系和 SC24 引物对 17

个牡丹品种(表 1)进行了 SCoT-PCR 扩增。由图 3 可见,不同品种扩增条带均清晰稳定,且多态性丰富。不仅体现出种内的遗传稳定性,还体现出品种间的遗传差异,表明该优化体系稳定可适用于牡丹 SCoT-PCR 分析。

运用优化的牡丹 SCoT-PCR 反应体系及供试洛阳红牡丹基因组 DNA,对 Collard 和 Mackill<sup>[10]</sup> 的 36 个所用引物进行多态性筛选,结果显示,所有引物均能扩增出清晰可辨的条带,每个引物扩增条带数 2~12 条不等,其中有 24 个引物均能扩增出清晰且丰富的多态性条带,占有引物组合的 66.70%(图 4)。

### 3 讨论

SCoT 标记作为一种基于 PCR 技术的新型分子标记具有操作简单、引物具有通用性、成本低廉、多态性高、可获得丰富的遗传信息等诸多优点,能更好地反应物种的遗传多样性和亲缘关系<sup>[10]</sup>。由于它也是基于 PCR 反应的标记技术,同其他基于 PCR 反应技术一样,其反应体系受诸多因素的影响,*Taq* 聚合酶量、 $Mg^{2+}$  浓度、模板 DNA 量、dNTPs 浓度和引物浓度等各反应成分都会影响 PCR 的结果<sup>[11]</sup>。因此,采用 SCoT 分子标记时应首先对其反应体系进行优化。

体系优化研究中一般均采用多次单因素设计的方法,该方法缺陷在于当变化一个因素固定其余几个因素时,往往靠经验或参考相近物种确定,这样既不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用,也不能保证各组分最佳浓度的组合就是最佳反应体系<sup>[12]</sup>。利用正交试验设计进行 PCR 体系优化方法是最早由何正文等<sup>[8]</sup>提出的,该方法可以综合考察 PCR 反应体系中个因素及其交互作用,与以往的单因素 PCR 优化设计相比,能够快速获得满意的试验结果,减少试验的工作量,降低试验成本,避免顾此失彼忽视其互作效应<sup>[13]</sup>。目前,有关用正交设计法优化牡丹反应体系的报道很多:王燕青等<sup>[14]</sup>采用正交设计得到了适合牡丹 SRAP 的最适反应体系。王佳等<sup>[7]</sup>对牡丹 ISSR-PCR 反应体系进行正交设计,优化出了适合牡丹 ISSR 最佳反应体系。但关于正交设计法优化牡丹 SCoT 反应体系的研究还未见报道。本研究应用正交试验设计对牡丹 SCoT-PCR 的反应体系进行了优化并对引物进行了筛选,得到了清晰且重复性好的条带,证明了该方法适应于牡丹 SCoT-PCR 反应体系优化研究。本试验得到最佳反应体系为: $Mg^{2+}$  浓度为 2.50 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L, *Taq* 酶用量为 0.50 U,引物浓度为

0.60  $\mu$ mol/L,模板 DNA 用量为 1.00 ng/ $\mu$ L,反应总体积 20.00  $\mu$ L。本研究结果表明: $Mg^{2+}$  浓度对牡丹 SCoT-PCR 扩增结果影响最大,引物浓度也是影响扩增效果的一个较重要的因素,初步筛选出的 24 个扩增效果较好的 SCoT-PCR 引物可用于牡丹遗传多样性分析。本研究结果可为今后利用 SCoT-PCR 这一新型标记技术进行牡丹分子遗传学与标记辅助选择育种研究打下基础,也为此标记应用于其他植物的研究提供了借鉴。

### 参考文献:

- [1] Hosoki T, Kimura D, Hasegawa R. Comparative study of tree peony (*paeonia suffruticosa* andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. Japan Soc Hort Sci, 1997, 66(2): 393-400.
- [2] 侯小改,尹伟伦,李嘉珏,等.部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析[J].中国农业科学,2006,39(8): 1709-1715.
- [3] 杨淑达,施苏华.滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J].生物多样性,2005,13(2): 105-111.
- [4] 郭大龙,侯小改,张静,等.牡丹 SRAP 反应体系的建立及正交设计优化[J].河南农业科学,2008,12: 110-113.
- [5] 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.
- [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, Plant Mol [J]. Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93.
- [7] 王佳,胡永红,张启翔,等.牡丹 ISSR-PCR 反应体系正交优化设计[J].安徽农业科学,2006,34(24): 6465-6466, 6484.
- [8] 何正文,刘云生,陈立华.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.
- [9] 谢云海,夏德安,姜静,等.利用正交优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2005,3(3): 445-450.
- [10] 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.
- [11] 李勇,朱永春.基于琼脂糖凝胶电泳的小麦 SSR 扩增体系优化[J].华北农学报,2009,24(6): 174-177.
- [12] 杨云水,李续娥,吴红伟.正交实验法在 PCR 反应优化中的应用[J].生物数学学报,2005,20(2): 202-206.
- [13] 郭大龙,张君玉,李猛,等.葡萄 SRAP 反应体系优化及引物筛选[J].基因组学与应用生物学,2010,29(2): 379-384.
- [14] 王燕青,季孔庶.正交设计优化牡丹 SRAP-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2009,7(1): 199-203.