

• 药材与资源 •

铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系的优化

徐旭栋, 蒋瑞彬, 蓝小明, 颜美秋, 丁志山, 吕圭源, 金 波*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 对铁皮石斛的目标起始密码子 (start codon targeted polymorphism, SCoT) 多态性反应体系进行优化, 为进一步对铁皮石斛遗传多样性的 SCoT 分析奠定基础。方法 以铁皮石斛的新鲜叶片为试验材料, 采用控制单一变量的方法分别研究模板 DNA 用量、引物浓度、TaqDNA 聚合酶用量、dNTPs 浓度、及退火温度共 5 个因素对 SCoT-PCR 扩增结果的影响。结果 铁皮石斛 SCoT 标记的 20 μ L 优化反应体系为: DNA 模板 20 ng、引物浓度为 30 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U、dNTP 浓度为 100 μ mol/L。适宜的 PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 56.1 $^{\circ}$ C 复性退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 36 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物在 600~2 000 bp。结论 该体系的建立为铁皮石斛种质遗传多样性分析、分子标记辅助育种等研究奠定了基础。

关键词: 铁皮石斛; 目标起始密码子 (SCoT) 多态性; 体系优化; 遗传多样性分析; 分子标记辅助育种

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2481-04

Optimization of SCoT-PCR reaction system of *Dendrobium officinale*

XU Xu-dong, JIANG Rui-bin, LAN Xiao-ming, YAN Mei-qi, DING Zhi-shan, LV Gui-yuan, JIN Bo

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** In order to optimize the reaction system of start codon targeted (SCoT) polymorphism of *Dendrobium officinale*, and to lay the foundation for analysis on genetic diversity of *D. officinale*. **Methods** The fresh leaves of *D. officinale* were used and the effects of template DNA, primer, Taq DNA polymerase, dNTPs, and annealing temperature on SCoT-PCR amplification were determined through single factor test. **Results** The SCoT-marked 20 μ L optimized reaction system of *D. officinale* included 20 ng template DNA, 30 μ mol/L primer, 1.0 U Taq DNA polymerase, and 100 μ mol/L dNTP. The suitable PCR amplification procedure was one cycle of pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 4 min, 36 cycles of denaturing at 95 $^{\circ}$ C for 50 s, annealing at 56.1 $^{\circ}$ C for 40 s, and extending at 72 $^{\circ}$ C for 2 min, extending at 72 $^{\circ}$ C for 5 min, and finally, being kept at 4 $^{\circ}$ C. PCR amplification results by 1.5% agarose gel electrophoresis showed that amplification products were mainly in the range of 600—2 000 bp. **Conclusion** The established SCoT-PCR reaction system could provide the reference for germplasm genetic diversity analysis and molecular marker-assisted breeding of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; start codon targeted (SCoT) polymorphism; system optimization; genetic diversity analysis; molecular marker-assisted breeding

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是药用石斛中的上品, 誉为“救命仙草”、“植物黄金”, 为传统的珍稀名贵中药材。由于石斛自然繁殖力低, 加上长期采挖, 野生铁皮石斛资源日渐枯竭, 成为濒危植物, 被列为国家重点保护的野生药材品种^[1]。为满足市场的需求, 铁皮石斛的人工栽培规模不断扩大, 已成为解决铁皮石斛资源紧缺问题的有效途径。然而由组织培养来人工栽培铁皮石斛,

在栽培过程中, 存在种源复杂、遗传背景认识不清等情况, 形成多种栽培种^[2]。因此对于药材市场上的铁皮石斛各栽培种间的遗传结构及遗传多样性研究对铁皮石斛资源的保护和利用具有重要意义。

DNA 分子标记是目前种质资源鉴定的重要手段之一。随着分子生物学和生物信息学的发展, 新型分子标记发展迅速, 广泛应用于中药材的鉴别研究和种群亲缘关系分析^[3]。目标起始密码子 (start

收稿日期: 2012-06-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAI04B06); 浙江省教育厅科研基金 (71003012; Y201122310); 浙江省中医药青年基金项目 (A2005Y005)

作者简介: 徐旭栋 (1990—), 男, 本科在读, 生物技术专业。

*通讯作者 金 波 E-mail: jinbont@sina.com

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1754.006.html>

condon targeted, SCoT) 技术是 2009 年提出的一种新型分子标记方法^[4], 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并对基因组进行扩增。由于基因组 DNA 有很多基因, 因而 SCoT 单引物在基因组水平上能有多个结合位点。SCoT 单引物在 PCR 反应中充当上下游引物的角色, 从而使得那些较近而又反向结合的引物结合位点之间的片段得以有效扩增。有的扩增是在一个基因中的第一个外显子中进行, 有的则跨越相邻的内含子进行, 从原理上可以产生相当丰富的多态性; 但目前 SCoT 标记的应用较少^[5], 尚未见铁皮石斛的 SCoT 标记应用; 本研究采用单因素试验优化铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系, 为铁皮石斛种质资源遗传多样性评价、分子标记辅助选择育种和遗传改良提供一种新的技术手段。

1 材料

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的新鲜叶片为材料, 分别采自浙江天台、金华、建德、富阳、乐清、桐乡、建德 7 个不同产地的铁皮石斛, 经浙江中医药大学陈孔荣老师鉴定并分别编号为 1~7。

Taq DNA 聚合酶、dNTP、Mg²⁺等分子生物学试剂均购自大连 TaKaRa 宝生物有限公司。本实验使用的引物采用 Bertrand C. Y. Collard 等设计的引物序列为 SC30 (5'-CCATGGCTACCACCGGCG-3'), 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2 方法

2.1 DNA 提取与检测

采用改进的十六烷基三甲基溴化胺 (ctab heradacyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取试验材料的基因组 DNA^[6]。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 经紫外分光光度计测定浓度后, -20 °C 储存备用。

2.2 PCR 扩增体系的优化

PCR 扩增反应在 Bio-Rad PCR 仪上进行, 优化前扩增程序参考文献方法^[7], 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 50 s, 50 °C 复性退火 40 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 36 次; 72 °C 延伸 5 min。扩增结束, 取 PCR 产物 10 μL, 与 2 μL 的 6×缓冲溶液混合, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 EB) 中进行电泳。

对 20 μL 反应体系中 dNTPs、Taq DNA 聚合酶、DNA 模板和引物进行单因子实验, 各影响因子梯度设置见表 1, 每个处理设 3 个重复。

表 1 SCoT-PCR 扩增体系优化试验设计

Table 1 Design for SCoT-PCR amplification system optimization

水平	DNA 模板量 / ng	TaqDNA 聚合酶 / (U·20 μL ⁻¹)	dNTPs 浓度 / (μmol·L ⁻¹)	引物浓度 / (μmol·L ⁻¹)	退火温度 / °C
1	10	1.0	50	0.5	50.0
2	20	1.5	100	1.0	51.9
3	30	2.0	150	1.5	53.7
4	40	2.5	200	2.0	56.1
5	50	3.0	250	2.5	58.0
6	60	—	300	3.0	60.0

3 结果与分析

3.1 DNA 模板用量对 SCoT-PCR 扩增效果的影响

在 20 μL 体系中, 其他因素不变, 分别考察铁皮石斛模板用量为 10、20、30、40、50、60 ng 时对 PCR 反应的影响, 结果见图 1。模板浓度 20 ng 以上、50 ng 以下均可获得清晰的扩增条带。说明模板浓度在实验范围内的 SCoT-PCR 反应较为良好, 均适合 SCoT 的扩增。从材料成本和扩增效果等因素考虑, 20 μL 体系中 DNA 模板用量为 20 ng 时最适宜值。

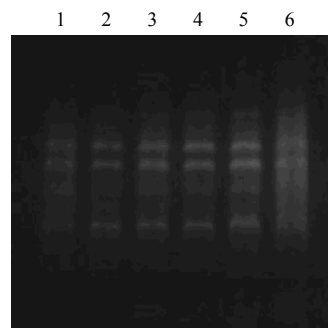


图 1 不同用量模板 DNA 的 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 1 SCoT-PCR amplification by different amounts of DNA templates

3.2 Taq DNA 聚合酶用量对 SCoT-PCR 扩增效果的影响

在变量只有 Taq DNA 聚合酶用量的试验中, 20 μL 体系中 Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U 时, 便可以获得清晰的电泳条带, 随着 Taq DNA 聚合酶用量的增加, 条带背景越来越模糊, 非特异片段增加 (图 2)。从实验成本及清晰度等因素考虑, 20 μL 体系中 Taq DNA 聚合酶用量以 1.0 U 为最适宜值。

3.3 dNTPs 浓度对 SCoT-PCR 扩增效果的影响

在变量只有 dNTPs 浓度的试验中, dNTPs 浓度对 SCoT 扩增结果影响较大, 见图 3。50 μmol/L 的

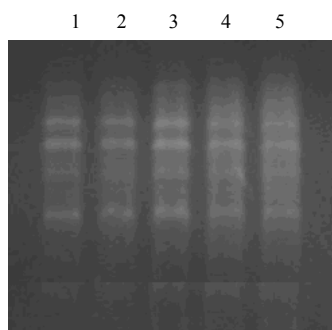


图 2 不同用量 Taq DNA 聚合酶的 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 2 SCoT-PCR amplification by different amounts of Taq DNA polymerases

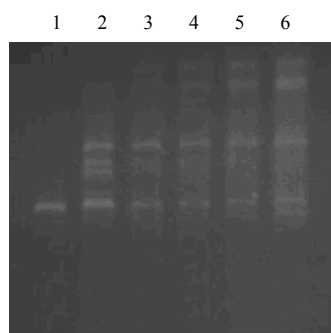


图 3 不同质量浓度 dNTPs 的 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 3 SCoT-PCR amplification by different concentration of dNTPs

dNTPs 浓度可扩增获得条带清晰但较少, 而浓度在 150 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 扩增获得条带较多但背景模糊, 非特异扩增较多。因此, 为了获得最佳扩增效果, 20 μL 体系中的 dNTPs 浓度以 100 $\mu\text{mol/L}$ 为最适值。

3.4 引物浓度对 SCoT-PCR 扩增效果的影响

在只改变引物浓度的试验中, 当引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增所得条带较少, 且条带不明显; 随着引物浓度的增加, 扩增条带增加且片段变大、清晰; 而当引物浓度达到 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增出来的条带最多最清晰; 超过该浓度后, 小条带未扩增, 结果见图 4。因此, 20 μL 体系中的引物浓度以 30 $\mu\text{mol/L}$ 为最适值。

3.5 退火温度对 SCoT-PCR 扩增效果的影响

在本试验中, 退火温度对 SCoT-PCR 扩增条带有明显的影响。当退火温度在 50~58 $^{\circ}\text{C}$ 时, 均可获得条带。而当温度在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 基本无可见条带。同时发现在 56.1 $^{\circ}\text{C}$ 时扩增出的条带最为清晰 (图 5), 因此 20 μL 体系中退火温度以 56.1 $^{\circ}\text{C}$ 最适宜。

3.6 SCoT-PCR 的引物扩增结果

用 SC30 引物采用优化后的体系对 7 种不同来源的铁皮石斛基因组 DNA 进行扩增, 结果显示扩增条带清晰, 并具有多态性片段 (图 6), 说明了该优化体系可用于铁皮石斛 SCoT-PCR 分析, 可以为进一步的铁皮石斛种内多样性分析奠定基础。

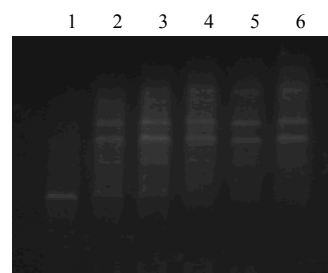


图 4 不同浓度引物的 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 4 SCoT-PCR amplification by different concentration of primers

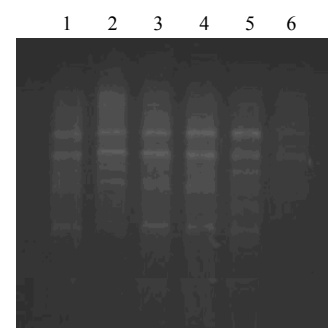
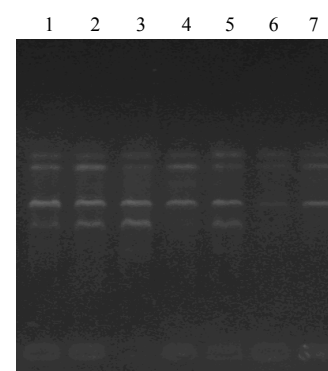


图 5 不同退火温度的 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 5 SCoT-PCR amplification at different annealing temperatures



1~7-不同产地的铁皮石斛样品

1—7-samples of *D. officinale* from different habitats

图 6 不同产地铁皮石斛 SCoT-PCR 扩增结果

Fig. 6 SCoT-PCR amplification of *D. officinale* from different habitats

4 讨论

现在基于 PCR 扩增的分子标记发展较快且应用广泛。而 SCoT 技术分子标记是 Collard 和 Mackill 在基于水稻研究而提出的新型分子标记技术。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并对基因组进行扩增。理论上能扩增出非常丰富的多态性位点。且 SCoT 结合了 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点, 具有操作简单, 成本低廉, 多态性丰富, 是现有各分子标记技术的补充^[8]。

实验中由于材料、仪器以及 PCR 反应体系对 SCoT 技术的结果都有较大的影响, 任何一个因素的改变都会对整个实验的结果产生影响。因此针对不同的试验材料及实验条件需要优化反应体系。利用控制变量法对铁皮石斛 PCR 不同影响因子进行梯度试验, 结果表明将 SCoT 技术应用于不同试验材料时, 对反应因子的浓度以及扩增体系进行优化, 能够提高标记分析体系的稳定性、可重复性和可靠性。本研究经反复试验得到适用于铁皮石斛 SCoT 标记的优化反应体系为: 20 μL 的反应体系中, 含 $10\times$ 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.0 μL 、20 ng 模板 DNA、30 $\mu\text{mol/L}$ 引物、1.0 U DNA 聚合酶、100 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs。

SCoT 技术作为一项新兴的分子标记技术, 已成功应用于在水稻中通过多样性分析和回交群体验证, 证明 SCoT 标记技术是非常有效的。目前已成功应用于花生、龙眼、马铃薯、葡萄、甜橙等^[9-14]。所以运用这项技术在铁皮石斛上不仅可以为药用石斛的分子标记鉴别提供一种新的方法和思路, 验证 SCoT 分子标记技术在石斛属中应用的可行性并建立石斛 SCoT 标记技术体系, 探讨药用石斛种间亲缘关系, 为进一步有效鉴定分析石斛奠定基础, 也能够为这项技术今后推广于其他领域提供借鉴。

参考文献

- [1] 潘仕萍, 李世宗, 杨宝明, 等. 云南珍稀植物铁皮石斛研究初报 [J]. 林业调查规划, 2011(36): 50-52.

- [2] 戴小英, 张淑霞, 周莉荫, 等. 铁皮石斛不同外植体组培快繁技术比较研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(10): 122-126.
- [3] Bertrand C, Collard Y, David J M. 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.
- [4] 周洁, 王忠华. DNA 分子标记技术在药用植物上的应用 [J]. 科技创新导报, 2011(4): 41-43.
- [5] 陈香玲, 李杨瑞, 杨丽涛, 等. cDNA-SCOT 基因差异表达两种电泳方法的比较研究 [J]. 生物技术通报, 2010(10): 93-95.
- [6] 张妙彬, 潘丽晶, 范干群, 等. 富含多糖的转基因石斛基因组 DNA 提取方法 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(1), 209-214.
- [7] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 SCoT-PCR 反应体系的优化基因组学与应用 [J]. 生物学, 2009, 28(5): 970-974.
- [8] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654.
- [9] 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种的应用 [J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2055-2061.
- [10] 蒋巧巧, 龙桂友, 李武文, 等. SCoT 结合克隆测序鉴别湖南甜橙变异类型 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 148-154.
- [11] 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.
- [12] Xiong F Q, Zhong R C, Han Z Q, *et al.* Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut genotypes [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3487-3494.
- [13] Luo C, He X H, Chen H, *et al.* Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38: 1176-1184.
- [14] Ahmad M G, Peter P, Zsolt P, *et al.* Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (ScoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato [J]. *Am J Pot Res*, 2011, 88(3): 226-237.