

郭志海,王鹏凯,郗红丽,等. 杨梅 iPBS-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):51-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.014

杨梅 iPBS-PCR 反应体系的建立与优化

郭志海^{1,3}, 王鹏凯^{1,3}, 郗红丽^{1,2}, 黄颖宏^{1,2}, 费 艳^{1,2}

(1. 江苏省太湖常绿果树技术推广中心, 江苏苏州 215107; 2. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014;
3. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州, 215008)

摘要:利用已报道的 iPBS 引物 2249 和 3 个杨梅品种的 DNA 为模板进行 iPBS-PCR 扩增, 采用单因素法对杨梅 iPBS-PCR 反应体系的 4 个组分(dNTP、 Mg^{2+} 、引物、模板)用量进行优化, 确定了杨梅 iPBS-PCR 20 μ L 反应体系: 2 μ L 10 \times Taq buffer, 1.6 μ L 25 mmol/L Mg^{2+} , 1.6 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 1 μ L 10 μ mol/L 引物, 0.2 μ L 5 U/ μ L Taq 酶, 30 ng 模板 DNA。梯度 PCR 试验表明可以参考 iPBS 引物 Tm 值确定退火温度。利用上述体系对随机取样的 10 个品种用 4 条 iPBS 引物进行扩增, 得到了条带清晰、多态性好的 iPBS 谱带。

关键词:杨梅; iPBS-PCR; 体系优化

中图分类号: S667.601 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0051-04

杨梅(*Myrica rubra*)是杨梅科杨梅属常绿小乔木, 原产于我国, 主要生长在长江流域以南的丘陵山地。杨梅果实营养丰富, 具有较强的保健功能, 是南方经济效益较高的水果之一^[1]。我国杨梅栽培历史悠久, 生态环境的多样性产生了性状多样的品种、品系和类型, 形成了丰富的种质资源。利用形态学、同工酶等方法鉴定杨梅种质资源局限性大、效率低。因此, 常利用分子标记对杨梅种质资源进行分析, 包括遗传多样性、亲缘关系分析、品(杂)种鉴别等方面。目前, RAPD、AFLP、SRAP、ISSR、SSR、iPBS、ScoT 等技术^[2-7]在杨梅中都已得到应用^[8]。

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)2011]; 江苏省科技支撑计划(编号: BE2012361); 国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 20120389); 江苏省农业三新工程[编号: SXGC(2014)076]。

作者简介: 郭志海(1965—), 男, 江苏江阴人, 高级农艺师、副教授, 主要从事园艺种质资源研究。E-mail: Gzh8115@163.com。

通信作者: 王鹏凯, 讲师, 主要从植物分子生物学研究。E-mail: mengxiao02181@hotmail.com。

iPBS 是以 LTR 类反转录转座子保守位点设计引物进行扩增的一种分子标记技术, 针对 LTR 类反转录转座子中 2 个 PBS(引物结合位点)区间进行扩增^[9]。该方法简单、有效, 可节约大量人力、物力, 不用预先获知 LTR 序列, 直接进行引物筛选。目前, 该技术已经成功应用于亚麻^[10]、大麦、小麦、苹果、玉米^[9]、葡萄^[11]等的研究。当材料、方法不同时, 需对扩增条件进行优化才能得出更科学的标记谱带。本研究利用单因素试验对杨梅 iPBS-PCR 反应体系进行优化, 通过对电泳结果的分析建立了杨梅 iPBS-PCR 反应体系。同时利用该反应体系对已有的 iPBS 引物进行初步筛选, 研究结果将为使用 iPBS 标记评价、鉴定杨梅种质资源提供了技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的杨梅种质资源材料均采自江苏省太湖常绿果树技术推广中心国家杨梅种质资源圃, 杨梅品种为晚稻(浙江舟山)、狗色头(江苏常熟)、浪荡子(江苏苏州东山)。PCR 试剂购于 TaKaRa 公司(10 \times rTaq buffer, 2.5 μ mol/L dNTP,

隆及其表达谱[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 207-211。

[12] Ye H Q, Chen S L, Xu J Y. Molecular cloning and characterization of the Myf5 gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, 2007, 147(3): 452-459.

[13] Johansen K A, Overturf K. Sequence, conservation, and quantitative expression of rainbow trout Myf5 [J]. Comp Biochem Physiol: Part B, 2005, 140: 533-541.

[14] 林亚秋, 李瑞文, 郑玉才, 等. 齐口裂腹鱼和鲤鱼 H-FABP 基因的克隆及其表达谱[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(6): 554-560.

[15] Ekmark M, Rana Z A, Stewart G, et al. De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle [J]. The Journal of Physiology, 2007, 584: 637-650.

[6] Te Pas M F, Hulsegge I, Coster A, et al. Biochemical pathways analysis of microarray results: regulation of myogenesis in pigs [J]. BMC Developmental Biology, 2007, 7: 66.

[7] Rescan P Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, 2001, 130(1): 1-12.

[8] Carvajal J J, Rigby P W. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle [J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(18): 3014-3018.

[9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[10] 王东林, 毛宝龄. 生肌调节因子及其作用机理[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1995, 17(4): 157-160.

[11] 林亚秋, 张倡琿, 郑玉才, 等. 九龙牦牛肌细胞生成素基因的克

25 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 , 5 U/ μL rTaq), 引物由上海生工合成(溶解至 10 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2 试验方法

1.2.1 杨梅 DNA 提取与检测 杨梅基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 快速提取法^[12]。将杨梅嫩叶直接在 CTAB 提取液中匀浆, 经过抽提、沉淀、溶解等步骤得到基因组 DNA 溶液。获得的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。通过紫外分光光度计测定 260、280 nm 处的吸光度, 用于测算 DNA 纯度 ($D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$)、浓度 ($D_{260\text{ nm}}$)。完成浓度测定的 DNA 溶液进一步稀释成 10 ng/ μL 的工作液, 用于后续 PCR 反应。

1.2.2 杨梅 iPBS-PCR 反应体系优化 杨梅 iPBS-PCR 扩增反应总体积为 20 μL , 选择在葡萄 iPBS-PCR 反应体系优化中使用的 2249 引物 (5'-AACCGACCTCTGATACCA-3') 进行 PCR 扩增(预试验结果显示该引物在杨梅中扩增效果较好)^[11]。采用单因素法对 2.5 mmol/L dNTP、25 mmol/L Mg^{2+} 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物、模板用量进行试验, 其中包括: (1) 2 μL 10 \times Taq buffer, 1 μL 2249 引物, 0.2 μL Taq 酶, 1.6 μL dNTP, Mg^{2+} 用量设为 1.2、1.4、1.6、1.8 μL , DNA 模板用量设为 5、10、15、20、25、30、50 ng, 用以确定最佳 Mg^{2+} 和模板 DNA 用量。(2) 2 μL 10 \times Taq buffer, 1.6 μL dNTP, 1.6 μL Mg^{2+} , 0.2 μL Taq 酶, 2249 引物用量设为 1、2 μL , DNA 模板用量设为 10、20、30、40 ng, 用以确定引物与模板的最佳比例和用量; (3) 2 μL 10 \times Taq buffer, 1 μL 2249 引物, 30 ng DNA 模板, 0.2 μL Taq 酶, 1.6 μL Mg^{2+} , dNTP 用量设为 1.2、1.6、2.0 μL , 用以确定 dNTP 的最佳用量。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳方法进行检测, 通过紫外凝胶成像系统对不同反应体系进行评价, 筛选出适合杨梅 iPBS-PCR 最佳反应体系。

1.2.3 杨梅 iPBS-PCR 反应程序 本试验中杨梅 iPBS-PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 49 ~ 59 $^{\circ}\text{C}$ (2 $^{\circ}\text{C}/\text{梯度}$, 共 6 个梯度) 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物评价方法与“1.2.2”节相同, 显示出退火温度对杨梅 iPBS-PCR 反应的

影响, 用以确定最佳退火温度。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取与质量控制

电泳检测结果(图 1)表明得到的杨梅基因组 DNA 主带明亮, 无明显拖尾, 经 RNA 酶处理后 RNA 降解较好。分光光度计检测结果表明 70 mg 新鲜叶片可以得到 2 ~ 3 μg 基因组 DNA, 经 RNA 酶处理后 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.65 ~ 1.90 之间, 纯度较好。

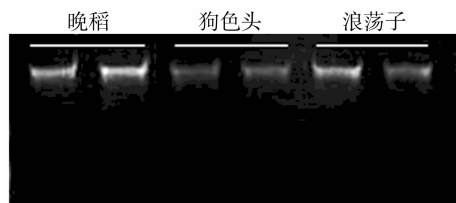
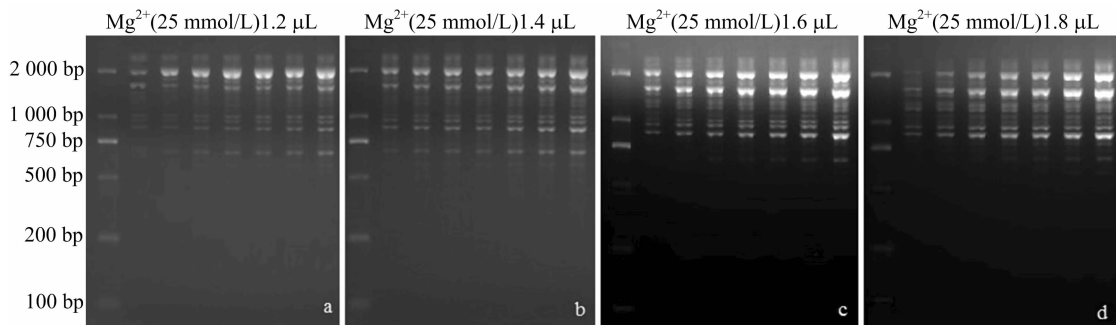


图1 CTAB 法提取三个杨梅品种的基因组 DNA

2.2 PCR 反应各因素对 iPBS-PCR 扩增反应的影响

选用 3 个品种的杨梅基因 DNA 进行 iPBS-PCR 反应, 测试不同反应体系下的扩增效果, 筛选 PCR 反应各因素的优化组合。

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 iPBS-PCR 的影响 PCR 反应中的 Mg^{2+} 对扩增的特异性和 Taq 酶活性有明显的影响。随着 Mg^{2+} 用量的增加, 扩增出的谱带逐渐增多且亮度也逐步增加, 弥散情况基本良好, 有利于谱带的判读; 但 Mg^{2+} 用量增至 1.8 μL 时, 部分谱带的弥散程度有所增加, 可能增加差异较小的谱带判读难度, 进而影响后续的结果分析。为了结果的一致性, 在测试时设置了 7 个模板用量 (5、10、15、20、25、30、50 ng), 发现 Mg^{2+} 用量对 iPBS-PCR 的影响在不同模板量的情况下是一致的(图 2)。因此, 在本研究中 1.2 ~ 1.8 μL Mg^{2+} 用量均适宜杨梅的 iPBS-PCR 反应, 但是为了平衡谱带数量和判读质量, 在后续试验中 Mg^{2+} 用量固定为 1.6 μL 。



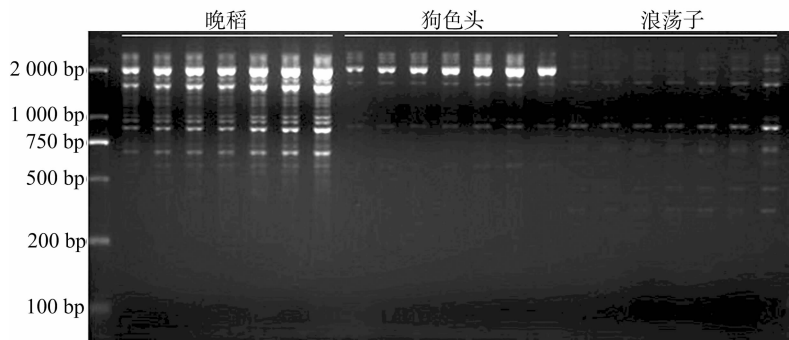
每个 Mg^{2+} 浓度下从左至右模板 DNA 用量依次为 5、10、15、20、25、30、50 ng。

图2 Mg^{2+} 浓度对杨梅(晚稻) iPBS-PCR 扩增反应的影响

2.2.2 模板 DNA 用量对 iPBS-PCR 的影响 模板用量是 PCR 体系的重要影响因素, 杨梅 iPBS-PCR 的预试验中就发现 100 ng 以上的模板用量会导致扩增失败。当 Mg^{2+} 用量固定为 1.6 μL 时在 5 ~ 50 ng 模板量范围内, 模板量的改变对 iPBS-PCR 影响较大(图 3)。当模板量增加时, 扩增出的谱带逐渐增多、亮度也有所增加, 并且这种影响在 3 个杨梅品种中

具有一致性; 对于得到谱带较多的品种, 当模板量增至 50 ng 时弥散程度增加, 影响了结果分析。因此 综合考虑以上结果, 确定后续试验中模板 DNA 用量为 30 ng。

2.2.3 引物用量对 iPBS-PCR 的影响 引物用量对扩增的特异性和谱带的清晰度有明显影响。当引物用量由 1 μL 增加至 2 μL 后, 谱带数量减少且弥散情况比较严重, 谱带的特

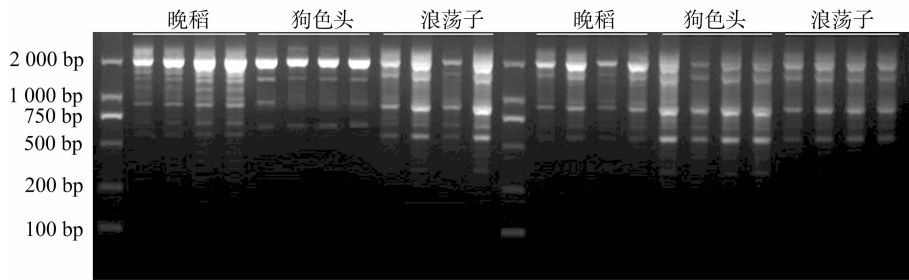


从左至右每个品种模板 DNA 用量依次为 5、10、15、20、25、30、50 ng。
图3 模板量对杨梅(晚稻、狗色头、浪荡子) iPBS-PCR 扩增反应的影响

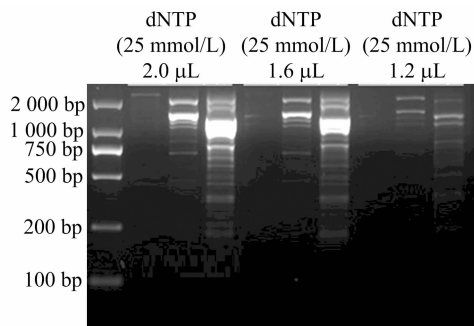
征性也发生变化;本试验中同时使用 3 个品种、4 个模板梯度,电泳结果显示引物用量增加对杨梅 iPBS - PCR 的影响是一致的(图 4)。因此,综合分析电泳结果,确定后续试验中引物用量为 1 μ L。

2.2.4 dNTP 用量对 iPBS - PCR 的影响 dNTP 用量与 PCR

反应的扩增效率关系密切。当 dNTP 用量为 1.2 μ L 时,扩增效率低、谱带亮度不足;随着 dNTP 用量增加,条带逐渐变亮,但是过多的 dNTP(2.0 μ L)会使谱带中的主带亮度大大增加,从而影响其它条带的判读(图 5)。因此,后续试验中 dNTP 用量确定为 1.6 μ L。



从左至右每个品种模板 DNA 用量依次为10、20、30、40 ng。
图4 引物用量对杨梅(晚稻、狗色头、浪荡子) iPBS-PCR 扩增反应的影响



每个 dNTP 浓度下从左至右品种为浪荡子、狗色头、晚稻。
图5 dNTP 用量对杨梅(浪荡子、狗色头、晚稻) iPBS-PCR 扩增反应的影响

2.2.5 杨梅 iPBS - PCR 最优化体系 通过一系列的单因素测试,综合分析电泳结果,建立 20 μ L 杨梅 iPBS - PCR 扩增体系(表 1)。

表1 杨梅 iPBS - PCR 优化体系

成分	加入量(μ L)
10 \times Taq buffer	2.0
25 mmol/L Mg^{2+}	1.6
2.5 mmol/L dNTP	1.6
10 μ mol/L 引物	1.0
5 U/ μ L Taq 酶	0.2
10 ng/ μ L 模板 DNA	1.0
灭菌 ddH ₂ O	12.6

2.3 退火温度对扩增反应的影响及杨梅 iPBS - PCR 优化体系验证

2.3.1 退火温度对 iPBS 扩增反应的影响 PCR 程序中的退火温度直接决定了引物扩增的效果,对产物的特异性有重要的影响。在分子标记中,退火温度可以直接影响谱带特征。报道的引物 2249 理论退火温度为 51 $^{\circ}$ C,合成报告 T_m 值为 53 $^{\circ}$ C,为检测不同退火温度对扩增反应的影响,以浪荡子为材料,在“2.2.5”节优化体系的基础上设置 49 ~ 59 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/梯度)共 6 个退火温度进行扩增反应;电泳结果显示随着退火温度的升高,得到的谱带逐渐减少,谱带特征发生很大变化(图 6);比较发现以 T_m 值(53 $^{\circ}$ C)为退火温度得到的谱带数目较多且比较清晰,因此在选择不同引物退火温度时推荐使用 T_m 值作为参考进行上下调节。

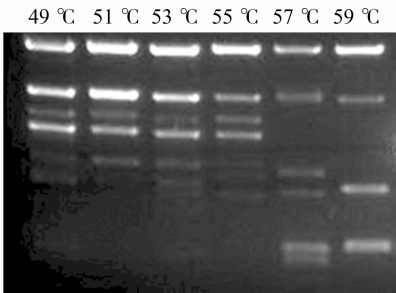


图6 退火温度对杨梅(浪荡子) iPBS-PCR 扩增反应的影响

2.3.2 优化体系下的扩增效果 从杨梅资源圃中随机挑选 10 个品种提取 DNA,并在已报道的 iPBS 引物中随机选择 4 条引物,以优化后的反应体系为基础、引物 T_m 值作为退火温度,进行 iPBS-PCR 扩增反应,验证优化体系和退火温度设

置的有效性。结果(图 7)显示,4 条引物均扩增出清晰的谱带且多态性明显,说明上述优化体系的确适用于杨梅 iPBS 分子标记。

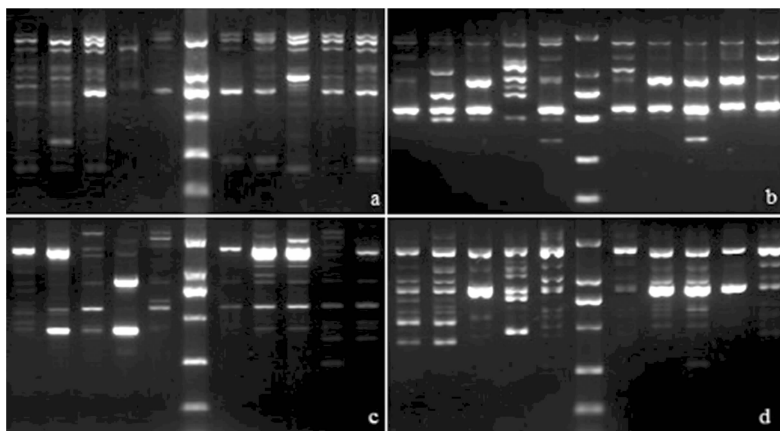


图7 优化体系下 10 个杨梅品种 4 条引物的 iPBS-PCR 扩增反应

3 结论与讨论

高等植物中过半的重复 DNA 由反转录转座子组成,它们散布于各染色体上,是动态的基因组组件,有能力整合新的拷贝,促进内部染色体重组^[13]。用其开发分子标记,信息量高,多态性好,但是 iPBS 分子标记也是基于 PCR 反应的分子标记,虽然多态性非常丰富,但是与其他分子标记一样受到多种因素的影响。试验的稳定性和可靠性与 PCR 反应体系和条件关系很大,因此在使用前需要对反应体系进行优化。PCR 体系中的各个组分不仅在绝对用量方面决定反应的扩增效果,各个组分之间的比例也会对反应造成影响。除此以外,扩增程序尤其是退火温度对 iPBS 分子标记的谱带特征影响非常大,本试验的测试结果同样支持此观点。综合本试验的扩增结果,可以看出杨梅 iPBS-PCR 反应体系中的各个组分在一定的用量范围内均可以得到较好的扩增效果,因此在实际试验过程中应该根据引物和模板的实际情况进行调整,最终得到最佳效果的分子标记谱带信息。本研究利用单因素法获得了适用于杨梅 iPBS 标记检测的 PCR 体系,即在 20 μ L 反应体系中:2 μ L 10 \times Taq buffer,1.6 μ L 25 mmol/L Mg^{2+} ,1.6 μ L 2.5 mmol/L dNTP,1 μ L 10 μ mol/L 引物,0.2 μ L 5 U/ μ L Taq 酶,30 ng 模板 DNA,灭菌 ddH₂O 补足 20 μ L。该反应体系重复性好,多态性高,有利于谱带的判读。本试验结果将为利用 iPBS-PCR 技术进行杨梅种质遗传多样性评价及鉴定提供技术支持,也将为应用于其他植物的研究提供借鉴。

参考文献:

- [1] 郑锡良,张振兰,梁森苗,等. 杨梅品种果实性状图谱分析[J]. 浙江农业科学,2015(3):388-390.
- [2] 钱皆兵,陈子敏,陈俊伟,等. 优质大果杨梅新品系乌紫杨梅的生物学特性及其 RAPD 鉴定[J]. 果树学报,2007,24(1):64-67.
- [3] Zhang S M, Gao Z S, Xu C J, et al. Genetic diversity of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) accessions revealed by amplified fragment length polymorphism[J]. HortScience, 2009, 44(2):487-491.
- [4] 林旗华,钟秋珍,张泽煌. 18 份杨梅种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 热带作物学报,2013,34(9):1667-1671.
- [5] 赖恭梯,刘炜姘,张梓浩,等. 戴云山野生杨梅自然群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报,2013,34(10):1863-1870.
- [6] Zhang S M, Xu C J, Gao Z S, et al. Development and characterization of microsatellite markers for Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc.) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(5):1605-1607.
- [7] Chen F Y, Liu J H. Germplasm genetic diversity of *Myrica rubra* in Zhejiang Province studied using inter-primer binding site and start codon-targeted polymorphism markers[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 170:169-175.
- [8] 倪海枝,陈方永,王引,等. 杨梅分子生物学研究现状[J]. 中国南方果树,2015(1):112-119.
- [9] Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, et al. iPBS: a Universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(8):1419-1430.
- [10] Smýkal P, Bačová - Kerteszová N, Kalendar R, et al. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(7):1385-1397.
- [11] 张潇玉,郭大龙,郭明晓,等. 葡萄 iPBS-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报,2014(3):508-513.
- [12] 林旗华,卢新坤,张泽煌. 杨梅 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中国农学通报,2012,28(1):294-297.
- [13] 汪尚,索娜娜,赵红燕,等. 反转录转座子分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 杭州师范大学学报:自然科学版,2012,11(5):410-415,442.