

王 辉,王 爽,姜 童,等. 干制辣椒 InDel - PCR 反应体系的构建及应用[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):28-30.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.007

# 干制辣椒 InDel - PCR 反应体系的构建及应用

王 辉,王 爽,姜 童,杨延杰,林 多

(青岛农业大学园艺学院/青岛市遗传改良与育种重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:**以干制辣椒叶片为试验材料,筛选适用于 InDel - PCR(insertion - deletion - PCR)的 DNA 提取方法。采用单因素试验设计,对干制辣椒 InDel - PCR 反应体系进行优化,以及建立干制辣椒 InDel 的最佳反应体系和扩增程序,利用构建的 InDel - PCR 反应体系对 InDel 引物进行筛选。结果表明:植物基因组试剂盒较改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取的 DNA 质量高、杂质少,更适合 InDel - PCR 的应用;适用于干制辣椒的 InDel - PCR 反应体系总体积为 15  $\mu\text{L}$ ,其中模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 1.0  $\mu\text{L}$ ,2  $\times$  Go Taq R Colorless Master Mix 7.5  $\mu\text{L}$ ,其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,30 次循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。在上述 PCR 条件下从 60 对 InDel 引物中筛选出 25 对多态性好、稳定性高的引物。

**关键词:**干制辣椒;InDel - PCR;InDel 引物

**中图分类号:**S641.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)10-0028-03

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*),是一年生或多年生草本植物<sup>[1]</sup>。干制辣椒作为辣椒的重要种类之一,是辣椒产业化生产的主要原料,在辣椒产业中占据重要的位置<sup>[2]</sup>。我国是仅次于印度的世界干制辣椒第二大出口国,干制辣椒作为我国的传统出口创汇品种,适种区域广,经济效益高,加工增值潜力大<sup>[3]</sup>,产业链长,尤其是西北、西南、华北重要的特色经济作物,全国有 20 多个地区将干制辣椒作为当地的主要产业。

InDel(insertion - deletion)是针对基因组中插入缺失位点而设计的 PCR 标记,广泛分布于基因组中<sup>[4-5]</sup>。InDel 标记具有带型简单、密度高、变异稳定、多态性强、检测容易的特点。应用 InDel 标记技术,可在材料间亲缘关系分析、关键基因资源拓宽、遗传群体评价等方面进行高效研究,进而为快速高效选育优良杂交组合奠定基础。目前,在水稻<sup>[6]</sup>、玉米<sup>[7]</sup>、番茄<sup>[8]</sup>、黄瓜<sup>[9]</sup>等作物的种质资源遗传多样性和亲缘关系等研究领域已有关于 InDel 标记技术的研究,但对于干制辣椒 InDel 标记的研究尚未见报道。

InDel - PCR 反应体系构建是 InDel 标记的研究基础。在进行 InDel - PCR 扩增时,不同模板材料所要求的反应条件不同,扩增结果易受反应条件中诸多因素的影响<sup>[10]</sup>,为保证 InDel 标记的准确性和重复性,建立和优化 InDel - PCR 反应体系十分必要。本试验以干制辣椒为材料,筛选适用于 InDel - PCR 的 DNA 提取方法,对 PCR 反应条件中模板 DNA 浓度、引物浓度和循环次数进行优化,以建立干制辣椒 InDel - PCR 反应的最佳体系,并进一步进行 InDel 引物筛选。

收稿日期:2016-12-05

基金项目:山东省农业良种工程(编号:2016LZGC011);青岛农业大学高层次人才科研基金(编号:6631115041)。

作者简介:王 辉(1981—),男,山东菏泽人,博士,讲师,主要研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail:fromstick@163.com。

通信作者:林 多,博士,教授,主要研究方向为蔬菜营养生理与品质育种。E-mail:linduo73@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

干制辣椒试验材料由青岛农业大学园艺学院干制辣椒育种课题组提供,随机选取 4 份干制辣椒材料进行干制辣椒基因组 DNA 的提取;选用簇生朝天椒三樱椒进行 InDel - PCR 反应体系的构建;随机选取其他 8 份干制辣椒材料进行干制辣椒 InDel 引物的筛选。

引物设计参照 Li 等开发的辣椒 InDel 引物<sup>[11]</sup>,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 干制辣椒基因组 DNA 提取** 采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和植物基因组 DNA 提取试剂盒法 2 种方法,分别提取干制辣椒材料 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳、InDel - PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳对提取的 DNA 进行检测。

改良 CTAB 法参考 Li 等的方法<sup>[11]</sup>,并对取样和研磨过程进行一定的改良,具体步骤如下:(1)取样,在新鲜叶片上取直径 2 cm 的小片,加入 2 mL 离心管中;(2)研磨,向离心管中加入液氮,用玻璃棒充分研磨至粉末状。

植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,按说明书步骤提取干制辣椒植物基因组 DNA。

**1.2.2 InDel - PCR 反应程序的建立** 设定 PCR 基本扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

PCR 反应体系循环数设置 25、30、35、40 次 4 个梯度,其余条件不变。

**1.2.3 InDel - PCR 扩增反应体系的优化** 选用 InDel 标记 CIDH28 为扩增引物进行扩增,设定 PCR 基本反应体系:总体积 15  $\mu\text{L}$ ,含模板 DNA 3  $\mu\text{L}$ ,2  $\times$  Go Taq R Colorless Master Mix 7.5  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 1.0  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 15  $\mu\text{L}$ 。模板 DNA 设置 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0  $\mu\text{L}$  5 个梯度,正反向引物设

置 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50  $\mu\text{L}$  5 个梯度,在保持其他因素一致的情况下,变化单一因子,每次都得上一个筛选到的某个因素的最佳值作为固定值使用到下一个因素筛选中,筛选最优参数。取 2  $\mu\text{L}$  PCR 产物,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

**1.2.4 InDel 引物的筛选** 利用构建的 InDel-PCR 扩增程序和体系对 8 份样品进行 PCR 扩增,参照 Li 等开发的辣椒 InDel 引物<sup>[11]</sup>对随机挑选的 60 对覆盖 12 条染色体的 InDel 标记进行多态性筛选。用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测分析,筛选条带清晰、多态性高、重复性好的引物。

## 2 结果与分析

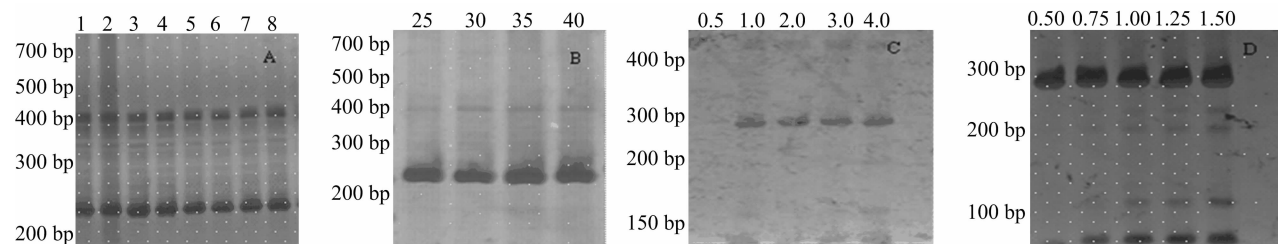
### 2.1 DNA 提取检测

由图 1 的 2 种方法提取的干制辣椒基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果可见,2 种方法提取的 DNA 条带均清晰整齐,完整无杂带,其中改良 CTAB 法提取的 DNA 亮度明显高于试剂盒法,说明改良 CTAB 法提取的 DNA 浓度高于试剂盒法;试剂盒法提取的 DNA 只有少量点样孔有杂质,改良 CTAB 法提取的 DNA 点样孔内普遍存在杂质,且有拖尾现象,说明试剂盒法提取的 DNA 纯度高于改良 CTAB 法。

由图 2-A 可以看出,以 2 种方法提取的 DNA 样品为模板进行 InDel-PCR 扩增,产物条带清晰,说明 2 种方法提取的 DNA 均可满足干制辣椒 InDel-PCR 扩增需要。

### 2.2 干制辣椒 InDel-PCR 反应体系的构建与优化

设计 25、30、35、40 次 4 个循环数梯度,由图 2-B 可知,



A—单数泳道为试剂盒法提取的 DNA, 双数泳道为改良 CTAB 法提取的 DNA; B—25、30、35、40 分别表示循环数(次); C—0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 分别表示模板量( $\mu\text{L}$ ); D—0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 分别表示引物用量( $\mu\text{L}$ )

图2 不同 DNA 提取方法(A)、不同循环次数(B)、不同模板量(C)及不同引物量(D)的聚丙烯酰胺电泳结果

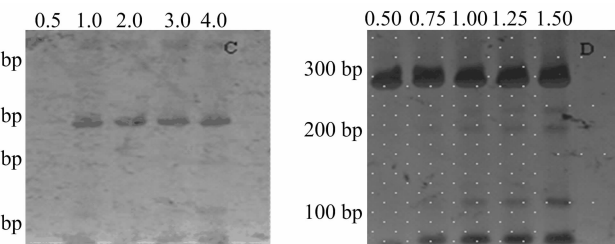
### 2.3 干制辣椒 InDel-PCR 反应体系的验证和引物筛选

选用引物 CIDH293、CIDH267 对构建的 InDel-PCR 反应体系进行验证,由图 3 可以看出,所有材料均能扩增出清晰的条带且多态性好、稳定性高,说明构建的 InDel-PCR 反应体系适用于干制辣椒 InDel 分析。对 60 对 InDel 引物进行 PCR 扩增,并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。试验结果表明,其中

25 次循环扩增结果出现条带缺失,不能满足 InDel 分子标记的需要;30、35、40 次循环扩增结果均条带清晰,且不同循环数间无明显差异,表明在 30 次循环时已达到饱和状态。为节省试验时间,减少非特异性扩增的影响,应选择 30 次循环。

适宜的模板量是保证特异性扩增和扩增产物足量的前提。由图 2-C 可知,当 DNA 用量为 0.5  $\mu\text{L}$  时,无扩增条带,当 DNA 用量为 1.0~4.0  $\mu\text{L}$  时,电泳带型无明显差异,均可满足试验需要。结合节约试验材料和保证扩增效果两方面考虑,本试验选择模板 DNA 量为 2.0  $\mu\text{L}$ ,经计算,其浓度约为 30 ng/ $\mu\text{L}$ 。

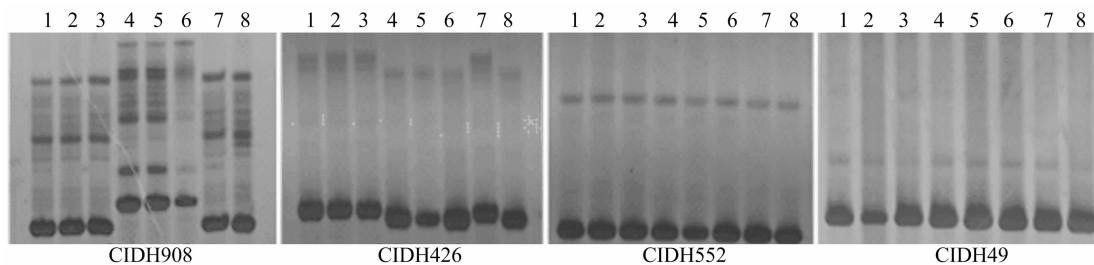
引物量对扩增效果的影响如图 2-D 所示,引物用量在 0.50、0.75  $\mu\text{L}$  时,扩增不完全,谱带数量少;当引物用量增至 1.00~1.50  $\mu\text{L}$  时,谱带清晰稳定,且条带之间无明显差异。为节约试验成本,引物量选择 1.00  $\mu\text{L}$  即可满足试验需要,其浓度约为 0.67  $\mu\text{mol/L}$ 。



A. 引物 InDelCIDH293

B. 引物 CIDH267

图3 引物 InDelCIDH293 和引物 CIDH267 的部分扩增结果



1~8—生物学性状差异较大、亲缘关系较远的 8 份材料

图4 部分 InDel 引物的筛选结果

### 3 讨论

InDel 标记带型简单、密度高、变异稳定、多态性强、检测容易,与其他分子标记相比,在基因组的同一位置出现相同大小的 InDel 标记的概率非常低,从而避免了统计重复的问题<sup>[12]</sup>。利用 InDel 标记进行作物种质资源遗传多样性分析,大大提高了遗传分析的重现性、准确性和分辨率,可解决育种过程中存在的引种中品种名称混乱、种质资源整理困难、育种材料间遗传重复度高、新品种突破困难等问题。

提取高纯度的模板 DNA 是进行 InDel-PCR 的前提,最经典的 DNA 提取方法是 CTAB 法,CTAB 法具有得率高、稳定性好、费用低等优点,但其操作步骤繁琐、耗时,所用药品中的异丙醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等对人体毒性很大。相较之下,植物基因组 DNA 提取试剂盒成本较高,但操作简单、纯度高、毒害少,因此应用越来越广泛<sup>[13-14]</sup>。

试验结果表明,2 种提取方法提取的 DNA 均可满足 InDel-PCR 的需要,利用植物基因组试剂盒法所提取 DNA 较改良 CTAB 法质量高、杂质少,但 DNA 得率略低,因此在模板 DNA 需求量小时优先使用植物基因组试剂盒提取 DNA,需求量较大时,可以采用改良 CTAB 法。此外,在干制辣椒 DNA 提取过程中,研磨技术会对 DNA 的提取造成很大影响,因此在研磨过程中,动作必须迅速,防止材料褐化;同时在水浴提取过程中应多次轻轻振荡离心管,使其充分混匀,以提取充分。

InDel-PCR 扩增受到多因素影响与多个因子的综合作用。模板 DNA 浓度过低,会造成没有扩增产物或条带不完全;模板 DNA 浓度过高,会增加反应体系中抑制反应的成分,出现非特异性扩增<sup>[15]</sup>。引物浓度对 PCR 的带型产生显著影响,浓度过低时扩增不完全,浓度过高时会导致引物二聚体的形成。循环次数是 InDel-PCR 扩增程序的关键因素,循环次数决定扩增产量,循环次数过少,扩增产物不足以满足电泳需要,次数过多,消耗反应物后,产物不会继续增加,反而会出现非特异性扩增,因此在有效范围内,应选择较少的循环次数<sup>[16-17]</sup>。

本试验通过单因素试验设计建立了干制辣椒 InDel-PCR 的最佳反应体系,通过验证,确认了其可行性,并进一步筛选出 25 对 InDel 引物。反应体系如下:总体积 15  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , $2 \times \text{Go Taq R Colorless Master Mix}$  7.5  $\mu\text{L}$ ,其余用  $\text{ddH}_2\text{O}$  补齐。扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,退火 30 s(温度根据引物报告单  $T_m$  确定),72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

### 参考文献:

- [1] 吴征镒,匡可任. 中国植物志 第 67(1)卷[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [2] 黄任中,黄启中,吕中华,等. 我国干制辣椒产业现状及发展对策[J]. 中国蔬菜,2015,2(2):9-11.
- [3] 段韞丹,司智霞. 2013 年我国蔬菜种子进口情况分析[J]. 中国蔬菜,2015,2(2):6-9.
- [4] Feltus F A, Wan J, Schulze S R, et al. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies indica and japonica genome alignments[J]. Genome Research, 2004, 14(9): 1812-1819.
- [5] 冯芳君,罗利军,李 荧,等. 水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较[J]. 分子植物育种,2005,3(5):725-730.
- [6] 姚国新,黄文超. 利用水稻籼粳分化 InDel 标记鉴定育种材料的籼粳属性[J]. 杂交水稻,2013,28(3):53-57.
- [7] 葛 敏,蒋 璐,张晓林,等. 利用 Insertion/Deletion(InDel)分子标记检测玉米杂交种混杂的原理及应用[J]. 分子植物育种,2013,11(1):37-47.
- [8] 申 璐,沈火林,柴 敏,等. 采用 InDel 和 SSR 标记分析番茄品种基因组 DNA 多态性[J]. 中国农业大学学报,2011,16(2):34-42.
- [9] 李斯更,沈 镒,刘 博,等. 基于黄瓜基因组重测序的 InDel 标记开发及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):278-283.
- [10] 梁 爽,原玉香,张晓伟,等. 大白菜 InDel-PCR 反应体系的优化[J]. 河南农业科学,2012,41(9):110-113.
- [11] Li W P, Cheng J, Wu Z, et al. An InDel-based linkage map of hot pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Mol Breeding, 2015, 35(1):32.
- [12] 高 颖,罗双霞,王彦华,等. 大白菜抽薹开花时间与 SSR 和 InDel 标记的关联分析[J]. 园艺学报,2012,39(6):1081-1089.
- [13] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 柿属植物基因组 DNA 提取方法比较[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(4):170-173.
- [14] 王 茜,廖惠红,黄宏明,等. 柑橘黄龙病病原 DNA 提取方法比较[J]. 南方农业学报,2013,44(2):225-229.
- [15] 郑道君,谢良商,曾建华,等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2011,19(2):177-183.
- [16] 王东娜,牟长城,冯富娟. 胡桃楸 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 实验室研究与探索,2010,29(11):18-22,37.
- [17] 李房英,黄彦晶,吴少华. 三角梅 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 海峡科学,2010(10):216-219.