

大豆 SCoT 分子标记技术体系的优化、验证及检测

李 强^{1,2}, 苏二虎², 高聚林^{1*}, 孙继颖¹, 于晓芳¹, 谢 岷¹

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特, 010019; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特, 010031)

摘要: 采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验和单因素试验 2 种方法对影响大豆 SCoT-PCR 反应的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、引物浓度和模板 DNA 用量等因素进行优化, 优化后的 20 μ L 大豆 SCoT-PCR 体系为: Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹、Taq 聚合酶用量 1.5 U、引物浓度 0.250 μ mol $\cdot$ L⁻¹、dNTPs 浓度 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹、DNA 模板用量 30 ng; 退火温度最适为 50.4 $^{\circ}$ C。运用 18 个大豆品种验证, 该反应体系稳定、可靠, 并从 82 条引物中筛选出条带清晰、多态性较好的 32 条引物。利用大豆品种吉育 75、本地黑豆及其 10 株 F_2 对该反应体系进行了初步的遗传验证, 结果显示, 杂交后代植株中出现了双亲的位点和亲本位点的缺失。该反应体系的建立为大豆种质遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建及分子标记辅助育种提供了新的技术手段。

关键词: 大豆; SCoT; 正交设计; 单因素试验; 体系验证; 引物筛选

中图分类号: S565.103 文献标识码: A 文章编号: 1007-9084(2013)05-0491-08

Optimization, verification and detection of SCoT molecular marker system in soybean

LI Qiang^{1,2}, SU Er-hu², GAO Ju-lin^{1*}, SUN Ji-ying¹, YU Xiao-fang¹, XIE Min¹

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: Start codon targeted polymorphism (SCoT) is a novel gene targeted marker technique. $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment and single factor experiment design were applied to optimize SCoT-PCR system of soybean in five factors as Mg^{2+} , dNTPs, primer, Taq DNA polymerase and template DNA. The results showed that the optimized system was as follows: a total volume of 20 μ L including 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ Mg^{2+} , 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 0.250 μ mol $\cdot$ L⁻¹ primer, 1.5 U Taq polymerase, 30 ng DNA template. The most suitable annealing temperature of primers was 50.4 $^{\circ}$ C. The optimized SCoT-PCR system was tested on eighteen soybeans, and the result was stable and reliable. From the 82 primer combinations tested, 32 were selected with clear band patterns and abundant polymorphism. Amplifications and genetic verification were carried out on Jiyu 75, local black soybean and progenies from Jiyu 75 $\times$ local black soybean. The results showed polymorphism bands and common bands from parents and progeny. The system provided a new technology for evaluation of genetic diversity, construction of genetic linkage map and molecular marker assisted breeding for the soybean.

Key words: Soybean; SCoT; Orthogonal design; Single factor experiment; System verification; Primers screening

大豆不仅是世界上最重要的油料作物, 而且也是人类最主要的植物蛋白来源^[1]。大豆起源于我国, 其栽培历史悠久, 经过长期自然演化、人工驯化栽培, 产生了丰富的遗传种质资源。目前世界上已

经应用多种分子标记技术对大豆种质资源进行了研究与利用, 已有研究先后应用 RAPD^[2]、AFLP^[3]、SSR^[4]、ISSR^[5]、SRAP^[6] 等分子标记技术对部分大豆品种间亲缘关系、遗传多样性及杂交后代鉴定等

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目(20111017); 内蒙古农牧业科学院青年创新基金项目(2011QNJJN07)

作者简介: 李 强(1982-)男, 内蒙古巴彦淖尔人, 助理研究员, 在职博士研究生, 主要从事大豆育种栽培研究, E-mail: hamerliqiang@163.com

* 通讯作者: 高聚林(1964-), 男, 内蒙古鄂尔多斯市人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物生理生态及决策系统研究, E-mail: nmgaojulin@

多方面进行了研究。但它们都是传统意义上的随机 DNA 分子标记,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^[7]。随着功能基因组学和大规模测序的深入发展,目的基因分子标记备受研究者关注,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^[8],从而加速育种进程。因此,建立一套简单、有效和实用的目的基因分子标记技术对大豆遗传多样性、亲缘关系及分子标记辅助育种具有重要意义。

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)标记是 Collard 等 2009 年从水稻上提出的一种基于 SPAR(单引物扩增反应)的新型目的基因分子标记,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,设计单引物对基因组进行扩增,产生偏向候选功能基因区显性多态性标记^[9]。SCoT 标记结合了 RAPD 标记和 ISSR 标记的优点,操作简单、成本低廉、多态性高、引物具有通用性,可获得丰富的遗传信息,并能有效地产生与性状关联的分子标记,有利于辅助育种;SCoT 标记不仅可以作为 RAPD 和 ISSR 的有效补充,而且是一种能跟踪性状的新的分子标记^[10]。但目前 SCoT 标记应用较少,仅在水稻^[9]、芒果^[11]、花生^[12]、葡萄^[13]等作物上应用,尚未见有 SCoT 标记在大豆上应用的研究报道。因此,本试验以大豆为材料,采用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计和单因素试验 2 种方法建立了大豆 SCoT-PCR 反应体系,并对该反应体系进行了验证及引物筛选,为研究大豆的遗传多样性、遗传图谱构建及分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验用大豆地方品种、育成品种及 F_2 后代材料 29 个。正交设计及单因素试验所用大豆品种均为杜纳吉卡;体系稳定性验证所用大豆品种为本地黑豆、铁豆 46、Decabig、小金黄、铁荚四粒黄、庆安黑豆、青豆、黄宝珠、公野 03-7239、嘟噜豆、Weber、Hack、小粒秣食豆、吉育 67、和龙油太、杜纳吉卡、铁荚子、蒙豆 9 号;体系遗传验证所用材料为吉育 75、本地黑豆及其 10 个 F_2 。所有材料于 2012 年 5 月在内蒙古农牧业科学院试验地采集幼嫩真叶,液氮速冻后用冰盒带回实验室,贮存于 -70°C 冰箱备用。

1.1.2 试验试剂 82 个 SCoT 引物,1~36 号引物参照 Collard 等^[9],37~80 号引物参照 Luo 等^[11],81、82 号引物参照熊发前等^[12],所有引物由上海生物工程(大连)有限公司合成。dNTPs、Taq DNA 聚合酶、 $10\times$ Buffer、 Mg^{2+} 等均购自宝生物工程(大连);D2000 marker 购自天根公司,DL3000 marker 购自南京博尔迪生物有限公司;核酸染料购自赛百盛公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板的提取与检测 采用 DNA 提取试剂盒的方法提取总 DNA,试剂盒购自 QIAGEN 公司。所得的 DNA 用紫外分光光度计和 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性。根据检测结果,将 DNA 稀释至 $20\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 扩增程序及产物的检测 PCR 反应在美国 BIO-RAD 公司 MYCycler therm cycler PCR 仪中进行,扩增程序为: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 50s, 50.4°C 退火 1min, 72°C 复性 2min,36 个循环;最后 72°C 延伸 5min。扩增反应结束后,取 $10\mu\text{L}$ 扩增产物,加入 $2\mu\text{L}$ $6\times$ loading buffer,在 1.5% 琼脂糖凝胶(含核酸染料)中电泳,电极缓冲液为 $0.5\times$ TBE,最后在凝胶成像系统观察和记录。

1.2.3 正交设计 选取大豆品种杜纳吉卡 DNA 为模板,SC35 为引物,将模板 DNA 用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq 酶用量等 5 种影响因素设置 5 个不同水平(表 1),采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计对大豆 SCoT-PCR 进行体系优化,2 次重复,各处理总体积 $20\mu\text{L}$,每个处理的 $10\times$ Buffer 用量均为 $2\mu\text{L}$,用 ddH_2O 补足。按照以后将要进行的遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建的要求,参照何正文等^[14]和谢云海等^[15]的直观分析法和电泳条带的打分方法,依据电泳条带的多少、清晰度、灵敏性、特异性及背景颜色进行打分,从而进行下一步的分析。

1.2.4 单因素试验 根据表 1 的各水平分别对各因素进行逐一优化,当某一因素设置不同浓度处理时,其他成分浓度固定: Mg^{2+} 浓度 $2.0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度为 $0.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Taq 酶用量为 1.5U 、引物浓度为 $0.250\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DNA 模板用量 30ng 。

1.2.5 反应体系稳定性验证及多态性 SCoT 引物筛选 采用优化的体系,用 18 个大豆品种检测其稳定性,并对 80 条引物进行多态性筛选,为 SCoT 在今后的遗传多样性研究提供技术支持。

1.2.6 SCoT 分子标记在大豆群体后代中的初步遗传验证 利用吉育 75、本地黑豆及其 10 个 F_2 进行 SCoT 标记的进一步验证。

表 1 大豆 SCoT – PCR 反应体系 L₂₅ (5⁶) 正交试验设计

Table 1 L₂₅ (5⁶) orthogonal experimental design of soybean SCoT – PCR

处理组合 Treatment	模板 DNA 用量 Template DNA/ng	镁离子 Mg ²⁺ /(mmol · L ⁻¹)	脱氧核苷酸 dNTPs/(mmol · L ⁻¹)	引物 Primer/(μmol · L ⁻¹)	Taq 聚合酶 Taq polymerase/U
1	15	1.25	0.1	0.125	0.5
2	15	1.50	0.2	0.250	0.7
3	15	2.00	0.3	0.375	1.0
4	15	2.50	0.4	0.500	1.5
5	15	3.00	0.5	0.625	2.0
6	20	1.25	0.2	0.375	1.5
7	20	1.50	0.3	0.500	2.0
8	20	2.00	0.4	0.625	0.5
9	20	2.50	0.5	0.125	0.7
10	20	3.00	0.1	0.250	1.0
11	30	1.25	0.3	0.625	0.7
12	30	1.50	0.4	0.125	1.0
13	30	2.00	0.5	0.250	1.5
14	30	2.50	0.1	0.375	2.0
15	30	3.00	0.2	0.500	0.5
16	40	1.25	0.4	0.250	2.0
17	40	1.50	0.5	0.375	0.5
18	40	2.00	0.1	0.500	0.7
19	40	2.50	0.2	0.625	1.0
20	40	3.00	0.3	0.125	1.5
21	50	1.25	0.5	0.500	1.0
22	50	1.50	0.1	0.625	1.5
23	50	2.00	0.2	0.125	2.0
24	50	2.50	0.3	0.250	0.5
25	50	3.00	0.4	0.375	0.7

2 结果与分析

2.1 大豆 SCoT 反应体系的正交试验分析

由正交试验电泳结果(图 1)可以看出,25 个处理组合扩增结果差异较大。其中,处理 16、17、21 无

扩增条带,处理 1、9、11、20、23 扩增条带较少,处理 2、6、7、12、13 扩增条带多且清晰。利用正交设计助手专业软件,对正交试验 2 次重复的 25 个处理进行直观分析和方差分析,结果见图 2、表 2。



注:M. DL3000 marker,从左到右依次为正交表 L₂₅ (5⁶) 的 1~25 个处理

Note: M. DL3000 marker,1 to 25 corresponding to treatments of L₂₅ (5⁶) in table 1

图 1 大豆 SCoT – PCR 反应体系正交试验优化结果

Fig.1 Results of soybean SCoT – PCR system optimized with orthogonal design

结果均值大小反映每个因素各个水平间的差异,极差大小反映了该因素对本试验的影响程度。由图 2 中 dNTPs 不同浓度曲线变化可看出,其均值差异较大,影响最显著,其次为 Mg²⁺ 浓度,其它因素影响较小。由表 2 也可得出 dNTPs 浓度、Mg²⁺ 浓度影响达到了显著水平,其它因素影响不显著。当

dNTPs 浓度处于 0.2mmol · L⁻¹时,均值显著高于其他水平,扩增结果也最为清晰;Mg²⁺ 浓度处于 1.5、2.0mmol · L⁻¹时,均值显著高于其它水平;Taq 酶用量为 1.5U 时均值最大,扩增结果也清晰、稳定。根据模板 DNA 用量各水平均值显示,当其处于 30ng 时,结果均值最大,电泳条带清晰度好;引物浓度均

值变化较小,选择 $0.250\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综合各分析结果确定正交试验的最优体系为: Mg^{2+} 浓度 $2.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度为 $0.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq 酶用量为 1.5U 、引物浓度为 $0.250\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板用量为 30ng 。

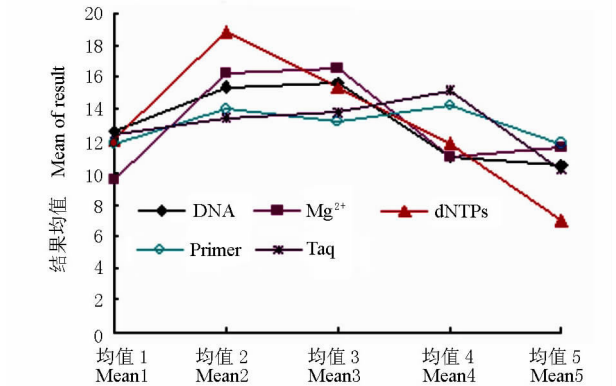


图2 大豆 SCoT-PCR 正交试验设计各因素与结果均值关系
Fig.2 Relationship between factors and result of orthogonal design for soybean SCoT-PCR reaction

表2 大豆 SCoT-PCR 反应体系正交设计方差分析
Table 2 Variance analysis of orthogonal design for soybean SCoT-PCR

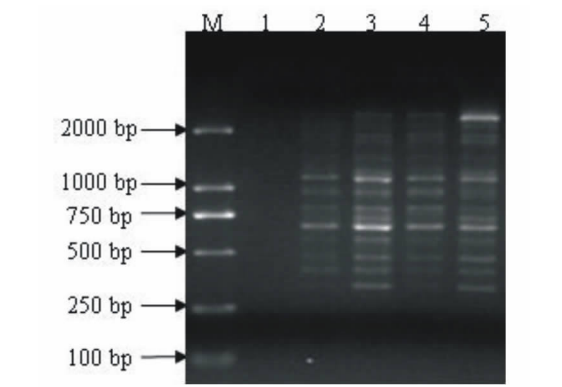
因素 Source	极差 Range	方差 SS	均方 MS	F 值 F
Mg^{2+}	7.00	50.9	12.725	7.60 *
dNTPs	11.80	97.3	24.325	14.52 *
Primer	2.40	17.3	4.325	2.58
Taq	5.00	29.3	7.325	4.37
DNA	5.20	6.7	1.675	
Error		6.7	1.675	
Total		208.2		

注: * 代表 0.05 水平差异显著
Note: * indicated significant difference at 0.05 level

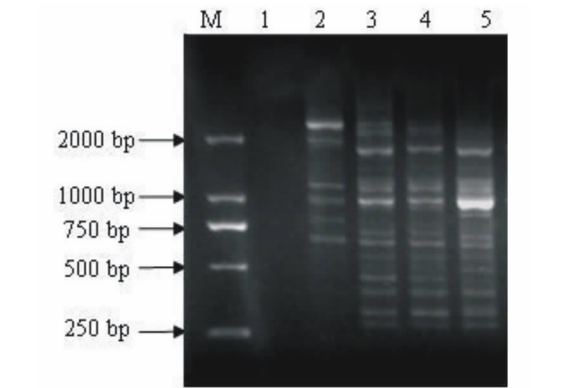
2.2 单因素试验

2.2.1 模板 DNA 用量对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响 由图 3 可看出,在只改变模板 DNA 用量实验中,模板用量为 10ng 时,无扩增条带,模板用量为 $20,40\text{ng}$ 时,扩增条带模糊且有缺带现象,模板用量为 $30,50\text{ng}$ 时条带清晰,差别不大,从节约和扩增效果出发,本试验 $20\mu\text{L}$ 体系中最适宜模板 DNA 用量选择 30ng 。

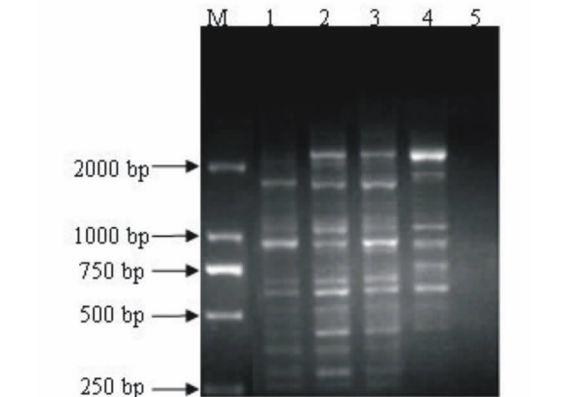
2.2.2 Mg^{2+} 浓度对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响 Mg^{2+} 浓度过低会降低 Taq 酶的活性,使扩增条带减少,过高非特异性条带增多,且条带模糊。由图 4 可以看出, Mg^{2+} 浓度为 $2.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带清晰度、亮度、特异性均好于其他水平。因此,本试验 $20\mu\text{L}$ 体系中 Mg^{2+} 最适浓度为 $2.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



注:M;D 2000 marker; 1~5;DNA 模板为 $10,20,30,40,50\text{ng}$
Note: M;D 2000 DNA marker;1 to 5;DNA templates concentration were $10,20,30,40,50\text{ng}$ respectively
图3 模板 DNA 用量对大豆 SCoT-PCR 反应的影响
Fig.3 Effect of DNA template concentration on soybean SCoT-PCR



注:M;D 2000 marker;1~5; Mg^{2+} 浓度为 $1.25,1.5,2.0,2.5,3.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Note:M;D 2000 DNA marker; 1 to 5; Mg^{2+} concentration were $1.25,1.5,2.0,2.5,3.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively
图4 Mg^{2+} 浓度对大豆 SCoT-PCR 反应的影响
Fig.4 Effect of Mg^{2+} concentration on soybean SCoT-PCR reaction



注:M;D 2000 marker;
1~5;dNTPs 浓度为 $0.1,0.2,0.3,0.4,0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Note:M;D 2000 DNA marker; 1 to 5;dNTPs concentration were $0.1,0.2,0.3,0.4,0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively
图5 dNTPs 浓度对大豆 SCoT-PCR 反应的影响
Fig.5 Effect of dNTPs concentration on soybean SCoT-PCR

2.2.3 dNTPs 浓度对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响 dNTPs 是 PCR 反应的原料,直接影响扩增效果。由图 5 可以看出,在只改变 dNTPs 浓度的实验中,dNTPs 为 0.1mmol · L⁻¹ 时,扩增条带较少;dNTPs 为 0.2 mmol · L⁻¹ 时条带清晰、稳定性好;dNTPs 为 0.3mmol · L⁻¹ 以上时,可以扩增出清晰的条带,但有缺带现象,重复性降低。因此,选择 0.2 mmol · L⁻¹ 为最适 dNTPs 浓度。

2.2.4 引物浓度对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响 由图 6 可看出,在只改变引物浓度的实验中,引物浓度对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响较小,电泳条带清晰,差别不大,考虑扩增条带的特异性、亮度,最适引物浓度选择 0.250μmol · L⁻¹。

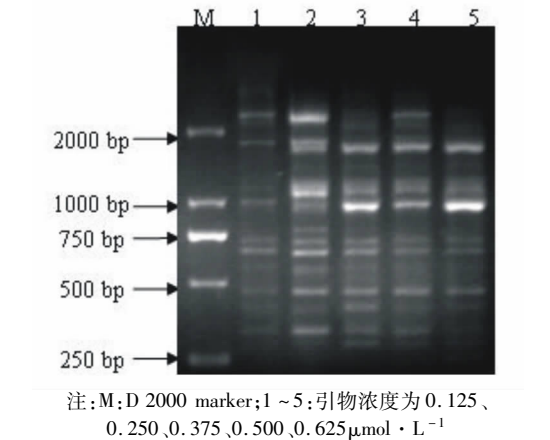


图 6 引物浓度对大豆 SCoT-PCR 反应的影响

Fig. 6 Effect of primer concentration on soybean SCoT-PCR

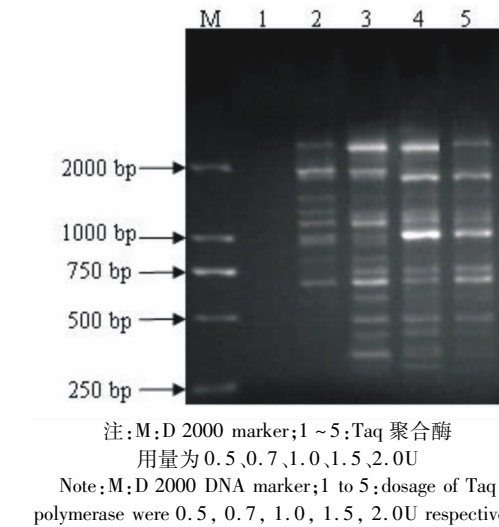


图 7 Taq 聚合酶用量对大豆 SCoT-PCR 反应的影响

2.2.5 Taq 酶用量对大豆 SCoT-PCR 扩增效果的影响 Taq 酶用量过低使得扩增产物较少,过高会

产生非特异条带。在只改变 Taq 酶用量的实验中,由图 7 可看出,Taq 酶用量为 0.5U 时,无扩增结果;当其用量为 0.7U、1.0U、2.0U 时扩增出了较亮的条带,但是多态性、重复性差。Taq 酶用量为 1.5U 时,电泳条带最清晰,多态性、稳定性好。因此,本试验 Taq 酶适宜用量为 1.5U。

2.2.6 退火温度对大豆 SCoT-PCR 扩增结果的影响 退火温度是影响 PCR 反应的重要因素。由图 8 可以看出,本实验中退火温度对 SCoT-PCR 扩增条带有明显的影响。当退火温度为 52.1 ~ 54.0℃ 时,扩增条带逐渐减少,特异性增强;退火温度在 45.0 ~ 50.4℃ 时,均可获得条带,但在 50.4℃ 时扩增出的条带最为清晰、稳定,且特异性好。因此,本试验 20μL 体系中退火温度用 50.4℃ 最适宜。

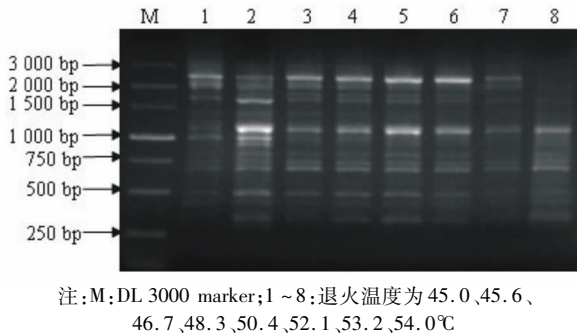


图 8 退火温度对大豆 SCoT-PCR 反应的影响

Fig. 8 Effect of annealing temperature on soybean SCoT-PCR

2.3 SCoT-PCR 反应体系稳定性验证

应用优化的 20μL 大豆 SCoT-PCR 反应体系,以引物 SC35 对 18 个大豆品种进行扩增,由图 9 可见,不同品种扩增条带均清晰稳定,且多态性丰富。不仅体现出大豆种内的遗传稳定性,还体现出品种间的遗传差异,表明该优化体系非常适于大豆 SCoT-PCR 分析。

2.4 SCoT 引物的筛选

运用优化的大豆 SCoT-PCR 反应体系及杜纳吉卡基因组 DNA,对 82 条引物进行多态性筛选,结果显示,71 条引物能扩增出清晰可辨的条带,每个引物扩增条带数 1 ~ 14 条不等,其中有 32 个引物能扩增出清晰且丰富的多态性条带,占有引物的 39.02%,部分引物扩增效果见图 10。

2.5 SCoT 分子标记在大豆杂交后代中的初步遗传验证

应用建立的 SCoT 体系对吉育 75、本地黑豆及其 10 株 F₂ 进行 PCR 扩增和电泳检测。结果显示扩增条带清晰,扩增产物在 250 ~ 3 000bp 之间。并

且在杂交后代植株中出现了双亲的位点和亲本位点的缺失,引物 SC35、SC31 扩增结果见图 11。

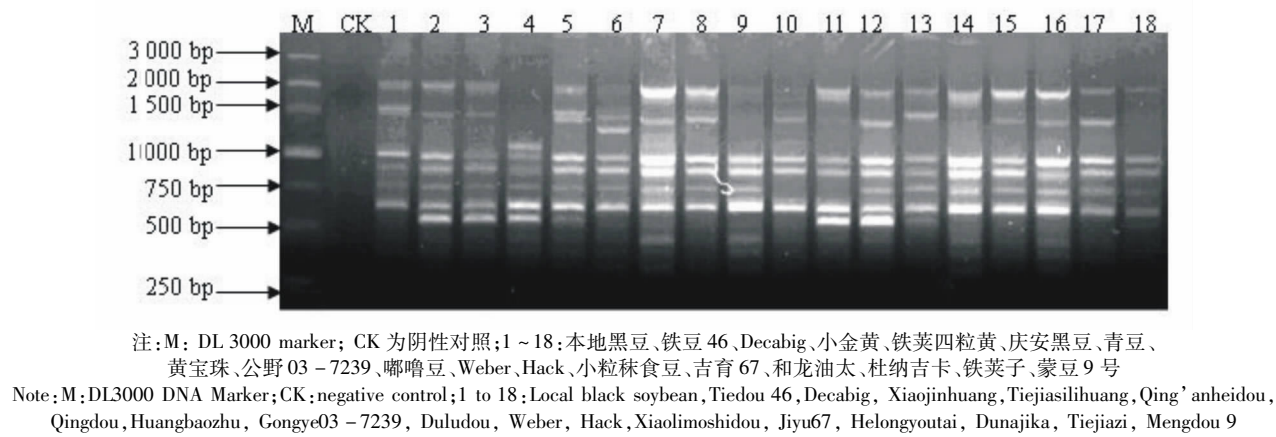


图 9 引物 SC35 对 18 个大豆品种的 SCoT-PCR 扩增

Fig. 9 SCoT-PCR amplification of 18 soybeans varieties by using primer SC35

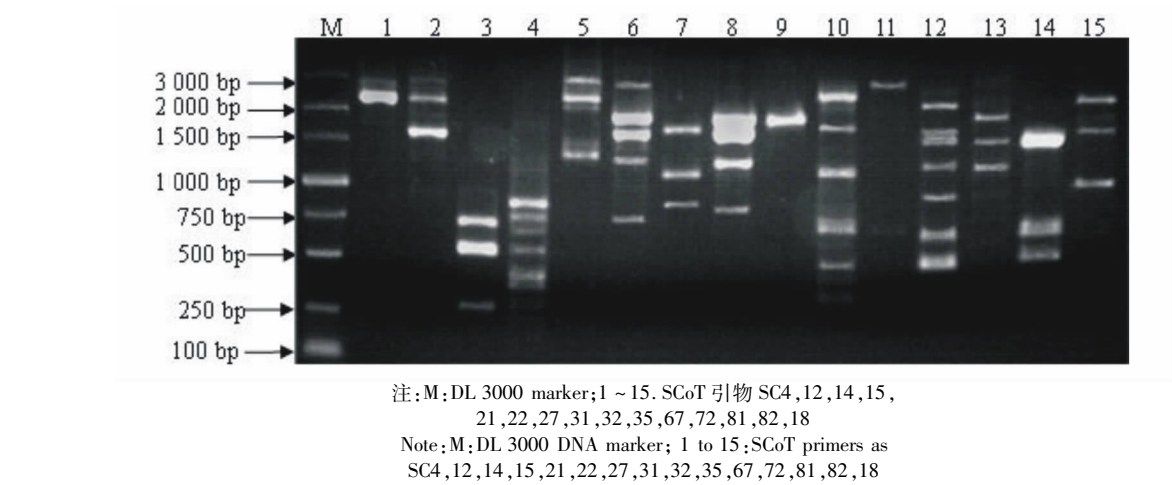


图 10 部分 SCoT 引物筛选结果

Fig. 10 Part of SCoT primer screening results

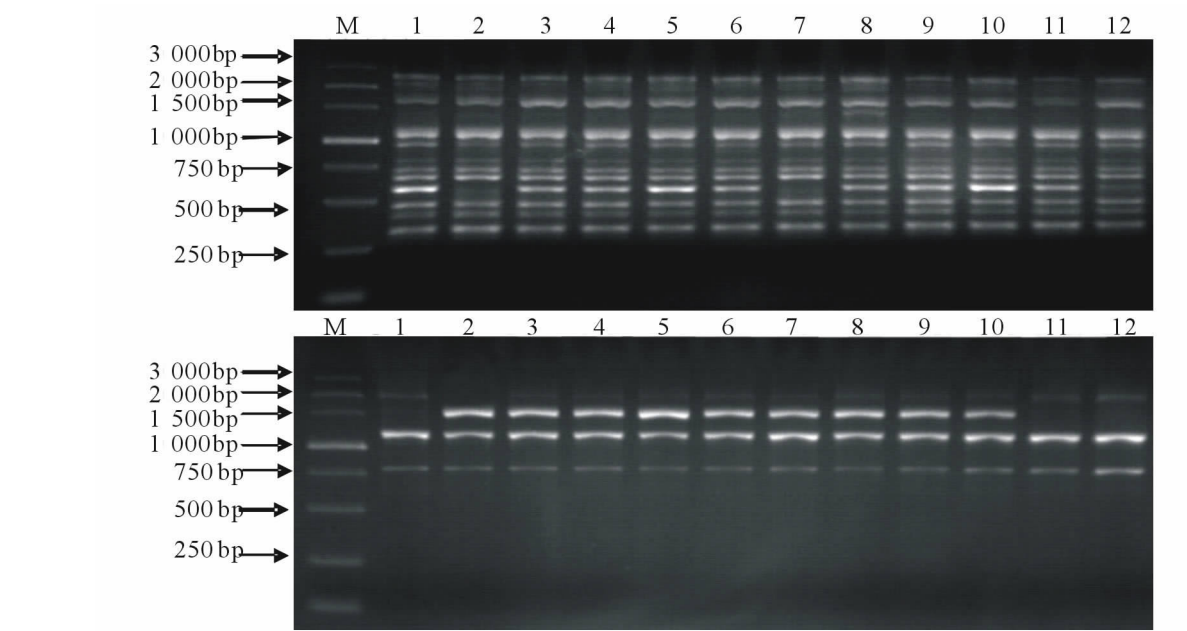


图 11 引物 SC35(上)和 SC31(下)对吉育 75 和本地黑豆及其杂交后代的扩增图谱

Fig. 11 Amplification profiles of F₂ hybrids and their parents by primer SC35(up) and SC31(down)

3 讨论与结论

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、成本低廉、引物具有通用性、多态性高、可获得丰富的遗传信息等诸多优点,能更好地反映物种的遗传多样性和亲缘关系^[16]。PCR 反应体系受诸多因素的影响,Taq 聚合酶用量、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度和引物浓度等各反应成分都会对扩增的敏感性、特异性、产量等产生影响^[17]。因此,采用 SCoT 分子标记时有必要对 SCoT - PCR 体系进行优化。

PCR 反应体系优化的方法很多,一般采用正交试验设计和单因素试验。正交试验设计优化 PCR 体系的方法最早由何正文等^[14]提出的,该方法可以综合考察 PCR 反应体系中各因素及其交互作用,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^[18]。但该方法也有一定的局限性,因在对电泳条带打分过程中,不同的人对条带的清晰度、特异性等的判断标准不同,主观性强,因此结果差异较大。单因素试验能对每个因素逐个优化,操作简单,因素不同水平扩增效果对比鲜明,能从中轻易选出该因素的最佳用量,该方法缺陷在于当变化一个因素固定其余几个因素时,往往需要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^[19]。因此,本试验在大豆 SCoT - PCR 反应体系具体优化时,结合 2 种方法的优点,互为补充、相互印证,以期建立稳定的 PCR 反应体系。

本试验研究结果表明,在一定范围内,dNTPs 浓度对大豆 SCoT 扩增结果影响最大,这与张君玉^[20]、韩国辉^[21]等的结论一致。其次是 Mg^{2+} 浓度,其它因素对 PCR 扩增结果有一定的影响,但都未达到显著水平。dNTPs 浓度过低影响扩增效率,产物较少,浓度过高,错误渗入率会大大增加,也可导致酶活性下降,影响重复性。 Mg^{2+} 浓度过低会降低 Taq 酶的活性,使扩增条带减少,甚至扩增不出条带,过高会引起非特异性扩增,这与侯小改^[22]、秦国新^[23]等的研究结果相一致。本研究中引物浓度对扩增结果影响很小,而模板 DNA 用量、Taq 酶用量对反应体系的影响程度正交试验和单因素试验 2 种方法有一定的差异,正交试验结果显示,这两个因素对扩增结果的影响不显著,而单因素试验中,当它们用量为 10ng 和 0.5U 时都没有扩增产物。其原因可能是正交设计更多的是考虑因素的搭配和相互之间的交互

作用,而单因素试验中,具体因子的作用效果对比更明显,所以 DNA 用量、Taq 酶用量的影响也显现出来。因此,在进行大豆 SCoT - PCR 反应体系优化时,先用正交试验设计摸索 SCoT - PCR 反应体系中的关键影响因子,初步确定每一因素的大概浓度(用量)范围,然后利用单因素试验对各个因子进一步优化,综合分析 2 种方法的试验结果最终确立大豆 SCoT - PCR 最佳的反应体系,这与张君玉等^[20]的结论一致。

本试验得到的 20 μ L 大豆最佳 SCoT - PCR 体系为: Mg^{2+} 浓度 2.0mmol $\cdot$ L⁻¹、Taq 聚合酶用量为 1.5 U、引物浓度为 0.250 μ mol $\cdot$ L⁻¹、dNTPs 浓度为 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹、DNA 模板用量 30ng。利用大豆种质资源及 F₂ 杂交后代初步验证了该体系的稳定性及 SCoT 标记技术的有效性。初步筛选出了 32 个多态性较好的 SCoT 引物,为今后的遗传多样性分析、分子标记辅助选择育种研究打下基础。

参考文献:

- [1] Cho M J, Widholm J M, Vodkin L O. Cassettes for seed - specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean[J]. Plant Mol Biol Rep, 1995, 13 (3): 255 - 269.
- [2] 张志永,盖钧镒. RAPD 在大豆种质资源及遗传连锁研究中的应用[J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 60 - 65.
- [3] 田清霞,盖钧镒,喻德跃. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)研究[J]. 大豆科学, 2000, 19(3): 210 - 217.
- [4] 王 彪,邱丽娟. 大豆 SSR 技术研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 19(1): 44 - 48.
- [5] 何海燕,沙 伟,张艳馥. 大豆 ISSR - PCR 反应体系的优化[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 510 - 513.
- [6] 周春娥,王 芳,周延清,等. 大豆遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 40 - 42.
- [7] 陆才瑞,喻树迅,于霁雯,等. 功能型分子标记(ISAP)的开发及评价[J]. 遗传, 2008, 30(9): 1 207 - 1 216.
- [8] 熊发前,庄伟建,唐荣华,等. 两种新型目标分子标记技术——CDDP 与 PAAP[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(9): 871 - 875.
- [9] 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(1): 86 - 93.
- [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的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635 - 638.
- [11] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity

- and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*,2010,38(6):1 176 – 1 184.
- [12] Xiong F Q, Zhong R C, Zhuang W J, et al. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes[J]. *Mol Biol Rep*,2011,38(5):3 487 – 3 494.
- [13] Guo D L, Zhang J Y, Liu C H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses[J]. *Mol Biol Rep*,2012,39(5):5 307 – 5 313.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用[J]. *作物学报*,2010,36(12):2 055 – 2 061.
- [17] 苏 辉,李志刚,宋书宏. 正交设计优化大豆 SSR – PCR 反应体系及引物筛选[J]. *华北农学报*,2009,24(2):99 – 102.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 韩国辉,向素琼,汪卫星,等. 柑橘 SCoT 分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用[J]. *园艺学报*,2011,38(7):1 243 – 1 250.
- [22] 侯小改,王 娟,贾 甜. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选[J]. *华北农学报*,2011,26(5):92 – 96.
- [23] 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*,2012,29(3):393 – 397.

(责任编辑:王丽芳)