



引用格式:贾梦珠,孙九喆,苏东赢,等. 烤烟品种的多重 PCR 技术标记鉴别[J]. 轻工学报, 2017,32(3):51-57.

中图分类号:TS424 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.3.009

文章编号:2096-1553(2017)03-0051-07

烤烟品种的多重 PCR 技术标记鉴别

Tag identification of flue-cured tobacco varieties by multiplex PCR technique

贾梦珠¹,孙九喆²,苏东赢²,杨金初²,王二彬²,许衡²,
王永超¹,王君婷¹,孟丹丹¹,马林¹

JIA Meng-zhu¹,SUN Jiu-zhe²,SU Dong-ying²,YANG Jin-chu²,WANG Er-bin²,
XU Heng²,WANG Yong-chao¹,WANG Jun-ting¹,MENG Dan-dan¹,MA Lin¹

关键词:

多重 PCR 技术;SCAR
标记;烤烟品种鉴别;
指纹图谱

Key words:

multiplex PCR technique;
SCAR tag; identifica-
tion of flue-cured
tobacco varieties;
fingerprints map

1. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心,河南 郑州 450000

1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

摘要:以 12 份烤烟品种为模板,针对 6 对 SCAR 引物进行引物比例和退火温度的条件优化,采用多重 PCR 技术,建立了 12 份烤烟品种的多重 PCR 指纹图谱和鉴别路线.结果表明,同普通 PCR 相比,多重 PCR 具有高效、快速、节约时间、成本低的优点,6 对 SCAR 引物稳定性好、条带特异性强,能准确区分 12 份烤烟品种.

收稿日期:2016-10-13

基金项目:河南中烟有限责任公司科技项目(ZW2015012)

作者简介:贾梦珠(1991—),女,河南省平顶山市人,郑州轻工业学院硕士研究生,主要研究方向为烟草生物技术.

通信作者:马林(1964—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草工业生物技术和卷烟工艺.

Abstract: With 12 varieties of flue-cured tobacco as a template, the conditions for primer concentration and annealing temperature for 6 pairs of SCAR primers were optimized. Multiplex PCR fingerprints and identification routes of 12 flue-cured tobacco varieties were established by multiplex PCR. The results showed that multiplex PCR had the advantages of high efficiency, high speed, time saving and low cost compared with ordinary PCR. Six pairs of SCAR primers had good stability and specific band specificity, which could distinguish 12 flue-cured tobacco varieties accurately.

0 引言

1988年, J. S. Chamberlain 等^[1]首次提出多重 PCR 技术, 多重 PCR 技术指加入两对或者两对以上的特异性引物, 使模板 DNA 在不同区域扩增多个目的片段或者多个模板 DNA 的反应体系, 具有高效、快速、节约时间、成本低等优点。目前, 多重 PCR 技术已广泛应用于植物病虫害检测和植物分子育种等领域^[2-7], 但应用于烟草方面的报道却很少。2008年, 高玉龙等^[8]采用多重 PCR 技术对烟草转基因进行了检测, 通过在多重 PCR 反应体系中添加增强剂, 验证了多重 PCR 技术在烟草中的稳定性与可使用性。2015年, 马林等^[9]对烤后烟叶多重 PCR 反应体系进行了优化, 结果表明烤后烟叶多重 PCR 扩增的最佳反应体系为: 20 μL 体系中含模板 DNA 45 ng, Mg^{2+} 浓度 2.50 mmol/L, dNTP 浓度 0.40 mmol/L, Taq 酶用量 4.00 U。

马林等^[10]运用烟草 RAPD 方法开发了烟草 SCAR 标记技术, 利用 6 对 SCAR 引物, 成功地建立了 12 个烤烟品种的分子 ID 和鉴别路线。本文拟将已建立的特异性引物相互组合, 利用多重 PCR 技术的优势, 快速鉴别 12 份烤烟品种, 建立烤后烟叶多重 PCR 指纹图谱和鉴别路线。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂: 烤烟烟叶品种 1—12 分别为: 红花大金元, K326, NC102, NC297, 云烟 85, 云烟 87, 云烟 97, 中烟 100, 翠碧-1 号, KRK26, 龙江 911, 南江 3 号, 均由河南中烟工业有限责任公司提供; Taq 酶, dNTP, 10 \times buffer, MgCl_2 , DL2000 DNA ladder marker, 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

引物来源: 6 对 SCAR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物信息见表 1。

表 1 SCAR 引物
Table 1 SCAR primers

SCAR 引物	引物对	序列(5'→3')	碱基数/bp	退火温度/°C	扩增片段长度/bp
SCAR1	S1-1	GTCCACACGGGGCAATTAATG	21	62~64	545
	S1-2	GTCCACACGGCTATGAGATTA	21		
SCAR2	S2-1	CACGGCTGCGAAGAGCTAAG	20	69	733
	S2-2	CACGGCTGCGTGTATGAAC	20		
SCAR3	S3-1	CAATCGCCGTAATAACACAAAAGTA	24	57~59	887
	S3-2	AATCGCCGTCAGGAGAGAGA	20		
SCAR4	S4-1	CCACAGCAGTCTGATATTGGATG	23	57~59	313
	S4-2	CCACAGCAGTAACAGCAGGA	20		
SCAR5	S5-1	AGGCTGTGCTTACTGCTTCTAC	22	68	555
	S5-2	AGGCTGTGCTATTGTAGGATGAGAC	25		
SCAR6	S6-1	TTTGAGAATACGTCTTAACGACCA	24	63	1760
	S6-2	CCACAGCAGTCCCTTCCTAA	20		

1.2 方法

1.2.1 烤后烟叶基因组 DNA 提取 烤后烟叶基因组 DNA 的提取采用文献[11]的方法。

1.2.2 多重 PCR 引物组合的条件优化 引物组合建立在本实验室前期引物组合实验的基础上。引物 3 + 引物 4, 引物 3 + 引物 6, 引物 3 + 引物 5, 这 3 种引物组合前期预实验结果没有理想的扩增条带, 特异性不明显, 没有后续实验优化的必要。根据引物退火温度相差的大小进行分组, 结果见表 2。

表 2 引物组合分组

Table 2 Primer combinations

退火温度	引物组合	引物退火温度
相近	引物 1 + 引物 6	引物 1 为 64 ℃, 引物 6 为 63 ℃
	引物 2 + 引物 5	引物 2 为 69 ℃, 引物 5 为 68 ℃
相差较大	引物 1 + 引物 2	引物 1 为 64 ℃, 引物 2 为 69 ℃
	引物 4 + 引物 6	引物 4 为 58 ℃, 引物 6 为 63 ℃
	引物 4 + 引物 5	引物 4 为 58 ℃, 引物 5 为 68 ℃

对于退火温度相近的引物组合, 只进行引物比例优化; 对于退火温度相差较大的引物组合, 其引物比例和退火温度都要进行条件优化。

多重 PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 6 min; 94 ℃ 变性 50 s; 各自退火温度下退火 20 s; 72 ℃ 延伸, 反应 35 个循环; 72 ℃ 延伸 6 min, 4 ℃ 保温。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 引物组合的条件优化

2.1.1 退火温度相近的引物组合的优化

1) 引物 1 + 引物 6 的条件优化结果如图 1 所示。

由图 1 可知, 引物 1 的扩增条带在 545 bp 左右, 引物 6 的扩增条带在 1760 bp 左右, 与普通 PCR 扩增结果一致。泳道 1—6 的引物比例分别为 1 : 1.5, 1 : 1.8, 1 : 2, 0.8 : 1, 1 : 0, 0 : 1, M 为 DL2000 Marker。1—6 泳道中, 泳道 5 和泳道 6 作为单引物对照。1—2 泳道只出现引

物 1 的扩增条带, 随着反应体系中引物 6 所占比例的增加, 泳道 3—4 出现两条引物扩增条带, 其中泳道 3 的两条特异性扩增条带最清晰, 所以引物 1 与引物 6 的最佳优化比例为 1 : 2。

2) 引物 2 + 引物 5 的条件优化结果如图 2 所示。

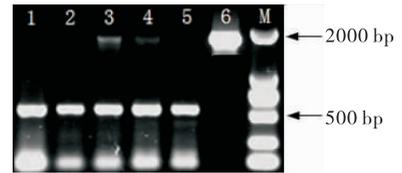


图 1 引物 1 + 引物 6 条件优化实验结果

Fig. 1 Conditional optimization experimental results of primer 1 + primer 6



图 2 引物 2 + 引物 5 条件优化实验结果

Fig. 2 Conditional optimization experimental results of primer 2 + primer 5

由图 2 可知, 引物 2 的扩增条带在 733 bp 左右, 引物 5 的扩增条带在 555 bp 左右, 与普通 PCR 扩增结果一致。泳道 1—6 的引物比例分别为 1 : 0, 0 : 1, 1 : 0.8, 1.5 : 1, 1.8 : 1, 2 : 1, M 为 DL2000 Marker。泳道 1 和泳道 2 作为单引物扩增对照。泳道 3 只出现引物 5 的扩增条带, 随着反应体系中引物 2 所占比例的增加, 泳道 4—6 出现两条引物扩增条带。其中泳道 5 的两条特异性条带最为清晰, 所以引物 2 与引物 5 的最佳优化比例为 1.8 : 1。

2.1.2 退火温度相差较大的引物组合的优化

1) 引物 1 + 引物 2 的条件优化结果

泳道 1—15 如表 3 所示, M 为 DL2000 Marker, 扩增结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 引物 1 的扩增条带在 545 bp 左右, 引物 2 的扩增条带在 733 bp 左右。泳道

1—5 中,1—3 泳道都只出现了引物 1 的扩增条带,应该增大反应体系中引物 2 所占的比例;泳道 4—5 没有扩增条带,表明退火温度太高,不利于引物 1 的条带扩增.泳道 6—10 中,随着引物退火温度的提高,泳道 8 出现两条引物扩增片段,退火温度继续提高,泳道 9 只出现引物 2 的扩增条带,泳道 10 没有扩增条带,表明退火温度和引物比例的提高都有利于引物 2 的条带扩增.泳道 11—15 中,泳道 11—13 都出现了两条引物的扩增条带,其中泳道 13 的两条扩增条带最清晰.所以引物 1 与引物 2 的最佳优化比例为 1 : 1.5,退火温度 66 ℃.

2) 引物 4 + 引物 6 的条件优化结果

泳道 1—18 如表 4 所示, M 为 DL2000 Marker, 扩增结果如图 4 所示.

表 3 引物 1 + 引物 2 实验电泳顺序

Table 3 Conditional optimization electrophoresis sequence of primer 1 + primer 2

引物比例	引物组合退火温度/℃				
	62	64	66	68	70
1.5 : 1	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5
1 : 1	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 9	泳道 10
1 : 1.5	泳道 11	泳道 12	泳道 13	泳道 14	泳道 15

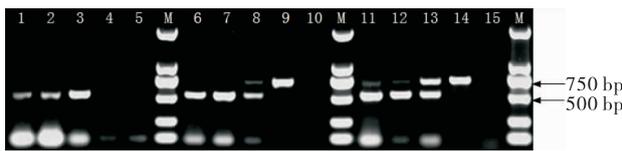


图 3 引物 1 + 引物 2 条件优化实验结果
Fig. 3 Conditional optimization experimental results of primer 1 + primer 2

表 4 引物 4 + 引物 6 实验电泳顺序

Table 4 Electrophoresis sequence of primer 4 + primer 6

引物比例	引物组合退火温度/℃					
	58	59	60	61	62	63
0.8 : 1	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
1 : 1	泳道 7	泳道 8	泳道 9	泳道 10	泳道 11	泳道 12
1 : 1.5	泳道 13	泳道 14	泳道 15	泳道 16	泳道 17	泳道 18

由图 4 可知,引物 4 的扩增条带在 313 bp 左右,引物 6 的扩增条带在 1760 bp 左右.当引物 4 与引物 6 的比例分别为 0.8 : 1, 1 : 1, 1 : 1.5 时,引物 6 始终没有出现条带,由于两个引物之间的扩增片段大小相差太大,一般的引物比例不能满足引物 6 的扩增要求,应加大反应体系中引物 6 所占的比例.随着退火温度的提高,泳道 1、泳道 3、泳道 4 和泳道 15 出现引物二聚体,而当退火温度分别为 59 ℃, 62 ℃ 和 63 ℃ 时,条带扩增清晰,无拖带现象.结果表明:退火温度为 59 ℃, 62 ℃ 或者 63 ℃ 时,均能达到理想的扩增效果.

引物 4 + 引物 6 引物比例实验结果如图 5 所示.

由图 5 可知,选取退火温度为 62 ℃,引物 4 的扩增条带在 313 bp 左右,引物 6 的扩增条带在 1760 bp 左右.泳道 1 为引物比例 0.2 : 3,泳道 2 为引物比例 0.2 : 2, M 为 DL2000 Marker.泳道 1 出现两条特异性扩增条带,且条带最为清晰,故引物 4 与引物 6 的最佳优化比例为 0.2 : 3.

3) 引物 4 + 引物 5 的条件优化结果

泳道 1—12 如表 5 所示, M 为 DL2000 Marker,

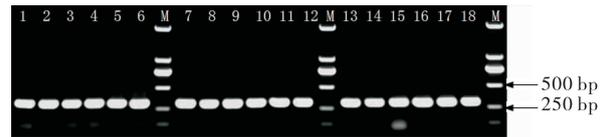


图 4 引物 4 + 引物 6 条件优化实验结果
Fig. 4 Conditional optimization experimental results of primer 4 + primer 6

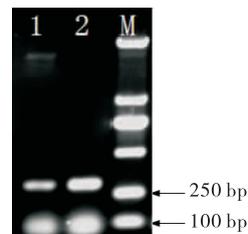


图 5 引物 4 + 引物 6 引物比例实验结果
Fig. 5 Experimental results of primer 4 + primer 6

扩增结果如图 6 所示。

由图 6 可知,引物 4 的扩增条带在 313 bp 左右,引物 5 的扩增条带在 555 bp 左右.泳道 1—4 中,只有 1—2 泳道出现两条引物扩增条带,随着退火温度的提高,只有引物 5 的扩增条带可见.表明引物 4 的最佳退火温度是 62 ~ 64 °C.泳道 5—8 中,只有泳道 5 出现两条引物扩增条带.泳道 9—12 中,只有泳道 9 出现两条引物扩增条带.泳道 1,2,5,9 中,两条条带亮度比较均衡的是泳道 5,故引物 4 与引物 5 的最佳优化比例为 1 : 1,退火温度 62 °C.

2.2 12 份烤烟品种的多重 PCR 指纹图谱

实验采用优化后的多重 PCR 反应体系和引物组合对 12 份烤烟品种进行 PCR 扩增筛选,每对引物组合至少重复扩增 3 次,以保证扩增的稳定性.在上述实验的基础上,选取扩增结果稳定同时能实现快速鉴别 12 份烤烟品种的引物组合,最终选取 3 对引物组合即可实现 12 份烤烟品种鉴别.多重 PCR 扩增图谱见图 7—图 9.图中,1—12 表示 12 份烤烟品种,M 为 DL2000 Marker.经过第一次多重 PCR,可能会出现 4 种情况:只有一条引物的扩增条带,只有

表 5 引物 4 + 引物 5 实验电泳顺序

Table 5 Electrophoresis sequence of primer 4 + primer 5

引物比例	引物组合退火温度/°C			
	62	64	66	68
1.5 : 1	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4
1 : 1	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8
1 : 1.5	泳道 9	泳道 10	泳道 11	泳道 12

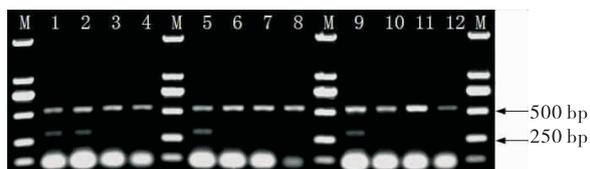


图 6 引物 4 + 引物 5 条件优化实验结果
Fig. 6 Conditional optimization experimental results of primer 4 + primer 5



图 7 引物组合 1(引物 1 + 引物 2)对 12 份烤烟品种的 PCR 扩增

Fig. 7 Primer combination 1 (primer 1 + primer 2) PCR amplification of 12 tobacco varieties



图 8 引物组合 2(引物 4 + 引物 6)对 12 份烤烟品种的 PCR 扩增

Fig. 8 Primer combination 2 (primer 4 + primer 6) PCR amplification of 12 tobacco varieties

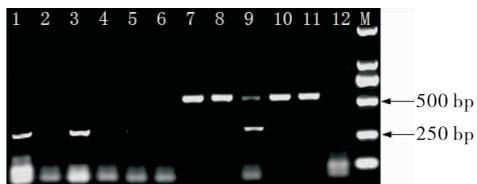


图 9 引物组合 3(引物 4 + 引物 5)对 12 份烤烟品种的 PCR 扩增

Fig. 9 Primer combination 3 (primer 4 + primer 5) PCR amplification of 12 tobacco varieties

另一条引物的扩增条带,同时有两条引物的扩增条带,没有扩增条带.进行第二次多重 PCR,可能出现 4 种同样情况,将每小组依次分开,再进行第三次多重 PCR,最终一一分开,实现 12 份烤烟品种的鉴别.如图 7 所示:泳道 1,2,3,6,7 扩增条带在 733 bp 左右;泳道 4,9,11,12 扩增条带在 545 bp 左右;泳道 5,8,10 在 545 bp 左右和 733 bp 左右均有扩增条带.如图 8 所示:泳道 1,2,8,9 扩增条带在 1760 bp 左右;泳道 4,7 扩增条带在 313 bp 左右;泳道 5,6,10,12 在 313 bp 左右和 1760 bp 左右均有扩增条

带;泳道3,11无扩增条带.如图9所示:泳道1,3扩增条带在313 bp左右;泳道7,8,10,11扩增条带在555 bp左右;泳道9在313 bp左右和555 bp左右均有扩增条带;泳道2,4,5,6,12无扩增条带.与普通PCR扩增结果一致.

2.3 烤烟品种鉴别分析

多重PCR扩增鉴别路线如图10所示,其中+表示有扩增条带;-表示无扩增条带;1—12为不同烤烟品种.

由图10可知,利用3对引物组合对12份烤烟品种进行多重PCR扩增,建立了12份烤烟品种的鉴别路线.经过第一步引物1和引物2的多重PCR扩增,出现3种情况,分别为只有引物1的扩增条带、只有引物2的扩增条带和同时有引物1和引物2的扩增条带.这3种情况再经过第二步引物4和引物6的多重PCR扩增,出现4种情况,分别为只有引物4的扩增条带、只有引物6的扩增条带、同时有引物4和引物6的扩增条带、没有扩增条带.第三步引物4和引物5的多重PCR扩增主要鉴别剩余的4个品种,出现3种情况,分别为只有引物4的扩增条带,只有引物5的扩增条带,没有扩增条带.结果表明,3对引物组合的扩增结果同普通PCR扩增结果保持一致,同时能快速实现对12份烤烟品种的鉴别,使鉴

别时间大大缩短.

3 结论

本文采用多重PCR技术对6对SCAR引物进行引物组合,对引物比例和退火温度进行条件优化,运用优化后的多重PCR技术和引物组合对12份烤烟品种进行多重PCR扩增,主要结论如下.

1)退火温度相近的引物组合中,引物1与引物6、引物2与引物5的最佳优化比例分别为1:2和1.8:1时,分别都有两条特异性条带,与单引物扩增条带完全吻合.

2)退火温度相差较大的引物组合中,引物1与引物2的最佳优化比例为1:1.5、退火温度为66℃;引物4与引物6的最佳优化比例为0.2:3,引物4与引物5的最佳优化比例为1:1,退火温度均为62℃,分别都有两条特异性条带.

3)利用多重PCR优化体系和3对引物组合对12份烤烟品种进行多重PCR扩增,得到12份烤烟品种多重PCR指纹图谱,建立了多重PCR扩增鉴别路线.

同普通PCR相比,本文采用的多重PCR具有高效、快速、节约时间、成本低的优点,6对SCAR引物稳定性好、条带特异性强,使鉴别时间大大缩短.后期可以设计转化更多的引物,扩

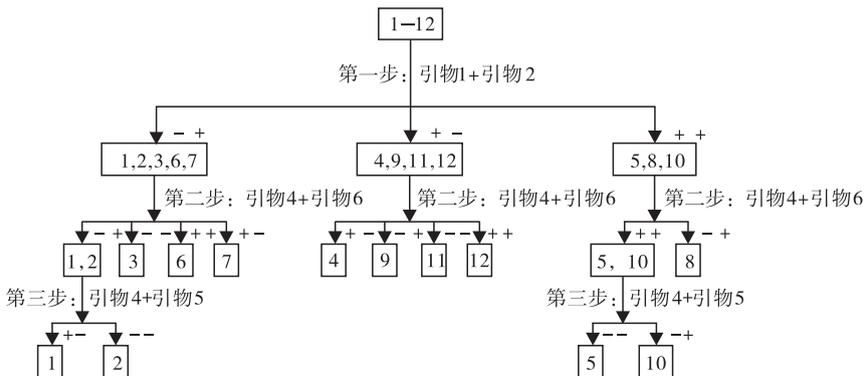


图10 多重PCR扩增鉴别路线

Fig. 10 Multiple PCR amplification identification route

大品种鉴别范围,以建立更多品种的多重 PCR 指纹图谱.

参考文献:

- [1] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RAINER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23):11141.
- [2] 王晓泉,焦新安,刘晓文,等. 江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究[J]. *微生物学报*, 2007(2):221.
- [3] 许瑾,徐涛,朱永芳,等. 多重 PCR 技术在鉴定菜豆中的应用[J]. *检验检疫学刊*, 2010(1):8.
- [4] 陈明洁,方倜,柯涛,等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术[J]. *武汉理工大学学报*, 2005, 27(10):33.
- [5] 赵红庆,苑锡铜,黄留玉,等. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2007(5):863.
- [6] 陈明洁,刘勇,涂知明,等. 多重 PCR 法快速鉴定转基因小麦植株及后代[J]. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(9):105.
- [7] 于力,朱龙英,万延慧,等. 多重 PCR 技术鉴定番茄 Ty-1 和 Mj 基因[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1):165.
- [8] 高玉龙,焦芳婵,徐照丽,等. 多重 PCR 在烟草转基因检测中的应用[J]. *生物技术通报*, 2008(2):140.
- [9] 马林,郭苗,苏东赢,等. 烤后烟叶多重 PCR 反应体系的优化[J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2015, 30(2):30.
- [10] 马林,罗昭标,罗华元,等. 烟草品种的 SCAR 标记鉴别[J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(5):79.
- [11] 马林,王广超,罗昭标,等. 烤后烟叶基因组 DNA 提取条件优化[J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2013, 28(2):59.
- (上接第 36 页)
- [15] 许鸿佳,邱锋. 中医药治疗痤疮研究进展[J]. *光明中医*, 2012, 27(3):606.
- [16] 杨彦洁. 中药治疗寻常性痤疮的文献分析及中医药内外结合治疗痤疮的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [17] 孙亮. 痤疮的中医辨证论治疗分析[J]. *世界最新医学信息文摘(电子版)*, 2016, 16(15):131.
- [18] 王敏. 中医特色疗法外治痤疮[J]. *中医外治杂志*, 2009, 18(1):63.
- [19] 杨岚,李元文,曲剑华. 痤疮辨证分型的文献研究[J]. *北京中医药*, 2015, 34(6):472.
- [20] 赵宏伟,吴志韵,袁琳,等. 祛痘化妆品用中药提取物的抗炎作用研究[J]. *香料香精化妆品*, 2013, 12(6):27.
- [21] 解玉,杜蕊,张雯雯. 中药面膜治疗寻常型痤疮 66 例临床观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(15):1865.
- [22] 张静萍. 中药湿敷联合倒膜治疗痤疮疗效观察[J]. *慢性病学杂志*, 2010, 12(9):1024.
- [23] 陈琴,陈晓雯,贾其军. 陈晓雯治疗痤疮经验[J]. *实用中医药杂志*, 2014, 30(8):755.
- [24] 顾炜,张小卿,吴景东. 从中医病因病机与常用药探讨痤疮的中医治疗特色[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(4):739.
- [25] 刘晶,唐昌敏. 以《内经》“天癸”理论为指导治疗“冲任不调型”痤疮的研究[J]. *湖北中医杂志*, 2015, 37(10):45.
- [26] 刘冬梅,李宏军,高进. 有雌激素活性中草药在皮肤科中的应用[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2005, 4(3):197.
- [27] 李士材. 雷公炮制药性解[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1958.
- [28] 杨彦洁,黄尧洲,郎娜. 疏风清肺汤联合中药膜治疗痤疮肺经风热 32 例临床研究[J]. *中医药导报*, 2014, 20(2):19.