

DOI:10.14188/j.ajsh.2018.04.006

基于珙桐SNP位点的dCAPS标记开发

许瑾¹,高妍¹,杨碧²,宋云¹,李明福¹,陈乃中¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100029; 2. 昆明海关,云南 昆明 650228)

摘要: 本研究收集了珙桐、喜树等19份植物材料,运用分子生物学和生物信息学手段比对分析了 *rpoB*, *rpoC*, *matK* 等8个基因碱基序列上的单核苷酸多态性(SNP)位点,在 *atpF-atpH* 基因上找到了合适的SNP位点并设计了dCAPS引物,经PCR扩增和酶切验证后,将SNP转化为衍生型酶切扩增多态性序列(dCAPS)标记,可促进SNP标记在珙桐的遗传图谱构建、基因定位、种质资源鉴定、遗传多样性研究等领域的应用。

关键词: 单核苷酸多态性(SNP);内切酶;珙桐;衍生型酶切扩增多态性序列(dCAPS)

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2018)04-0334-05

Exploration of SNP and relative dCAPS markers in *Davidia involucrata*

XU Jin¹, GAO Yan¹, YANG Bi², SONG Yun¹, LI Mingfu¹, CHEN Naizhong¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China;

2. Kunming Customs, Kunming 650228, Yunnan, China)

Abstract: Nineteen plant materials (*Davidia involucrata*, *Camptotheca acuminata*, etc.) were collected, and nucleotide sequences of eight gene such as *rpoB*, *rpoC*, *matK* were analyzed by molecular biology and bioinformatics software to search for single nucleotide polymorphism (SNP). The derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) primers were designed based on the SNPs and the genomic DNA was used for amplification. The amplicons were digested by restrict enzymes to convert SNPs into dCAPS markers which can be applied in genetic map construction, gene mapping, germplasm identification, genetic diversity research and other fields.

Key words: single nucleotide polymorphism (SNP); endonuclease; *Davidia involucrata*; derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS)

0 引言

衍生型酶切扩增多态性序列(derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS)是PCR反应和酶切相结合产生的一种分子标记方法^[1,2]。它是在酶切扩增多态性序列(CAPS)标记基础上进一步改进而来的,CAPS技术的基本原理是先用已知位点的DNA序列去设计一套特异性的PCR引物,然后去扩增,接着用一种专一性的限制性内切酶酶

切所得的扩增产物并进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析;dCAPS技术则是通过在扩增引物中引入错配碱基,产生可以结合单核苷酸多态性(SNP)位点引入新的限制性内切酶作用位点,经过核酸内切酶酶切,产生和CAPS标记类似的多态性。dCAPS分子标记技术主要应用于植物基因的定位、图位克隆、分型和品种品系鉴定等方面的研究^[3~6]。

珙桐(*Davidia involucrata*)属蓝果树科(Nyssa-

收稿日期: 2018-03-26 修回日期: 2018-05-09

作者简介: 许瑾(1980-),女,副研究员,硕士,主要从事植物物种资源分子标记。E-mail: xujin1199@sina.com

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0210300)

引用格式: Xu J, Gao Y, Yang B, et al. Exploration of SNP and relative dCAPS markers in *Davidia involucrata* [J]. Biotic Resources, 2018, 40(4): 334-338.

许瑾,高妍,杨碧,等. 基于珙桐SNP位点的dCAPS标记开发[J]. 生物资源, 2018, 40(4): 334-338.

ceae)珙桐属(*Davidia*),又名水梨子、鸽子树,为我国单属特有植物,是第三纪孑遗植物,有“活化石”之称。在1 000万年前新生代第三纪时期曾广泛分布于全世界,在第四纪冰川时期,大部分地区的珙桐相继灭绝,目前仅在我国西南地区海拔300~2 500 m的山地林中存活^[7]。珙桐同时被《国家珍贵树种名录》、《国家重点保护野生植物名录》和《中国稀有濒危保护植物名录》收录,是国家一级重点保护植物,具有很高的学术地位和科学研究价值^[8]。

本研究通过对 *rpoB*, *rpoC*, *matK*, *atpF-atpH*, *pskK-pskI*, *ndhJ*, *trnL*, *psbA-trnH* 基因进行扩增,利用生物信息学的方法,筛选 SNP 位点,设计 dCAPS 引物,选择合适的内切酶,最终建立了快速鉴定珙桐的 dCAPS 分子标记体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

供试植物材料及其采集地点见表1。

表1 供试植物材料
Table 1 Plant materials for testing

序号	材料名称	学名	采集地点(提供单位)
1	珙桐	<i>Davidia involucrata</i>	昆明植物园
2	珙桐	<i>Davidia involucrata</i>	昆明植物园
3	喜树	<i>Camptotheca acuminata</i>	昆明植物园
4	辣椒	<i>Capsicum annuum</i>	中国农业科学院作物科学研究所
5	菊花	<i>Dendranthema morifolium</i>	中国农业科学院作物科学研究所
6	水稻	<i>Oryza sativa</i>	中国农业科学院作物科学研究所
7	梨	<i>Pyrus</i> spp.	中国农业科学院作物科学研究所
8	水青树	<i>Tetracentron sinense</i>	昆明植物园
9	大豆	<i>Glycine max</i>	中国农业科学院作物科学研究所
10	攀枝花苏铁	<i>Cycas panzhihuaensis</i>	昆明植物园
11	福建柏	<i>Fokienia hodginsii</i>	昆明植物园
12	紫毛兜兰	<i>Paphiopedilum venustum</i>	昆明植物园
13	银带虾脊兰	<i>Calanthe argenteo-striata</i>	昆明植物园
14	鹅掌楸	<i>Liriodendron chinense</i>	昆明植物园
15	云南拟单性木兰	<i>Parakmeria yunnanensis</i>	昆明植物园
16	观光木	<i>Michelia odora</i>	昆明植物园
17	樱桃	<i>Cerasus pseudocerasus</i>	中国农业科学院作物科学研究所
18	马铃薯	<i>Solanum tuberosum</i>	中国农业科学院作物科学研究所
19	油菜	<i>Brassica napus</i>	中国农业科学院作物科学研究所

1.1.2 主要试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒来自天根生化科技有限公司,PCR 扩增所用试剂和 DNA Marker DL2000 全部来自日本 TaKaRa 公司,引物合成是由北京奥科有限责任公司完成,PCR 产物纯化所用 ExoSAP-IT[®]酶来自美国 GENE 公司,其余测序相关试剂来自 ABI 公司,内切酶来自 NEB 公司,其他生化试剂全部为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

采集供试材料的新鲜叶片,于研钵中用液氮速冻,快速研磨。采用植物基因组 DNA 提取试剂盒

提取植物材料的基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增

按照参考文献 Renaud Lahaye^[9]及生物条码协会(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)公布的相关信息,选取 *rpoB*, *rpoC*, *matK*, *atpF-atpH*, *pskK-pskI*, *ndhJ*, *trnL*^[10], *psbA-trnH*^[11] 基因进行扩增。

1.2.3 纯化与测序

PCR 产物纯化采用 ExoSAP-IT[®]酶来处理,可以去除多余的 dNTP 和引物。测序在 ABI 3130 测序仪上进行。

1.2.4 数据分析及dCAPS引物设计

对测得珙桐序列通过NCBI blast获得亲缘关系近的物种序列,采用Sequence Analysis和DNA-STAR软件进行校对和排序,通过多序列比较,寻找珙桐的SNP位点,利用网页版dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>)软件设计上游引物(5'-GGTTACATTTTTCATATGATCTCCG-3'),Primer Premier 5.0设计下游引物(5'-ATTTTATTGTCCTTGATG-3'),内切酶为AciI。

1.2.5 PCR特异性扩增及酶切

PCR扩增选择25 μL体系,其中10×LA Buffer (不含Mg²⁺) 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物 (10 mmol/L) 各0.5 μL, LAaq (5 U/μL) 0.25 μL, 基因组DNA取1 μL, ddH₂O 13.75 μL。PCR扩增程序为:94℃预变性10 min, 94℃变性30 s, 51℃退火40 s, 72℃延伸40 s, 35个循环, 72℃终延伸10 min。PCR扩增结束后,采用相应的限制性内切酶酶切,4%

琼脂糖电泳分离,在紫外凝胶成像系统中观察,拍照。

2 结果

2.1 植物材料DNA提取和基因扩增

采用天根DNA提取试剂盒提取植物基因组DNA效果较好,可用于后续试验。PCR扩增产物纯化后用于测序。

2.2 序列分析和dCAPS标记引物设计

用Sequence Analysis和DNASTar软件对*rpoB*, *rpoC*, *matK*, *atpF-atpH*, *pskK-pskI*, *ndhJ*, *trnL*, *psbA-trnH*基因的数据进行比对、编辑,在*atpF-atpH*基因中找到了可用于dCAPS引物设计的1个A→C的SNP位点(图1)。

2.3 dCAPS引物扩增结果

由图2可以看出,仅有珙桐和喜树材料有扩增,特异性条带大小约为400 bp左右,而其他植物材料均未有扩增。

GGTTACATTTTTCATATGATCTCCTCCTTATAGATAGACTAAAAAATCGAAC
GGTTACATTTTTCATATGATCTCCTCCTTATAGATAGACTAAAAAATCGAAC

图1 珙桐*atpF-atpH*基因SNP位点

Fig. 1 SNP site of *atpF-atpH* gene in *Davidia involucrata*

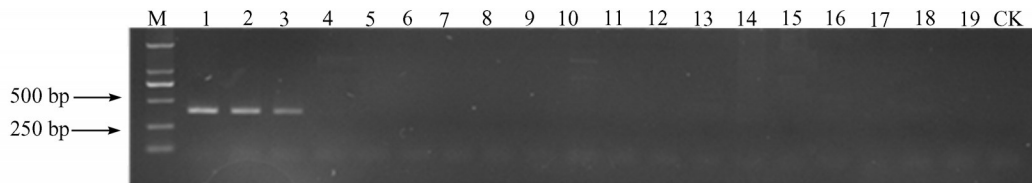


图2 dCAPS标记扩增结果

Fig. 2 Result of dCAPS amplification

M:DL2000; 1. 珙桐(1); 2. 珙桐(2); 3. 喜树; 4. 辣椒; 5. 菊花; 6. 水稻; 7. 鸭梨; 8. 水青树; 9. 大豆; 10. 攀枝花苏铁; 11. 福建柏; 12. 紫毛兜兰; 13. 银脉虾脊兰; 14. 鹅掌楸; 15. 云南拟单性木兰; 16. 观光木; 17. 樱桃; 18. 马铃薯; 19. 油菜; CK:水对照

M:DL2000; 1. *Davidia involucrata*(1); 2. *Davidia involucrata*(2); 3. *Camptotheca acuminata*; 4. *Capsicum annuum*; 5. *Dendranthema morifolium*; 6. *Oryza sativa*; 7. *Pyrus* spp.; 8. *Tetracentron sinense*; 9. *Glycine max*; 10. *Cycas panzhihuaensis*; 11. *Fokienia hodginsii*; 12. *Paphiopedilum venustum*; 13. *Calanthe argenteo-striata*; 14. *Liriodendron chinense*; 15. *Parakmeria yunnanensis*; 16. *Michelia odora*; 17. *Cerasus pseudocerasu*; 18. *Solanum tuberosum*; 19. *Brassica napus*; CK: water control

2.4 酶切结果

由图3可以看出,经AciI酶切后,两种珙桐材料的酶切片段大小均为280 bp左右,而喜树材料并未被酶切,因而通过此方法可以达到鉴定珙桐的目的。

3 讨论

我国是世界上生物多样性最丰富的地区之一,而我国大量的物种及其遗传资源也在遭到国内、外人为的威胁^[12,13]。一些重要物种,如名贵兰花品种,由于巨大的商业利益驱使人们对其乱挖滥采,并使

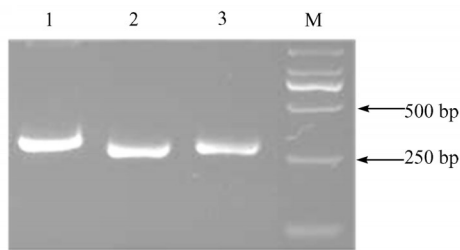


图3 dCAPS标记酶切结果

Fig. 3 Result of dCAPS restriction enzyme digestion

注: 1. 喜树; 2. 珙桐(1); 3. 珙桐(2); M: DL2000

Note: 1. *Camptotheca acuminata*; 2. *Davidia involucrata* (1); 3. *Davidia involucrata*(2); M: DL2000

其流入国外,导致原生地资源枯竭或丧失,严重影响了生物多样性。与此同时,物种资源的保护和鉴定工作还处于起步阶段^[14]。SNP的检测方法有很多种,一般来说分为两大类,一类是以凝胶电泳为基础的传统经典的检测方法,如RFLP、简单重复序列标记(SSR)、扩增片段长度多态性(AFLP)等;另一类是高通量,自动化程度较高的检测方法,如DNA测序、质谱、DNA芯片检测等^[15,16]。最直接的方法还是从已定位的序列标签位点(STS)和表达序列标签(EST)挖掘出SNP位点。以上方法各有优缺点,如质谱法具有通量高、灵敏度高等优点,但有一些SNP不适合设计引物,且成本较高;RFLP法可利用探针有很多,但工作量比较大,重复度不高。

DNA条形码(DNA barcode)是指生物体内能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段^[17]。它已经成为生态学研究的重要工具,不仅用于物种鉴定,同时也有助于生物学家进一步了解生态系统内发生的相互作用。本研究通过扩增 *rpoB*, *rpoC*, *matK*, *atpF-atpH*, *pskK-pskI*, *ndhJ*, *trnL*, *psbA-trnH* 条码基因并测序分析来发掘SNP位点。研究表明通过条码基因挖掘SNP位点相比于传统方法(EST数据库)来说,实验周期较短,成本也相对较低,同时还能保证较好的重复性和稳定性^[18]。

本文针对珙桐dCAPS分子标记的成功开发,可促进SNP标记在珙桐的遗传图谱构建、基因定位、种质资源鉴定、遗传多样性研究等领域的应用,也为今后物种资源检验检疫工作提供了方法借鉴,有助于我国物种资源的可持续利用。

参考文献

[1] Neff M M, Neff J D, Chory J, *et al.* dCAPS, a simple

technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics [J]. Plant J, 1998, 14(3): 387-392.

[2] Toshiyuki K, Naoto N. Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert SNPs into PCR-based markers [J]. Breeding Science, 2005, 55(11): 93-98.

[3] Paul K B, Mark R T. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation [J]. Nature, 2002, 4(416): 847-850.

[4] Liu S P, Wang J R, Wang L, *et al.* Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family [J]. Cell Research, 2009, (19): 1110-1119.

[5] Shu Y J, Li Y, Zhu Z L, *et al.* Establishment and optimization of the rapid method to develop soybean CAPS molecular markers [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(12): 62-65.

束永俊,李勇,朱振雷,等.大豆CAPS标记快速开发方法的建立与优化[J].东北农业大学学报,2009,40(12): 62-65.

[6] Jung J K, Park S W, Liu W Y, *et al.* Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification [J]. Euphytica, 2010, 175(1): 91-107.

[7] Yu Y T, Xu G B. Literature review of researches on *Davidia involucrata* Baill [J]. Nonwood Forest Research, 2006, 24(4): 92-94.

禹玉婷,徐刚标.珙桐研究进展[J].经济林研究,2006,24(4): 92-94.

[8] Xu G B, Yu Y T, Shen X B. Studies of genetic diversity of dove trees (*Davidia involucrata*) in west Hunan and Hubei by RAPD [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2007, 27(6): 5-9.

徐刚标,禹玉婷,申响保.湘鄂西地区珙桐天然群体遗传结构的研究[J].中南林业科技大学学报,2007,27(6): 5-9.

[9] Renaud L, Vincent S, Sylvie D, *et al.* A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa) [J]. Nature Recedings, 2008, 6(16): 1-19.

[10] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Biol, 1991, 17(5): 1105-1109.

[11] Nadot S, Bittar G, Carter L, *et al.* A phylogenetic analysis of monocotyledons based on the chloroplast gene *rps4*, using parsimony and a new numerical phenetics method [J]. Molecular Phylogenetics and Evolu-

- tion, 1995, 4(3): 257-282.
- [12] You J W, Lin X M, Liao Z L, *et al.* Resource conservation of the wild *Dioscorea versipellis* [J]. Research and Practice of Chinese Medicines, 2007, 21(4): 25-27.
由金文, 林先明, 廖朝林, 等. 八角莲致濒原因及其野生资源保护[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(4): 25-27.
- [13] Yi S R, Huang Y, Xiao B, *et al.* Study on conservation strategy of rare and endangered medicinal plants in Chongqing [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2007, 9(4): 61-66.
易思荣, 黄娅, 肖波, 等. 重庆市珍稀濒危药用植物保护战略研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(4): 61-66.
- [14] Zhan C Y. Thinking of the law on protecting the resources of rare and endangered wild plants in China [J]. China Forestry Economy, 2008(1): 27-30.
詹长英. 我国保护珍稀濒危野生植物资源的法律思考[J]. 中国林业经济, 2008(1): 27-30.
- [15] Zheng Y P, Chander S, Yang X H, *et al.* Method for detecting SNP based on PCR technique [J]. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(3): 51-55.
郑艳萍, Chander S, 杨小红, 等. 一种基于聚合酶链式反应检测 SNP 的方法[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 51-55.
- [16] Zhang L, Li W, Xie C H. Research progress in single nucleotide polymorphisms in *Oryza sativa* [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2007, 35(34): 10955-10957.
张玲, 李伟, 谢崇华. 水稻单核苷酸多态性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 10955-10957.
- [17] Xu J, Xu T, Xiao Z K, *et al.* Analysis of *psbA-trnH* gene sequences of Gramineae and its application in identification of *Oryza punctata* [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 2: 85-92.
许瑾, 徐涛, 肖正康, 等. 禾本科 *psbA-trnH* 的序列分析及其在斑点野生稻鉴定中的应用[J]. 生物技术通报, 2011, 2: 85-92.
- [18] Zhao H J, Xu J, Gao B D, *et al.* The establishment of dCAPS marker system in *Oryza punctata* and *Oryza officinalis* on the basis of the SNP [J]. Molecular Plant Breeding, 2011, 9(2): 169-173.
赵红敬, 许瑾, 高必达, 等. 基于 SNP 位点快速鉴定药用、斑点野生稻的 dCAPS 标记体系的建立[J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 169-173.

□