

# 利用正交设计优化亚麻 SRAP-PCR 反应体系

吴建忠

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为亚麻分子标记及分子育种提供可靠的理论依据,利用正交试验设计对亚麻 SRAP-PCR 反应体系中的 4 因素(模板 DNA、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度)在 3 个水平上进行正交优化,确立了适合亚麻 SRAP-PCR 反应的 20  $\mu$ L 体系:75 ng 模板 DNA、0.75  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$  引物、1.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$   $Mg^{2+}$ 、0.40 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  dNTPs 和 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。

**关键词:**亚麻;正交设计;优化;SRAP

**中图分类号:**S563.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)03-0030-03

SRAP(相关序列扩增多态性)是 2001 年由美国加州大学蔬菜系 Li 与 Quiros 博士在芸薹属作物中开发出来的一种新型的基于 PCR 的分子标记系统,具有简便、共显性高、重复性较好、产量适中、易于分离条带、方便测序的优点,其最大的特点是针对基因的阅读框区域(ORFs),通过独特的双引物设计对基因的 ORFs 的特定区域进行扩增,过程采用变温复性法,前 5 个循环复性温度为 35℃,后 35 个循环则为 50℃,这样的循环过程保证了反应的稳定性,同时扩增后的 DNA 片段可用聚丙烯酰胺分离也可用琼脂糖凝胶电泳等方法分离检测。目前 SRAP 标记已开始应用于作物遗传多样性分析、种缘进化关系及比较基因组学等方面。

亚麻(*Linum usitatissimum*)在世界各地均有分布,在我国种植面积居世界前列,是我国重要的纤维和油料作物。近年来,对于亚麻性状的选择正由传统的表型选择向 DNA 分子水平的基因直接选择发展,分子生物学方面的技术在亚麻上得到了广泛应用,国内外对亚麻 DNA 遗传多样性和指纹图谱等方面的研究主要利用 RAPD<sup>[1-2]</sup>以及 AFLP<sup>[3-5]</sup>标记技术,而 SRAP 标记在亚麻上的研究报道较少。在构建遗传图谱中,SRAP 标记以其在基因组中均匀分布的特点以及高频率共显性优于 AFLP 标记<sup>[6]</sup>。但目前有关亚麻 SRAP 标记的建立和应用,以及标准化的、高效的亚麻 SRAP 反应体系及其优化方法的研究较少。该研究采用正交试验设

计的方法,建立亚麻 SRAP-PCR 的最优反应体系,旨在对适宜亚麻的 SRAP 反应条件进行优化,以期建立一套适宜亚麻的 SRAP 技术体系,为亚麻分子标记及分子育种提供可靠的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为法国纤维亚麻品种戴安娜(Diane),体系验证同时用到油用亚麻品种宁亚 17,材料均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所亚麻育种室提供。选取健壮幼苗,用保鲜袋封存后贮存在-80℃冰箱备用。试验在黑龙江省农业科学院经济作物研究所实验室完成。

试验试剂有 Tris-HCl、EDTA、NaCl、CTAB、RNase、Agarose、苯酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、琼脂糖、溴酚蓝、二甲苯青、冰乙酸、PCR-buffer、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、EB 和 PVP 等。

随机引物对[m2e7: 5' TGAGTCCAAACCG-GAGC-3', 5' GACTGCGTACGAATTCAA -3']由上海生工公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 亚麻基因组 DNA 提取方法 亚麻基因组 DNA 提取参照文献[7]。利用紫外分光光度计及 1.5%琼脂糖凝胶检测其纯度和浓度,并稀释到 50 ng $\cdot$  $\mu$ L $^{-1}$  备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系优化的正交试验设计 根据统计学原理,采用正交设计  $L_9(3^4)$  进行试验,设计模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs 4 因素 3 水平,设计的 PCR 各反应成分的因素-水平及正交试验表见表 1。

收稿日期:2011-12-10

作者简介:吴建忠(1983-),男,内蒙古自治区乌兰察布市人,硕士,研究实习员,从事亚麻生物技术与遗传育种研究。E-mail: wujianzhong176@163.com。

表 1 PCR 正交试验设计  
Table 1 Orthogonal design for PCR

编号	模板 DNA/ng	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	引物/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	得分		平均得分	
No.	Template DNA	/mmol·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>	Primers	Score		Mean score	
1	50	1.0	0.3	0.50	3	4	3	3.33
2	50	1.5	0.4	0.75	1	3	2	2.00
3	50	2.0	0.5	1.00	6	5	6	5.67
4	75	1.0	0.4	1.00	6	5	4	5.00
5	75	1.5	0.5	0.50	9	9	9	9.00
6	75	2.0	0.3	0.75	8	8	6	7.33
7	100	1.0	0.5	0.75	4	2	5	3.67
8	100	1.5	0.3	1.00	5	6	2	4.33
9	100	2.0	0.4	0.50	4	3	3	3.33

设 9 个处理,每个处理 3 次重复,共 27 个样,按照表 1 加样。反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,除这些变化因素外,每个样还含有 1 $\times$ PCR buffer 和 *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、35 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min、5 次循环;94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、50 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min、循环 35 次;最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 h。对反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶检测拍照,肉眼读带,根据条带数目依次给 9 个反应打分,每一条清晰可辨的条带记 1 分,取 3 次得分的平均值进行直观分析,分别得出 4 因素对 PCR 试验影响大小的值,得分见表 1。

2 结果与分析

2.1 电泳结果评分

按照表 1 设计的 9 个反应进行 PCR 试验,电泳的检测结果见图 1(3 次重复结果差异不大,仅附

1 次电泳图谱),依据谱带及杂带的多少分别统计得分,进行直观分析,从 3 次重复试验看出,结果的一致性较好:反应 1、2、3 条带较少,反应 4、5、6 条带最多,且清晰可辨,反应 7、8、9 条带较多,但较模糊,这一现象表明,模板 DNA 浓度是 PCR 反应的最大影响因素。

2.2 各因素对 PCR 结果的影响

2.2.1 模板 DNA 对 PCR 反应的影响 模板 DNA 的用量和纯度对 PCR 产物的产量和特异性都有影响。结果表明,当模板 DNA 浓度在 75 ng 时为最佳反应量,PCR 反应得分最高,扩增条带清楚可辨。

2.2.2 引物浓度对 PCR 反应的影响 引物浓度影响 PCR 扩增特异性效果,该试验中 PCR 引物浓度在 0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时与其它浓度比较反应条带清晰可辨,杂带较少,表明 0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为体系引物浓度的最佳条件。

2.2.3 dNTPs 对 PCR 反应的影响 dNTPs 是 PCR 的反应原料,该试验中,dNTPs 浓度在 0.4 和 0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  的 PCR 反应得分平均值差别较小,因此从节约的角度选择前者作为体系的最佳浓度。

2.2.4 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 反应的影响 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 扩增的特异性和产量有明显影响。该研究中 Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  时条带最清晰,反应得分最高,当 Mg<sup>2+</sup> 浓度在 1.0 和 2.0 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  时条带均较少,得分平均值下降,因此选择 1.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  Mg<sup>2+</sup> 作为该体系的最佳浓度。

2.3 SRAP-PCR 优化反应体系的验证

采用已优化的 SRAP-PCR 反应体系(模板 DNA 75 ng、引物浓度 0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Mg<sup>2+</sup> 浓度

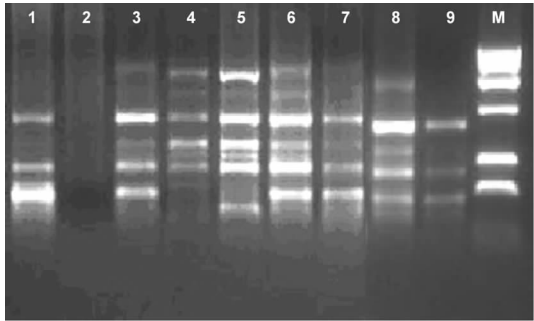


图 1 PCR 产物电泳结果  
M:1000 bp 标准分子量;1~9:各反应产物,编号同表 1  
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products  
M:1000 bp DNA marker;1~9: Number of reaction products,the same case in Table 1

1.5 mmol·L<sup>-1</sup>、dNTPs 浓度 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>、*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U),以 6 对引物对纤维亚麻品种戴安娜和油用亚麻品种宁亚 17 的 DNA 进行扩增,以验证该体系的效果。从图 2 中可以看出,利用 SRAP-PCR 优化体系进行 PCR 扩增,采用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,结果表明,条带清晰、多态性较丰富。

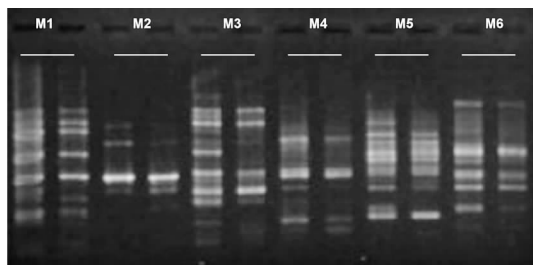


图 2 SRAP-PCR 优化反应体系的验证结果

Fig. 2 The result of SRAP-PCR reaction system optimization

### 3 结论与讨论

建立特定试验条件下适合某植物的最佳 SRAP-PCR 反应体系可为 SRAP 分子标记提供良好的基础,不同植物的 SRAP-PCR 反应体系是不同的<sup>[8]</sup>。该试验获得了亚麻 SRAP-PCR 的最佳优化体系(20 μL):75 ng 模板 DNA、0.75 μmol·L<sup>-1</sup> 的引物、1.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Mg<sup>2+</sup>、0.4 mmol·L<sup>-1</sup> 的原料 dNTPs、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。此最佳体系

在正交设计表中得分最高。利用该优化体系进行 PCR 扩增,采用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,结果是条带清晰、多态性较丰富。此标记体系的优化为开展亚麻 DNA 指纹图谱的构建及分子标记辅助育种奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Fu Y B. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax[J]. Crop Science, 2005, 45(3): 1084-1091.
- [2] Fu Y B, Diederichsen A, Richards K W, et al. Genetic diversity within a range of cultivars and landraces of flax(*Linum usitatissimum* L.) as revealed by RAPDs[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49(2): 167-174.
- [3] Everaert I, de Riek J, de Loose M, et al. Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed(*Linum usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data[J]. Plant Varieties and Seeds, 2001, 14(2): 69-87.
- [4] Spielmeier W, Green A G, Bittisnich D, et al. Identification of quantitative trait loci contributing to wilt resistance on an AFLP linkage map of flax(*Linum usitatissimum*) [J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 97(4): 633-641.
- [5] van Treuren R, van Soest L J M, Hintum T J L. Marker-assisted rationalization of genetic resource collections: a case study in flax using AFLPs[J]. Theor. Appl. Genet., 2001, 103(1): 144-152.
- [6] 王斌,党占海,张建平,等. 亚麻 SRAP 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(4): 760-764.
- [7] 吴建忠. 亚麻全基因组 DNA 的提取及分析[J]. 黑龙江农业科学, 2011(7): 18-19.
- [8] 刘立军,蒙祖庆,邢秀龙,等. 亚麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 726-730.

## Optimization of SRAP-PCR System for Flax Based on Orthogonal Design

WU Jian-zhong

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** In order to provide reliable theory basis for flax molecular marker and molecular breeding, the orthogonal design was used to optimize SRAP-PCR amplification system at 3 levels of 4 factors in flax(DNA template, primer, Mg<sup>2+</sup>, dNTPs). The most suitable SRAP-PCR reaction system for flax was total 20 μL containing 75 ng DNA template, 0.75 μmol·L<sup>-1</sup> primers, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.40 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs and *Taq* DNA polymerase 1.5 U.

**Key words:** flax; orthogonal design; optimization; SRAP