

# 二次通用旋转组合设计优化辣椒 SRAP-PCR 反应体系

谈敏<sup>1</sup>, 张其安<sup>2,\*</sup>, 刘童光<sup>1,\*</sup>, 江海坤<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; <sup>2</sup>安徽省农业科学院园艺研究所, 合肥 230031)

二次通用旋转组合设计是在正交回归组合设计的基础上发展而来, 具有旋转性, 能使与试验中心点距离相等的试验点上的预测值方差相等, 易于得到组合的最优反应体系。本试验中应用二次通用旋转组合设计方法, 对得到的数学模型进行分析, 以期获得最佳的辣椒 SRAP 反应体系, 为辣椒的分子研究提供技术参考。

参试辣椒材料均由安徽省农业科学院园艺研究所提供。品种‘H-119’用于 SRAP-PCR 反应体系的优化研究, 18 个自交系用于 SRAP-PCR 反应体系的检验。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 35 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 5 个循环; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 33 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳缓冲液为 1 × TBE, 100 V 恒电压电泳 2.5 h。按条带数、清晰度及背景对 32 个组合设计的电泳条带进行打分, 取 2 次得分的平均值, 应用 DPS 数据处理软件对结果进行分析。

以  $X_1$  (Taq 聚合酶)、 $X_2$  ( $Mg^{2+}$ )、 $X_3$  (dNTPs)、 $X_4$  (引物) 和  $X_5$  (模板 DNA) 为自变量, PCR 电泳产物结果得分为变量  $Y$ , 得到 PCR 电泳产物结果得分的回归方程为:  $Y = 4.622 - 1.093X_1 - 0.406X_2 - 0.26X_3 - 0.448X_4 - 0.01X_5 + 1.222X_1^2 + 1.472X_2^2 + 0.597X_3^2 + 0.722X_4^2 + 0.409X_5^2 - 1.297X_1X_2 - 0.453X_1X_3 + 0.016X_1X_4 - 0.016X_1X_5 + 0.328X_2X_3 - 0.141X_2X_4 - 0.859X_2X_5 - 0.109X_3X_4 + 0.359X_3X_5 + 0.203X_4X_5$ 。

方差分析结果表明, 回归方程显著性检验  $F_2 = 3.39$  在 0.1 水平上差异极显著, 但是失拟检验  $F_1 = 12.17$  在 0.1 水平上差异极显著, 说明未控制因素对试验的影响很大, 回归模型与实测值不能较好地拟合, 所以不能直接用模型进行优化分析。为此, 采用计算机对不同水平的组合进行模拟试验, 以零水平的均值 7.94 为临界值, 获得大于临界值的方案 2 602 个, 在 95% 的置信区间均值大于 7.94 的优化方案为: Taq 聚合酶 ( $X_1$ ) 用量 0.465 ~ 0.49 U,  $Mg^{2+}$  ( $X_2$ ) 2.264 ~ 2.298  $mmol \cdot L^{-1}$ , dNTPs ( $X_3$ ) 0.189 ~ 0.211  $mmol \cdot L^{-1}$ , 引物 ( $X_4$ ) 0.789 ~ 0.811  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 模板 DNA ( $X_5$ ) 用量 43.59 ~ 45.021 ng。结合实验室移液枪的实际条件, 将优化方案定为: 在 10  $\mu L$  反应体系中 Taq 聚合酶用量 0.5 U,  $Mg^{2+}$  浓度 2.3  $mmol \cdot L^{-1}$ , dNTPs 浓度 0.2  $mmol \cdot L^{-1}$ , 引物浓度 0.8  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 模板 DNA 用量 45 ng。进一步将 18 个不同的辣椒材料用不同引物组合对优化体系稳定性检验, 结果表明该体系可靠稳定, 适用于辣椒 SRAP 分子标记的研究。

**关键词:** 辣椒; 二次通用旋转组合设计; SRAP; 反应体系

**中图分类号:** S 641.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) S-2578-01

**收稿日期:** 2011-09-02

\* 通信作者 (E-mail: zhangqianah@yahoo.com; Tel: 0551-5160817)