

二次通用旋转组合设计优化辣椒 SRAP-PCR 反应体系

谈 敏¹, 张其安^{2,*}, 刘童光^{1,*}, 江海坤²

(¹ 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; ² 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 · L⁻¹, dNTPs (X_3) 0.189 ~ 0.211 mmol · L⁻¹, 引物 (X_4) 0.789 ~ 0.811 μmol · 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 μL 反应体系中 Taq 聚合酶用量 0.5 U, Mg^{2+} 浓度 2.3 mmol · L⁻¹, dNTPs 浓度 0.2 mmol · L⁻¹, 引物浓度 0.8 μmol · 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)