

湖南农业大学

中职教师在职攻读硕士学位

学 位 论 文

亚麻 RAPD 反应体系的优化和品种间多态性
标记的筛选

二 00 八年九月

分类号_____

密 级_____

UDC_____

单位代码_____

湖南农业大学
中职教师在职攻读硕士学位
学 位 论 文

亚麻 RAPD 反应体系的优化和品种间多态性
标记的筛选

Optimization of Flax RAPD Reaction System and Screening
of Polymorphic RAPD Markers Between Flax Cultivars

研究生姓名 梁毅莉

指 导 教 师 陈信波教授

学 科 专 业 生物化学与分子生物学

研 究 方 向 植物分子生物学

提交论文日期 2008 年 9 月 25 日 论文答辩日期 2008 年 12 月 11 日

答辩委员会主席 _____ 论文评阅人 _____

学位授予日期_____

二 00 八年九月

独创性声明

本人声明所呈的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解湖南农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意湖南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

亚麻 RAPD 反应体系的优化和品种间多态性标记的筛选

摘 要

亚麻 (*Linum sitatissimum L.*) 是亚麻科 (Linaceae) 亚麻属 (Linum) 的一年生草本纤维植物, 已经有六七千年的栽培历史。亚麻是重要的经济作物, 它既是当今世界第三大纤维作物, 又是五大油料作物之一。我国亚麻品种繁多, 命名杂乱, 不利于亚麻种质资源的研究和推广, 同样也不利于有良品种的选育。本实验在优化亚麻 DNA 提取方法和 RAPD 反应体系的基础上, 进行了亚麻多态性 RAPD-PCR 随机引物的筛选, 为在分子水平上研究亚麻的遗传多样性和构建我国亚麻品种的遗传图谱奠定一定的基础。主要的实验结果如下:

1. 通过对 SDS 法、CTAB 法、CTAB 改良法和高盐低 pH 值法四种方法提取亚麻幼苗基因组 DNA 的进行紫外吸收检测和电泳检测, 结果表明: 四种方法提取的 DNA, 完整性好, A260/A280 的值在 1.6-1.9 之间, 都可以用于亚麻基因组 DNA 的提取, 但是其中高盐低 PH 法提取的 DNA 浓度太低; SDS 法提取的 DNA 中混有褐色杂质; CTAB 法提取的 DNA 中存在较多的蛋白质杂质, 其中以 CTAB 改良法提取的 DNA 质量为最好, 本实验选用 CTAB 改良法。
2. 通过对 PAPD 反应体系的模板 DNA、引物、dNTP、Taq 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度的优化试验及对 PCR 反应程序的筛选, 确定了亚麻 RAPD 分析的适宜反应体系和反应程序为: 每 25 μL 反应体系中, 模板 40 ng, 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 2.5 μL , 10 mmol L^{-1} dNTP 0.5 μL , 2U μL^{-1} Taq 酶 0.5 μL , 其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 25 μL 。适宜反应循环程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。
3. 用 600 个随机引物对白花和山西大同两个亚麻品种进行 RAPD 分析, 筛选出 31 条在两品种间具多态性的特异 RAPD 引物。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶分

离，31 条 RAPD 特异引物所扩增的 DNA 片段多在 250-1000 bp 之间。这些结果为利用以上两个品种构建我国的亚麻遗传图谱奠定了基础。

关键词：亚麻；提取方法；分子标记；RAPD

Optimization of Flax RAPD Reaction System and Screening of Polymorphic RAPD Markers Between Flax Cultivars

Abstract

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an annual herb which has 6000-7000 years planting history. As an important cash crop, flax is the third largest natural fiber crop and one of the five major oil crops in the world. China's flax variety, named in a disorderly manner is not conducive to the flax germplasm research and extension, the same is not conducive to good selection of varieties. The objectives of the present study were to set up an efficient flax RAPD protocol and screen of RAPD markers for flax genetic diversity analysis and genetic linkage map construction. The main results are as follows:

1. The SDS method, CTAB method, improved CTAB method, high-salt and low pH method were tried to extract flax genomic DNA from young seedlings. The qualities DNA were checked by agarose gelelectrophoresis and spectrophotometer . The results showed that the integrity of DNA samples obtained by these four methods was good, and the OD260/OD280 values were between 1.6 to 1.9. But the concentration of the DNA eatracted by high-salt and low pH method was too low; the DNA eatracted by SDS method was in brown color and impure; the DNA eatracted by CTAB method had high protein contamination. The DNA eatracted by improved CTAB method gave best PCR performance and was choosed as the DNA extraction method for flax RAPD amplification system.

2. The primer, dNTP, Taq polymerase, Mg²⁺ concentration of the test and PCR reaction procedure were optimized for best flax RAPD performance. The optimized flax PCR protocol was: The 25μL reaction system include buffer (with Mg²⁺ 10 mmol L⁻¹) 2.5 μL, template DNA 40 ng, Taq polymerase 1.0 U, 10 mmol L⁻¹dNTP (dTAP, dGTP, dCTP, dTTP) 0.5 μL, 10 μmol L⁻¹ primer 2.5 μL, adding autoclaved ultra-pure water to final volume of 25 μL. The RAPD PCR was run as 94 °C predenature for 4 min; 40 cycles of 94 °C denaturing for 45s, 37 °C annealing 1 min, 72 °C elongation for 1.5 min; a final cycle of 72 °C for 10 min, then placed at 4 °C.

3. RAPD analysis of Baihua (a flax variety used for fiber) and Shangxidatong (a flax variety used for oil) was carried out with 600 random decamer primers according to the optimized PCR reacting system. Thirty one primers were found producing polymorphism bands between the two varieties. These primers can be used for later construction of flax genetic linkage map using these two varieties as parents for the F₂ population.

Key words: flax; *Linum usitatissimum* L.; DNA extraction method; RAPD;
Molecular marker.

目 录

第一章文献综述	1
1 DNA分子标记及常用的方法.....	2
1.1 基于DNA分子杂交的方法.....	3
1.2 基于PCR技术的DNA扩增方法	4
1.2.1 采用随机引物进行扩增	4
1.2.2 采用特定引物或引物对进行扩增	5
1.2.3 PCR与限制性核酸内切酶相结合的方法	6
1.2.4 单核苷酸多态性SNPs分子标记的方法	7
2 分子标记的植物研究中的应用	8
2.1 利用分子标记构建遗传图谱	8
2.1.1 使用单一分子标记	9
2.1.2 使用多种分子标记共同构建	10
2.2 研究植物分类学及遗传多样性.....	10
2.3 进行植物基因定位和检测	11
2.3.1 质量性状	12
2.3.2 数量性状	13
3 分子标记在亚麻中的应用	13
3.1 用于亚麻分类和遗传多样性的研究.....	13
3.2 进行基因定位	14
3.3 鉴定DH植株	15
3.4 构建遗传图谱	15
3.5 进行种质资源管理	16
4 本研究的意义和目的	17
4.1 研究意义	17
4.2 研究目的	17
第二章 亚麻基因组DNA的提取	19
1 材料与方法	19
1.1 材料	19
1.1.1 植物材料	19
1.1.2 实验仪器	19

1.1.3 实验试剂及药品	19
1.2 实验方法	19
1.2.1 亚麻基因组 DNA 提取	19
1.2.2 四种提取方法获得的DNA检测	22
1.2.3 样品总DNA提取	22
2 结果与分析	22
2.1 四种提取方法获得的DNA纯度和浓度检测结果	22
2.2 四种提取方法获得的DNA电泳检测结果	22
3 讨论	23
3.1 提取 DNA 时在操作上应注意的问题	23
3.2 提取 DNA 时细胞次生代谢物质的影响	24
3.3 亚麻DNA提取方法及提取质量	25
第三章 RAPD 反应体的系优	26
1 材料与方法	26
1.1 植物材料	26
1.2 实验药品	26
1.3 主要仪器及设备	26
1.2 实验方法	26
1.2.1 RAPD反应体系优化的梯度实验	26
1.2.2 正交试验	26
2 结果与分析	27
2.1 梯度实验的结果	27
2.1.1 模板对RAPD结果的影响	27
2.1.2 引物浓度对 RAPD 的影响	28
2.1.3 Taq酶对RAPD结果的影响	28
2.1.4 dNTP浓度对RAPD结果的影响	29
2.1.5 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 的影响	29
2.1.6 循环次数对RAPD的影响	31
2.1.7 退火温度和时间对RAPD的影响	31
2.2 正交试验的结果	32
2.3 梯度试验和正交设计的验证试验比较	32

2.4 最佳RAPD-PCR反应体系和反应条件的确定	32
2.4.1 最佳 RAPD-PCR 反应体系	33
2.4.2 最佳 RAPD- PCR 反应条件	33
3 讨论	33
3.1 RAPD 技术的重复性和稳定性	33
3.2 琼脂糖凝胶电泳操作时应注意的问题	35
3.2.1 琼脂糖凝胶电泳	35
3.2.2 琼脂糖凝胶的染色	35
第四章 多态性RAPD标记的筛选	36
1 材料与方法	36
1.1 材料	36
1.1.1 实验材料	36
1.1.2 实验药品	36
1.1.3 主要仪器及设备	36
1.2 试验方法	36
1.2.1 第一次引物筛选	36
1.2.2 第二次引物筛选	36
1.2.3 第三次引物筛选	37
2 结果与分析	37
2.1 第一次引物筛选的结果	37
2.2 随机引物第二次筛选的结果	39
2.3 对第二轮筛选出的引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果	40
3 讨论	42
3.1 RAPD统计的主观因素问题	42
3.2 RAPD技术对实验结果的影响	43
3.3 多态性条带的差异性	44
3.4 聚丙烯酰胺凝胶技术	44
3.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳	44
3.4.2 聚丙烯酰胺凝胶的染色	44
第五章 结论与展望	46
1实验得出的结论如下	46

1.1 CTAB改良法是亚麻基因组DNA最适提取方法·····	46
1.2 亚麻 RAPD 分析的适宜反应体系和反应程序·····	46
1.3 筛选到31条RAPD特异引物·····	46
2 展望·····	46
2.1 构建我国亚麻品种的遗传图谱·····	46
2.2 研究我国主要亚麻品种之间的亲缘关系和遗传距离·····	47
2.3 把RAPD标记转化成SCAR标记·····	47
2.4 亚麻的基因工程·····	47
参考文献·····	48
附录·····	54

第一章 文献综述

亚麻 (*Linum sitatissimum L.*) 是亚麻科 (Linaceae) 亚麻属 (Linum) 的一年生草本纤维植物, 已经有六七千年的栽培历史。亚麻是重要的经济作物, 它既是当今世界第三大纤维作物, 又是五大油料作物之一。亚麻常年种植面积 1.33×10^6 ha 以上, 主产国有俄罗斯、中国、加拿大和欧洲大陆, 我国亚麻栽培已经有 2000 多年的历史, 有传统的北方栽培中心和刚刚发展的南方栽培中心, 2004 年中国纤用亚麻种植面积达 1.6×10^5 ha, 跃居世界第一, 油用亚麻播种面积 $6.0 \sim 7.0 \times 10^4$ ha, 居世界第二位^[1], 是继俄罗斯之后的第二亚麻栽培生产大国。

亚麻纤维从亚麻的茎部提取, 是世界上最古老的纺织纤维, 历史可追溯到 10 000 年前。在瑞士境内发现的新石器时代古人类的遗址中, 亚麻的各种碎片已经被发现。亚麻纤维强韧、柔细, 具有较好的色泽, 耐摩擦、耐高温, 散热快, 吸尘率低, 不易撕裂, 不易燃烧, 无静电, 耐酸碱, 是追求绿色环保的首选纺织原料, 被誉为天然纤维中的“皇后”。越来越受到全世界消费者的喜爱, 2001 年, 全球纺织用亚麻的产量比前一年上升了 22 个百分点。仅欧盟内部纺织用亚麻的成交额达 3 亿欧元, 法国是世界上亚麻制品的主要生产地, 每年种植面积约为 55 500 ha, 产量约为 64 000 t, 而且亚麻质量是最好的。中国亚麻的产量排在第六位, 虽然种植面积高达 100 000 ha, 但亚麻纤维的产量只有 3100 t。

亚麻籽以各种形式作为食品的配料以及作为药物使用的特性已有 5 000 多年的记载。我国年产亚麻籽 50 万吨以上, 占世界总产量的 22.4%, 居世界第二位。而今对亚麻籽最突出的研究是作为功能食品的应用, 因为近年来研究证明其含有大量的对人体有益的物质。亚麻籽中富含多不饱和脂肪酸 (72%), 其中 α -亚麻酸 (ALA) (占总脂肪酸量的 57%) 是人体必需脂肪酸。亚麻籽蛋白是一种很好的蛋白质, 具有很好的生理功能。其具有高支链氨基酸 (BCAA: 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸), 低芳香族氨基酸 (AAA) 和高的 Fischer 比率 (BCAA / AAA) 的蛋白质, 这为特殊需要的病人提供能产生特殊生理功能的食品, 如患有癌症、烧伤、外伤和肝炎等营养不良的病人。亚麻籽中含有很高的木酚素, 木酚素是一种二酚类化合物的植物雌激素其结构类似于雌激素, 具有一种温和的酷似人体性激素的功能。亚麻籽中还含有较丰富的植物胶, 可作为一种食用纤维具有营养价值。此外, 亚麻籽中含丰富的矿物元素, 其中富含钾、锌等人体必需的微量元素。目前加拿大、澳大利亚、英国等国家在亚麻籽作为功能食品的开发方面作了大量的研究工作, 并

有许多产品不断出现在市场上。

目前，在育种方面，传统的育种方法已经不能满足生产的要求，分子生物学的理论与技术的飞速发展使亚麻的育种，特别是抗性品种的培育带来了新的契机，已经有许多学者在这一方面取得了进展。特别是近几年来，随着分子克隆和重组脱氧核糖核酸技术的完善，诞生了一类重要的遗传标记——分子标记，在植物研究上产生了巨大的影响。当前，大量的分子标记用于基因组分析，基因定位与克隆，品种鉴定，外源基因导入等方面。

在亚麻的生长过程中，由于受到环境和气候条件的影响，植物的外部形态和内部结构甚至基因组成方面都发生了变化。特别是亚麻已经有六七千年的栽培历史，经过漫长的人工选育，以及育种时常用栽培亚麻品种和亚麻属的不同植物、亚麻变种进行杂交，从而使亚麻属内种、亚种和品种之间的亲缘关系十分混乱。传统的从形态特征对植物进行分类的方法，面对这样复杂的关系根本无能为力，给亚麻的分类鉴定带来困难，因为仅仅从其外观特征或者生长习性，某一个品种可能有某几个种或属的特征。因而，很难按一般的分类方法讲其分类，这些不仅给育种带来了困难，也造成一定的经济损失。而分子标记直接从遗传物质DNA水平上去揭示它们之间的亲缘关系，就可以很容易的解决这个问题。

1 DNA分子标记及常用的方法

随着分子生物学在近十多年的快速发展，分子标记已经成为现代生物技术一种十分重要的研究方法。广义的分子标记是指生物大分子的多态性为基础的遗传标记，包括两类，即：同工酶标记和DNA标记。狭义的分子标记仅指DNA标记。同工酶是指同一位点的不同等位基因和不同基因位点所编码的同一种酶，以及转录后的酶变体等所有酶的表现型。同工酶标记，它是蛋白质水平来反映生物的遗传变异。通过同工酶的不同形式来鉴别不同的基因型。由于其经济方便，易于操作，已广泛应用于群体遗传学、系统进化和作物品种质量鉴定等方面的研究。但是同工酶分析也存在较大的内在局限性，首先是其结果不是很稳定，易受环境、取样部位及发育状态的影响；其次是其所能分析的位点有限，只能分析同源生物酶的基因，且多态性偏低；同时，它只能检测导致蛋白质产物分子净电荷改变的氨基酸组成的差异，有时两个不同的基因位点可能编码为电泳迁移性相同的酶，造成虚假同源性；另外，电泳技术一般限于由结构基因编码的水溶性蛋白，在这些水溶性蛋白中电泳也只能检测到影响电泳迁移率的蛋白，因而同工酶始终低估种间实际差异。由于受到这些技术上的限制，可供利用的同工酶标记数量极为有

限，因此同工酶标记技术已经被新的DNA分子标记所取代。

分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记，是DNA水平遗传多态性的直接的反映。Grodzicker等人于1974年首次利用DNA限制性片段多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism 简称RFLP)作为一种新的遗传标记检测腺病毒温度敏感突变型，使直接应用DNA多态性来检测遗传多样性成为可能，把遗传标记的发展推到了一个全新的阶段，并由此形成了一种新兴的遗传标记技术—DNA分子标记。因为生物各种性状的差异主要是遗传物质DNA的差异造成，因而通过DNA分子标记可以直接检测基因组的遗传变异，它更能准确揭示同物种内不同种、变种、品种品系间个体的差异，它具有无与伦比的优越性：①较高的可靠性，因为DNA标记直接检测遗传物质DNA，几乎不受环境因素、取样部位和发育阶段的影响，不影响目的基因的表达，与不良性状无必然的连锁 ②DNA标记在数量上几乎没有限制，因而检测出的多态性位点是无限的。③很多分子标记表现为共显性，能鉴别纯合基因型与杂合基因型，提供完整的遗传信息。④DNA标记对性状的表达没有影响。因此，DNA分子标不仅广泛应用于遗传图谱构建、基因定位等方面，而且在作物种质资源研究中也具有重要意义，被认为是鉴别品种、品种系(含杂交种、自交系)及分析种质资源遗传多样性的有利工具。所以通常的分子标记通常指DNA分子标记，常用的DNA分子标记方法：

1.1 基于DNA分子杂交的方法

主要是指限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism 简称RFLP)。RFLP是最早以DNA多态性为基础发展起来的分子标记，它是指用限制行内切酶切割不同个体基因组DNA后，含有同源序列的酶切片段在长度上差异，这种差异可用特定的探针进行Southern杂交，然后放射自显影而显示出来。RFLP分析的基本原理是由于限制性内切酶识别序列内的点突变或由于部分DNA片段的缺失、插入、异位和倒位而引起酶切位点的缺失或获得，这种限制性位点的改变使利用限制性内切酶切割DNA所得的片段发生变化，从而导致限制性片段的多态性。结果稳定可靠、重复性好，特别适应作物遗传连锁图谱的绘制和目标基因的标记。但RFLP分析是一项综合技术，涉及基因组DNA的提取、限制行内切酶的消化、琼脂糖凝胶电泳、Southern印迹转移、DNA探针制备和分子杂交等一系列分子生物学技术，技术复杂，所需费用较高，而且RFLP分析的效率依赖于合适探针及内切酶的获得，只有选用合适的探针和内切酶，某个位点才能表

现出多态性，同时由于需要使用同位素，更使它的广泛应用受到限制，在较长时间里主要局限于理论研究的领域^[2]。但是随着荧光标记探针技术的发明和应用，RFLP标记开始得到广泛应用。

1.2 基于PCR(Polymerase Chain Reaction)技术的DNA扩增方法

根据引物设计不同，又可划分为两类：

1.2.1 采用随机引物(Arbitrary primer)进行扩增

随机扩增多态性DNA 技术 (Random amplified polymorphic DNA) 简称 RAPD 分子标记，是1990年Williams和 Welsh发明的一种较为简便的检测DNA多态性技术。RAPD分析是以一系列随机排列的寡聚核苷酸（10个左右）为引物，以所研究基因组DNA为模板进行PCR扩增。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离或聚丙烯酰胺电泳分离，经EB染色或银染来检测扩增产物DNA片段的多态性，这些扩增产物的多态性反映了基因组相应区域的DNA多态性。RAPD能够进行多态性检测的原理是：RAPD所用的一系列引物的DNA序列各不相同，但对于任一特定的引物，它和基因组DNA序列有其特定的结合位点，当基因组在这些特定结合位点区域发生改变，如DNA片段的插入、缺失或碱基突变，就可以导致这些特定结合位点分布发生相应的变化，而使PCR产物增加、减少或发生分子量的改变。RAPD分析所用的一系列引物的碱基序列不同，但对于任一特定引物，它与所检测的DNA序列有特定的结合位点。然对每一个引物而言，其检测基因DNA多态性是有限的，但可用的引物数很多，可检测区域几乎覆盖整个基因组，所以从理论上讲，RAPD可对整个基因组DNA进行多态性检测。而且RAPD引物是无限的，而且在端粒、重复序列及RFLP标记区都可找到RAPD位点，因此可以做出很密集的遗传图谱来。

RAPD分子标记有许多优点：（1）所用引物为10bp的随机引物，不需要预先了解目的基因和相适宜的序列；（2）在每个RAPD反应中，可以只用一个引物，通过一种引物在两条DNA互补链上的随机配对实现扩增；（3）RAPD引物没有种属的界限，同一套引物可以应用于任何植物的研究；（4）RAPD可以覆盖整个基因组，反应整个基因组的变化；（5）RAPD分析只需要少量的模板，一次反应仅需要20-100ng，可以对DNA量很少的样品进行分析；（6）RAPD反应的退火温度低，一般为35-45℃，一方面保证引物与模板的稳定配对。

RAPD技术也有一些局限性，首先它是以PCR反应为基础，而且所使用的引物比较短，所以对反应条件极为敏感，稍有改变便影响扩增产物的重复性，因此

在实验方法上它存在着重复性差的缺点。即使对于同一材料使用同一引物，实验条件的细微变化，扩增产物就会有差异。但研究表明，只要反应条件保持不变，反应体系中的多种试剂来源和浓度保持一致，严格控制反应程序的各个环节及各个循环参数的稳定性，重复的结果是不难得到的^[3]。RAPD另一个缺点是它属于显性位点，因此在F₂代中无法区别纯合显性和杂合体的基因型。另外，RAPD标记的多态性取决于两亲本材料之间的亲缘关系的远近，以及反应条件的优化程度和电泳时琼脂糖的浓度也会影响到多态性的揭示。

与RAPD技术原理相似的分子标记还有DAF(DNA amplification fingerprinting)，共同点之处是：DAF采用的引物比RAPD引物更短，引物可以在基因组DNA中找到更多的靶位点，扩增产物将会出现更多的谱带，产生的多态性会更多，但是由于引物更短反应条件会更敏感，更易出现错配。

1.2.2 采用特定引物或引物对进行扩增

SSR (Simple Sequence Repeat) 又称微卫星DNA (Microsatellite)、短串联重复 (short tandem repeats. STR)，是一种由2~5个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列，它广泛分布于整个真核基因组的不同座位上，每个座位重复单位的数量可能不完全相同，因而形成多态性，其多态性又称为简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP)^[4]，即SSR分子标记。由于SSR位点两侧DNA顺序高度保守，可以通过设计特异性引物进行PCR扩增^[5]，扩增产物可利用电泳进行分离。当利用一对引物扩增不同基因型中的SSR位点时，通常可检测出SSR的多态性。

SSR作为一种新兴的分子标记具有许多优点：(1) 建立在PCR基础上；(2) 高度多态性；(3) 基因组中随机广泛分布；(4) 共显性遗传；(5) 结果定性好；(6) 易于实现自动化，SSR在生命科学研究中具有广阔的应用前景。因为SSR标记具有种族特异性，像大豆、棉花、水稻、葡萄、花生的SSR标记早已有人做过研究，引物序列也已公开发表，可以直接使用或其同属的植物转移使用。而像香蕉、橡胶、亚麻等很多植物至今还没有关于SSR标记的研究报道，也就是说没有相近物种的SSR标记可供转移使用，必须自己开发引物。因此需要筛选特异性引物，需要做大量的工作，费时，费力，且花费较大，已经成为SSR技术的开发的重要制约因素。

ISSR标记是基于SSR 发展起来的又一种新型的标记技术，具有和SSR一样的多态性^[6]。由于微卫星是随机分布在真核生物的基因组内，ISSR的基本原理是

利用人工合成的16-18个核苷酸重复序列(2、3、4或5核苷酸重复)作为引物,在引物的3'端或5'端加上2~4个随机选择但通常为简并的核苷酸,对SSR之间的DNA序列进行PCR扩增,而不是扩增SSR本身。与SSR不同,SSR标记必须依赖测序设计引物,耗时费力,在一定程度上阻碍了其广泛应用,ISSR最大的优点是不需要预先获知序列信息,直接采用半随机引物进行扩增,就可获得丰富的多态性,还能比RFLP、RAPD提供更多的遗传信息。

EST—SSR标记也是一种与SSR有关的新型分子标记,是由美国科学家Venter于1989年提出的^[7],EST(Expressed Sequence Tags,表达序列标签)—SSR来自表达基因,因而除具备传统基因组来源的SSR标记所有优势外,可能还与基因功能表达具有直接或间接关系,从而强化了SSR标记在遗传研究中的应用,并首先应用于人类基因组研究,之后被广泛用于植物基因组研究,它是通过大规模的cDNA随机测序,从而获得对基因组认识的一种研究策略。目前,许多国家和组织正在积极开展某些作物基因组EST计划的研究^[8-9]

SCAR分子标记技术是由Paran和Michelmore(1993)首次提出并应用;它是通过对多态性RAPD和AFLP产物测序的基础上,设计一对新的特异引物(20-24个碱基),特异地扩增一个在特定位点的DNA片段,一般是在原RAPD引物的3'与5'端延长14个碱基,利用两端各24个碱基的引物进行特异扩增。与RAPD方法使用较长的引物和高退火温度比较,该项技术具有高稳定性,有可以将显性RAPD标记转化为共显性的SCAR标记的可能性。而且如果是显性标记,则在检测中可以直接染色,而不需进行电泳检测等显著的优点,该方法已经成为育种在近几年开展的实践中直接应用的首选标记。在近几年开展的抗病基因标记研究中,许多研究者均将RAPD和AFLP标记转化为SCAR标记,并在转育后代中得到较好的验证^[10-11]。

1.2.3 PCR与限制性核酸内切酶相结合的方法

扩增片断长度多态性(amplified fragment length polymorphism)简称AFLP分子标记,是1993年由Zabeau和Vos发明并发展起来的一种检测DNA多态性的新方法^[12]。AFLP技术是RFLP和RAPD两种分子技术的结合,基本原理是对限制性酶切片段进行PCR扩增:DNA用限制性内切酶切割后,用专门设计的针对某种限制性内切酶的通用接头(adaptor)以及可与接头序列和限制性内切酶酶切位点序列配对的专用引物,对酶切的限制性片段进行扩增,扩增结果通过电泳显示。根据3'端的选择碱基种类与数目,就可调节AFLP产物的条带的特异性和数量。对于

不同材料来说，酶切片段的长度不同，会产生扩增产物长度的多态性。可以说 AFLP 技术是将 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性结合起来，克服了上述两种方法的缺点，被认为是迄今为止最有效的分子标记。其优点如下：具较高的可靠性和高效性、具有共显性和显隐性、多态水平最高、检测位点最多、操作简便、分子识别率最高、速度快、 T_m 值高、DNA 用量少等，可应用于任何 DNA 的研究。AFLP 是目前构建基因组特定区段高密度遗传连锁图谱最为有效的方法^[13-14]。但 AFLP 不是万用表，也存在一些缺陷，如对模板反应迟钝、谱带可能发生错配与缺失，成本较高，对技术要求苛刻等。

CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence, 酶切扩增多态性序列) 分子标记，CAPS 标记作为 PCR 和酶切技术相结合的分 子标记技术^[15]，与 AFLP 标记方法不同的是先扩增，再酶切扩增片段，检测酶切片段的长度多态性。最常用的是对 RFLP 标记、AFLP 标记进行转换成 CAPS 标记，其主要步骤是对上述标记使用的克隆进行测序，根据序列的信息设计一对引物，用该引物对基因组进行特异扩增，再用特异的限制性内切酶消化，电泳检测酶切产物的多态性，如果多态性与上述标记相符合，即获得了 CAPS 标记。由于 CAPS 标记应用的是特异性扩增和酶切。技术操作简单，结果重复性也好，实 验室间可共享资料，结果易于保存，另外，标记的位点为单拷贝或寡拷贝序列，为直接标记有益基因提供了捷径，优点相对其他标记来说还是有不可比拟的优越性^[16]。但对于大多数的单碱基差异，不一定能找到合适的内切酶来转化为可用的 CAPS 标记，且应用成本要较高，使该技术发展的制约因素。

1.2.4 单核苷酸多态性 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) 分子标记的方法

1994 年，单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, 简称 SNP) 这个术语第一次出现在人类分子遗传杂志上，随后 Lander 第一次正式提出 SNPs 为新一代分子标记^[17]，单核苷酸多态性 (SNPs) 是广泛存在于基因组中的一类 DNA 序列变异，其频率为 1% 或更高。它是由单个碱基的转换，颠换、插入及缺失等形式引起的点突变，稳定而可靠，并通常以二等位基因的形式出现。常用的 SNP 检测分析技术有：阵列杂交分析 (array hybridization assays)、基因芯片技术 (gene chips)、同源杂交 (homogenous hybridization)、限制性酶切法和 DNA 直接测序法 (direct sequencing)。由于 SNPs 的高密度特性，所以利用它就可以构建出目前最精细的遗传图谱。另一方面又由于它是基于单个核苷酸的替代，所以理论上可有可

能在核苷酸水平上将“遗传图”、“物理图”、“序列图”统一起来，在技术上又可能摒弃遗传标记分析技术的“瓶颈”——凝胶电泳技术，而将最新的非电泳分析技术用于统一的“基因组图”的构建。由于近几年SNP检测与分析技术的飞速发展，特别是DNA微阵列与芯片技术（基因芯片）相结合，使其迅速成为继RFLP和微卫星标记(SSRs)之后最有前途的第三代分子标记。采用大规模和高通量的方法来发现、检测、研究与利用SNPs，已引起了科学家和商业公司的极大兴趣和激烈角逐，其实质是一场“基因争夺战”。美国国立生物技术信息中心(NCBI)已建立了SNPs公用数据库，SNPs登记数目成几何级数增加。

SNPs是非常有用的分子标记，但也存在不少的问题。在制作SNP图、SNP分型、SNP结果分析等方面还存在一些问题：首先，制作SNP图理论上需要约500个有代表性的个体，以开发一套密度至少在100,000左右的SNP^[18]，即使在多重PCR和SNP芯片发展方面取得了很大进展，仍需要大量单个扩增反应对每个SNP进行靶扩增，但成本太高，一般实验室难以开展该工作。统计学上的准确性需要增加SNP的密度，但大批量扩增和检测反应所产生的错误信号也随之增加。其次，难以确定用哪个SNP解决错误的遗传问题，并对数据进行有效的分析。目前，对导致复杂性状的多因素遗传基础还缺乏了解，经典的孟德尔概念(两个等位基因，正常对异常)常常被用于分析复杂的问题。实际上，只有当导致复杂疾病的基因仅有一个野生型和一个易感等位基因，并且等位基因杂合度较低时，才能用统计学方法去分析遗传标记与疾病表型的关系。连锁分析在确定复杂性状的基因方面几乎未取得成功，遗传统计方法和工具也有待于开发和完善。此外，SNP还存在专利问题。因此，如果SNP的开发得不到足够的重视和经费支持，那么大量的SNP和cSNP就可以被大量的私人研究机构开发与占有，这对SNP的研究与应用是很不利的。

分子标记是一个发展十分迅速的生物技术，二十多年来，除上面所讲到的常用方法外，还有COS (Conserved Ortholog Set)技术、Mutiplex—CAPS技术^[19]、序列标志位点(Sequence—tagged sites, STSs)标记、SPAR (Single Primer Amplification Reactions)标记、AP~PCR(Arbitrary Primed PCR)等几十种标记方法。正在生物医学、农学、生物进化等众多领域发挥着巨大的作用。理想的分子标记必须达到以下几点要求：(1)多态性高；(2)共显性遗传，即可用它鉴别二倍体基因型；(3)遍布整个基因组；(4)除特殊位点标记外均匀分布；(5)能辨别等位基因；(6)选择中性，即无基因多效性；(7)检测手段简洁，快速，易

自动化；（8）开发和使用成本要尽量低廉；（9）实验室内和实验室间的重复性高。但目前还没有发现已有的任何一种分子标记能完全满足以上要求。

2 分子标记的植物研究中的应用

2.1 利用分子标记构建遗传图谱

分子遗传图谱是随着各类分子标记的发展而形成的现代育种观念，是指以遗传标记(已知性状的基因或特定DNA序列)间重组频率为基础的1条染色体或基因位点的相对位置线性排列图。遗传图谱作图的基本原理是染色体的交换与重组，即同源染色体减数分裂过程中发生交换，使染色体上的基因发生重组，两个基因之间发生重组的频率取决于他们之间的相对距离，因此只要准确地估算出交换值，进而确定基因在染色体上的相对位置，就可以绘制出连锁遗传图。遗传图谱的构建是基因组研究中的重要环节，是基因定位与克隆乃至基因组结构与功能研究的基础。构建一张高密度的遗传图谱有助于利用与重要基因紧密连锁的分子标记进行标记辅助选择育种，有助于对QTL的研究，有助于进行种质鉴定和进化关系的研究以及进行基因克隆和多聚基因家族研究，有着极其重要的意义。常用的构建分子遗传图谱方法有：

2.1.1 使用单一分子标记

自1980年Bestein首次提出利用分子标记建立遗传连锁图谱设想以来，1987年Donis—Keller等建立了第一张人的RFLP图谱^[20]，其饱和度远远超过了经典的图谱。之后许多生物(包括植物如玉米、番茄、水稻、小麦、太麦、燕麦、大豆、高粱、油菜、莴苣、)的RFLP图谱相继问世，其中水稻的连锁图上RFLP标记最多，饱和度最高，平均每条染色体上有近100个，即不到2厘摩(cM)就有一个标记^[21]。张蕴哲等利用毛新杨×毛白杨的杂交群体，选用19对PstI / MseI引物和4对EcoRI / IKseI引物，构建杨树的遗传连锁图谱，总图距4 418 cM，包含239个AFLP标记，22个含4个以上标记的连锁群，标记间的平均图距是18.5 cM，图谱中还有8个重复位点和7个只与连锁群中的某一个标记连锁的标记^[22]。向道权等利用中国农大培育的高产、多抗性玉米杂交组台农大3138的F₂家系为材料，构建了具有80对SSR标记的玉米遗传图谱，标记间平均距离25.42 cM，覆盖玉米基因组的2033.4 cM^[23]。李效尊等利用侧枝长势强、全雌性黄瓜自交系S06(欧洲温室型)和侧枝长势极弱、强雄性自交系\$52(来源于大别山农家品种)的杂交F₂代群体，构建了黄瓜的随机扩增多态性DNA(RAPD)分子遗传框架图谱，图谱中共包括79个RAPD标记，分属9个连锁群，总长度1110.0 cM，平均间距为13.7 cM^[24]。

陈书霞等以芥蓝C100-12 × 甘蓝秋50-Y7为杂交组合，构建了F₂作图群体，利用300个随机引物对两亲本进行了RAPD检测，共筛选到150个RAPD引物在亲本间表现多态，该图谱有96个多态性RAPD标记，9个主要的连锁图，覆盖基因总长度约为555.7 cM^[25]。宛煜嵩等利用大豆栽培品种晋豆23作母本，农家种灰布支黑豆作父本培育而来的F₁₀代RIL群体（Jinf）的472个家系，依据Gregan等1999年发表的大豆遗传图谱为蓝图，构建了一张含有227个SSR座位的大豆微卫星连锁图，总遗传距离2431.2 cM，相邻标记间的平均距离为8.3 cM^[26]。现在经济价值较高的植物大多已构建一种分子标记的遗传图谱，包括一些多年生的木本植物。

2.1.2 使用多种分子标记共同构建

单一分子标记构建的遗传图谱因为遗传标记较少，相邻标记间的距离较远，且标记分布不均匀。为了构建标记数更致密更完善的遗传图谱，近些年国内外开始采用多种分子标记整合来构建遗传图谱。2003年易克等利用可溶性固形物含量高、皮薄、感枯萎病的栽培西瓜自交系97103和可溶性固形物含量低、皮厚、抗病的野生西瓜种P1296341为亲本，获得F₈的重组自交系群体。通过16个SSR引物对和5个ISSR引物对该群体进行扩增，建立了一个包括38个SSR标记和10个ISSR标记组成的遗传图谱，该图谱总长558.1 cM，平均图距为11.9 cM^[27]。2004年杨俊品等利用玉米的两个栽培品种48-2×5003的166个F₂单株为作图群体，利用135个RFLP探针和131对SSR引物对亲本48-2、5003之间的多态性进行了检测，筛选出109个RFLP多态性探针和81对SSR多态性引物用于F₂群体分析，利用上述109个RFLP标记和81个SSR标记，构建了具190个RFLP、SSR标记199个标记位点的玉米分子遗传图谱，覆盖整个基因组2984.1 cM，标记间平均间距15.1 cM^[28]。2005年吕蓓等将52个AFLP标记整合到由宛煜嵩等构建的含有227个SSR标记的大豆遗传连锁图，绘制成一张含SSR-AFLP标记的大豆遗传连锁图，总遗传图距2512 cM，加入AFLP标记使得这些连锁群的标记密度有所增加，并且改善了标记分布的均匀性^[29]。2003年于拴仓等利用不同生态型的大白菜栽培种高代自交系177和276杂交获得的102份F₆重组自交系，通过对AFLP和RAPD两种分子标记进行遗传分析，构建了包含17个连锁群，由352个遗传标记组成的大白菜连锁图谱，其中包括265个AFLP标记和87个RAPD标记，该图谱覆盖基因长度2665.7 cM，平均图距7.6 cM^[30]。张海英等应用黄瓜的重组自交系群体中分离的200个AFLP标记、117个RAPD标记和5个SSR标记，进行连锁分析，得到一张包含9个连锁组

群的遗传图谱框架(图1), 其中包括141个AFLP标记, 89个RAPD标记和4个SSR标记, 该图谱覆盖基因组727.5 cM, 平均图距3.1 cM, 每个连锁群上的标记数在10~65之间, 长度在56.6~108.5 cM, 图谱密度1 cM / 标记~8.3 cM / 标记^[31]。

2.2 研究植物分类及遗传多样性

传统的植物学分类方法主要是形态标记分类法, 具有一定的不可靠性, 许多物种之间的分类关系及亲缘关系仍需进一步研究。分子标记的出现, 大大弥补了传统形态标记分类法的不足, 成为现代植物分类学研究的有力工具。将分子标记应用于确定亲本之间的遗传差异和亲缘关系, 可划分杂种优势群, 提高杂交优良潜力, 如黄益勤等利用RFLR分子标记对玉米种质进行杂种优势群的划分^[32]。程中平采用RAPD技术, 对桃、李、杏、梅、樱类植物中的223个试材进行了DNA扩增分析, 对22个随机引物180个位点上的RAPD带进行聚类分析, 认为桃、李、杏、梅、樱类植物可划分为桃属、李属、杏属和樱属^[33]。芥菜(*Capsla bursa—pastoris*)种以下的分类一直很混乱, 乔爱民等利用RAPD技术对芥菜的16个变种进行了分析, 结果将它们划分为3个组, 而传统的分类方法将它们划分为4个类群乃至4个亚种^[34]。侯和胜等利用40个引物芦荟属(*Aloe*)中的9种芦荟亲缘关系进行了初步的分析, 结果表明中国芦荟(*A. vera* var. *chinese*)和皮具刺芦荟(*A. aculeate*)具有较近的亲缘; 鹿角芦荟(*A. vera* var. *natalensis*)、木立芦荟(*A. arborescens*)和库拉索芦荟(*A. barbadensis*)具有较近的亲缘; 其中鹿角芦荟、木立芦荟的遗传距离特别近, 可认为是同一品种的变种, 由于形态上的一些分化而出现了不同的命名。皂质芦荟(*A. saponaria*)的亲缘关系较近, 朱旺纳芦荟(*A. juvenna*)与各品种之间都保持着相当远的遗传距离^[35]。

2.

利用分子标记进行基因定位和检测, 就是根据与目的基因连锁的分子标记来确定目的基因在遗传图上的位置, 或判断目的基因在杂文后代个体中的存在, 其中目的基因包括数量性状基因和质量性状基因。早在1923年, Sax就提出并用形态遗传标记进行数量性状基因定位, 但是由于形态等常规可分辨遗传标记数量极其有限, 进展一直很缓慢, 直到分子标记的出现, 才使得该项研究得到了迅猛发展。利用分子标记进行基因定位和检测关键是确立分子标记与目的基因的遗传连锁关系, 它有两方面的意义: 一是在植物育种中, 利用分子标记进行性状鉴定和选择, 这一技术被称之为标记辅助选择技术(Marker—As-sisted Selection,

简称MAS)。二是为分离和克隆基因提供了一个重要途径(map based clone) 尤其对基因产品不清楚的基因, 如果目的基因与分子标记很少或不发生重组, 表明分子标记位于目的基因附近, 这样我们就可以结合其它新技术, 如染色体行走和跳跃技术(chromosomal walking and jumping)、酵母人工染色体(yeast artificial chromosome)等, 达到分离和克隆基因目的。因此, 这两类性状在建立与分子标记连锁关系的方法上有着明显不同。

2.3.1 质量性状

目前, 这方面的研究多集中于抗病性状基因, 它的优势在于提供了一种不依赖于人工接种鉴定选择抗病基因的手段, 尤其对同时鉴定多个抗病基因的杂交后代个体具有接种鉴定无法代替的作用。有三种鉴定质量性状基因与分子标记遗传连锁关系的方法:

分离群体共分离法, 是通过分析抗病基因与分子标记在分离世代(如F₂, BC)的共分离关系将抗病基因定位在遗传连锁图上。一般包括三个步骤: (1) 构建分离遗传群体(如F₂, BC); (2) 检测分离群体每个成员的分子标记基因型, 并同时接种确定抗病性状基因型; (3) 构建包括抗病基因在内的遗传连锁图。如1998年Spielmeyer等通过构建AFLP标记遗传图谱, 将亚麻的抗镰刀菌枯萎基因定位在染色体上^[36]。

近等基因系(Near Isogenic Lines, NILs)法, 是通过检测近等基因系之间分子标记多态性来确立目标基因与分子标记的遗传连锁关系。根据回交育种原理, 如果分子标记在近等基因系间存在多态性, 则表明分子标记与抗病基因连锁, 近等基因系目的也在于此。在此基础上, 有必要再进行分离群体共分离分析加以验证和确定分子标记与抗病基因的遗传距离, 若有近等基因系可供利用, 此方法是比较理想的方法。如2002年, 薄天岳等利用基因系NM4, 完成了对亚麻抗锈病基因M4的定位^[10]。

分离群体分组分析法(Bulked Segregation Analysis), 该方法可看作是前一方法通类似于NILs, 故也称作近等基因池, 该方法可以克服许多作物没有或难以创造相应NILs的限制, 是由Michelmore等提出^[37]。抗病基因型将F₂分离群体分组(F₂个体基因型通过F₃家系分离来确定), 分别建立纯合型抗病类型和纯合感病类型混合DNA库, 之后对它们进行分子标记多态性分析。如2003年薄天岳等用高抗枯萎病亚麻品种“晋亚7号”与高感枯萎病品种“晋亚1号”配制杂交组合, 完成了对FuJ7(t)基因的分子定位^[11]。

2.3.2 数量性状

数量性状基因位点(Quantitative trait loci, QTL)定位在RFLP技术之前几乎是一个空白。目前已提出了许多利用分子标记进行QTL定位的方法,且不断有新方法提出。定位QTL所采用的遗传群体有分离群体(如F₂, BC₁)、重组自交系(Recombinant Inbred Lines)和双单倍体(Doubled haploid)。

分子标记是一项刚刚兴起的生物技术,具有十分广阔的发展前景。除了前面讲到的应用,还可在绘制品种、品系的DNA指纹图谱,品种鉴定,杂种优势分析与预测,分子标记辅助选择育种,种质资源的创新与鉴定等多方面发挥巨大的作用。

3 分子标记在亚麻中的应用

3.1 用于亚麻分类和遗传多样性的研究

在亚麻的生长过程中,由于受到环境和气候条件的影响,植物的外部形态和内部结构甚至基因组成方面都发生了变化。特别是亚麻已经有六七千年的栽培历史,经过漫长的人工选育,以及育种时常用栽培亚麻品种和亚麻属的不同植物、亚麻变种进行杂交,从而使亚麻属内种、亚种和品种之间的亲缘关系十分混乱。传统的从形态特征对植物进行分类的方法,面对这样复杂的关系根本无能为力。而分子标记直接从遗传物质DNA水平上去揭示它们之间的亲缘关系,就可以很容易的解决这个问题。2001年R.Van.Treuren等对来自CGN (the Centur for Genetic Resources, The Netherlands)的29份栽培亚麻样品和12份野生亚麻样品进行AFLP分析,这些材料仅有极少的文献资料,只是根据育种线索可分为‘M25’、‘Ru’和‘Rm’三大品种系,仅用2对引物在41份样品中就得到241条多态性片段,得出了M25’、‘Ru’和‘Rm’三大品种系内个样品之间的遗传距离,以及野生型和三大品种系之间的遗传距离^[38]。2003年O.V.Murarenko等对亚麻属的三种亚麻(Linum usitatissimum L. 2n=30、L.angustifolium Huds. 2n=30、L.bienne Miu 2n=30)和它们之间的杂种进行RAPD分析,共使用22个引物,结果表明三个物种间有较高的相似性,其中Linum usitatissimum和其他两种之间有明显的不同,而来自Linum usitatissimum和L.bienne的RAPD片段只表现有很少的不同。从而得出这样的结论:L.bienne是Linum usitatissimum的亚种,而不是一个单独的种,这三个物种都可以看作起源于最接近L.angustifolium的一个共同祖先^[39]。2005年5月Yong—bi Fu对PGRC (Plant Gene Resources of Canade)的2727份亚麻样品进行分析,这些样品是来自63个国家,其中54份样品来自亚麻属的26

个野生种，用16个RAPD引物分析，有149个RAPD多态性片段出现在每一个样品中，RAPD多态性片段出现的频率有一个较大范围从0.0004到0.9978，平均为0.537，大多数的(84.2%)RAPD多态性片段出现在每个国家的样品内，仅有15.8%的多态性出现在不同国家的样品内，来自东亚的样品和欧洲地区的样品有最大的不同，来自印度次大陆和非洲地区的样品与其它地区最截然不同，来自西亚地区的样品通常与来自非洲地区的样品有更多的联系，但和来自印度次大陆的样品有较少的关系。从而根据RAPD标记，建立了47个国家和一个野生群体的系统进化树，来自印度次大陆的样品和其他样品有最远的距离(0.19—0.32)，接下来是非洲(0.14—0.27)，西亚(0.06—0.22)，中亚(0.05—0.19)，其他7个地区的遗传距离不超过0.10^[40]。

此外，Yong—bi Fu等还得出亚麻的RAPD标记规律：(1) RAPD多态性在亚麻中通常表现较低；(2) 野生型亚麻的多态性大于栽培品种；(3) 籽用亚麻的多态性大于纤用和兼用亚麻；(4) 北美的籽用亚麻比来自其他国家的品种有更多的多态性；(5) 加拿大1980年以前培育的籽用亚麻比1980年以后培育的籽用亚麻有更多的多态性；(6) 北美籽用亚麻育种经过近百年的遗传侵蚀对基因组的影响很小^[41-42]

3.2 进行基因定位

基因定位就是寻找与目的基因紧密连锁的遗传标记并确定其在染色体上的位置，基因定位一直是遗传学研究的重要范畴之一，它对育种专家来讲非常重要，同时它对绘制生物的基因图和由此研究生物的进化关系也有重要的意义。目前对亚麻基因定位主要集中在抗性基因的研究，1999年G. Hausner等通过对来自北美的22个栽培品种研究，利用AFLP标记对亚麻抗锈病基因L2、L6、L11进行了分子标记定位^[43]。国内2002年，薄天岳等利用亚麻感病品种Bison作母本与含抗锈病基因M4的供体Victory杂交，并以Bison为轮回亲本进行连续12代回交育成M4的近等基因系NM4 (Near Lsogenic Lines. NILs)，首先用520个RAPD引物对NM4，Bison以及它们的F2代进行分析，得到RAPD标记OPA18432与M4基因紧密连锁，二者之间的遗传距离为2.1 cM，并将引物OPA18432转化为SCAR标记，完成了对亚麻抗锈病基因M4的定位^[10]。2003年薄天岳等利用高抗枯萎病亚麻品种“晋亚7号”与高感枯萎病品种“晋亚1号”配制杂交组合，接种鉴定其正反交F1代以及F2代分离群体，应用分离群体分组分析法，采用48个EcoRI /MseI引物组合进行AFLP分析，发现特异条带AG / CAG 与暂定名为FuJ7(t)的抗枯萎病基因紧密

连锁，二者之间的遗传距离为5.2 cM。将AG / CAG 片段回收、克隆和测序，成功地将其转化为SCAR 标记，完成了对FuJ7(t)基因的分子定位^[41]。这些抗性基因的定位对今后的分子育种工作将会有极大的帮助。

3.3 鉴定DH (double-haploid) 植株

亚麻是一种自花受粉植物，所以亚麻的栽培品种是纯系的，其单株是纯合的。对这种作物而言，常规育种方法即通过连续几代的近交选育建立纯系是比较耗时的，用单倍体技术进行亚麻育种有潜在优势，它不仅能够在一代中得到完全纯系，而且能建立有效的基因型选择方法。目前，在亚麻上要建立一个加倍的单倍体 (DH) 系列，花药培养是一个最成功的方法。然而在花药培养的可育植株中，来自于花药体细胞组织者高达50%。既然体细胞植株不是育种目标所需要的，就不得不对花药培养植株进行鉴定。以农艺性状的均一性为基础来鉴定加倍的单倍体植株，会拖延它们的应用并且增加劳动力和空间的消耗，因为一年的田间评估是必要的。而且，在田间进行农学性状的评价要受到环境条件变化的影响，毫无疑问，应用外部形态标记对加倍的单倍体体系 (DH) 进行鉴定很困难。因此，与用田间评估方法来鉴别加倍的单倍体体系 (DH) 相比较，用分子标记方法对小孢子起源植株进行早期鉴定是一个既快又有效而且节约成本的方法。基本原理是如果双亲均有一个特异的RAPD片段，则F1代的植株就会有两个多态性片段。即DNA片段是从两个位点扩增的。这样，来源于小孢子的植株可用分子标记进行分离。因为供试植株是杂合的，体细胞的植株与F1有相同的RAPD标记。Y. Chen等利用了3个RAPD引物和一个ISSR引物鉴定16株来自亚麻愈伤组织的幼苗，其中15株均是DH植株 (DH)^[44]。

3.4 构建遗传图谱

亚麻被认为起源于一个古老的四倍体，估计基因组为 7.0×10^8 bp ($2n=30$)，相对比较小，全部DNA仅占细胞核的2%，并且个染色体大小相似。已知大核糖体亚基RNA基因已经被定位在一个大的具中间着丝粒的染色体的两侧区域，并且占居了该染色体的一半以上^[45]，5srDNA被证实分散在多数染色体中^[46]，一个次要的45srDNA的位置被发现在一个小的染色体上^[47]。但是这些数据没有被放置到一个全面的连锁图谱中。直到1995年才有Cullis等成功构亚麻建出第一张亚麻遗传图谱，这张图谱有19个AFLP标记和69个RAPD标记，包含15个连锁群^[48]。1998年Spielmeyer等利用CRZY8/RA91的一个DH (double-haploid) 群体为研究材料，采用AFLP分子标记，产生213个AFLP标记位点，覆盖了1400 cM的长度，亚麻基

因的平均距离是10 cM，由18个连锁群组成，包含两个形态学特征（种子和花的颜色）的连锁关系的AFLP遗传图谱^[36]。到了2000年Gorman和Cullis利用栽培品种Koto和Leona杂交形成的F₂代群体，以及栽培品种CII303和tormont Cirrus杂交形成的F₂代群体构成的两个杂交系，使用20个AFLP引物和520个RAPD引物进行分析，构建了包含15个AFLP标记和80个RAPD标记，一个STS标记的包含15个连锁群，约1000 cM的遗传图谱^[49]，这是到目前为止科学家构建的三张亚麻遗传图谱。

构建亚麻遗传图谱首先可以鉴别出一些在亚麻品种中起重要作用的控制基因，进而明确环境因素在产生稳定的遗传变异中的作用；第二是可以开发出一套标记，能够在没有任何图谱的新品种或品种系中使用，通过显现特殊的染色体来介绍它们；特别是，一套锚定位点将能够快速鉴定任何新基因的连锁群，以及同样快速地鉴定任何染色体的重组。

3.5 进行种质资源管理

物种的遗传多样性是长期进化的产物，是其生存和发展的前提。对物种遗传多样性和遗传结构的研究，是探讨其适应性、生存力的基础，同时也是品种遗传改良的基础。所以许多国家和地区的有关机构会收集许多样品来充实自己的种质资源，如PGRC(Plant gene Resources Of Canada, the Canada national seed genebank)收集了来自全世界的2813份亚麻样品。利用种质资源特征的描述遗传资源管理的一个重要方法，可以鉴别收集到的样品之间的差距和重复的样品，从而建立起核心样品收藏，有助于增加收集规模，减少财务支出，提高管理水平，增加资源的利用效率。传统的种质资源管理是从形态特征的描述上进行分类的，可人们发现形态特征往往被制约，而且能够被环境条件强烈地影响，很难直接对大量的种质资源进行鉴别。现在在种质资源管理中，经常结合形态学分析和分子特征分析或者直接采用独有的分子标记，因为分子标记的直接是遗传物质DNA，可以直观地反映样品之间的差异。如2001年，R. Van. Treuren等对29份来自CGN(the Centur for Genetic Resources, The Netherlands)样品进行AFLP标记，仅用2对AFLP引物，就把29份样品缩减到14个^[38]。

从已有的资料显示，在亚麻的研究中，分子标记这一现代生物技术应用的人还很少，采用的多为AFLP标记和RAPD标记，并且主要是国外在进行，研究的样品和栽培品种也很少来自中国。对亚麻这一重要的经济作物，利用分子标记，进行分类和遗传多样性研究，构建遗传图谱，以及重要抗性基因定位和数量性状位点定位QTL (quantitative trait loci.) 将是十分重要的工作。

4 本研究的意义和目的

4.1 研究意义

我国地域辽阔，生态环境复杂多变，亚麻形态变异丰富多彩，经过劳动人民长期因地制宜选种培育，创造了不同类型的品种资源（包括许多纤用亚麻和油用亚麻以及兼用亚麻）。但是和发达的亚麻种植国法国，荷兰，加拿大等比较起来，我国的亚麻生产还处于十分落后的局面。其中选育“优质，高丰，抗逆性强，适应性广”的亚麻新品种，是当前亚麻生产中首先要解决的问题。因为在亚麻的生长期中，会受到许多病害（如亚麻锈病，亚麻枯萎病，亚麻白粉病等）的影响；此外，我国的亚麻种植区在亚麻生长期高温，干旱，以及土壤的盐碱化，都十分不利于亚麻的生产。而盲目从国外引种的话，因为亚麻品种有与其与之相适应的生态环境及栽培条件，对生态环境不适应就难以发挥其应有的作用。因此对于亚麻，特别是我国重要的亚麻品种，利用分子标记，进行分类和遗传多样性研究，构建遗传图谱，以及重要抗性基因定位和数量性状位点定位 QTL（quantitative trait locus）将是十分重要的工作。

另外，亚麻的物种分类尚未很好地解决，主要表现为种类数目不清和种名混乱。目前没有统一地分类鉴定标准。由于分类标准不统一，分类手段地局限性，导致了品种来源不清，品种亲源关系不明，品种命名杂乱，同样不利于亚麻种质资源的研究和品种地选育及推广。由此，利用现代生物技术从DNA水平上进行亚麻遗传多样性和分类研究显得尤为重要。而利用RAPD分析的优势在于不需要准备genomic或cDNA文库，就可以对任何物种的整个基因组进行DNA分子水平上的多态性检测，通过构建基因组指纹图谱并经统计分析为品种和品系遗传关系的确定提供依据。不同品种和品系树状图的建立不仅为遗传进化研究，而且可以为杂种优势利用亲本选配提供了分子依据，这样大大克服了工作的盲目性，提高了工作效率。

4.2 研究目的

（1）通过对四种DNA提取方法：SDS法、CTAB法、CTAB改良法和高盐低PH法对亚麻基因组DNA的方法，优化出一种适应亚麻基因组DNA的提取方法；

（2）建立RAPD-PCR反应体系，RAPD-PCR反应体系种包括buffer、dNTP、primer、TaqDNA聚合酶、去离子水及模板等成分。PCR反应中各成分的用量及成分之间量的比例关系是影响PCR结果的重要因素，通过本实验将筛选出最优的反应体系，提高RAPD技术的稳定性，从而便于RAPD结果在不同的实验室之间

交流:

(3) 利用RAPD技术, 对白花和山西大同两种重要的亚麻品种进行多态性分析, 筛选RAPD特异引物, 为构建我国的亚麻品种的遗传图谱奠定基础。

第二章 亚麻基因组DNA的提取

在进行 RAPD 反应之前, 需获得一定量的模板 DNA, 为了不使模板 DNA 的质量对分析结果造成明显的影响, 因此提取 DNA 的方法显得非常重要^[50-51]。DNA 的提取其最根本的要求是保持核酸的完整性, 基因组 DNA 产品的分子量应在 50Kb 以上。本实验在前人研究的基础之上, 通过对四种提取方法: SDS 法、CTAB 法、CTAB 改良法和高盐低 pH 值法的比较, 得出最适合 RAPD 分析的亚麻基因组 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本实验所采样品取自中国农科院麻类研究所苗圃。选取健壮幼苗, 用保鲜袋封存后置于贮存在 -80℃ 备用。供试的 2 份亚麻品种为纤用亚麻品种白花 (原产地法国-1 号) 和油用亚麻山西大同 (原产地中国-2 号)。本实验是在中国农业科学院麻类研究所农业部麻类遗传改良与工程微生物重点实验室完成的。

1.1.2 实验仪器

实验仪器主要有: 冰箱、超低温冰箱、泡沫冰盒、高温灭菌锅、液氮罐、微波炉、超纯水仪、紫外分光光度计、台式高速冷冻离心机、恒温水浴箱、真空冷冻干燥仪、超净工作台等。

1.1.3 实验试剂及药品

已用的试剂及药品主要有: SDS, EDTA (PH8.0), NaCl, β -巯基乙醇, 氯仿, 异戊醇, 乙醇, 醋酸钾 (KAC), PVP, 苯酚, NaAc, KAc, RNase (Rib nuclease, RNA 酶), Tris 碱等。

1.2 实验方法

1.2.1 亚麻基因组 DNA 提取

快速提取高质量的 DNA 是对植物基因组进行研究的基础, 目前, 国内外已有许多 DNA 的提取方法^[52-53], 这些方法因所研究的对象和目的不同而有差异。参照文献的 DNA 提取方法, 本实验选取了四种有代表性和综合效果较好的方法对亚麻的基因组 DNA 进行提取。

1.2.1.1 SDS 法

参考薄天岳等的方法^[10], 具体步骤如下: 2 g 冰冻材料, 放入置于冰上的研钵中, 加 4mL 提取液(0.4 molL⁻¹ NaCl, 10% PVP, 2% Na₂S₂O₅(焦亚硫酸钠))研磨成糊状, 均匀分装于 4 个 1.5 mL 灭菌离心管中, 于 1.2X10⁴ rpm 离心 4 min(4℃), 弃上清液, 沉淀加 600μL SDS 裂解液(0.1mol L⁻¹ Tris-HCl(pH8.0), 1.4mol L⁻¹ NaCl, 20 m mol L⁻¹ EDTA(pH8.0), 2% SDS, 2% Na₂S₂O₅)悬浮, 室温放置 10 min, 不时轻摇动。10000 rpm 离心 10 min, 弃沉淀。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25/24/1), 温和上下颠倒混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。逐滴加入 2/3 体积的冰异丙醇, 温和颠倒 3—5 次, 直至絮状沉淀集结, 在-20℃冰箱中置 20 min, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇漂洗 2 次; 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 μL ddH₂O 中。加入 5 μL RNase, 37℃保温 1 h。加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管(重复一次)。加入 1/10 体积的 NaAc, 混匀, 再加入 2 倍体积的冰乙醇, 在-20℃冰箱中置 20 min。挑出絮状 DNA, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇漂洗 2 次, 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 μL ddH₂O 中。检测 DNA 的浓度和纯度, 置-20℃冰箱保存。

1.2.1.2 CTAB 法

具体步骤如下: 1.5 mL 离心管加入 750 μL 植物裂解液(100 mmolL⁻¹ Tris-Cl(pH8.0), 20 mmolL⁻¹ EDTA(pH8.0), 1.4 molL⁻¹ NaCl, 2 g CTAB, 2 mL 巯基乙醇), 65℃预热。取 2 g 冰冻亚麻幼苗, 用液氮研磨成粉末, 将植物组织粉末迅速装入之前的 1.5 mL 离心管; 混匀, 置 65℃水浴 30 min。10000 rpm 离心 10 min, 弃沉淀。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25/24/1), 温和上下颠倒混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。逐滴加入 2/3 体积的冰异丙醇, 温和颠倒 3—5 次, 直至絮状沉淀集结, 在-20℃冰箱中置 20 min, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇漂洗 2 次; 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 μL ddH₂O 中。加入 5 μL RNase, 37℃保温 1 h。加入加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管(重复一次)。加入 1/10 体积的 NaAc, 混匀, 再加入 2 倍体积的冰乙醇, 在-20℃冰箱中置 20 min。挑出絮状 DNA, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上

清, 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次, 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 $\mu\text{LddH}_2\text{O}$ 中。

1.2.1.3 CTAB 改良法

采用改进的 CTAB 法^[54]: 1.5 mL 离心管加入 750 μLCTAB 植物裂解液, 65°C 预热。取 2 g 冻存亚麻幼苗, 加入 0.2 g 非水溶性的 PVP, 用液氮研磨成粉末, 将植物组织粉末迅速装入之前的 1.5 mL 离心管, 混匀, 置 65°C 水浴 30 min。10000 rpm 离心 10 min, 加入 250 μLKAc , 混匀, 0°C 冰箱中置 20 min, 10000 rpm 离心 10 min, 弃沉淀。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1), 温和上下颠倒混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管。逐滴加入 2/3 体积的冰异丙醇, 温和颠倒 3—5 次, 直至絮状沉淀集结, 在 -20°C 冰箱中置 20 min, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次; 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 $\mu\text{LddH}_2\text{O}$ 中。然后加入 5 μLRNase , 37°C 保温 1 h。加入加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 转入新的离心管(重复一次)。加入 1/10 体积的 NaAc, 混匀, 再加入 2 倍体积的冰乙醇, 在 -20°C 冰箱中置 20 min。挑出絮状 DNA, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次, 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 100 $\mu\text{LddH}_2\text{O}$ 中。检测 DNA 的浓度和纯度, 置 -20°C 冰箱保存。

1.2.1.4 高盐低 pH 值法

参考文献^[55]中的方法, 具体步骤如下: 称取 2 g 冻存亚麻幼苗于研钵中, 加液氮充分研磨至粉状, 迅速加入 1.5 mL 提取缓冲液 (100 m molL^{-1} NaAc, 50 m molL^{-1} EDTA, 500 m molL^{-1} NaCl, 1.4% SDS, 4 g PVP), 大致平均分配于两个 1.5 mL 的离心管中, 于 65°C 水浴 45 min, 其间不时轻轻摇动几次; 离心(4°C, 10000 rpm, 10 min), 取上清, 加入 2/3 体积 pH4.8 的 2.5 m molL^{-1} KAc, 混匀后于冰上放置 30 min 沉淀蛋白质; 离心(4°C, 10000 rpm, 10 min); 取上清, 加入 2/3 体积的 -20°C 预冷的异丙醇沉淀 DNA, 于 -20°C 的冰箱放置 30 min; 挑出析出的 DNA 沉淀, 沉淀溶于 0.5~1 mL 无菌水中, 离心(4°C, 10000 rpm, 10 min); 取上清, 加入 0.6 倍体积的 -20°C 的异丙醇, 混匀后, 离心(4°C, 10000 rpm, 10 min), 收集 DNA 用 70% 的乙醇洗涤沉淀 2~3 次; 在 4°C 冰箱中干燥或在超净工作台上快速吹干; 最后, 视 DNA 量的多少, 溶解在 100 $\mu\text{LddH}_2\text{O}$ 中, 分装后存放于 -20°C 冰箱中待用。

1.2.2 四种提取方法获得的DNA检测

1.2.2.1 DNA的纯度和浓度检测

对以上四种方法的获得DNA进行纯度和浓度进行检测，DNA的质量检测在DU-640核酸蛋白质分析仪上进行。取1 μ L的DNA溶液和99 μ L的超纯水于石英比色皿中，混匀，以超纯水为对照溶液，测定波长为260 nm、280 nm的OD值。

1.2.2.2 DNA的电泳检测

参考《分子克隆实验指南》第三版上册，配置1.0% (W/V) 的琼脂糖凝胶，将上述四种方法提取的总DNA点样，于1 \times TAE缓冲液中电泳，待溴酚兰迁移至琼脂糖凝胶一半处，取出胶，在凝胶分析系统中观察并拍照记录。

1.2.3 样品总DNA提取

利用最适宜的亚麻提取样本中的DNA提取后，在DU-640核酸蛋白质分析仪上进行检测，根据检测得到各样品DNA的浓度，统一配制成浓度为40 ng μ L⁻¹的模板DNA，用1.5 mL的Eppendorf管分装，贮存于-20 $^{\circ}$ C^[56-57]备用（在每管上注明提取日期）。

2. 结果与分析

2.1 四种提取方法获得的DNA纯度和浓度检测结果

DNA进行紫外吸收检测和电泳检测，计算OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值以得到样品得纯度，并按照DNA总含量 (μ g mL⁻¹) = OD₂₆₀×50×稀释倍数，计算出四种方法提取样品的DNA浓度。DNA检测结果见表1。

结果表明：四种方法提取的DNA，完整性好，A₂₆₀/A₂₈₀的值在1.6~1.9之间，都可以用于亚麻基因组DNA的提取，其中高盐低PH法提取的DNA浓度太低；SDS法和CTAB法的OD₂₆₀/OD₂₈₀偏低，说明样品DNA中蛋白质和酚类物质还没有完全清除；CTAB改良法提取的DNA浓度适中且OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.8223，从DNA纯度和浓度检测结果分析，可以看出CTAB改良法效果最好。

2.2 四种提取方法获得的DNA电泳检测结果

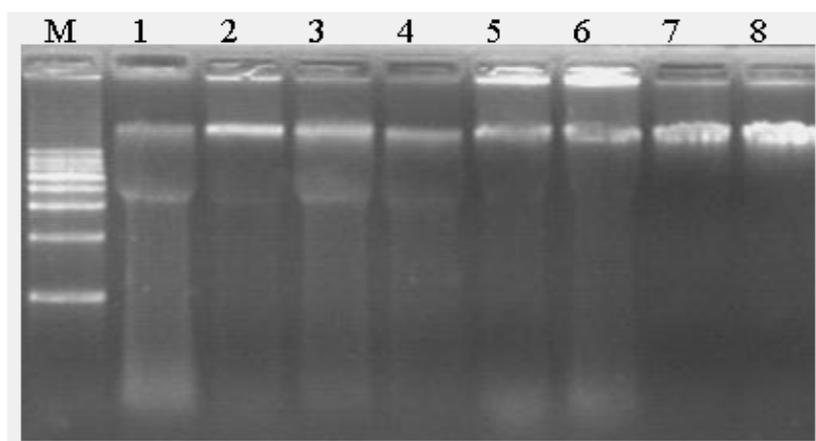
利用凝胶分析系统中观察并拍照记录。得到电泳图1。

四种方法的DNA电泳结果表明(图1)，除个别样品有轻微的拖尾现象外，其它样品的DNA均成整齐划一的带型，说明样品在DNA提取过程中保存了较好的完整性。亚麻富含多糖，用高盐低PH值的DNA提取方法，沉淀出的DNA具有很强的粘连性，电泳检测时，DNA难以从点样孔跑出，这可能是由于高浓

度的多糖所致，它与 DNA 不可逆的结合及不易分离有关。

表1： 四种方法提取1号样品总DNA的纯度和浓度

方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	Con (μg mL ⁻¹)
SDS	0.0932	0.0559	1.6686	116.498
CTAB法	0.2140	0.1263	1.6653	262.995
CTAB改良法	0.3403	0.1867	1.8223	425.378
高盐低PH法	0.0737	0.0405	1.817	92.114



(M:Marker ;1,2: CTAB法;3,4:CTAB改良法;5,6:高盐低PH法;7,8:SDS法)

图 1: 四种方法提取的 DNA 电泳结果

Figure1 The genomic DNA extracted with four different methods

提取的 DNA 经过酒精清洗并吹干后，肉眼观察发现高盐低 PH 值法和 SDS 区室法提取的 DNA 实验效果不佳。高盐低 PH 值法和 CTAB 法提取的 DNA 中存在较多的蛋白质杂质，SDS 法提取的 DNA 中混有褐色杂质，可能为酚类物质氧化所产生。因此，四种提取方法的优劣顺序为:改良 CTAB 法>CTAB 法>高盐低 pH 值法>SDS 法。经过改良的 CTAB 法增加了盐的浓度，能有效去除多糖的含量，获得较纯的 DNA。本实验选用 CTAB 改良法。

3 讨论

3.1 提取 DNA 时在操作上应注意的问题

在进行RAPD反应之前，需获得一定量的模板DNA，为了不使模板DNA的质量对分析结果造成明显的影响，因此提取DNA的方法显得非常重要。DNA的提取其最根本的要求是保持核酸的完整性，基因组DNA产品的分子量应在50Kb以上，而在DNA提取的过程中是有许多因素导致DNA降解成小片段：（1）物理因素降解。因为DNA分子量较小，机械张力或高温很容易使DNA分子发生断裂，因此，在操作时应尽可能轻缓、温和，尽量避免过多的溶液转移，剧烈的震荡等以减少机械张力对DNA的损伤，同时，也应避免过高的温度研磨成粉末后加入提取液，因冷却成块，不能用力研磨，应自然化冻，否则得不到大片段DNA。

（2）细胞内源DNA酶的作用，DNA酶可以降解DNA，为避免和钝化DNA酶的作用，在溶液中常加入EDTA来螯合 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ，因为 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 是DNA酶的辅因子。（3）PH会影响DNA的产量和质量，如在过酸的环境下，由于DNA脱嘌呤而导致DNA的不稳定，极易在碱基脱落的地方发生断裂，因此，在DNA的提取过程中，应避免使用过酸的条件，本实验提取液PH值均调至8.0。

为了获得大片段亚麻基因组DNA，有利于下一步试验的进行，在DNA提取操作时必须要注意：

（1）材料用液氮速冻磨碎后，要立刻转入核分离液中，这样既减少了植物叶片组织与空气接触的时间，防止酚类物质被氧化变成棕褐色，又防止了植物叶片受到伤害后活性增加的DNase降解DNA，保证了基因组的完整性。

（2）第二步是在65℃水浴中进行的，在这一步中温度回升时，多酚氧化酶即恢复活性，因此应避免材料与空气接触，管壁和管盖上不能有植物组织残留，在液面上可用一层新鲜核分离液来隔离空气；在水浴过程中，不要摇动Eppendorf管，虽然这样做会影响产量，但能最大程度地防止多酚的氧化。

3.2 提取 DNA 时细胞次生代谢物质的影响

植物细胞储存了大量的、种类繁多的次生物质，这些物质在提取DNA的过程中，与DNA共沉淀，形成黏稠的胶状物，难以溶解或产生褐变。这样的DNA是无法用于后续分子生物学研究和分析的，所以，去除多糖和多酚等次生物质，对提取和纯化植物DNA来说很重要。在去除多糖类物质中，表面活性剂CTAB比SDS的效果好，适当地提高CTAB和巯基乙醇的含量（不低于1%）能有效地去除多糖等次生物质。另外，由于DNA在低浓度乙醇盐溶液中的沉淀速度远远高于多糖和色素等物质，在DNA提取过程中，植物中含有的多酚类物质在多酚氧化酶的催化作用下会发生氧化反应，致使提取出来的DNA质量降低，本实验采用

CTAB改良法。一般植物组织中的多糖及其他一些次生代谢产物的含量随植物组织器官的生长而增加，因此，试验中选用亚麻幼苗作提取材料可降低上述影响。

为去除多酚类次生物质，在提取介质中必需加入的是 β -巯基乙醇，它的作用是提供-SH，与多酚类物质竞争氧，因而有效地防止了酚氧化为醌，避免褐变。其终浓度范围是0.1-2% (V/V)，不同材料，使用的浓度不同，本实验使用的浓度为1%，低于此浓度抑制褐化；浓度过高，DNA产率低。PVP能与多酚结合形成一种不溶的络合物，也能有效去除酚，通常与抗氧化剂一起使用，终浓度为2% (W/V)。抗氧化剂 β -巯基乙醇和PVP必须研磨时临时加入，否则无效。且在研磨时加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)并用较高浓度的盐溶液和较低的酸性介质防止酚类化合物的进一步氧化。

3.3 亚麻DNA提取方法及提取质量

植物材料DNA的提取质量往往实决定PCR成功与否的关键，因而保证实验的顺利进行，必需有一套高效快速的DNA提取方法^[58-62]。影响提取的DNA质量的因素很多，在实验中必须保证每一个步骤的严谨性，保证实验条件的统一性，这样实验的结果才具有意义。目前，在DNA提取方法这一研究领域中，其方法很多，但是往往大同小异，主要是根据研究对象和目的的不同而有所差异。通过实验证明：SDS法、CTAB法、CTAB改良法和高盐低PH法皆可用于亚麻DNA的提取。其中以CTAB改良法提取的DNA浓度最高。故本实验对亚麻总DNA提取采用CTAB改良法。

质量好的DNA（适合RAPD-PCR反应），其 OD_{260}/OD_{280} 值应介于 1.8 ± 0.1 。当 OD_{260}/OD_{280} 大于1.9时表明有RNA污染，小于1.6时表明有蛋白质或酚类物质污染。若DNA不够纯，由于RNA或非核酸类杂质的干扰，通过紫外线吸收测算数据可能会有出入。这时通过电泳检测结果更加可靠。

第三章 RAPD 反应体系的优化

RAPD反应体系组分包括模板、dNTP、Taq酶、 Mg^{2+} 、Buffer和引物；反应参数包括循环次数、退火温度、延伸时间等。上述反应体系中各组分及反应参数对RAPD技术的稳定性和重现性有很大的影响^[63]，因此确定好最佳的反应组分和反应参数才能保证整个反应体系的稳定性和重现性，进而保证整个试验结果的可靠性。确定好最佳的反应组分和反应参数，才能进行引物筛选工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

采用第二章的 CTAB 改良法提取的白花和山西大同两个亚麻品种的基因组 DNA。

1.1.2 实验药品

琼脂糖、溴酚蓝、二甲苯菁、冰乙酸、PCR-buffer, dNTP, Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、EB 等。随机引物是从上海生工公司订购的 10bp 引物。

1.1.3 主要仪器及设备

超低温冰箱、台式高速冷冻离心机、Biometra PCR 仪、紫外可见分光光度计、电泳仪、水浴锅、移液枪、凝胶成像系统、高压灭菌锅、超纯水仪、微波炉、干燥箱、研钵、天平、超净工作台、低温冰箱等、垂直板电泳槽等。

1.2 实验方法

1.2.1 RAPD反应体系优化的梯度实验

进行影响RAPD反应稳定性的各个因素的梯度实验，包括模板DNA、引物、dNTP、Taq聚合酶、 Mg^{2+} 浓度以及对PCR反应程序的退火温度和循环次数。

1.2.2 正交试验

为了保证试验结果的可靠性，采用正交设计试验来验证上面的试验结果因素三水平 $L_9(3^4)$ 。正交设计试验采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ ，即模板30 ng，40 ng，50 ng； $2U \mu L^{-1}$ Taq酶分别为0.25 μL ，0.5 μL ，0.75 μL ；10 mmol L^{-1} dNTP 分别为0.25 μL ，0.5 μL ，0.75 μL ；10 $\mu mol L^{-1}$ 引物分别为1.5 μL ，2.5 μL ，3.5 μL 。试验设计见表3。

表2: L₉ (3⁴) 正交试验表Table2 Orthogonal Table of L₉ (3⁴)

列号 试验号	模板	Taq酶	dNTP	引物
1	1 (30 ng)	1 (0.25 μL)	1 (0.25 μL)	1 (1.5 μL)
2	1 (30 ng)	2 (0.5 μL)	2 (0.5 μL)	2 (2.5 μL)
3	1 (30 ng)	3 (0.75 μL)	3 (0.75 μL)	3 (3.5 μL)
4	2 (40 ng)	1 (0.25 μL)	2 (0.5 μL)	2 (2.5 μL)
5	2 (40 ng)	2 (0.5 μL)	3 (0.75 μL)	1 (1.5 μL)
6	2 (40 ng)	3 (0.75 μL)	1 (0.25 μL)	3 (3.5 μL)
7	3 (50 ng)	1 (0.25 μL)	3 (0.75 μL)	2 (2.5 μL)
8	3 (50 ng)	2 (0.5 μL)	1 (0.25 μL)	3 (3.5 μL)
9	3 (50 ng)	3 (0.75 μL)	2 (0.5 μL)	1 (1.5 μL)

2 结果与分析

2.1 梯度实验的结果

2.1.1 模板对RAPD结果的影响

在 RAPD 反应中, 必须对模板 DNA 浓度进行最优化选择, 最佳的模板浓度范围取决于所研究的类群与模板纯度。不同类群的 DNA 进行 RAPD-PCR 时, 模板的最适浓度范围不一, 一般为 20-80 ng^[64]。DNA 模板含量是 PCR 扩增的重要因素, 含量过高会出现非特异性扩增条带甚至抑制扩增, 过低则得不到所需的扩增产物。已经通过实验证明在一定的浓度范围内扩增出的图谱变化不大, 本试验设计了以下几个浓度梯度 (ng/反应): 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng, 60 ng; 10 mmolL⁻¹Buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μL, 2U μL⁻¹ Taq 酶 0.5 μL, 10 mmol L⁻¹dNTP0.5 μL, 10 μmol L⁻¹引物 2.5 μL, 其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 25 μL。研究发现: 在一定的模板浓度范围内扩增出的图谱变化不大, 最适合亚麻 RAPD 分析的 DNA 模板浓度为 40 ng。因此本实验采用的模板浓度为 25 μL 的反应体系中模板 DNA 40 ng。模板 DNA 纯度对 RAPD 反应影响不大。当模板的最适浓度确定后, 各种方法提取的 DNA 均能获得一致的扩增结果。实验结果见图 2。模板中一定量的蛋白质或 RNA 不影响扩增, 但是 DNA 模板中残留的微量氯仿、

SDS, CTAB、异丙醇等小分子有机物却能显著抑制 Taq DNA 聚合酶的活性，从而影响扩增结果。因此，当 DNA 样品中杂质含量过高时应进行纯化。

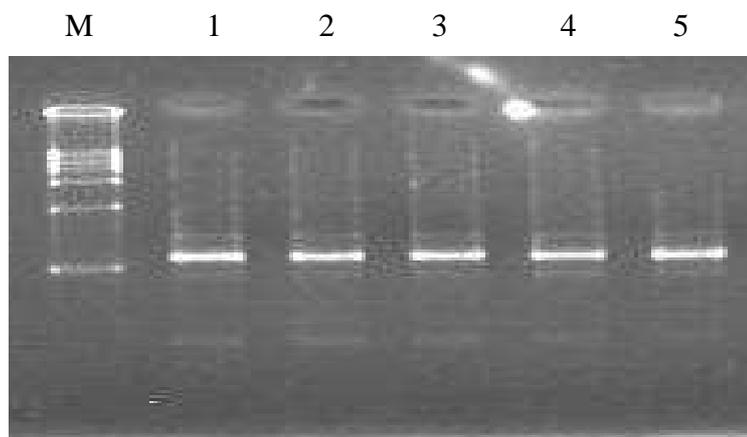


图 2： 以引物 3 优化模板浓度

泳道1-5分别对应引物浓度为20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng, 60 ng

Figure2 Optimize the model solution with primer 3

2.1.2 引物浓度对 RAPD 的影响

引物浓度的变化实质上是改变了引物与模板配对机率，从而影响扩增效率。引物浓度过低，引物与模板的结合机率降低，扩增反应过早终止，扩增条带过浅甚至不能得到可观察的结果；引物浓度过高，引物与模板非特异性配对增加，出现非特异性扩增增加，使得带型弥散模糊。在 RAPD-PCR 中，模板与引物浓度的比例影响扩增产物的质与量，直接关系到引起非特异性扩增。因此，本实验在前人基础上做 5 个引物浓度梯度，每反应体系中分别加入浓度为 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的引物：1.5 μL , 2.0 μL , 2.5 μL , 3.0 μL , 3.5 μL ；10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL , 10 mmol L^{-1} dNTP 0.5 μL , 2U μL^{-1} Taq 酶 0.5 μL , 模板 40 ng, 其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 25 μL 。根据扩增结果，同时考虑到试验结果的可靠性和节约成本，引物最佳浓度为每反应体系 2.5 μL 。扩增结果如图 3。

2.1.3 Taq 酶浓度对 RAPD 结果的影响

Taq 酶在 PCR 中的用量受反应体积、酶的活性及酶的耐热性等因素的制约。高浓度的 Taq 酶不仅会造成经济上的浪费，而且容易产生非特异扩增产物的积累，从而影响试验结果；Taq 酶过低会使新链的合成效率下降，从而导致扩增产物的减少。从大多数文献^[65-66]来看，在 25 μL 的反应体系中，酶的用量在 0.5-2U 时可以得到可重复的清晰条带。本试验在前人的研究基础上设置 5 个 Taq 酶浓度

梯度，浓度分别，每反应体系中分别加入浓度为 $2 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ 的 Taq DNA 聚合酶： $0.125 \mu\text{L}$ ， $0.25 \mu\text{L}$ ， $0.5 \mu\text{L}$ ， $0.75 \mu\text{L}$ ， $1.0 \mu\text{L}$ ； 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) $2.5 \mu\text{L}$ ， $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 $2.5 \mu\text{L}$ ， 10 mmol L^{-1} dNTP $0.5 \mu\text{L}$ ，模板 40 ng ，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 $25 \mu\text{L}$ 。根据扩增结果，同时考虑到试验结果的可靠性和节约成本，Taq DNA 聚合酶最佳浓度为每反应体系 1 U 。

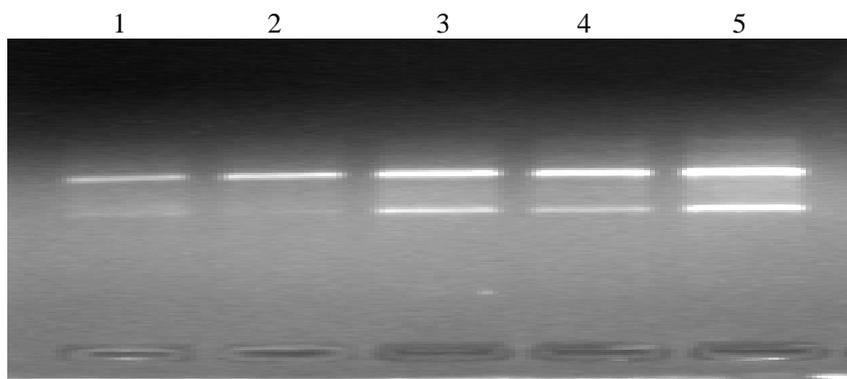


图3：不同引物浓度的RAPD扩增结果

泳道1-5分别对应引物浓度为 $1.5 \mu\text{L}$ ， $2.0 \mu\text{L}$ ， $2.5 \mu\text{L}$ ， $3.0 \mu\text{L}$ ， $3.5 \mu\text{L}$

Figure3 Results of RAPD Amplification with Differentai Primers Concentrations

2.1.4 dNTPs浓度对RAPD结果的影响

PCR反应体系中的dNTPs是进行DNA扩增的原料，dNTPs浓度直接影响对RAPD扩增产物的产量、特异性以及合成的忠实性^[64-67]。过高的dNTPs浓度将有可能造成非靶序列结合和延伸时核苷酸的错误渗入，降低精确性，而且还会于反应混合物中的Taq DNA聚合酶竞争 Mg^{2+} ，抑制聚合酶的活性，造成弥散现象或非特异性带的产生；而低浓度的dNTPs则会影响合成效率，使dNTPs过早消耗完，而使产物单链化，影响扩增产量，导致反应速度的下降，从而产生的扩增条带很弱。另外，过多的冻融会使产生降解^[68]。本实验在前人基础上做5个dNTPs浓度梯度，每反 $25 \mu\text{L}$ 应体系中分别加入浓度为 10 mmol L^{-1} dNTPs： $0.125 \mu\text{L}$ ， $0.25 \mu\text{L}$ ， $0.5 \mu\text{L}$ ， $0.75 \mu\text{L}$ ， $1.0 \mu\text{L}$ ； 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) $2.5 \mu\text{L}$ ， $2 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ Taq酶 $0.5 \mu\text{L}$ ， $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 $2.5 \mu\text{L}$ ，模板 40 ng ，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 $25 \mu\text{L}$ ，扩增结果如图5。dNTPs浓度最佳浓度为每反应体系为 10 mmol L^{-1} dNTP的 $0.5 \mu\text{L}$ 。

2.1.5 Mg^{2+} 浓度对RAPD的影响

Mg^{2+} 是PCR反应中的一个重要因素^[69-72]，它不仅会影响 Taq DNA 酶的活性，

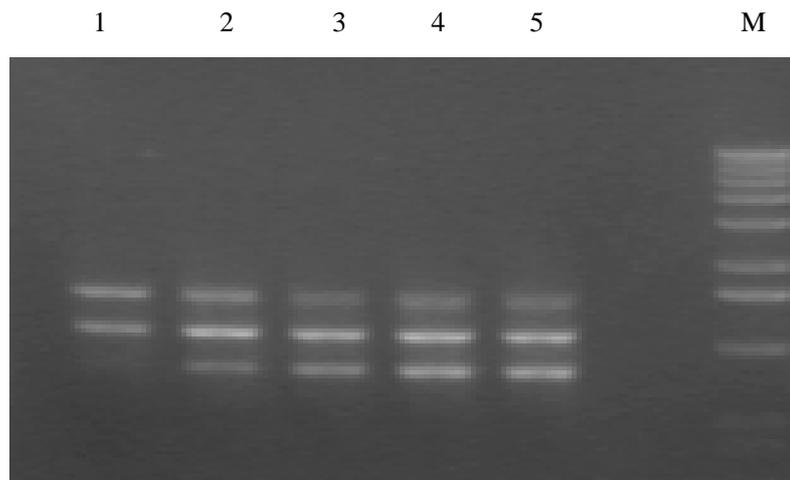


图4: 不同Taq酶浓度的RAPD扩增结果

泳道1-5分别对应每反应体系中加入浓度为 $2U/\mu L$ 的Taq酶: $0.125 \mu L$, $0.25 \mu L$, $0.5 \mu L$, $0.75 \mu L$, $1.0 \mu L$

Figure 4 Results of RAPD Amplification with Different Taq Polymerase Concentrations

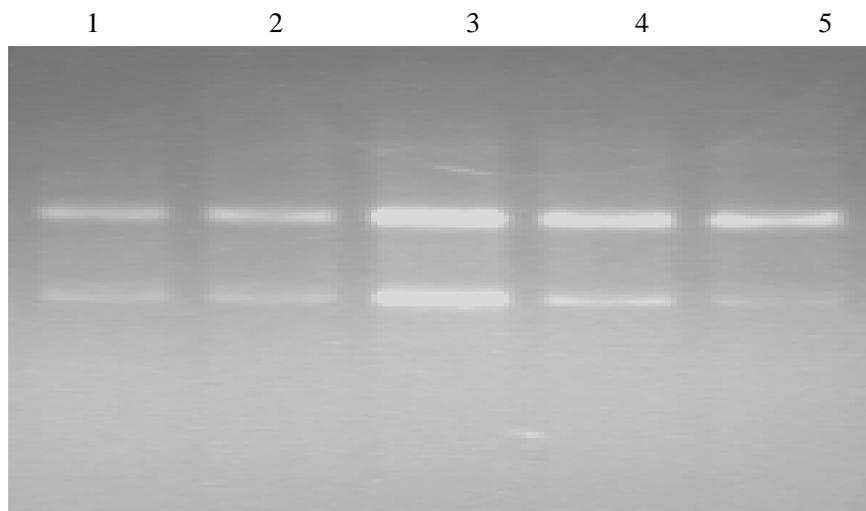


图5: 不同dNTP浓度对RAPD扩增结果

Figure 5 Results of RAPD Amplification with Different dNTP Concentrations

泳道1-5分别对应每反应体系中加入浓度为 10 mmol L^{-1} dNTP: $0.125 \mu L$, $0.25 \mu L$, $0.5 \mu L$, $0.75 \mu L$, $1.0 \mu L$

还会影响引物与DNA模板的结合效率、模板与PCR产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成。这是因为 Mg^{2+} 是Taq DNA酶的激活剂, Mg^{2+} 浓度过低, Taq

DNA酶的作用效率也低，但 Mg^{2+} 浓度过高，对扩增反应的效果也不利，可能会产生非特异性的扩增，导致带型弥散模糊。根据前人的经验，本实验的反应体系中加入 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) $2.5\ \mu\text{L}$ ，则 Mg^{2+} 为 1.0 mmol L^{-1} 。

2.1.6 循环次数对 RAPD 的影响

扩增循环数关系到 RAPD 扩增产物的多少，在一定的范围内，每一循环都使特异区段拷贝增加一倍。理论上，在反应中模板 DNA 的部分区段以几何级数扩增：但反应并不是无限的，经过一定次数的循环，随着 dNTP 和引物的耗尽，Taq DNA 聚合酶的失活等，扩增就会进入线性或停止阶段。本实验在前人基础上做 5 个循环次数梯度：30、35、40、45、50；反应体系中加入 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) $2.5\ \mu\text{L}$ ， $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 $2.5\ \mu\text{L}$ ， 10 mmol L^{-1} dNTP $0.5\ \mu\text{L}$ ， $2\text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 $0.5\ \mu\text{L}$ ，模板 $40\ \text{ng}$ ，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 $25\ \mu\text{L}$ 。根据扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中的分离结果，30 个循环时扩增出的带型很弱，35 个循环时只有几个别的带有点弱和模糊，40 个循环可以得到较好的扩增图谱，从试验结果中发现最佳的循环次数应为 40 次。本实验扩增选用 40 个循环。

1 2 3 4 5

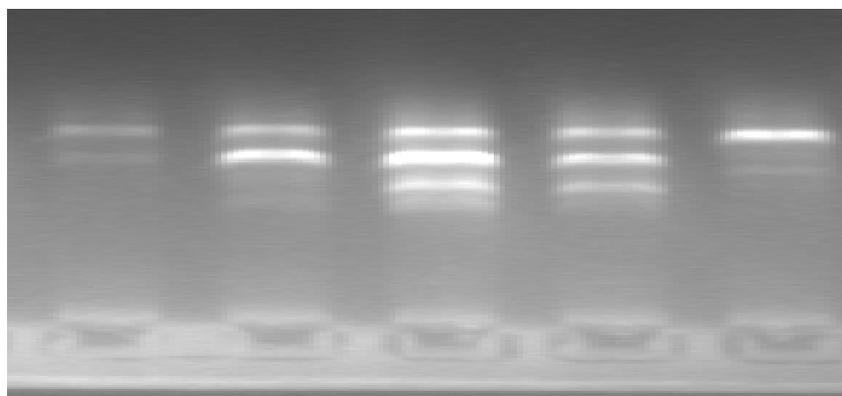


图6：不同循环次数对RAPD扩增结果

Figure 6 Results of RAPD Amplification with Differentiai Cycles

泳道1-5分别循环次数：30，35，40，45，50

2.1.7 退火温度和时间对 RAPD 的影响

退火温度是影响扩增特异性的主要因子之一。理论上讲，在一定温度范围内，退火温度越高扩增特异性越高，随着温度的降低扩增产物的特异性也降低。与退火温度相同，退火时间也影响扩增的特异性。在 RAPD 反应的退火温度下，Taq

DNA 聚合酶仍具有一定的活性，退火时间延长，引物与模板 DNA 非特异性配对机会增大，产生非特异性扩增产物。已经通过实验证明，退火温度在 34℃~38℃ 的范围内，扩增的带型基本一致，而温度过低(34℃以下)则带数少且模糊；温度过高(40℃以上)则带型太强，可能出现非特异性扩增，对扩增的结果产生不利影响。因此，本实验选择 37℃的退火温度。

2.2 正交试验的结果

琼脂糖凝胶电泳检测结果，如图7。

从电泳图发现，其中最佳方案为4，即每反应体系中:模板40 ng，10 mmol L⁻¹Buffer(含Mg²⁺) 2.5 μL，10 μmol L⁻¹引物2.5 μL，10 mmol L⁻¹dNTP0.5 μL，2U μL⁻¹ Taq酶0.25 μL，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至25 μL。

2.3 梯度试验和正交设计的验证试验比较

把两个试验的结果加以比较发现，除了Taq酶浓度稍有不同外，其他结果完全一致。因此固定其他因素，再在小范围内做Taq酶浓度的梯度试验。设计如下：Taq酶 0.5 U，1.0 U，1.5 U；模板40 ng，10 mmol L⁻¹Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL，10 μmol L⁻¹引物2.5 μL，10 mmol L⁻¹dNTP0.5 μL，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至25μL。试验结果表明：Taq酶 1.0 U为最佳浓度。

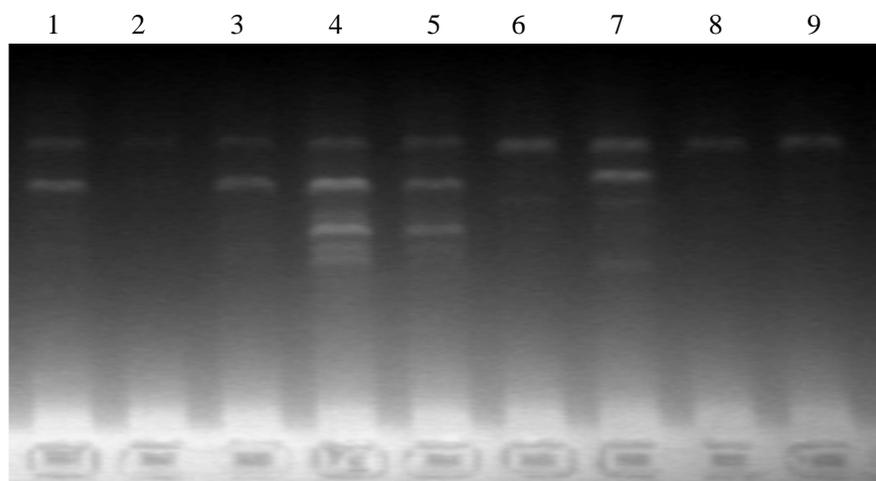


图7：正交设计电泳图（1-9 分别对应试验方案号1-9）

Figure 7 Electrophoresis of Orthogonal Design

2.4 最佳RAPD-PCR反应体系和反应条件的确定

根据上面的试验结果及其分析可以看出：RAPD扩增结果虽然受到诸多因素的影响，但是诸如模板DNA、dNTPs影响因素对试验结果影响不大，或只受其

浓度单一因素的影响，试验进行中还是比较容易控制的。如模板DNA浓度对扩增结果影响不是很大，在较大一个范围内都能扩增出比较清晰而稳定的条带，这也与前人认为RAPD扩增反应对模板DNA要求不是很高的结论相一致。而Taq DNA聚合酶主要是受其活性影响比较大，因而只要选择了一种活性比较高的Taq DNA聚合酶再加以检测还是可以保证比较稳定的试验结果的。

其中对试验结果影响较大而又难以控制的因素就是引物因素。因为不同的引物内(G+C)%是不同的，前人研究表明(G+C)%含量过高或过低均会使扩增失败的可能性加大；另外，引物浓度偏高又会引起错配和非特异性扩增，且可以增加引物之间形成二聚体的几率，这两者还由于竞争使用Taq DNA聚合酶、dNTPs，这一切均会使得DNA合成产率下降。而引物3'端最后4个核苷酸碱基的含量对扩增结果影响很大。这样就使得引物对扩增结果的影响更趋复杂，引物对扩增结果的影响并不是引物浓度单一因素的影响而致，而是受到几个因素相互的影响。因而并不是单一的增高引物浓度就能得到较好的扩增结果，试验的结果也体现了这一点。

基于上述分析建立起来的优化RAPD-PCR反应体系为：

2.4.1 最佳RAPD-PCR反应体系

Eppendorf PCR 管中反应总体积为 25 μL ，具体反应体系如下：

PCR Buffer (含 Mg^{2+})	10 mmolL^{-1}	2.5 μL
dNTPs	10 mmolL^{-1}	0.5 μL
随机引物	10 μmolL^{-1}	2.5 μL
Taq DNA 聚合酶	2 $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$	0.5 μL
模板 DNA	40 ng	1.0 μL

灭菌超纯水补足 25 μL

2.4.2 最佳 RAPD-PCR 反应条件

优化的 PCR 反应体系确定后，试验不同的热循环参数(如退火温度、退火时间和循环次数等)对 RAPD 反应的影响，以筛选最佳的热循环参数。在保持反应体系其他因素一致的条件下，改变单一因子(如 Mg^{2+} 、dNTP、TaqDNA 聚合酶、引物和模板浓度等)，筛选最佳参数。反应循环程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min，1 个循环；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min；72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min，40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增反应均在 Biometra PCR 仪上进行。

3 讨论

3.1 RAPD 技术的重复性和稳定性

RAPD-PCR技术是一个倾向于经验性的技术，PCR又是一个比较复杂的生物化学反应，反应体系中各成分之间的相互作用也是非常复杂，有许多因素均会影响扩增结果。因而确定体系中每个因子（模板、dNTP、Taq聚合酶、 Mg^{2+} 、Buffer、引物、反应参数等）合适的反应参数是保证RAPD反应稳定性和重复性的前提。关于RAPD优化体系的建立在许多植物中均有报道，但是不同的植物RAPD最佳体系的差别较大。

本实验表明，影响亚麻RAPD扩增反应的主要因子有模板DNA浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTP浓度、Taq聚合酶浓度、循环次数、退火温度等，而其中影响较大又是最难控制的影响因素是引物，这是由于其不同的引物具有不同的碱基结构及对实验结果影响不同造成的，这就是在试验的过程中需要认真把握，不能理想的认为是引物浓度单一因素所能决定的。

通过对上述PCR反应体系中主要参数的比较实验结果表明，亚麻适宜的RAPD反应条件是：模板40 ng，10 mmol L⁻¹ Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL，10 μmol L⁻¹ 引物2.5 μL，10 mmol L⁻¹ dNTP 0.5 μL，2U μL⁻¹ Taq酶0.5 μL，其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至25 μL。反应程序为：第一步94℃预变性3 min，第二步92℃变性50 s，第三步37℃退火50 s，第四步72℃延伸100 s，第五步有第四步返回第二步，循环40次，第七步72℃后延伸5 min，最后4℃保存以备电泳。利用这一反应体系可有效地进行亚麻的RAPD分析。而且亚麻对这些影响因子都有一个较大范围的适应性，某一个因子或多个因子的微量变化，不至于影响亚麻RAPD分析的结果，具有较好的稳定性和重复性。

为了保证RAPD技术的重复性和稳定性，在用RAPD进行比较分析时，一定要在整个研究中采用同一商品Taq酶及其缓冲体系，一次性买足同一个批次的商品Taq酶并妥善保存。因为Taq酶的商品来源不同会导致RAPD结果的不可重复，采用不同厂家的Taq酶，扩增结果可能完全不同。在此实验中，各成分之间的加样顺序对实验结果没有影响，我们通常将反应所需dNTP和Buffer一次取出混合均匀，再进行分装，只是模板需最后加入，以减少被污染的机会；实验的操作过程均须在无菌台上进行，严防污染，所有器具均高压灭菌，一次性使用。

针对RAPD标记的可重复性差的问题，通过实验证明，只要严格控制反应程序的各个环节及各个循环参数的稳定性，重复的结果不难得到。因此，RAPD反

应条件的优化是至关重要的。尽管RAPD标记可靠性差(假阳性高),但可以将RAPD标记转换成STSS 或SCAR 标记,可极大地提高其标记的准确性和可靠性。这将使RAPD 标记技术在亚麻领域的其他方面的应用得到推广^[73-77]。

3.2 琼脂糖凝胶电泳操作时应注意的问题

3.2.1 琼脂糖凝胶电泳

要想获得好的琼脂糖凝胶电泳图,我们认为制作一块好胶也是其关键之一,且每一个步骤都不能忽视,容器最好是容量瓶,且注意液体不要超过容量瓶容积的一半,以三分子一为好,用牛皮纸包于瓶口^[78-80]。在加热溶解琼脂糖时应不断地晃动容量瓶,以受热均匀,并对光检查,使粘附于容器壁上的小颗粒完全溶解,同时防止烧糊;待胶液冷却到50℃左右时,将胶从一角倒入电泳槽中制板时要避免产生气泡,如有气泡产生,则用剪去尖嘴的吸头小心吸出,以避免影响电泳的结果;凝胶聚合后,拔出样梳时用力要均匀,以防止将点样孔扯烂。

电泳开始时,可以用较高的电压,如100-120伏特。这样可以使样品很快进入凝胶内,从而减少样品的扩散,待样品进入胶内后,即保持3-5 Vcm⁻¹条件下进行电泳。电泳缓冲液要经常更换,保持新鲜,防止污染。

3.2.2 琼脂糖凝胶的染色

琼脂糖凝胶电泳使用溴化乙锭(EB)种荧光染料进行染色,它含有一个可以嵌入DNA堆积碱基之间的一个平面基团,这个基团的固定位置及碱基的密切接近,导致染料和DNA结合并在紫外光下红色呈现荧光。EB可以用于检测单链或双链核酸,一般有两种方式,一种在凝胶中加入EB溶液,这种情况下,线性双链DNA的电泳迁移率降低近15%,但优点是能在电泳过程中或电泳结束后在紫外光下直接检查凝胶。另一种是在不加EB的条件下进行电泳,电泳结束后再染色。后者的染色效果会更好,本实验采用后一种方法。

第四章 多态性RAPD标记的筛选

在PCR优化的反应体系和反应条件确定后,即可以开始扩增和引物筛选。由于RAPD标记技术应用的是随机引物,为得到可靠的RAPD结果,本实验选用2份有代表性,即差异较大的样品白花和山西大同的DNA作为模板,对随机引物进行严格筛选。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料

第二章采用 CTAB 改良法提取的白花和山西大同两个亚麻品种的基因组DNA。

1.1.2 实验药品

琼脂糖、溴酚蓝、二甲苯菁、冰乙酸、PCR-buffer, dNTP, Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、EB 等。随机引物是从上海生工公司订购的 10 bp 引物。

1.1.3 主要仪器及设备

超低温冰箱、台式高速冷冻离心机、Biometra PCR 仪、紫外可见分光光度计、电泳仪、水浴锅、移液枪、凝胶成像系统、高压灭菌锅、超纯水仪、微波炉、干燥箱、研钵、天平、超净工作台、低温冰箱等、垂直板电泳槽等。

1.2 试 验 方 法

本研究随机引物选择的 600 条 RAPD 引物是从上海生工订购的商品化随机引物,其产品编号为 S1-S500,S1001-1100。为了获得最具多态性的随机引物,共进行三次筛选。

1.2.1 第一次引物筛选

上海生工的 600 条 RAPD 引物,其产品编号为 S1-S500,S1001-1100,对 2 个品种进行筛选。通过 PCR 扩增,对扩增产物进行检测,把 PCR 产物与点样缓冲液(40%蔗糖, 0.2596%溴酚蓝)混匀,点入 2.0%琼脂糖凝胶中,使用 1 × TAE 缓冲液,在 110V 电压下电泳 90 分钟。Marker 为 1000bp Ladder(分子量 100~5000bp)。停止电泳后取出凝胶,在含 $1\mu\text{g mL}^{-1}$ 溴化乙锭的浸胶液中静置二十分钟。置 Multimega 凝胶成像系统中观察电泳结果并照相^[81]。

1.2.2 第二次引物筛选

对第一次筛选的多态性较好的随机引物进行第二次引物筛选,用相同的方

法对扩增产物进行检测。

1.2.3 第三次引物筛选

在前两轮用琼脂糖凝胶电泳检测 RAPD 扩增产物后,为使分离效果更加清晰,更易辨别 RAPD 产物的多态性,使用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳对前两轮筛选出来的引物进行最后一轮确定。做好准备工作后先进行 9V 预电泳,然后将样品与适量 6×凝胶载样缓冲液混合,点入加样孔中,使用 1×TBE 缓冲液,在 9V 电压下电泳 1.5~2 小时至二甲苯氰为胶板的 2/3 处,Marker 为 1000 bp Ladder(分子量为 100~5000 bp)。停止电泳后取出凝胶,放入固定液(900 mL H₂O,100 mL 冰乙酸)中到指示剂蓝带消失,清洗两次后放入银染液(1g AgNO₃,1 L 蒸馏水,1.5 mL 37% 甲醛)中静置 30 min,取出胶板,用蒸馏水冲洗 2~3 秒,放入预冷的显影液(30 g 无水 Na₂CO₃,1.5 mL 37% 甲醛,200 μL 1% 硫代硫酸钠)中至条带清晰,用固定液终止反应后,约 5 min 后取出胶板,用蒸馏水洗 5 min,取出晾干,拍照保存^[81]。

2 结果与分析

2.1 第一次引物筛选的结果

订购的上海生工编号为 S1-S500,S1001-1100 的 600 条 RAPD 随机引物,进行第一次引物筛选。结果发现:有的随机引物对 2 个品种不能扩增出任何谱带,有的随机引物扩增出的谱带很弱且仅能对部分材料扩增。用 2% 的琼脂糖凝胶分

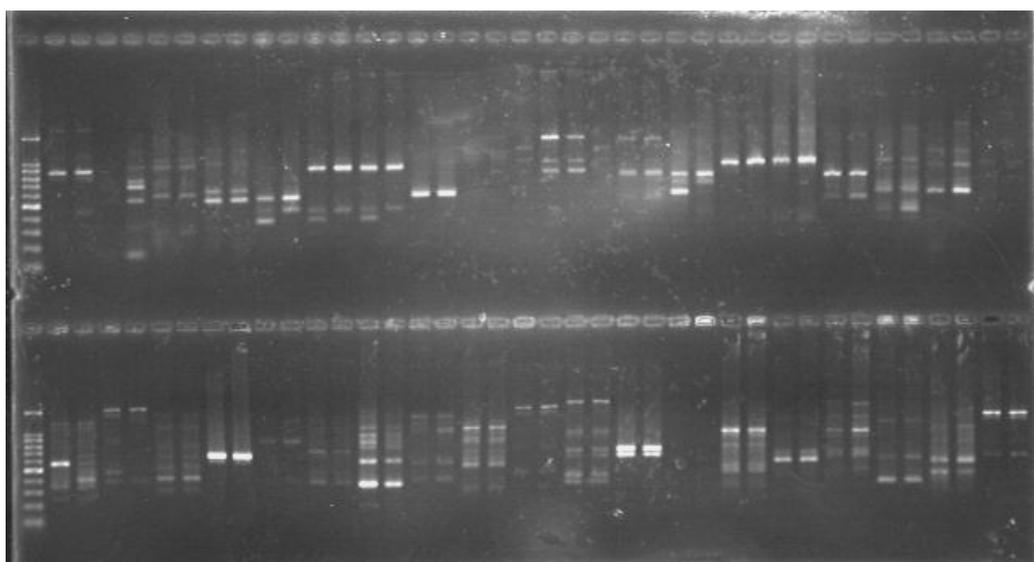


图 8: 26-63 号引物扩增结果

Figure 8 The amplified result of primer 26-63

离 RAPD 的扩增结果，能够产生较清晰的条带，但 2 个亚麻之间的可见多态性条带不多，能够筛选出的特异引物共 126 条。可以看出大部分随机引物在白花和山西大同两个品种中扩增的结果大致相同，但是也有部分特异的条带。这说明两者的基因组差异不大，DNA 片段的插入、缺失或碱基突变，就可以导致这些特定结合位点分布发生相应的变化，而使 PCR 产物增加、减少或发生分子量的改变，从而产生特异的条带扩增。见图 8-11。

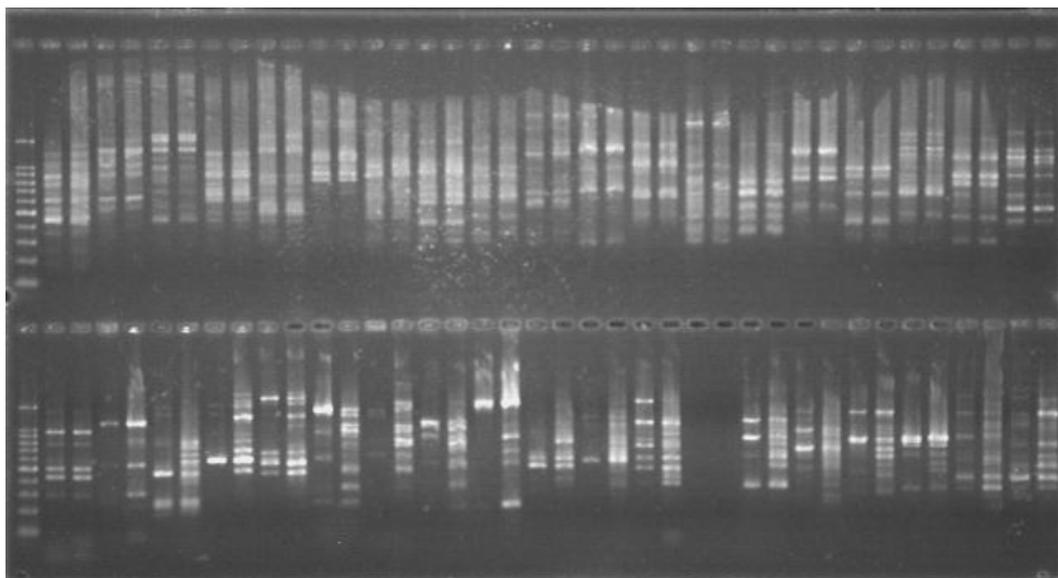


图 9： 252-289 号引物扩增结果

Figure 9 The amplified result of primer 252-289

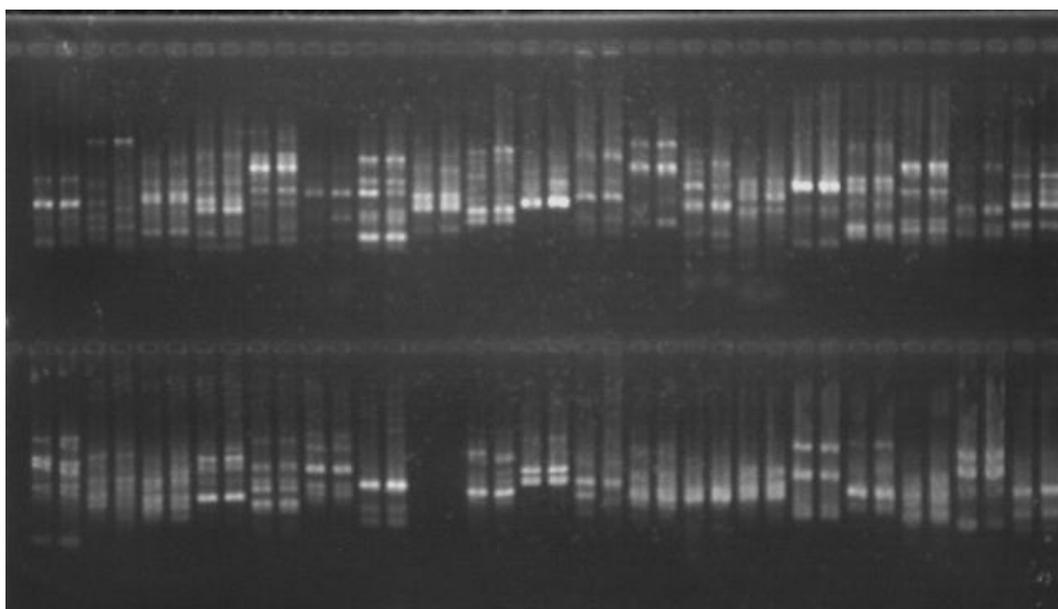


图 10： 1056-1093 号引物扩增结果

Figure 10 The amplified result of primer 1056-1093

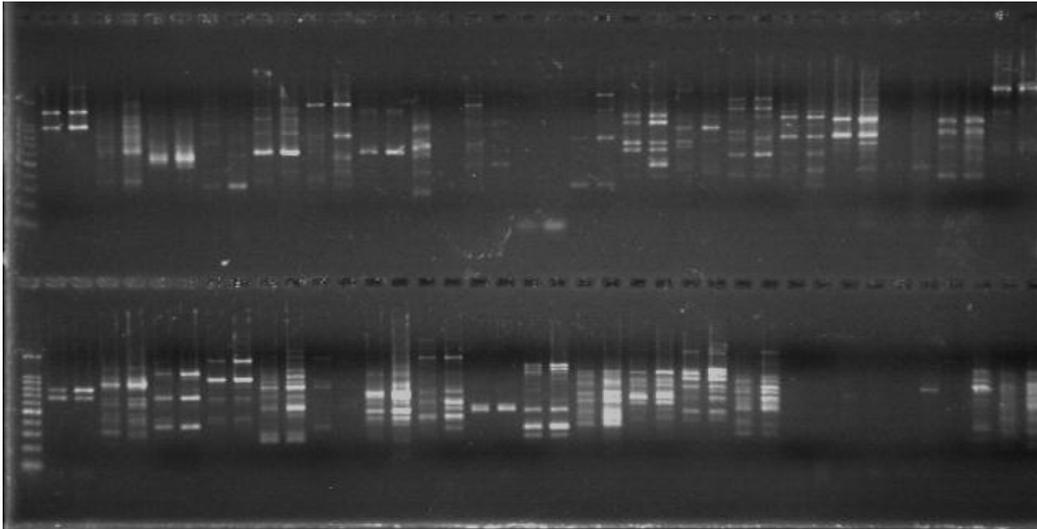


图11: 176-213号引物扩增结果

Figure 11 The amplified result of primer 176-213

图 8-11 第一轮部分 RAPD 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure8-11.The first round of RAPD amplified results of 2 flax by 2% agarose gel

2.2 随机引物第二次筛选的结果

因为 RAPD 反应的不稳定性，所以有必要对第一轮筛选出的引物进行第二轮的确定。仍是在同样的实验条件下，用琼脂糖电泳进行检测。第二轮筛选出的特异引物共 61 条，见图 12-13。

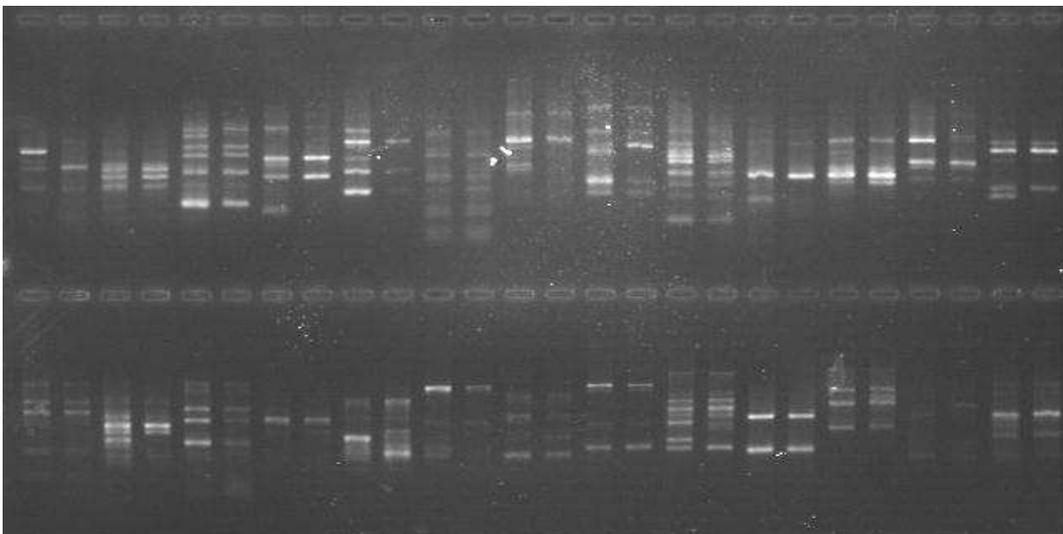


图 12: 5,7,8,9,11,16,18,19,23,26,27,28,30,32,33,35,37,38,39,43,44,52,56,59,61,65,67 号引物的扩增结果

Figure 12 The amplified result of primer

5,7,8,9,11,16,18,19,23,26,27,28,30,32,33,35,37,38,39,43,44,52,56,59,61,65,67

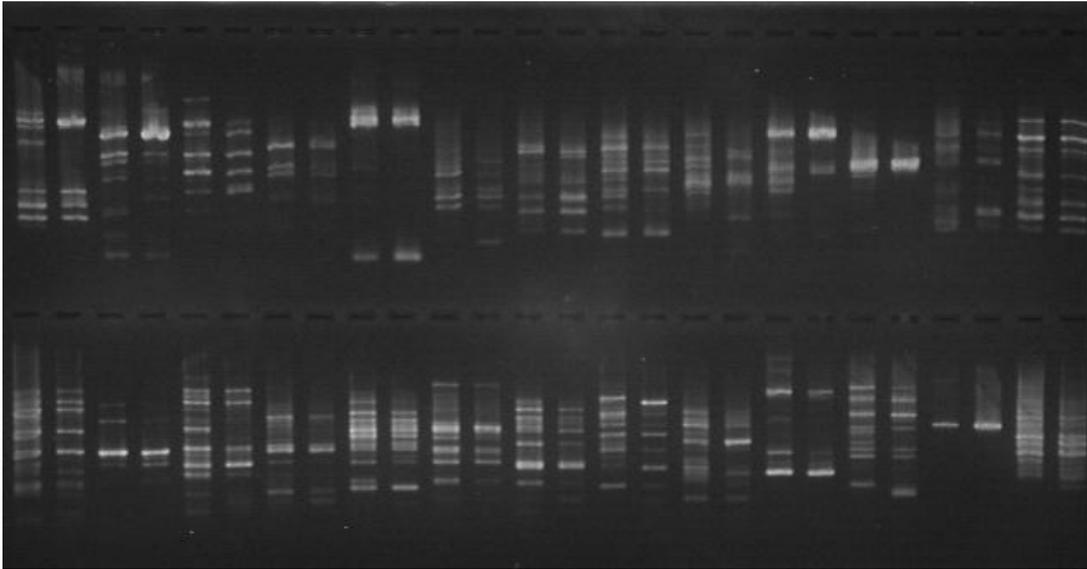


图 13: 402, 43, 404, 407, 408, 411, 413, 414, 416, 418, 420, 421, 425, 427, 437, 439, 442, 445, 449, 456, 457, 458, 462, 465, 469, 470 号引物的扩增结果

Figure 13 The amplified result of primer 402, 43, 404, 407, 408, 411, 413, 414, 416, 418, 420, 421, 425, 427, 437, 439, 442, 445, 449, 456, 457, 458, 462, 465, 469, 470

图 12-13 第二轮部分 RAPD 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 12-13 Part of the second round of RAPD amplified results of 2 flax by 2% agarose gel

2.3 对第二轮筛选出的引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果

RAPD 分析结果(图14) 显示, 同一引物对不同的亚麻 DNA样品的扩增结果具有高度的同源性, 说明不同亚麻品种在遗传基础上是一致的; 不同引物的扩增条带均不相同, 说明所选引物具有很好的多态性。

第二轮筛选出的引物多数仍保留有多态性的扩增条带, 但可以看出扩增的条带有深有浅, 如果要进行以后的研究工作, 将RAPD转化为SCAR标记, 一定要选择稳定出现多态性且十分明亮的多态性扩增条带。由于聚丙烯酰胺凝胶电泳的敏感性较琼脂糖凝胶电泳高, 其敏感性相差10倍以上, 故采用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶分离RAPD扩增产物, 多态性条带非常清晰, 也更容易辨别, 同时在电泳时借助分子Marker可以判断所扩增片断的大小。第三轮聚丙烯酰胺凝胶电泳共筛选出特异引物共31条, 见表3。由实验得出的结论可看出: 所扩增片断多在

250-1000bp之间,这一结果可能与酶的活性及结合引物在基因组上的结合位点有关。可以进一步用其他分子量的Marker来标定扩出的片段大小,以供下一步的研究利用,如在亚麻的高产、优质、抗病虫害等性状和品系鉴定,以及构建高密度亚麻遗传图谱等方面得以应用^[82-86]。

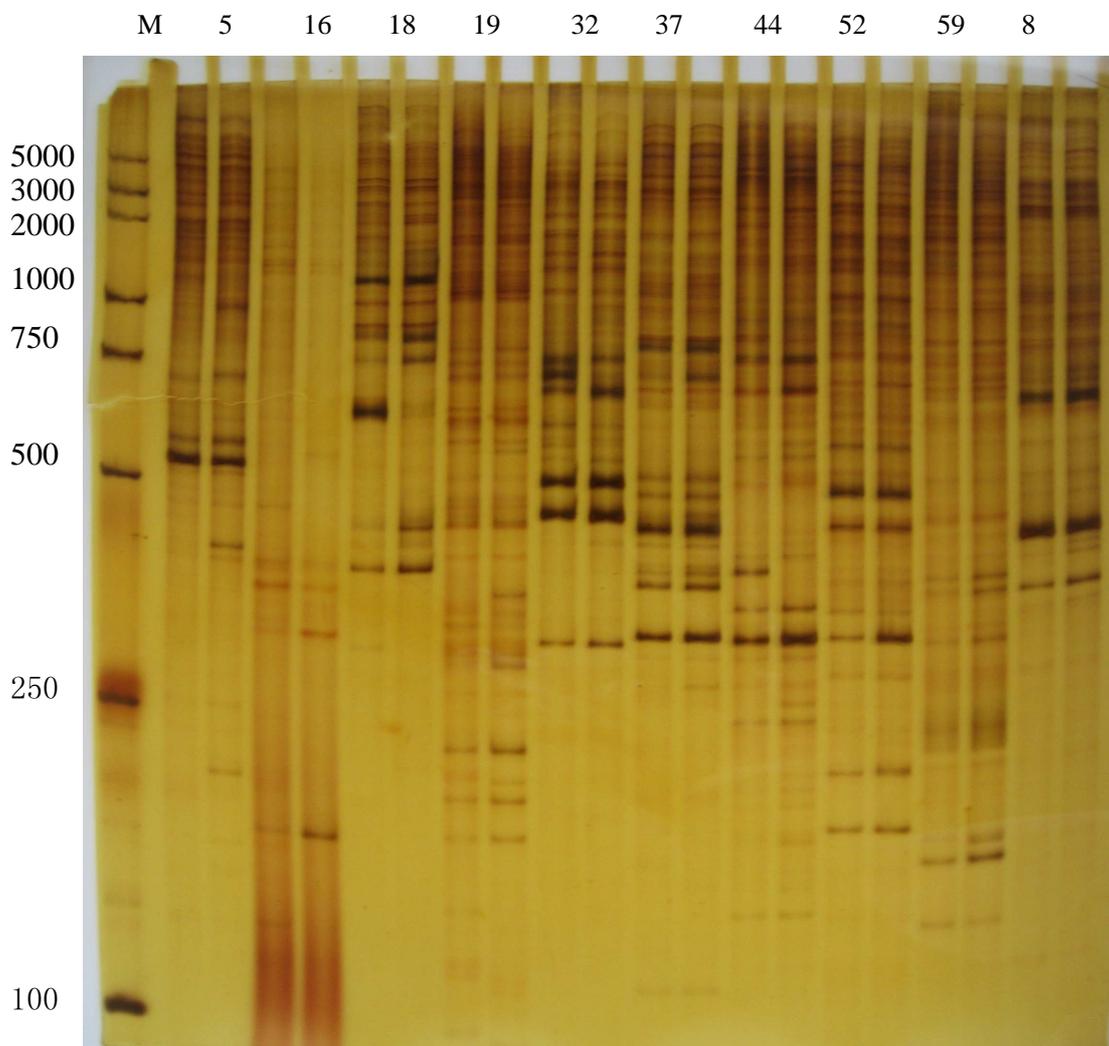


图 14: 部分 RAPD 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Figure14 Part of RAPD amplified results of 2 flax by 6% PAGE

表 3: 31 个有效引物序列和扩增结果

Table 3 The sequence of 31 effective primers and amplified results

引物编号	序列(5' -3')	多态性带数	多态性带分布位置
5	TGCGCCCTTC	3(山西大同)	1000, 280, 170
16	TTTGCCCGGA	1(白花)	560

引物编号	序列(5' -3')	多态性带数	多态性带分布位置
18	GGTCCCTGAC	1(山西大同)	330
19	ACCCCCGAAG	1(白花)	750
32	TCGGCGATAG	1(白花)	300
37	CAGCACCCAC	2(山西大同)	300, 350
44	TCTGGTGAGG	1(山西大同)	500
52	GATGACCGCC	1(白花)	400
59	CTGGGGACTT	2(白花山西大同一)	350, 400
80	ACTTCGCCAC	2(山西大同)	450, 600
81	CTACGGAGGA	2(山西大同)	250, 150
85	CTGAGACGGA	1(山西大同)	350
141	CCCAAGGTCC	1(白花)	600
198	CTGGCGAACT	2(山西大同)	800, 950
235	CAGTGCCGGT	2(山西大同)	600, 700
272	TGGGCAGAAG	1(山西大同)	650
358	TGGTCGCAGA	2(白花)	650, 700
361	CATTCGAGCC	2(白花)	400, 650
383	CCAGCAGCTT	1(山西大同)	600
394	GTGACAGGCT	2(山西大同)	300, 400
416	GTAACCAGCC	2(山西大同)	300, 500
439	GTCCGTACTG	2(白花山西大同一)	300(白花), 150(山西同)
480	GACCCTAGTC	1(白花)	600
482	TCTGTGCGTC	1(山西大同)	600
484	AGTGCGCTGA	两者有若干差异带	500-1000
489	GGCTAACCGA	两者有若干差异带	750-1000
1028	AAGCCCCCCA	1(白花)	800
1041	ACGGGTCAGA	1(白花)	900
1057	ACCCCCTATG	1(山西大同)	400
1072	AGTGTAGCCC	2(山西大同)	600, 800
1073	ACGCATCGCA	1(白花)	1500

3 讨论

3.1 RAPD统计的主观因素问题

一般认为对所用样本数较少的群体,通过分析大量的基因位点可以减少由于样本较少引起的误差。本实验中我们所取的材料样本数相对来说还显不够,所以我们通过增加引物的数目以获得大量基因位点这一措施进行弥补。另外,在RAPD的统计中还包含有一些主观因素,处理不当将导致错误的结论。如由于扩增片段出现的强弱不同,有些很弱的带是否统计在内存在着争。本实验据以下条件对引物进行严格筛选:

(1) 产生的DNA带清晰可辨,若出现的条带数很少而不得不将弱带统计在内,那么在整个统计过程中必须将所有的弱带都统计在内,使其前后保持一致,以最大程度上减少误差,得到可靠的统计结果;

(2) 产生的多态性DNA带重复性好,如果在重复性实验中仍然存在的条带,则可以将其条带统计在内,否则将不予统计;

(3) 在分析的样品间有较高的多态性;

(4) 扩增性强。

3.2 RAPD技术对实验结果的影响

RAPD技术应用于植物系统学研究上,可以确定物种间的亲缘关系与进化距离。但是RAPD技术也有自己的缺点,对于两个亲缘关系较近的物种,如果它们的遗传图谱有较大的差异,用这种方法并不能确定这种差异究竟是由哪一种遗传机制造成的^[87-89]。因此,RAPD技术在研究植物的种、属以及品种间的亲缘关系时,应注意如下问题:

(1) 由于引物的竞争抑制或检测手段的限制等原因,基因组中RAPD位点有时不能检测出,可能造成差异的假象。

(2) 电泳迁移率一致的带并不一定同源,而不同种或属的扩增产物难以作同源性分析,只能作表征分析从而只能从相识性或遗传距离上去分析亲缘关系,其结果可能与真实的系统关系存在这一定的差异。

(3) RAPD带谱通常在种间或属间的变异水平较高,因此取样时样品应该具有较高的代表性。用一个个体代表一种或用一个种代表一个属都有可能造成实验结果的较大偏差。

(4) 两个亲缘关系较近的物种,如果它们的遗传图谱有所差异,用RAPD技术很难确定这种差异究竟是由哪种遗传机制所造成的。

(5) 在表征分析时,有时一些RAPD产物的出现呈现相关关系,即一个位点的出现依赖另一个位点的出现与否;另外一些RAPD产物的差异来自基因组的

同一个区域，若将每一个差异单独计算，相当于某一性状极度加权。这些在结果分析时都应引起注意。

3.3 多态性条带的差异性

同一引物对供试样品进行扩增后，其中的某一扩增带，有的样品中有，有的样品中没有，而有的样品可能极弱或者完全没有的条带就被称为多态性条带。通过对所试样品扩增出来的条带进行统计和分析，可以看出：同一引物对不同的亚麻 DNA样品的扩增结果具有高度的同源性，说明不同亚麻品种在遗传基础上是一致的；不同引物的扩增条带均不相同，说明所选引物具有很好的多态性。由此可以得出：这些实验结果与RAPD的原理是相一致的，即引物与模板解链后的单链结合是随引物与模板不同以及这些引物的位置是否在彼此可扩增的距离内（引物间距为200-2000bp）来决定的。这也充分表明了亚麻种质资源遗传背景的复杂性，品种之间起源上既有一定的同源性，但在遗传距离上又有一定的差异性。

3.4 聚丙烯酰胺凝胶技术

3.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的电泳方法。其敏感性较琼脂糖凝胶电泳高10倍以上，故第三轮RAPD扩增产物采用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶分离，产生的多态性条带非常清晰，也更容易辨别，同时在电泳时借助分子Marker可以判断所扩增片断的大小。但是聚丙烯酰胺聚合反应可受下列因素影响：

(1) 大气中氧能淬灭自由基，使聚合反应终止，所以在聚合过程中要使反应液与空气隔绝。

(2) 某些材料如有机玻璃，能抑制聚合反应。

(3) 某些化学药物可以减慢反应速度，如赤血盐。

(4) 温度高聚合快，温度低聚合慢。

以上几点在制备凝胶时必须加以注意。此外pH值的改变会引起带电分子电荷的改变，进而影响其电泳迁移的速度，所以电泳过程应在适当的缓冲液中进行的，缓冲液可以保持待分离物的带电性质的稳定，本实验采用1×TBE缓冲液，使用9W恒功率条件下电泳4 h。

3.4.2 聚丙烯酰胺凝胶的染色

聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）银染是非常关键的步骤。它能很好地分离鉴别核酸小片段，与琼脂糖凝胶电泳相比，操作复杂，价格高，但其分辨率高，能分辨

相差几个碱基的核酸小片段,结果可永久保存,从该胶中回收的DNA纯度极高,可适用于分子生物学中较高要求的实验等^[90-91]。但是,在实验过程中,常会出现一些问题,如:胶破裂、背景太深、无DNA带或带纹不清晰等。前人在操作时间、温度、光强等方面对PAGE银染进行了一系列的研究,取得了不少进展^[92-95]。本实验聚丙烯酰胺凝胶电泳以后采用银染进行染色。进行银染时应注意以下问题:

(1) 硝酸银要现用现配,时间长了硝酸银会分解,一般在固定的时候配制,要有一段时间让硝酸银充分溶解。

(2) 显影液要提前配制,放入4度冰箱预冷。这一步很重要,如果没有充分预冷,显色时很难控制显色时间,不是染过了导致背景很高,就是染的很浅。因此在固定前就要把显影液配好,甲醛和硫代硫酸钠溶液一定要在显影前加,不要提前加。

(3) 显色时间的控制非常重要,一定要分两次显色,第一次显色出现条带后马上转移至剩下的显影液中。显色时间第一次大概是5分钟左右,操作中一定要在边上看着。显色后马上放入终止液(10%的冰乙酸)中,两分钟后放入纯水中,注意不得用自来水冲洗,自来水中离子会使凝胶变黑,两分中后取出。第二次显色时不要等所有条带都出来后再终止,因为显色有一个延续效应。

(4) 最好将显色好的凝胶转贴到普通滤纸上,真空抽干,照相保存。

导致PAGE银染结果不理想主要有两方面的原因。一方面是在DNA的提取、酶切、连接、扩增中操作或药品出现问题,这可通过在每一步操作后进行琼脂糖凝胶电泳样品来确定;另一方面是染色过程中主要是药品出现问题。相对来说,染色过程中很难对中间结果进行确定,而且整个PAGE银染过程涉及的药品多而杂,不可能对药品进行逐个实验,往往染色结果不理想,只能全部更换药品,费时又费钱,一定要严格按照上述步骤要领操作,才可以得到较为理想的银染效果。

第五章 结论与展望

本实验在优化亚麻 DNA 提取方法和 RAPD 反应体系的基础上,进行了亚麻多态性 RAPD-PCR 随机引物的筛选,为在分子水平上研究亚麻的遗传多样性和构建我国亚麻品种的遗传图谱奠定一定的基础。

1 实验得出的结论如下

1.1 CTAB 改良法是亚麻基因组 DNA 最适提取方法

通过对 SDS 法、CTAB 法、CTAB 改良法和高盐低 pH 值法四种方法提取亚麻幼苗基因组 DNA 的进行紫外吸收检测和电泳检测,结果表明:四种方法提取的 DNA,完整性好,A260/A280 的值在 1.6-1.9 之间,都可以用于亚麻基因组 DNA 的提取,但是其中高盐低 PH 法提取的 DNA 浓度太低;SDS 法提取的 DNA 中混有褐色杂质;CTAB 法提取的 DNA 中存在较多的蛋白质杂质,其中以 CTAB 改良法提取的 DNA 质量为最好,本实验选用 CTAB 改良法。

1.2 亚麻 RAPD 分析的适宜反应体系和反应程序

通过对 PAPP 反应体系的模板 DNA、引物、dNTP、Taq 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度的优化试验及对 PCR 反应程序的筛选,确定了亚麻 RAPD 分析的适宜反应体系和反应程序为:每 25 μL 反应体系中,模板 40 ng, 10 mmol L^{-1} Buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 2.5 μL , 10 mmol L^{-1} dNTP 0.5 μL , 2U μL^{-1} Taq 酶 0.5 μL , 其余用灭菌的超纯水补充整个反应体系至 25 μL 。适宜反应循环程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

1.3 筛选到 31 条 RAPD 特异引物

用 600 个随机引物对白花和山西大同两个亚麻品种进行 RAPD 分析,筛选出 31 条在两品种间具多态性的特异 RAPD 引物。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶分离,31 条 RAPD 特异引物所扩增的 DNA 片段多在 250-1000 bp 之间。这些结果为利用以上两个品种构建我国的亚麻遗传图谱奠定了基础。

2 展望

从本实验已经获得的实验结果来看,对亚麻的 DNA 分子水平上的 RAPD 研究,将使 RAPD 标记技术在亚麻领域的其他方面的应用也得到推广。可以展望:

2.1 构建我国亚麻品种的遗传图谱

本研究通过对白花和山西大同两种重要的亚麻品种进行多态性分析,已经筛

选到了亚麻的RAPD特异引物，为构建我国的亚麻品种的遗传图谱奠定基础。

2.2 研究我国主要亚麻品种之间的亲缘关系和遗传距离

利用筛选到的亚麻RAPD特异引物，研究我国主要亚麻品种之间的亲缘关系和遗传距离，品种资源的遗传多样性研究不仅可以为新品种选育策略的制订提供依据，还可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性指导，这对亚麻新品种的选育和杂交优势的利用具有很重要的意义。

2.3 把RAPD标记转化成SCAR标记

把实验得到的这些特异带转化成SCAR标记，就可以提高所找到的某一RAPD标记在应用上的稳定性。可将该RAPD标记片段从凝胶上回收并进行克隆和测序，根据其碱基序列设计一对特异引物(18~24个碱基左右)。以此特异引物对基因组DNA再进行PCR扩增，便可扩增出与克隆片段同样大小的特异带。这种经过转化的特异DNA分子标记称为SCAR标记。相对于RAPD标记，SCAR标记由于所用引物较长及引物序列与模板DNA完全互补，因此扩增结果稳定性好、可重复性强。

2.4 亚麻的基因工程

克隆出更多的亚麻基因，详细地分析不同品种的遗传背景和基因功能，最终找到控制亚麻纤维产量的功能基因，进而进行转基因工程，有望产生巨大的社会效益和经济效益。

总之，本实验采用的亚麻RAPD反应体系和筛选出的31个有效随机引物均为今后更大规模地从分子水平上鉴定亚麻品种或品系奠定了分子生物学基础，对加快亚麻育种进程和新品种选育有着重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] 王玉富. 我国亚麻生物技术的发展. 中国麻业, 2005, 27(2): 60-Wang Y F. Study and development of flax biotechnology in *Plant Fibers and Products*, 2005, 27(2): 60-65. (in Chinese)
- [2] 张海英 许勇 王永健 分子标记技术概述 2001 2 4-6长江蔬菜
- [3] 郭安平 周鹏 彭世清 彭世清 苧麻属植物RAPD反应体系影响因子的研究第3期2001年9月64-69热带作物学报
- [4] Chin E C I , et al. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation[J]. *Genome*, 1996, 39: 866~873
- [5] Weber J L. May P E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reactionLJJ. *Am J Hum Genet*, 1 989, 44: 388~396.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalaki A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]*Genomics*, 1994, (20): 176—18
- [7] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et fl1. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome pr~ect. *Science*, 1991,
- [8] 骆蒙, 贾继增. 国际麦类基因组EST计划研究进展. 中国农业科学, 2000, 33(6): 110~112,
- [9] Kota R, Varshney R K, Thiel T, et al. Generation and comparison of EST. derived ssRs and SNPs in barley (*Hordeum Vulgare*L.). *Hereditas*, 2001, 135: 145~151
- [10] 薄天岳 叶华智 王世全 等 亚麻抗锈病基因M4 的特异分子标记 遗传学报, 2002 29(10): 922~927
- [11] 薄天岳 叶华智 李晓兵等亚麻抗枯萎病基因FUJ 7(t)的分子标记中国农业科学2003, 36(3): 287—291
- [12] vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407~4414
- [13] MACHESWARAN M, Subudhi P K, Nandi S, et al. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population [J]. *Theor. Appl. Genet*, 1997, 94: 39~45.
- [14] QI x, Stam P, Lindhout P. Use of locus—specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley I-J]. *Theor. Appl. Genet*, 1998, 96: 376-384.

- [15] Mour2: B. Pflieger S. Blettes A Pf al A CAPs marker Io assist lecfioa of tomato spotted voilt iiris(TswV resistance in pepe r Genorne, 2000, 43: I 37~142]
- [16] 余波澜, 黄朝峰, 周文娟等 大麦1H特异性CAPS标记和ASA标记的创制 遗传学报, 28(6): 550-555, 200
- [17] Lander E. S. 1996. The new genomics: global views of biology. Science, 274: 536 —539.
- [18] Kruglyak L. The use of a genetic ma p of bialleicma rkers in linkage studies[J]. Nat. Genet. , 1997, 17: 21- 24.
- [19] 王孝宣 杜永臣 朱德蔚等Multiplex—CAPS技术及其在番茄遗传鉴定中的应用 Aeta Horticulturae Sire'ca 园艺学报 2003, 30 (6): 673~677
- [20] Donis keller het al.cell.1987 51 :319-337
- [21] squaki T. et . Abstract of plantGenome-. SanDiego. USA, 1995: i1
- [22] 张蕴哲 刘红霞 郭荣领等毛新杨×毛白杨AFLP分子遗传图谱林业科学研究 Forest Research 2003, 16(5): 595~ 603
- [23] 向道权 曹海河 曹永国等玉米SSR遗传图谱的构建及产量性状基因定位 遗传学报 Aera Geneaea sinace 28 (8): 778~784 2001
- [24] 李效尊 潘俊松 王 刚等黄瓜侧枝基因(*Ib*)和全雌基因(*f*)的定位及RAPD遗传图谱的构建 自然科学进展 第14卷 第11期 2004年11月
- [25]陈书霞 王晓武 方智远RAPD标记构建芥蓝×甘蓝分子标记连锁图 园艺学报2002, 29(3): 229-232
- [26]宛煜嵩 王珍 肖英华等 一张含有227个标记的大豆遗传连锁图 分子植物育种 2005年 第3卷 第1期 第15-20页。
- [27]易克 徐向利 卢向阳等 利用SSR和ISSR标记技术构建西瓜分子遗传图谱 湖南农业大学学报(自然科学版) (2003)04—0333—05
- [28]杨俊品 荣廷昭 黄烈健等 玉米分子遗传框架图谱构建作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2004年 Vol. 30, No. 1 82~87页
- [29]吕蓓 张丽霞 宛煜嵩等 用AFLP标记饱和大豆遗传连锁图 分子植物育种 2005年 第3卷 第2期 第163-172页
- [30]于拴仓 王永健 郑晓鹰大白菜分子遗传图谱的构建与分析中国农业科学2003, 36(2): 190—195

- [31]张海英 葛凤伟 王永健黄瓜分子遗传图谱的构建园艺学报2004, 31(5): 617~622
- [32]黄益勤, 李建生. 利用RFLP标记划分45份玉米自交系杂种优势群的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(3): 244—250.
- [33]程中平 利用分子标记对桃、李、杏、梅、樱类植物系统发育的分析 中国南方果树2003; 32(3): 45~50
- [34]乔爱民, 刘佩瑛, 营建军. 芥菜16个变种的RAPD研究[J]. 植物学报, 1998, 40(10): 915—921.
- [35]侯和胜, 刘洪艳, 佟少明. 9种芦荟亲缘关系的RAPD分析[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(2): 179—182.
- [36] W. Spielmeyer, A. G. Green, D. Bittisnich, *et al.* Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*) Theor Appl Genet (1998) 97: 633-641
- [37]Michclmore RM et al. 1991. Proc Natl acad Sct USA. 88I 9828~9832
- [38]R. van Treuren • L. J. M. van Soest • Th. J. L. van Hintum Marker- assisted rationalisation of genetic resource collections:a case study in flax using AFLPs Theor Appl Genet (2001) 103:144 - 152
- [39] O. V. Murarenko, V. A. Lmesh, T. E. Samatadze , et al. Genome Comoarisons with Chromosomal and Molecular Markers for Three Closely Related Flax Species and Their Hybrids. Russian Journal of Genetics. April 2003. Volume39. Number4. 414—421
- [40] Yong-Bi Fu Geographic Patterns of RAPD Variation in Cultivated Flax Crop Science; May/Jun 2005;45, 3; ProQuest Biology Journals pg. 1084
- [41]Fu. Y. B, A. Diederichsen, K. W. Richards, and G. Peterson. 2002b Genetic diversity Of flax (*Linum usitatissimum* L) cultivars and landraces as reveale by RAPDs. Genet. Resour. Crop Evol. 49. 167-174
- [42] Fu. Y. B, GRowland, S. D. Duguid, and K. W. Richards. 2003b RAPD analysis of 54 North America flax cultivars. Crop Sic. 143; 1510-1515
- [43] Hausner G, Rashid K Y, Kenaschuk E O, Procnier J D. The deveopment of CO. domi nant PCR/RFLP based markers for the flax ru st re—sistance alleles of the L locus. Genome, 1999, 42: 1~8.
- [44]Y. Chen, G. Hausner, E. Kenaschuk, D Proeunier, P. Dribnenki, G. Penner. Plant Cell

- Report(1998)18: 44-48.
- [45] Creissen GP, Cullis CA (1987) Genome organization and variation in higher plants. *Ann Bot* 60, Suppl 4:103 - 113
- [46]Schneeberger RG, Creissen GP and Cullis CA (1989) Chromosomal and Molecular Analysis of 5S RNA Gene Organization in Flax, *Linum usitatissimum* Gene 83:75 - 84
- [47]Flor HH . Tests for allelism of rust—resistance genes in flax. *Crop Sci. ence*, 1965, 5: 415~ 418。
- [48] Cullis CA, Oh TJ, Gorman MB (1995) Genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum*).*Proc 3rd Meeting Int. Flax Breed Des Group. St Valery en caux France, 7-8 November 1995, P 161-169*
- [49] T. J. Oh • M. Gorman • C. A. Cullis FLP and RAPD map
- [50] Delye C, Corio Costet MF. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes [J]. *Mycological Research*, 1998, 102 (3) :283-288
- [51] 施苏华, 唐绍清, 陈月琴, 等, 11 种金花茶植物的 RAPD 分析及其系统学意义[J]. *植物分类学报*, 1999, 37 (5) : 425-432
- [52]黄建安, 黄意欢, 罗军武, 王坤波, 周李华. 茶树基因组 DNA 的高效提取方法[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*. 2003, 29(5) :402~407.
- [53] 黄晓丹, 张云贵, 应铁进. 高质量植物基因组 DNA 的提取 [J]. *植物生理学通讯*. 2005, 42 (2) :311~314. O. V. Murarenko, V. A. Lmesh, T. E. Samatadze , et al. Genome Comparisons with Chromosomal and Molecular Markers for Three Closely Related Flax Species and Their Hybrids. *Russian Journal of Genetics*. April 2003 . Volume39. Number4. 414—421
- [54] 王玉富, 周思军, 刘燕, 李希臣, 关凤芝, 路颖, 王殿奎, 张福修, 卢翠华, 雷勃君, 钱华, 韩玉琴. 亚麻总 DNA 快速提取法的研究. *中国麻作*, 1997, 19 (1) : 19-21. Wang Y F, Zhou S J, Liu Y, Li X C, Guan F Z, Lu Y, Wang D K, Zhang F X, Lu C. H, Lei B J, Qian H, Han Y Q. Study on the method of rapid genomic DNA extraction from flax. *China's Fiber Crops* 1997, 19 (1) : 19-21. (in Chinese)
- [55] 傅荣昭, 孙勇如, 等. *植物遗传转化技术手册* [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 131-137

- [56] Penner G A, Bezte L J, 1994. Increased detection of polymorphism among randomly amplified wheat DNA fragments using a modified temperature sweep gel electrophoresis (TSGE) technique. *Nucl Acids Res.* 22:1780-1781
- [57] 王斌, 限制性片段长度多态性 (AFLP) 及其在植物育种中的应用. *中国农业科学*, 1994, 27 (6) : 67-72
- [58] 周永红, 郑有良, 等. 10 种披碱草属植物的 RAPD 分析及其系统学意义 [J]. *植物分类学报*, 1999, 37 (5) : 425-432
- [59] 杜光伟, 易清明, 陈家宽. 运用 AP-PCR 对中国慈姑属内亲缘关系的研究 [J]. *植物分类学报*, 1998, 36 (3) : 216-221
- [60] Dolores M Loureiro, M Garmen Martinez, Jean-Michel Boursiquot and Patrice This. Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* "Albarino" and some similar grapevine cultivars [J]. *J Amer Soc Hort Sic.* 1998, 123 (5) : 842-848
- [61] Guillemaut P, Drouard L M. Isolation of plant DNA: A fast inexpensive, and reliable method [J]. *Plant Mol Bio Rep.* 1992, 10 (1) : 60-65
- [62] 袁庆华, 桂枝, 张文淑. 苜蓿基因组 DNA 提取和 RAPD 反应条件优选 [J]. *草地学报*, 2001, 9 (2) : 99-105
- [63] 任端文, 卢强, 徐晓立. 提过 RAPD 稳定性的几点经验与探讨 [J]. *生物技术*, 2001, 1 (2) : 40-41
- [64] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIRAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by Arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:6531-535
- [65] 陈心露, 赵祥云, 刘建斌等. RAPD 技术在园艺植物种质资源中的应用 [J]. *园艺学进展*, 1994: 67-70
- [66] Miller S L. Phylogenetic analysis of selected species of the genus *Silene* using Morphological characters and nucleotide sequences of the ITS region of nuclear Ribosomal DNA [J]. *Masters Thesis, Duke University, Durham, North Carolina* 1994
- [67] WELSH J, MCLELLAND M, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18:7213-7218.
- [68] 孟祥栋, 马红, 张卫华等. 利用 RAPD 技术对葱属品种遗传关系的分析 [J]. *生物多样性*, 1998, 6 (1) : 25-29
- [69] Wang Yuejin, O. Lamikanra Analysis of Sequencing the RAPD Marker to Seedless Genes

- in Grapes[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25 (4) : 1-5
- [70]Toshiharu Hashizume, Ikuhiro Shimamoto, Yoshiaki Harushima, et al. construction Of a Linkage map for watermelon (*Citrullus Lanatus*(Thunb.)Matsum&Nakai) using Random amplified polymorphic DNA(RAPD). *Euphytica*, 1996, 90:256-273
- [71]Gonzalez JM Ferrer E. Random amplified Ploymorphic DNA analysis in Hordean species[J]. *Genome*. 1993, 36:1029-1031
- [72]Nollau P, Moser C, Wagener C. Isolation of DNA from stool and bodily fluids for PCR amplification. *Biotechniques*, 1996, 20:784-788
- [73] Hausner G, Rashid K Y, Kenaschuk E O, Procunier J D. The deveopment of CO. domi nant PCR/RFLP based markers for the flax ru st re—sistance alleles of the L locus. *Genome*, 1999, 42: 1~8.
- [74] Y. Chen, G. Hausner, E. Kenaschuk, D Proeunier, P. Dribnenki, G. Penner. *Plant Cell Reporl*(1998) 18: 44-48.
- [75] Creissen GP, Cullis CA (1987) Genome organization and variation in higher plants. *Ann Bot* 60, Suppl 4:103 - 113
- [76]Schneeberger RG, Creissen GP and Cullis CA (1989) Chromosomal and Molecular Analysis of 5S RNA Gene Organization in Flax, *Linum usitatissimum* Gene 83:75 - 84
- [77]Flor HH. Tests for allelism of rust—resistance genes in flax. *Crop Sci. ence*, 1965, 5: 415~ 418.
- [78]张开春, 尹淑萍, 杨英军等, 分子标记在果树上的应用[J]. *果树科学*, 1999, 16 (3) : 324-327
- [79]吴燕民, 裴东, 奚声珂等, 运用RAPD对胡桃属种间亲缘关系的研究[J]. *园艺学报*2000, 27 (1) : 17-22
- [80]邵宏, 柳家英. 植物分子系统分类学的新技术[J]. *生物学通报*, 1999, 32 (3) : 25-27
- [81] 王关林 方宏筠《植物基因工程》第三版
- [82] 柯枫英, 等. 玉米淀粉修饰基因du 的RAPD 标记研究[J]. *作物学报*, 1999, 25(1) : 1~7.
- [83] 涂金星, 等. 甘蓝型油菜核不育材料育性基因的RAPD标记[J]. *华中农业大学学报*, 1997, 26(4) :218~722.
- [84] Jean M, GG Brown, BSlantry. Targeted mapping approaches to identify DNA markers linked to RFLP restorer gene for the ‘Polima’ CMS of canola (*Brassicd napus*

- L) [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, (97):431~ 438.
- [85] Rector BG, JNALL, WAParott. Identification of molecular linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, (96):786~790.
- [86] Somer D J, KRD Friesen, G Rakow. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Denet*, 1996, (96):897~903.
- [87] Fang Deqiu, Robert R Krueger, Mikeal L Roose. Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *J Amer Soc Hort Sic*, 1998, 23(4):612-617
- [88] Welsh T, Mellelland M. Fingerprinting genomes using PCR with Arbitrary primers *Nucleic. Acid Res.* 1990, 19:303-306
- [89] 周永红, 郑有良, 等. 10种披碱草属植物的RAPD分析及其系统学意义[J]. *植物分类学报*, 1999, 37(5):425-432
- [90] Promega. *Protocols and Applications guide 3rd* [M]. USA: promega Corporation. 1996, 156.
- [91] 李宏业, 范树国, 刘玉乐, 等. 改良聚丙烯酰胺凝胶电泳检测DNA[J]. *细胞生物学杂志*, 1999, 21(4):201.
- [92] 乐晓萍, 杜鹏, 张钦宪, 等. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良[J]. *河南医科大学学报*, 2001, 36(4):395~396.
- [93] 朱名安, 周新. DNA 银染法常出现的问题及解决办法[J]. *郟阳医学院学报*, 1999, (3):169.
- [94] 潘尚领, 龙桂芳, 陈萍, 等. DNA 直接银染测序法的建立和优化[J]. *广西医科大学学报*, 2001, 18(3):447~448.
- [95] 刘建斌, 等. 用银染方法分析RAPD产物[J]. *北京农学院学报*, 1996, 11(2):42~44.

附录 缩略词 (Abbreviation)

缩略词	中文名	英文名
PCR	聚合酶链式反应	Polymerase Chain Reaction
RAPD	随机扩增多态性	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	限制性片段长度多态性	Restriction Fragment Length Polymorphism
ALFP	扩增片段长度多态性	Amplified fragment length polymorphism
SCAR	序列特异扩增区域	Sequence Characterized Amplified Regions
SSR	简单重复序列	Simple Sequence Repeat
DAF	扩增指纹印迹	DNA amplification fingerprinting
SSLP	简单序列长度多态性	Simple sequence length polymorphism
EST	表达序列标签	Expressed Sequence Tags
CAPS	酶切扩增多态性序列	Cleaved amplified polymorphic sequence
SNPs	单核苷酸多态性	Single Nucleotide Polymorphism
MAS	标记辅助选择技术	Marker-Assisted Selection
NILs	近等基因系	Near Isogenic Lines
QTL	数量性状基因位点	Quantitative trait loci
DH	加倍单倍体	Double-haploid
RNase	核糖核酸酶	Ribonuclease
kb	千碱基对	Kilobase pair
min	分钟	Minute
CTAB	十六烷基三甲溴化钠	Cetyltrimethylammonium bromide
SDS	十二烷基磺酸钠	Sodium dodecylsulfate
PVP	聚乙烯吡咯烷酮	Polyvinyl pyrrolidone
bp	碱基对	Base pairs
TE	Tris/ EDTA 缓冲液	Tris/ EDTA buffer
EDTA	乙二胺四乙酸	Ethylene diamine tetraacetic acid
EB	溴化乙锭	Ethidium bromide
OD	光密度	Optical density
Tris	三羟甲基氨基乙烷	Tris(hydroxymethyl)amino-methane

缩略词	中文名	英文名
DNA	脱氧核糖核酸	Deoxynucleoside acid
RNA	核糖核酸	Ribonucleic acid
dNTP	脱氧核苷三磷酸	Deoxynucleotide Triphosphate
cM	厘摩	Centi Morgans
BME	β -巯基乙醇	β -Mercaptoethanol
rpm	每分钟转速	Revolutions per minute
μ g	微克	microgram
μ l	微升	microlitre
U	单位	unit
ddH ₂ O	双重蒸馏水	Double Distilled Water
mmol	毫摩尔	millimole

致 谢

本课题是在导师陈信波教授的精心指导下完成的，从论文的选题、实施到完成都倾注了陈老师的大量心血。导师不仅在学业上给予耐心教诲，而且在生活和思想上给予了无微不至的关怀，特别是当我面对困难准备放弃时，是陈老师的帮助和鼓励使我坚持走到今天。导师严谨的治学态度、锐意创新的学术作风、渊博的学识、高尚正直的品格，给我留下了深刻的印象，使我获益匪浅，受益终生。在此，谨向导师致以崇高的敬意和诚挚的感谢！

正是我的指导老师陈信波教授的亲自指导与无私关怀，才使我将毕业论文按时完成；正是陈老师对论文的多次修改才使我的论文质量有了大幅度的提高，更是我从中学到了许多书本上根本学不到的东西，陈老师的言传身教不仅使我学会了怎么学习，而且也使我学会怎样去做一个真正关心学生爱护学生的好老师。

在农大学习期间，得到了生物科学技术学院饶力群院长、杨虹琦教授、张学文教授、王征老师、邓林伟老师、易克老师、戴小阳老师，以及作物基因工程实验室的周小云老师的悉心指导和大力支持，在此表示最真诚的感谢！

论文的顺利完成还要特别感谢生物科学技术学院 07 届毕业生陈婕妤同学。在实验和论文的撰写过程中还得到了师兄向建华的关注指点，师弟邹杰、李尉、许发喜、王育华和师妹刘爱玲、王文芳等的通力支持，在此向他们表示我由衷的感谢！

走到今天背后需要有强大的后盾：是我的家人特别是我的爱人潘永峰在背后默默地支持、鼓励、帮助和关怀，才使我克服了前进道路上的许多障碍和阻力，使我在求学路上信心百倍，一如既往，勇往直前，才使我终于顺利完成学业。我还要感谢我的公公和婆婆，正是他们在家精心照顾我的儿子，才使我在外求学期间没有了后顾之忧，安心学习，需要感谢的还有我的儿子，他的乖巧懂事，勤奋爱学使我不用担心他的学习生活。

最后，向所有支持和帮助过我的学业上的老师、家人和朋友道一声最真挚的感谢！

作者简介

姓名：梁毅莉

性别：女

民族：汉族

籍贯：河南孟津

出生日期：1973年3月

学习和工作经历：

1989.8-1993.7：河南孟津县第一高级中学学生

1993.9-1997.6：河南师范大学学生

1997.7-至今：河南科技大学林业职业学院教师

2004.3-2008.12：湖南农业大学攻读中职硕士

将要发表的论文：

2009年2月《亚麻 RAPD 反应体系的优化和品种间多态性标记的筛选》一文将发表于《湖南农业》