

摘 要

本文共使用 252 条 10-mer 的随机引物对遗传背景相似的兄妹交分离出的 17 对可育株和不育株亚麻进行 RAPD 分子标记及特异片段序列分析的研究, 对 HotStart Tag DNA 聚合酶浓度、退火温度、dNTP 浓度以及模板 DNA 的浓度进行了优化, 从而得出了各因素最适的 RAPD 反应体系。通过对产生多态性带的引物至少 5 次的筛选, 结果发现在 252 条随机引物中有三条引物, 即 S62、S135 和 G06 均可在遗传背景相似的兄妹交分离出的可育株和不育株亚麻中, 获得稳定的多态性差异带。据统计 S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0% 和 83.3%。其中引物 S62 和引物 S135 都能在不育株上获得一条稳定多态性差异带, 而在相应的可育株上却没有, 根据引物名以及片断大小将该差异带暂时命名为 S62-500 和 S135-350。引物 G06 却相反, 而是在可育株上获得一条稳定的多态性差异带, 相应的不育株上却没有, 并且也将该差异带暂时命名为 G06-650。

将 RAPD 标记得到的三条差异片段回收、克隆及测序, 然后用 BLAST 进行序列分析。结果表明序列 S62-500、S135-350 和 G06-650 都与水稻的不同染色体 DNA 具有一定的同源性。通过分析, 我们认为序列 S62-500 与亚麻核不育有着密切的关系。序列 S135-350 与亚麻核不育基因及其不育性的恢复基因有关。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关。

关键词: 亚麻; 显性雄性核不育; RAPD 标记; 差异片段的序列分析

RAPD Markers and Sequence Analysis of Specific Fragment Linked to Dominant Genomic Sterile Gene of Flax

Abstract

A total 252 arbitrary 10-mer primers were used to screen markers linked to the dominant male genomic sterile and fertile gene in flax. The optimum conditions of RAPD reaction were studied. It was found that three primers of S135, S62 and G06, which could stably amplify specific DNA fragments and the relevant percentages are 71.4%, 75.0% and 83.3%, respectively. S62 and S135, respectively, could produce RAPD markers correlated with dominant male genomic sterile gene, named S62-500 and S135-350. G06 could produce RAPD marker correlated with dominant male genomic fertile gene, named G06-650.

The cloned S62-500, S135-350 and G06-650 specific fragments were sequenced and analyzed the sequence with BLAST. The results of sequence analysis showed that S62-500 correlates closely with the genomic sterile gene of flax, S135-350 has the correlation to the genomic sterile gene of flax and fertility restoration gene, G06-650 may be correlative to the gene of dominant earliness of flax.

Key words: *Flax; Dominant Genomic Male Sterile; RAPD Markers; Sequence Analysis of Specific Fragment*

Directed by: Boffin. ZHANG Hui

Assoc. Boffin. SI Qibateer

Applicant for Master degree: GAO Fengyun (Crop Genetic & Breeding)

(College of Agriculture, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China)

目 录

- ┆┆┆ 文摘
- ┆┆┆ 英文文摘
- ┆┆┆ 论文说明：缩略语表
- ┆┆┆ 第一章 引言
- ┆┆┆ 第二章 RAPD 标记
- ┆┆┆ 第三章 RAPD 标记片段的克隆及序列分析
- ┆┆┆ 第四章 结论
- ┆┆┆ 致谢
- ┆┆┆ 参考文献
- ┆┆┆ 附录
- ┆┆┆ 作者简介

缩略语表

LB (Luria-Beritai medium)	LB 培养基
Amp (ampicillin)	氨苄青霉素
EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)	乙二胺四乙酸
Min (minute)	分钟
OD (optical density)	光密度
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
rpm (rotation per minute)	转/分
SDS (sodium dodecyl sulfate)	十二烷基黄酸钠
bp (base pair)	碱基对
Tris (trihydroxymethylamino methane)	三羟甲基氨基甲烷
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	随机扩增多态性 DNA
SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)	特异扩增区的序列
IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	5-溴-4 氯-3 吲哚- β -D-半乳糖苷
TBE (Tris Boric acid EDTA)	Tris-硼酸 EDTA

第一章 引言

亚麻是我国北方地区重要的经济作物和油料作物。亚麻纤维是我国五大麻纺纤维原料之一，纤维强度是棉花的 1.5 倍，是绢丝的 1.6 倍，可纺支数高，制作的高级衣料在国际市场十分走俏。亚麻不仅是北方群众喜爱的食用油，而且是很重要的工业用油。随着 α -亚麻酸作为保健、药用功能的不断开发，亚麻油作为营养保健品已开始进入千家万户，市场前景广阔。但由于亚麻是自花授粉作物，限制了遗传变异的扩大和杂种优势的利用，致使亚麻育种在丰产、抗病、优质等方面难以有重大突破。内蒙古农科院胡麻课题组发现的显性核不育亚麻是一个显性雄性核不育的突变体，它具有花瓣完全开放、花粉败育彻底、不育株标记性状明显、不育性稳定等特点。经“CAB 情报资料检索中心”检索，该材料在国内外属首次发现^[1]。由于它的标记性状明显，区别于已发现的核不育材料（水稻、小麦、谷子、油菜）^[2]，因此具有很高的利用价值。目前课题组已对显性核不育亚麻的不育机理进行了细胞学、生理生化的研究；对其遗传规律及利用途径进行了深入系统的研究，但关于显性雄性核不育亚麻分子机理的研究还属空白。

亚麻显性雄性核不育作为一种优良生物性状，很有必要开展雄性不育分子机理的研究，而要阐明这一现象，重要的是从有关基因组中克隆雄性不育相关基因。那么利用 RAPD 分子标记对该显性雄性核不育基因进行标记对克隆雄性不育相关基因具有非常重要的作用。

1 国内外亚麻生物技术研究概况

世界上共有 22 个国家和地区种植亚麻，进行亚麻生物技术研究的主要有加拿大、捷克、法国、葡萄牙、澳大利亚、俄罗斯、印度和中国等。经过二十多年的探索和研究取得了令人瞩目的进展。亚麻生物技术研究主要有花药培养单倍体育种、组织培养、原生质体培养、转基因技术的研究。

1.1 花药培养与单倍体育种

国内亚麻花药培养研究始于 70 年代，1978 年，孙洪涛等率先在国际上培育出第一批亚麻单倍体苗。研究探讨了外源激素对亚麻花药、花瓣、未授粉子房去分化培养的作用^[3]，找到了适合亚麻花药培养的激素水平搭配，采用 B₅^[4]、Ms^[5]、N₆^[6] 等基本培养基中的大量元素、微量元素^[7]对亚麻花药培养效果进行试验，得出了较为适合亚麻花药培养的培养基^[8]，并找到了检测再生植株是否为单倍体的合适方法^[9]。宋淑敏等

在花药培养方法上进行了改进,采用低温处理、双层培养法提高了亚麻花粉植株的产量^[14]。吴昌斌等进行了亚麻子房离体受精研究获得种皮不完整的种子及直接萌发的幼苗^[15]。刘燕等研究探讨了多胚性亚麻种子进行单倍体育种技术获得初步成功^[16]。

对禾本科作物来说,亚麻花药培养体系是比较成熟的,而且积累了丰富的理论知识,但是目前还没有关于单纯使用该技术育成正式推广的新品种的报导。

在国外,1979年有关于亚麻花药培养的研究初报。从所查文献资料来看,近几年来,从事亚麻花药培养与单倍体育种研究的主要有:加拿大的陈余荣,他所进行的研究是油用亚麻的花药培养(加拿大以油用亚麻为主)。Nichterlein, K. 等 1991、1993 年报导了从亚麻小孢子获得再生植株以及基因型和外界条件对植株再生的影响^[17,18]。俄罗斯全俄亚麻研究所生物技术育种专家 АлексейЦПОЛОЛЯКОВ 利用花药培养、多胚性种子利用等方法进行单倍体育种,培育出了纤维产量比对照增加 40%的新品系^[19]。波兰天然纤维作物研究所的 Iwona Rutkowska-Krause 在单倍体育种研究方面取得了显著成就。她认为低温处理对愈伤的形成没有作用,而花药接种后进行 2-4 周的暗培养对愈伤的形成及植株的再生具有明显的促进作用^[20]。捷克农技育种及服务有限公司的主要育种者 Eva Tejklova 1992 年报导了亚麻花药培养的初步结果^[21],四年后,又报导了不同因子对亚麻花药培养的影响^[22],通过花药培养单倍体育种技术选育出了高纤维品种 Venica,全麻率达到了 38%,2002 年已经注册推广。

1.2 组织再生体系的研究

1981 年我国孙洪涛等完成了亚麻组织培养植株再生的初步研究,成功的利用亚麻的茎尖、子叶、下胚轴为外植体诱导出亚麻的再生植株,进行三个世代的连续观察,获得雄性不育体、感病、矮秆等广泛的性状变异^[23]。同时应用组培技术对野生亚麻进行离体培养研究获得初步成功^[24],这将对亚麻新的种质资源的创造和野生资源的保存具有极其重要的意义。

1977 年国外在亚麻品种的改良中,已开始采用组织培养技术来产生再生植株^[25]。此外葡萄牙的 Cunha A 等人在 1987 年报导了不同自由甾醇含量和成分与亚麻体胚发生、无根苗形成和愈伤组织生长的关系^[26],找到了适合愈伤组织生长的激素水平搭配。1999 年对培养基参数就亚麻下胚轴外植体体胚发生的影响^[27]进行了总结。

1.3 原生质体培养

自 1970 年初首次获得原生质体再生植株成功以来,我国有 20 多种是通过原生质体获得的再生植株。1998 年,黑龙江省亚麻原料工业研究所科研人员在上海植物生

理研究所重点实验室的协作下,进行亚麻原生质体培养获得了再生植株,这为亚麻体细胞杂交研究奠定了基础。

1983年,国外有关于亚麻原生质体培养获得再生植株的报导,1998年法国的 Roger D 对原生质体培养过程中基本几丁质与亚麻体细胞形态发生的联系进行了研究^[80]。

1.4 转基因技术的研究

王玉富等采用微注射法成功地将外源 DNA 通过花粉管导入亚麻,并得到了过氧化物同工酶谱带明显变异的后代^[81],经田间鉴定发现在株高、工艺长度、抗倒伏性、花色、种皮等性状有变异^[82]。他们还利用根瘤农杆菌介导法进行亚麻转基因的研究^[83],并成功获得再生植株,初步建立起了根瘤农杆菌介导法亚麻转基因系统^[84]。目前已经获得抗除草剂 Basta 的转基因植株及抗虫基因 Bt 的再生植株。同年,王毓美等也报导了亚麻几丁酯酶基因导入的研究^[85]。

如上所述,我国分别采用农杆菌介导法和种质系统介导法成功的进行了目标基因的导入,获得了转基因植株或品系(种),初步建立了亚麻基因转化的受体系统,说明了我国亚麻转基因技术的研究已进入了世界先进行列,将为亚麻育种提供一个新的发展方向。

国外自从 1983 年 Hephum 等用根瘤农杆菌感染亚麻上胚轴得到亚麻肿瘤株系和 1987 年 Nazir Basiran 等报导了利用农杆菌介导法获得了亚麻转基因植株开始,亚麻育种进入转基因阶段^[86]。1989 年加拿大的 Alan McHugen 等人采用农杆菌介导法获得抗除草剂“绿黄隆”转基因亚麻新品系。捷克也进行了农杆菌法、基因枪法、真空负压法亚麻转基因技术的研究,将 35s 启动子基因导入亚麻并获得了变异株系^[87,88],目前俄罗斯也育成了抗“绿黄隆”的亚麻品系^[89]。澳大利亚也有关于转基因技术在亚麻上的应用^[90]。

2 RAPD 分子标记的应用

2.1 RAPD 分子标记的原理

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 即随机扩增多态性 DNA,是 1990 年由两组美国科学家 Williams 等和 Welsh 等同时发展起来的一种新的分子标记技术^[91,92]。它是以 DNA 聚合酶链式反应技术为基础,用 9-10 个核苷酸随机序列作为引物,以从组织中分离得到的 DNA 为模板,通过 PCR 扩增,合成多态性 DNA 片段。再进行电泳分离和溴化乙锭染色,多态性的产生可以由与引物互补的 DNA 核苷酸序

列中一个碱基的差别形成。

其基本原理是：模板 DNA 在高温（94~96℃）下变性，解成单链，然后又在低温（35~40℃）下与引物结合（退火），最后 Taq DNA 聚合酶在一定的温度（72℃）下促使引物与模板结合进行延伸，就这样在变性、退火、延伸不断地循环过程中不断地合成新的 DNA 链。

2.2 RAPD 分子标记在目标基因标记中的应用

RAPD 分子标记技术因其具有简便、快速、灵敏、安全等特点，得到了广泛的应用。目前该方法已广泛应用于种质资源鉴定，品种鉴定，作物起源与分类，目标性状基因的标记与定位等研究。在目标基因标记方面的应用有：许莉等（1998）用 RAPD 技术对光敏核不育水稻农垦 58S 进行标记^[40]。李子银等利用 RAPD 和双引物 RAPD 标记定位光敏核不育基因^[41]。干滢等（1999）从使用的 254 个随机引物中，发现有两个随机引物（2-70-11 和 60-37）可分别检测到一个与可育基因连锁的 RAPD 分子标记，即：2-70-11₇₀₀ 和 60-37₁₁₅₀ 的甘蓝型油菜“79.7”细胞核雄性不育基因^[42]。此外在其它作物中，如玉米、大豆等^[43,44]都有 RAPD 标记的成功报导。Delourme et al. (1994) 和 Hale et al. (1994) 分别在油菜和菜豆中找到 RAPD 标记^[45-46]。

3 本研究的目的是和意义

植物雄性不育及杂种优势的利用研究是我国农业科学倍受重视的研究领域，而作物雄性不育是杂种优势利用中十分重要的遗传工具。显性雄性核不育亚麻是内蒙古独有的亚麻遗传育种资源，它的发现填补了国内外研究的空白，对亚麻育种具有极其重要的价值。本研究是在过去研究工作的基础上，以亚麻雄性核不育单基因控制的不育材料分离出的不育株和可育株为供试材料，利用 RAPD 分子标记技术寻找 DNA 多态性差异，并回收该差异片断进行克隆以及序列分析。

RAPD 技术在植物遗传育种中有着举足轻重的地位，并且 RAPD 技术在各种作物中成功应用的实例为我们将要进行的亚麻显性核不育基因 RAPD 分子标记的初步研究提供了一个重要基础。就目前来说，有关亚麻在分子标记方面的研究比较少，迄今为止有加拿大的 Yong-BiFu 等对加拿大的植物基因资源中的亚麻分子特征进行过 RAPD 标记和我国的薄天岳等人对亚麻抗锈病基因^[47]、抗枯萎病基因进行了分子标记^[48]。因此，我们采用 RAPD 技术对亚麻显性核不育基因进行分子标记的初步研究，将对亚麻雄性核不育基因的分离和克隆并深入研究其表达特征，对于阐明雄性不育机理和拓宽作物杂种优势的利用范围，都有极其重要的意义，同时也为亚麻育种提供了

一个新的发展方向。

第二章 RAPD 标记

1 材料和方法

1.1 实验材料

用遗传背景相似的兄妹交分离出的可育株和不育株亚麻为材料。具体将核不育亚麻材料中以单基因控制的不育材料作为实验材料,播种后在开花期不育材料将按 1:1 分离出不育株和可育株,然后依据标记性状(不育株花为淡紫色,可育株花为深紫色)区分不育株和可育株。

1.2 实验方法

1.2.1 仪器设备

小型台式离心机	德国,	型号	18R
水浴摇床	德国,	型号	WB22
移液器	美国,	型号	RAININ
PCR 仪	德国,	型号	Eppendorf
电泳仪	美国,	型号	POWER-PAC300
多通道分子成像仪	美国,	型号	FLOUR-S MAX

1.2.2 实验试剂

引物: 10-mer 引物购自上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)和南京依贝仪器设备有限公司。HotStart Taq DNA 聚合酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)以及其它试剂药品均购自北京天为时代科技有限公司。

1.2.3 主要试剂的配制

1. 植物细胞裂解液(100 ml)

1M Tris·HCl(pH8.0)	10 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	1 ml
5M NaCl	10 ml
10% SDS	12.5 ml
70 μ l/ml β 巯基乙醇	7 ml

一个新的发展方向。

第二章 RAPD 标记

1 材料和方法

1.1 实验材料

用遗传背景相似的兄妹交分离出的可育株和不育株亚麻为材料。具体将核不育亚麻材料中以单基因控制的不育材料作为实验材料，播种后在开花期不育材料将按 1:1 分离出不育株和可育株，然后依据标记性状（不育株花为淡紫色，可育株花为深紫色）区分不育株和可育株。

1.2 实验方法

1.2.1 仪器设备

小型台式离心机	德国,	型号	18R
水浴摇床	德国,	型号	WB22
移液器	美国,	型号	RAININ
PCR 仪	德国,	型号	Eppendorf
电泳仪	美国,	型号	POWER-PAC300
多通道分子成像仪	美国,	型号	FLOUR-S MAX

1.2.2 实验试剂

引物：10-mer 引物购自上海生工生物工程技术有限公司（Sangon）和南京依贝仪器设备有限公司。HotStart Taq DNA 聚合酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）以及其它试剂药品均购自北京天为时代科技有限公司。

1.2.3 主要试剂的配制

1. 植物细胞裂解液（100 ml）

1M Tris·HCl(pH8.0)	10 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	1 ml
5M NaCl	10 ml
10% SDS	12.5 ml
70 μ l/ml β 巯基乙醇	7 ml

用灭菌超纯水定容至 100ml

2. TE 缓冲液 (100 ml)

1M Tris·HCl(pH8.0) 1 ml

0.5M EDTA(pH8.0) 200 μ l

用灭菌超纯水定容至 100ml

3. 电泳缓冲液 5×TBE (500 ml)

Tris 27g

硼酸 13.75 g

0.5M EDTA (pH8.0) 10 ml

用灭菌超纯水定容至 500ml

1.2.4 亚麻总 DNA 的提取

1.2.4.1 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 进行亚麻总 DNA 的提取

操作步骤:

1. 分别取亚麻可育株与不育株的新鲜叶片 100mg 置于研钵中, 加入液氮充分研磨。
2. 将研碎的叶片转移到加入 700 μ l 65℃ 预热的缓冲液 GP1 中, 然后 65℃ 水浴保温 20 分钟, 在水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。
3. 加入 700 μ l 氯仿, 充分混匀, 12,000 转离心 5 分钟。
4. 将上一步所得上层水相转入一个新的离心管中, 加入 700 μ l 缓冲液 GP2, 充分混匀。
5. 将混匀的液体转入吸附柱 CB 中, 12,000 转离心 30 分钟, 弃掉废液。(先加 700 μ l 离心, 弃废液, 再加入剩余的溶液, 再次离心。)
6. 在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液 GD(使用前请检查是否已加入乙醇), 12,000 转离心 30 秒, 并弃掉收集管中的废液。
7. 在吸附柱中加入 700 μ l 漂洗液 GW(使用前请检查是否已加入乙醇), 12,000 转离心 30 秒, 并弃掉收集管中的废液。
8. 在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 GW, 12,000 转离心 30 秒, 弃掉收集管中的废液。
9. 将吸附柱 CB 放回收集管中, 12,000 转离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液。
10. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 加入 50-200 μ l 洗脱缓冲液 TE(洗脱缓

冲液应在 60-70℃水浴预热), 室温放置 2-5 分钟, 12,000 转离心 2 分钟。

11. 离心得到的溶液再加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 转离心 2 分钟。
12. 上一步得到的液体为基因组 DNA, -20℃保存备用。

1.2.4.2 常规方法对亚麻总 DNA 的提取

操作步骤:

1. 分别取遗传背景相似的可育株和不育株亚麻的新鲜叶 0.2g。在液氮中研磨(越细越好)。
2. 将上述研碎的粉末状叶片转移至 1.5ml 离心管中, 加入 800 μ l 细胞裂解液充分混匀。65℃水浴保温 20 min。
3. 从水浴中取出离心管, 加入 0.25 ml 5mol/L KCl 溶液, 混匀, 冰浴 20 min。
4. 10,000 rpm 离心 10 min。
5. 将上清液转移至另一 1.5 ml 离心管中。
6. 加等体积 Tris·HCl 饱和酚/氯仿/异戊醇混匀(25:24:1), 12,000r/min 离心 5min, 取上清液。
7. 加等体积氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 12,000r/min, 离心 5min, 取上清液。
8. 加入 0.6-1 倍体积的异丙醇(沉淀 DNA), 混匀, 10,000r/min, 离心 10min, 弃上清。
9. 离心获得沉淀, 70%乙醇洗 3 次。风干沉淀。
10. 加入 500 μ l TE 缓冲液溶解 DNA。
11. 取 3 μ l 上清液, 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。提取得到的 DNA 带应为一条, 如 DNA 降解会出现弥散带型。

1.2.5 RAPD 扩增反应

1.2.5.1 RAPD 扩增反应条件的优化

本实验分别对 HotStart Taq DNA 聚合酶, dNTP 和模板 DNA 等浓度进行了最优化筛选。同时也对不同梯度的退火温度进行了筛选。其中反应体系优化过程中, 只有一个条件改变, 而其余条件不变。然后根据 RAPD 产物在凝胶上扩增 DNA 带的强弱和清晰度等差异上, 选出最适的 RAPD 扩增反应条件。

1.2.5.2 RAPD 标记及其标记产物的琼脂糖凝胶电泳检测

用 252 条 10 个碱基的随机引物对遗传背景相似的兄妹交分离出的 17 对可育株和不育株亚麻的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增反应。然后用 1.2% 琼脂糖凝胶对 RAPD 扩增产物, 在 $0.5\times$ TBE 缓冲液中, 60V 电压下进行电泳 (平板电泳), 2 小时 40 分后, 溴乙锭染色 30 分钟 (溴乙锭浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$), 在紫外光下观察后, 再把凝胶放在多通道分子成像仪中拍照, 通过照片上分离出的 DNA 片段清晰度, 以及分离出的 DNA 片段在相应的可育株与不育株亚麻之间存在的差异进行引物的筛选, 从而筛选出能够在相应的可育株与不育株亚麻之间产生稳定的多态性差异带的引物。用该引物扩增产生的稳定的多态性差异带为 RAPD 标记的目标产物。

2 结果与分析

2.1 提取的亚麻总 DNA 的浓度与质量检测分析

2.1.1 亚麻总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析



图 1 用试剂盒法提取的亚麻 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Gel electrophoresis graph of Flax DNA extracted by Kit



图 2 用常规法提取的亚麻 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Gel electrophoresis graph of Flax DNA extracted by convention method

注: 图 1 和图 2 中-为可育; +为不育。

从图 1 和图 2 中两种方法提取的亚麻总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果可以看出, DNA 谱带既亮又整齐没有出现拖尾和弥散现象, 并且加样孔又没有蛋白和其它物质, 说明 DNA 纯度很高没有其它杂质的污染, 也没有降解。因此, 这两种方法提取的 DNA 都可以作为 RAPD 分析中 PCR 反应的模板。

2.1.2 亚麻总 DNA 紫外分光光度计检测

经紫外分光光度计检测两种方法得到的 DNA 在 OD_{260} 处都有显著吸收峰, OD_{260}/OD_{280} 值常规法提取的为 1.85, 试剂盒法提取的为 1.92, 均在 1.8-2.0 之间。

因此, 通过以上两种检测结果显示两种方法提取的亚麻总 DNA 浓度和纯度都达到了 RAPD 的分析标准。

2.2 RAPD 反应分析

2.2.1 RAPD 反应条件优化的分析

2.2.1.1 HotStart Taq DNA 聚合酶浓度分析

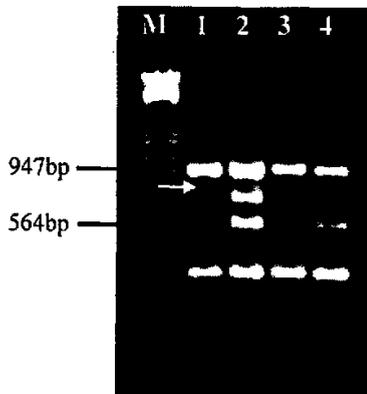


图 3 不同 HotStart Taq DNA 聚合酶浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 3 The effect of HotStart Taq DNA Polymerase concentration on the RAPD reaction

注: 图 3 中 M 为 λ DNA/EcoR I + Hind III; 1, 3 为可育; 2, 4 为不育; 1, 2 为每 25μ l 反应体系含 3.75U HotStart Taq DNA 聚合酶; 3, 4 为 2.5U。

图 3 是 HotStart Taq DNA 聚合酶的不同浓度对 RAPD 扩增反应影响的琼脂糖凝胶电泳图。根据图中 DNA 扩增带的强弱可以看出 1、2 谱带比相应的 3、4 谱带亮。并且 1 与 2 谱带在 564bp 和 947bp 之间存在着显著的差异, 即 1 谱带在该位置上有 4 条带比相应的 2 谱带多一条带, 如图中箭头所示, 且 1 谱带比相应的 2 谱带在亮度上弱一些。而 3 与 4 谱带之间无论在带的数目上、形态上还是在亮度上都不存在明显的差异。因此, 选出 1, 2 的 HotStart Taq DNA 聚合酶浓度为 RAPD 反应体系的最适浓度, 即为 3.75U/25 μ l。

2.2.1.2 退火温度的分析

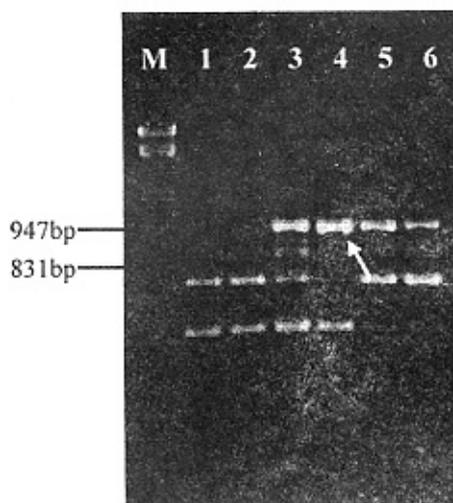


图4 不同退火温度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 4 The effect of annealing temperature on the RAPD reaction

注：图4中M为 λ DNA/EcoR I + Hind III, 1, 3, 5为可育; 2, 4, 6为不育;

1, 2退火温度为36℃; 3, 4为37℃; 5, 6为42℃.

根据图4对RAPD产物进行的琼脂糖凝胶电泳图谱中, 可知不同梯度的退火温度对样品进行的PCR反应是存在着一定差异的。1和2、5和6泳道的DNA扩增带的强弱和清晰程度以及该谱带在相应的可育与不育泳道之间不存在什么差异。而3和4泳道在831bp和947bp之间存在一定的差异, 即不育泳道比相应的可育泳道多一条带, 如图中箭头所指, 且不育带比相应的可育带在亮度上弱一些。因此, 3和4的退火温度是最适合的为37度。

2.2.1.3 dNTP浓度的分析

通过图5和图6中dNTP浓度的不同对RAPD扩增反应的影响的凝胶电泳图谱分析, 可以得出图6中谱带的亮度比图5中的既强又清晰, 并且图6中相应的可育与不育之间在谱带数目上存在着较明显的差异, 即5比6的谱带数要少。另外, 图6中的1和2谱带在小于500bp的位置上也存在一定的差异, 即在该位置2谱带没有1谱带亮。因此, 通过以上比较分析, 我们得出最适浓度的dNTP, 即每25 μ l反应体系中含dNTP 6.25 mM (见图5和图6)。



图5 dNTP 浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 5 The effect of dNTP concentration

on the RAPD reaction

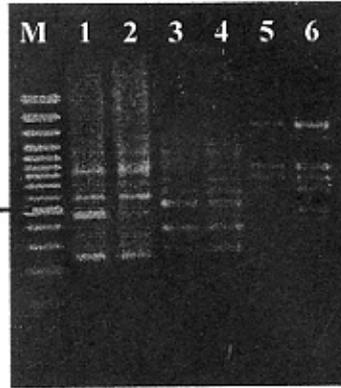


图6 dNTP 浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig.6 The effect of dNTP concentration

on the RAPD reaction

注：图5和图6中M为100bp DNA Ladder Plus, 1, 3, 5为可育, 2, 4, 6为不育;

图5中为每25 μ l反应体系含dNTP 5.0 mM; 图6中为6.25 mM.

2.2.1.4 模板 DNA 浓度对 RAPD 反应的影响

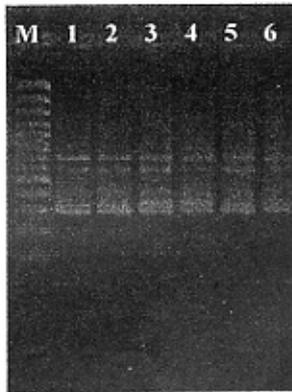


图7 DNA 模板的不同浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 7 The effect of DNA concentration on the RAPD reaction

注：图7中M为100bp DNA Ladder Plus, 1, 3, 5为可育, 2, 4, 6为不育;

1, 2为25 μ l体系含DNA34ng; 3, 4为45ng; 5, 6为51ng.

虽然 DNA 模板的浓度对 RAPD 反应影响不太大, 不过从图7中以不同浓度 DNA 为模板的 PCR 产物进行的琼脂糖凝胶电泳来看, 虽然扩增的条带数都一样, 不过扩

增谱带的清晰度和整齐度上存在一些差异。相对来说, 1 和 2 的条带比其它条带更清晰和整齐。因此, 以 1 和 2 的浓度为标准, 那么最合适的 DNA 模板的浓度就为每 25 μl 反应体系中含 34ng 的 DNA 量。

2.2.2 RAPD 扩增反应条件优化的结果

通过以上 RAPD 扩增反应条件的优化, 得出最终的 RAPD 扩增反应条件为: ① RAPD 扩增反应体积为 25 μl , 成分包括 2.5mM dNTPs, 2.5 μl ; 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}), 2.5 μl ; 10 μM 10-mer Primer, 2.0 μl ; 17 ng DNA 2.0 μl ; 2.5U/ μl HotStart Taq DNA 聚合酶, 1.5 μl ; 灭菌的超纯水, 14.5 μl 。②RAPD 扩增反应程序是 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 分钟, 然后进行以下热循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 秒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 分钟, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 分钟, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟。

2.2.3 RAPD 标记产物的琼脂糖凝胶电泳结果分析

本文共使用了 252 条 10 个碱基的随机引物对遗传背景相似的兄妹交分离出的 17 对可育株和不育株亚麻的基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 可分离出大小不同的 DNA 片段。并且不同的引物扩增出的 DNA 片段从 1~6 条不等, 平均每条引物产生 3 条扩增谱带, 扩增产物的大小变化在 200~2000bp。

在 252 条随机引物中, 有三条引物 S62(GTGAGGCGTC)、S135(CCAGTACTCC) 和 G06(GTGCCTAACC) 在兄妹交分离得到遗传背景相似的可育株和不育株亚麻中, 均可以扩增出稳定的多态性差异带 (详见图 8-图 10)。

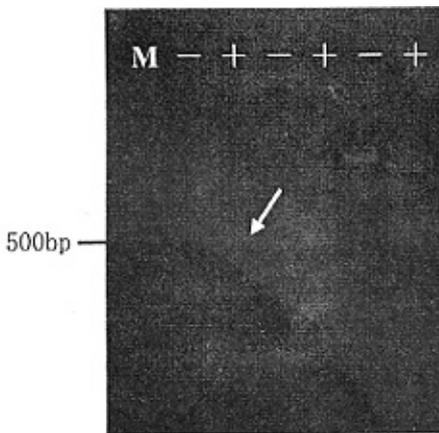


图 8 引物 S62 的 RAPD 反应结果

Fig.8 The RAPD reaction of S62

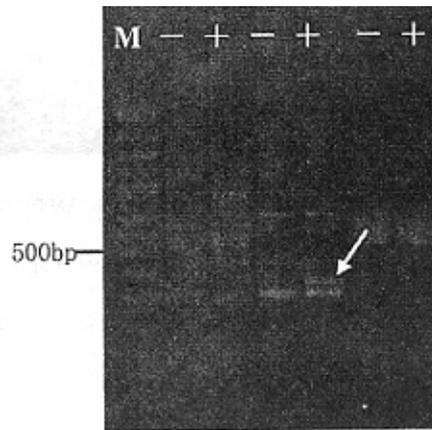


图 9 引物 S135 的 RAPD 反应结果

Fig.9 The RAPD reaction of S135

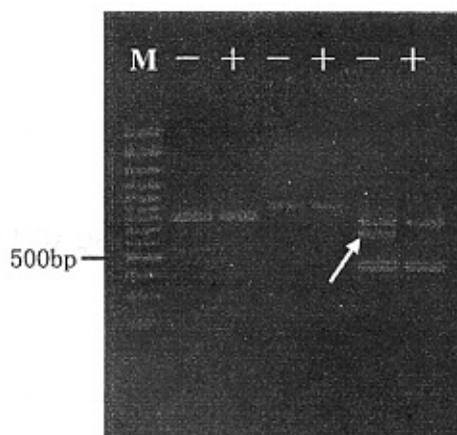


图 10 引物 G06 的 RAPD 反应结果

Fig.10 The RAPD reaction of G06

注： 图 8-图 10 中-为可育；+为不育；M 为 100bp DNA Ladder Plus.

经过多次（每条引物至少 5 次）的重复性实验，引物 S62 和 S135 均表现出不育株比相应的可育株多一条带，说明这两条差异带与核不育有关。两条差异带的大小约为 500bp 和 350bp，如图 8 和图 9 中箭头所指。根据所用引物名称及扩增片段的大小，我们把差异片段暂时命名为 S62-500 和 S135-350。而引物 G06 却表现出可育株比相应的不育株多一条带，那么它与可育有关。该差异带的大小约为 650 bp，如图 10 中箭头所指。同样根据所用引物名称及扩增片段的大小，我们把差异片段暂时命名为 G06-650。

3 讨论

3.1 RAPD 标记的重复性评价

RAPD 的可重复性，针对 RAPD 重复性差的问题，刘新芝等（1997）利用 RAPD 分子标记对我国目前推广的玉米杂交种的 15 个主要亲本自交系进行了遗传距离测定一文中认为只要严格控制反应程序的各个循环参数的稳定性，重复的结果不难得到，并已筛选出玉米 PCR 反应的最佳条件。因此，RAPD 反应条件的优化是至关重要的。本文通过对 RAPD 反应条件的优化，获得了稳定的多态性带，并且 S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0%和 83.3%。

3.2 RAPD 标记的可靠性评价

尽管 RAPD 标记的可靠性差,但可以将 RAPD 标记转换成 SCAR 标记,这样可极大地提高其标记的准确性和可靠性。薄天岳等人(2002)在亚麻抗锈病基因 M4 的特异分子标记一文中,将 RAPD 标记成功地转换为特异的 SCAR 标记。这将为 RAPD 标记技术在亚麻领域的其它方面的应用得到推广。因此,为了提高 RAPD 标记的准确性和可靠性,我们有必要将该 RAPD 标记转换为特异的 SCAR 标记。

3.3 遗传背景相似的兄妹交由于育性分离得到的可育株和不育株亚麻的遗传背景极其相似,主要是在育性上存在差异,并且 S62-500 和 S135-350 这两条差异片段只出现在不育株上,而与此相对应的可育株上却没有。因此,我们认为 S62-500 和 S135-350 这两条差异带可能与亚麻显性雄性核不育基因有关,可以作为该不育基因的分子标记。

3.4 由于差异片段 G06-650 只出现在可育株上而与此相对应的不育株上却没有。因此,我们认为该差异带可能与可育有关,可作为可育基因的分子标记。

第三章 RAPD 标记片段的克隆及序列分析

1 方法

1.1 实验方法

1.1.1 仪器设备

与第二章 1.2.1 相同。

1.1.2 实验试剂

pGM-T Easy PCR 产物克隆试剂盒、细菌(TOP10 感受态)购自北京天为时代科技有限公司。其它试剂药品均与第二章 1.2.2 相同。

1.1.3 主要试剂的配制

1. LB 液体培养基(1000ml)

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	10 g

3.2 RAPD 标记的可靠性评价

尽管 RAPD 标记的可靠性差,但可以将 RAPD 标记转换成 SCAR 标记,这样可极大地提高其标记的准确性和可靠性。薄天岳等人(2002)在亚麻抗锈病基因 M4 的特异分子标记一文中,将 RAPD 标记成功地转换为特异的 SCAR 标记。这将为 RAPD 标记技术在亚麻领域的其它方面的应用得到推广。因此,为了提高 RAPD 标记的准确性和可靠性,我们有必要将该 RAPD 标记转换为特异的 SCAR 标记。

3.3 遗传背景相似的兄妹交由于育性分离得到的可育株和不育株亚麻的遗传背景极其相似,主要是在育性上存在差异,并且 S62-500 和 S135-350 这两条差异片段只出现在不育株上,而与此相对应的可育株上却没有。因此,我们认为 S62-500 和 S135-350 这两条差异带可能与亚麻显性雄性核不育基因有关,可以作为该不育基因的分子标记。

3.4 由于差异片段 G06-650 只出现在可育株上而与此相对应的不育株上却没有。因此,我们认为该差异带可能与可育有关,可作为可育基因的分子标记。

第三章 RAPD 标记片段的克隆及序列分析

1 方法

1.1 实验方法

1.1.1 仪器设备

与第二章 1.2.1 相同。

1.1.2 实验试剂

pGM-T Easy PCR 产物克隆试剂盒、细菌(TOP10 感受态)购自北京天为时代科技有限公司。其它试剂药品均与第二章 1.2.2 相同。

1.1.3 主要试剂的配制

1. LB 液体培养基(1000ml)

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	10 g

用 1N NaOH 调 pH 至 7.0, 加水至总体积 1000 ml, 121℃ 湿热灭菌 20 分钟。

2. LB 固体培养基 (1000ml)

只需在 1L LB 液体培养基中加 15 g 琼脂, 然后 121℃ 湿热灭菌 20 分钟。

3. 质粒快速提取缓冲液

0.3M 蔗糖	5.13g
1M Tris•HCl(pH8.0)	1.25ml
0.02% 溴甲酚绿	5mg
0.5M EDTA(pH8.0)	2.5 μ l

灭菌超纯水定容到 50 ml。

4. SDS 碱液

10N NaOH	30 μ l
10% SDS	200 μ l
灭菌超纯水	770 μ l

5. 电泳缓冲液 5×TBE 的配制与第二章 1. 2. 3 中的相同。

1.1.4 RAPD 标记片段的回收纯化

① 将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下放入干净的离心管中, 称取重量。

② 向胶块中加入 3 倍体积溶胶液 PN, 50℃ 水浴放置 10 分钟, 期间不断温和地上下翻转离心管, 以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块, 可再补加一些溶胶液或继续放置几分钟, 直至胶块完全溶解(若胶块的体积过大, 可事先将胶块切成碎块)。

③ 将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CA1 或 CA2 中(吸附柱放入收集管中), 13,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放入收集管中。

④ 向吸附柱中加入 700 μ l 漂洗液 PW(使用前检查是否已加入无水乙醇), 13,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放入收集管中。

⑤ 向吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 PW, 13,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液。将离心吸附柱 CA1 或 CA2 放回收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温或 50℃ 温箱数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液

影响下一步的实验。

⑥ 将吸附柱放入一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量 65-70℃ 水浴预热的洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟。13,000 rpm 离心 1 分钟收集 DNA 溶液。

⑦ 为了提高 DNA 的回收量，可将离心得到的溶液重新放回离心吸附柱中，重复步骤⑥。

⑧ 将⑦步得到的 DNA 置于零下 20℃，保存备用。

1.1.5 DNA 的克隆

将回收纯化的 DNA 片段与 pGM-T Easy 载体连接，转化感受态大肠杆菌细胞，经筛选挑出含插入片段的单克隆菌落，快速提取质粒后，进行电泳和 PCR 检测插入片段。主要步骤如下：

1.1.5.1 连接反应体系

10 × Ligation Buffer I	1μl
pGM-T Easy 载体 (50ng/μl)	1μl
T ₄ DNA Ligase (3U/μl)	1μl
回收的 DNA 片断	6μl
无菌去离子水	1μl
Total	10μl

16℃保温过夜。

1.1.5.2 转化

1.1.5.2.1 转化平板的制备

向铺好的含有 Amp（氨苄青霉素）的固体琼脂平板培养基表面加入 16μl 50 mg/ml IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷），40μl 20mg/ml X-gal（5-溴-4 氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷），使用无菌的弯头玻璃棒将其均匀的涂开，避光置于 37℃放置 1-3 小时，使溶解 X-gal 的二甲基甲酰胺尽量挥发干净。

1.1.5.2.2 热激转化

① 取 5μl 连接产物加到 50μl Top 10 感受态细胞中（感受态细胞应刚从-70℃冰箱中取出放于冰浴上，待刚刚解冻时加入连接产物，连接产物的加入量不超过感受态细胞体积的十分之一），轻弹混匀，冰浴 30 分钟。同时，用超螺旋质粒 pUC19 同步转

化感受态细胞作为对照检测转化效率, 将 1 μ l pUC19 加入另一只含有 50 μ l 感受态细胞的管中, 其余的操作步骤与连接产物的转化步骤同步进行。

② 将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 60-90 秒, 取出管后立即置于冰浴中放置 2---3 分钟, 其间不要摇动离心管。

③ 向离心管中加入 250 μ l 37 $^{\circ}$ C 预热的 LB(不含抗生素)培养基, 180 转/分, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 分钟。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达, 使菌体复苏。

④ 将离心管内容物混匀, 吸取 100 μ l 已转化的感受态细胞加到含有 Amp, IPTG, X-gal 的 LB 固体琼脂培养基上, 用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时。(涂布剩余的菌液可置于 4 $^{\circ}$ C 保存, 如果次日的转化菌落数过少可以将剩余的菌液再涂布于新的培养板上)。

1.1.5.2.3 蓝白菌落筛选与划线培养

分别挑取生长在含有 Amp, IPTG, X-gal 的 LB 固体琼脂培养基上的蓝色、白色单菌落, 划线培养在另一含有 Amp 的 LB 固体琼脂培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。

1.1.5.3 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的检测

1.1.5.3.1 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的琼脂糖凝胶电泳检测(Kieser 法)

用牙签各取少量划线培养的蓝、白菌落分别加入到 50 μ l 的质粒快速提取缓冲液中, 混匀, 各加入 25 μ l SDS 碱液中, 迅速轻轻混匀, 于 65 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 水浴保持 10-15 分钟, 自然冷却至室温, 加入 35 μ l 水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 彻底乳化, 10,000 rpm 离心 10 分钟, 分别取 10 μ l 蓝、白菌落的上清液用 0.8%的琼脂糖凝胶在 0.5 \times TBE 缓冲液中进行电泳。

1.1.5.3.2 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的 PCR 检测

用牙签取少量经 Kieser 法筛选获得的阳性克隆(白色菌落), 于 100 μ l 水中, 悬浮, 煮沸 10 分钟以上, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 取 5 μ l 上清液做 PCR。

PCR 反应体系 25 μ l:

10 \times Buffer(含 Mg ²⁺)	2.5 μ l
dNTP (2.5mM)	2.5 μ l
Primer (10 μ M)	2.0 μ l

模板	5.0 μ l
HotStart Taq DNA 聚合酶(2.5U/ μ l)	1.5 μ l
dd H ₂ O	11.5 μ l
Total	25 μ l

PCR 反应程序与第二章 2.2.2 的 RAPD 反应程序相同。

取 10 μ l PCR 产物，用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的序列测定

分别从三个差异片段的重组克隆中随机各选取一个独立的重组克隆，分别命名为 S62、S135、G06。寄到上海生工生物工程 DNA 测序部测序。

2 结果与分析

2.1 回收的 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳检测分析

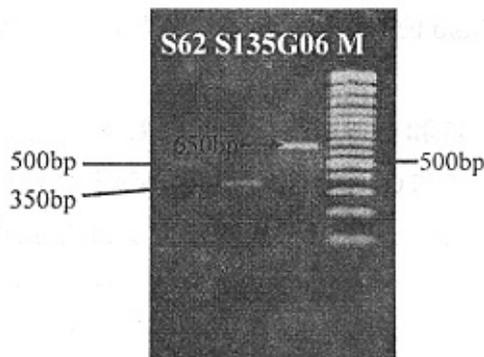


图 1 回收 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig.1 Gel electrophoresis test graph for extraction of DNA

注：图 1 中 M 为 100bp DNA Ladder Plus.

图 1 中结果显示，回收的 S62，S135 和 G06 三个 DNA 的谱带都比较亮，并且也很整齐，说明没有其它杂质的污染。并且各片段大小与我们预期的目的片段的大小一致。

2.2 回收 DNA 片段紫外分光光度计检测

经紫外分光光度计检测回收的 DNA 片段在 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.81，在 1.8-2.0 之间。

因此，通过以上两种检测说明回收 DNA 片段的浓度和纯度均达到了克隆分析的要求。

2.3 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的琼脂糖凝胶电泳检测分析



图 2 重组质粒 S62 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig. 2 Gel electrophoresis test graph for recombined plasmid S62



图 3 重组质粒 S135 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig. 3 Gel electrophoresis test graph for recombined plasmid S135



图 4 重组质粒 G06 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig. 4 Gel electrophoresis test graph for recombined plasmid G06

注：图 2-图 4 中 2-8 为重组质粒，1 为没有重组的质粒。

根据对图 2-图 4 中，从蓝色菌落中提取的 1 号质粒与 2-8 号从白色菌落中提取的

质粒的琼脂糖凝胶电泳谱带的分析,可以看出 1 号质粒的电泳位置比 2-8 号从白色菌落中提取的质粒的位置靠前,因为分子量小的质粒会跑在前面而分子量大的则跑在后面,说明位置靠后的质粒已重组上,而位置靠前的质粒没有插入。所以图 2-图 4 的结果显示出 2-8 号质粒均已重组,即 2-8 号质粒为重组质粒。

2.4 重组质粒中 S62、S135 和 G06 差异片段的 PCR 检测结果分析

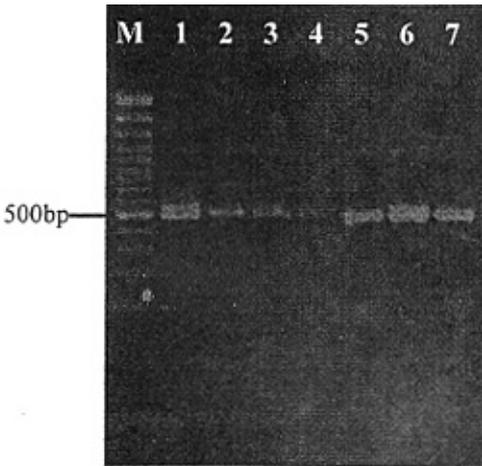


图 5 重组质粒 S62 的 PCR 检测

Fig. 5 The PCR test of recombinated plasmid S62

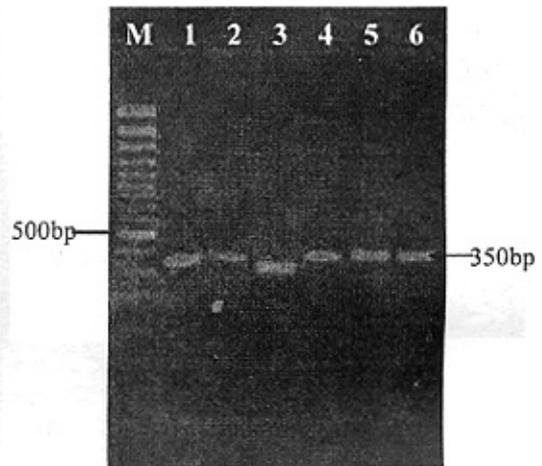


图 6 重组质粒 S135 的 PCR 检测

Fig.6 The PCR test of recombinated plasmid S135

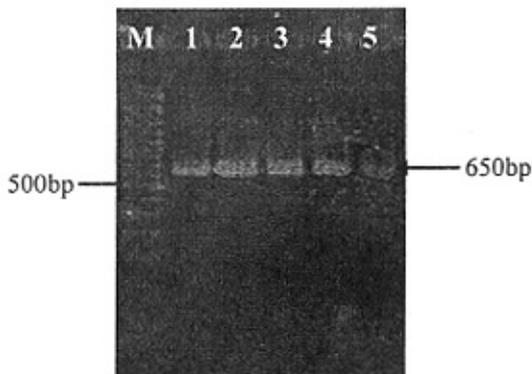


图 7 重组质粒 G06 的 PCR 检测

Fig. 7 The PCR test of recombinated plasmid G06

注: 图 5-图 7 中 M 为 100bp DNA Ladder Plus; 1-7 为重组质粒.

图 5 中结果显示 S62 重组质粒的 1-7 号 PCR 产物的片段大小约为 500 bp, 与我们回收的 S62 目的片段大小一致, 说明该 1-7 号重组质粒为阳性重组克隆, 即为我们所要的目的片段的克隆。

从图 6 可知 S135 重组质粒的 1-6 号 PCR 产物中, 除 3 号重组质粒的片段明显小于 350 bp 外, 其余 5 个重组质粒的片段大小都约为 350 bp, 并且与我们回收的目的片段一样大。这说明除 3 号以外, 其余 5 个重组质粒都是阳性重组克隆。

图 7 中 1-5 号重组质粒同样也是与我们回收得到的目的片段大小一致, 说明是我们所要的阳性重组克隆。

2.5 差异片段 S62-500、S135-350 和 G06-650 的测序结果分析

S62-500、S135-350 和 G06-650 三条差异片段的大小分别为 499 bp、335 bp 和 649 bp。将得到的三条差异片段的序列经 BLAST 分析, 结果表明与水稻的不同染色体 DNA 具有一定的同源性。

S62-500 的序列

GTGAGGCGTCCCCAACTCAACTAATTAACCCACCATCCTAGCGCTAA
 AATCATGGAGGTCTGGGAGTACGTATCCATCAGACGGTATCATAAACCAT
 AGACGGCAAACCTGTGGCCCCGTAATCATGAGGGGCAAACCTCAGCCCAT
 AAATCATAGTGGGCAAACTGTTGCCCGAATCATAAGGGGCGGTGATCTA
 GCTAGTGAGTTTCATGTTTTAAATCCACCTATTACACATCTAAGTGGGAGT
 TCTTATTTCTTATCACTGGTCATGTCTAATCTTATCATCATCTAACATTAAT
 GTTAGTCTAACCTTATAGTTACATAGGAGACATAACTTGCACAACATCAG
 AGTAATAACATGTCACAAATAAACACTCAATCATGGAATCATGACATAAA
 TTAAATGCATCGAATTAACCTAATAACCTACTGCAACGACAAGA
 TATTACCCCTTAAACCAAACGACCTTATTGGCAAGCCGACGCCTCAC

S135-350 的序列

CCAGTACTCCACCGCCACTGCTCCCCATATCTGAACCCGATTTCAATCAAT
 CTGTTGAAAACCTTAAGAAAATAGAGGAGAAAGGTAGCTAGAGATTGATCTGTG
 CTAGTTTCTCTACTTCATGGTTTGGCTTTTCATATAGAACAATCTAATAAATAA
 AAAGCAAAGGGGATAGAGGTGATTTATATATAACAAACAAAAGGAAGAGGA
 AAAAGAGGGGTTTTTCCGGTGACAACAATTTCCAGCCGTTGGATTTGAGATG
 ATGATAAAATGGAGCTTTCGTCTCGGAAACAGACTACTCAAGTAAGTTGTGGG
 CCATATTTGGAGTACTGG

G06-650 的序列

GTGCCTAACCGGTACAGGTGGTAAGCCAGTTCATGAGCAGCCCTCGAAAG
 AGCCATCTCGATGCAGTGCACAGGATTCTACAATGCCTCTCAGGTACTATTGATG
 TTGGACTATATTTTCCTTCCTCAGGTTCTTCTACTCTCACAGCATTCCGCCGATGGT
 GATTAGCCGGGCGTGTGGATACACGTCGCTTGACTTGCAAATGGTGTGTTAAAT
 CTGGTAATTCCTTTATTAGTTGGCGGTGTAAGAAGCATGATTGTACATCAAAGTC
 TTCTACTAAAGATGAGTACAATCAATGTCAGAAGTGTGCTCAAAGGTTGGGTGG
 TTGATGAGGTTACTTGACGAGTTTGGTGCCAACATCGAGACTCCCATTTCAGTTA
 GTTGGTGACAACACTAGTGCTATTTCAGATAGCCAATAATCCAGTTCTTCATGATC
GCACGAAACACATATAGACTAACGTGCATTCATTCGGGACTTGATCACTGAAG
 GAGCTATCAAGTTGGCCTACATTAATTCTAAAGATCAAATTTCCAACCTTGCTTAC
 GAAGCGTCTTTCTACAAATCGACACTGGTTCTTGGCACACAAATTGATGATGCA
 CAGCAGCCACCATCAGTTTGAGGAGGCTGTTATTGTATATCGGGTTAGGCACA

注：以上标有下划线的均为随机引物。

2.5.1 差异片段 S62-500 的序列分析

通过 BLAST 分析，其中 190-430 bp 同源性最高（中部）。有 27 份核心同源序列，同源序列长度为 20-28 个核苷酸。

其中序列中标有点式下划线的区段(405bp-429 bp)与水稻的第 8 染色体有部分同源性如下：

> gi | 58531195 | dbj | AP008214.1 | *Oryza sativa*(japonica cultivar-group)
genomic DNA, chromosome 8, complete sequence.

Length=28434780

Score=42.1 bits(21), Expect=1.6

Identities=24/25 (96%), Gaps=0/25(0%).

Strand=Plus/Minus.

Query	405	AATGCATCGAATTA	AACTTAAT	429
Sbjct	22550639	AATGCATCAAATTA	AACTTAAT	22550615


```

Query 430      GATCGCACGAAACACATATA      499
                  |||
Sbjct 35528729 GATCGCACGAAACACATATA      35528710

```

> gi | 58531196 | dbj | AP008215.1 | *Oryza sativa*(japonica cultivar-group)
genomic DNA, chromosome 9, complete sequence.

Length=22696651

Score=40.1 bits (20), Expect=8.5

Identities=20/20(100%), Gaps=0/20(0%).

Strand=Plus/Plus.

```

Query 383      GTGACAACACTAGTGCTATT      402
                  |||
Sbjct 7770060   GTGACAACACTAGTGCTATT      7770079

```

邓晓建等利用 F_2 群体和 4 种分子标记技术, 将 6442S-7 携带的 1 个显性早熟基因定位于水稻第 3 染色体短臂靠近端部一侧^[50]。而我们从亚麻可育株上得到的 G06-650 序列与水稻的第 3 和第 9 染色体分别在 383 bp-402 bp 和 430 bp-499 bp 之间各有 20 个核苷酸是具有同源性, 同源比率均为 100%。基于目前所查文献还没有关于水稻第 9 染色体的报导, 那么认为序列 G06-650 很可能与显性早熟基因有关。

通过以上分析, 我们认为序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关。

3 讨论

3.1 经 BLAST 分析, 我们得到的 3 条差异片段与动物、人、果蝇以及一些植物的基因序列有同源性, 因为我们主要研究的是关于亚麻核雄性不育基因, 所以排除一些人和动物的分析, 主要集中在植物上。在这些植物中水稻研究的比较透彻, 那么本文主要将该 3 条差异片段的序列与水稻基因组的序列进行了同源性的比对。由于从所查文献中只能获得与水稻不育基因及其不育性恢复基因相关的一些信息, 而找不到具体的有关控制不育基因的座位在水稻的某染色体上的多少碱基位置处。我们只能依据 BLAST 分析, 推出序列 S62-500 很可能与亚麻核不育有着密切的关系; 序列 S135-350

与亚麻核不育基因及其不育性的恢复基因有关。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关。

3.2 本研究通过 RAPD 标记对亚麻显性雄性核不育基因进行标记, 将标记到的差异带回收、克隆、测序并进行了序列分析。虽然, RAPD 反应的可重复性差并且假阳性又很高。但是, 本文通过对 RAPD 反应条件的优化, 获得了稳定的多态性带, 并且 S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定性的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0%和 83.3%。说明该 RAPD 标记中获得的差异带是可行的, 那么为了能够获得更稳定的多态性差异片段, 今后我们可以将 RAPD 标记转化为更稳定、可靠的 SCAR 标记。特别是通过对该差异带回收、克隆和测序后, 经 BLAST 分析, 发现与水稻的第 3、5、8、9 和 10 染色体有同源性。我们得出了序列 S62-500 很可能与亚麻核不育有着密切的关系; 序列 S135-350 与亚麻核不育基因及其不育性的恢复基因有关。这将为今后从 mRNA 水平研究亚麻显性雄性核不育基因奠定了一定的基础。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关, 将对亚麻遗传改良具有重要的应用价值。

第四章 结论

1 本实验中我们通过只改变一个 RAPD 反应条件, 而其余条件不变, 对 RAPD 反应条件进行优化, 得到了各因素最适的 RAPD 反应体系。并且在 252 条随机引物中筛选出三条引物 S62(GTGAGGCGTC)、S135(CCAGTACTCC) 和 G06(GTGCCTAACC), 通过多次 (每个引物至少 5 次) 重复实验它们都能获得稳定的多态性差异带, S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0%和 83.3%。S135、S62 和 G06 三条引物各标记到的一条差异片段, 其大小为分别为 335 bp、499 bp 和 649 bp, 命名为 S135-350、S62-500 和 G06-650。其中 S135-350 和 S62-500 只在不育株上能标记到, 而在相应的可育株上却标记不到。相反 G06-650 只是在可育株上能标记到而相应的不育株上却没有该标记。

2 经过对 RAPD 标记片段的回收、克隆、测序和 BLAST 分析, 我们得出了序列 S62-500 很可能与亚麻核不育有着密切的关系; 序列 S135-350 与亚麻核不育基因及其

与亚麻核不育基因及其不育性的恢复基因有关。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关。

3.2 本研究通过 RAPD 标记对亚麻显性雄性核不育基因进行标记, 将标记到的差异带回收、克隆、测序并进行了序列分析。虽然, RAPD 反应的可重复性差并且假阳性又很高。但是, 本文通过对 RAPD 反应条件的优化, 获得了稳定的多态性带, 并且 S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定性的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0%和 83.3%。说明该 RAPD 标记中获得的差异带是可行的, 那么为了能够获得更稳定的多态性差异片断, 今后我们可以将 RAPD 标记转化为更稳定、可靠的 SCAR 标记。特别是通过对该差异带回收、克隆和测序后, 经 BLAST 分析, 发现与水稻的第 3、5、8、9 和 10 染色体有同源性。我们得出了序列 S62-500 很可能与亚麻核不育有着密切的关系; 序列 S135-350 与亚麻核不育基因及其不育性的恢复基因有关。这将为今后从 mRNA 水平研究亚麻显性雄性核不育基因奠定了一定的基础。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关, 将对亚麻遗传改良具有重要的应用价值。

第四章 结论

1 本实验中我们通过只改变一个 RAPD 反应条件, 而其余条件不变, 对 RAPD 反应条件进行优化, 得到了各因素最适的 RAPD 反应体系。并且在 252 条随机引物中筛选出三条引物 S62(GTGAGGCGTC)、S135(CCAGTACTCC) 和 G06(GTGCCTAACC), 通过多次 (每个引物至少 5 次) 重复实验它们都能获得稳定的多态性差异带, S135、S62 和 G06 各引物出现的稳定的多态性差异带的频率分别为 71.4%、75.0%和 83.3%。S135、S62 和 G06 三条引物各标记到的一条差异片段, 其大小为分别为 335 bp、499 bp 和 649 bp, 命名为 S135-350、S62-500 和 G06-650。其中 S135-350 和 S62-500 只在不育株上能标记到, 而在相应的可育株上却标记不到。相反 G06-650 只是在可育株上能标记到而相应的不育株上却没有该标记。

2 经过对 RAPD 标记片段的回收、克隆、测序和 BLAST 分析, 我们得出了序列 S62-500 很可能与亚麻核不育有着密切的关系; 序列 S135-350 与亚麻核不育基因及其

不育性的恢复基因有关。这将为今后从 mRNA 水平研究亚麻显性雄性核不育基因奠定一定的基础。而序列 G06-650 可能与控制亚麻的显性早熟基因有关。将对亚麻遗传改良具有重要的应用价值。

致 谢

本论文是在导师张辉研究员和斯钦巴特尔副研究员的悉心指导和严格要求下完成的。从论文的选题、实验方案的设计、实施到论文的撰写和修改，无不浸透了导师的心血。导师渊博的知识、严谨的治学态度、坚持不懈、勇于创新的精神、正直的人格，将对我的'人生之路有着莫大的影响。在此，谨向恩师致以诚挚的谢意。

在论文完成期间，内蒙古大学张鹤龄老先生和哈斯教授给予很多指点和良好的建议，在此特向二位老师表示诚挚的谢意。

在论文完成期间，还得到导师课题组各位老师以及内蒙古农牧业科学院生物中心的各位老师的大力支持和帮助，在此一并表示衷心的感谢！

在学习期间得到了农学院老师和同学的关心和帮助，在此一并表示衷心的感谢！

特别感谢多年来我的父母对我学习和生活上的理解、支持和无微不至的关怀！

感谢所有帮助和支持我的老师、同学和朋友们！

参 考 文 献

- 1 陈鸿山. 核不育油用亚麻研究初报[J]. 华北农学报, 1986, 1 (1): 87-91
- 2 邓景杨. 农作物雄性核不育基因的研究及其在育种上的应用[C]. 全国生命科学前沿学术研讨会论文集, 1988, 60-65
- 3 李树林. 甘兰型油菜细胞核雄性不育性的遗传规律探讨及其应用[J]. 上海农学报, 1985, 1 (2): 1-12
- 4 张书芳, 宋兆华, 赵雪云. 大白菜细胞核基因互作雄性不育系选育及应用模式[J]. 园艺学报, 1990, 17 (2): 117-125
- 5 孙洪涛, 董丽辉, 傅卫东, 等. 外源激素对亚麻花药、花瓣未授粉子房去分化培养的作用[J]. 中国麻作, 1984 (4): 41-43
- 6 Ghpta Hs , et al. J. plant physiol, 1998, 133: 457
- 7 Melchers SG , et al. Carlsberg Res Commun, 1978, 43: 203
- 8 孙宝林. 生物工程学报[J], 1990 (6): 116
- 9 姬妍茹, 李振伟, 鲁振家, 等. B₅培养基中的微量元素在亚麻花药培养中的作用[J]. 中国麻作, 1997 (3): 18
- 10 孙洪涛, 曲家祥, 傅卫东, 等. 应用多因子实验的方差分析筛选亚麻花药培养基[J]. 植物学通报, 1988, 5 (3): 176-181
- 11 孙洪涛, 傅卫东, 吴昌斌, 等. 影响亚麻花药培养的某些因素[J]. 植物学通报, 1995 (3)
- 12 宋淑敏, 孙洪涛, 傅卫东, 等. 亚麻花药培养研究的进展[J]. 中国麻作, 1996, 18 (4): 4-6
- 13 吴昌斌, 孙洪涛, 宋淑敏, 等. 亚麻子房离体受精研究初报[J]. 中国麻作, 1997 (2): 16-17
- 14 刘燕. 多胚性亚麻种子的单倍体育种技术[J]. 中国麻作, 1999 (3): 19-20
- 15 Nichterlein, K. , et al. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from another callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. Euphytica, 1991, 58: 157-164
- 16 Nichterlein, K. , et al. Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. Plant Cell, Report, 1993, 12: 426-430
- 17 Poliakov A. V. , et al. Perspectives of haploids use for flax improvement (*Linum usitatissimum* L.) [J]. Report of flax genetic resources workshop, Bron 8-10

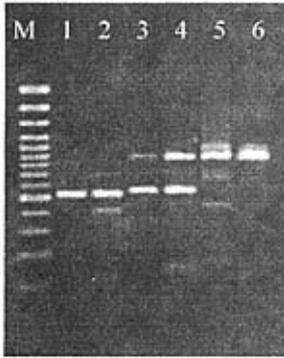
- November, 1994, 38-41
- 18 Rutkowska-Krause I., et al. Plant regeneration through anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) [M]. Proceedings of the third meeting of the international flax research group, 7-8 November 1995: 83-90
 - 19 Tejklova E. The first results with anther culture of *Linum usitatissimum* L. [J]. Proceeding Biotechnology in Central European Initiative Countrise, Graz, 1992b: 51
 - 20 Tejklova E. Some facters affecting anther culture *Linum usitatissimum* L. [J]. Rostlinna Vyroba, 1996, 42 (6): 249-260
 - 21 苑志辉, 孙洪涛, 武昌斌, 等. 亚麻体细胞无性系的建立及其植株再生 [J]. 中国麻作, 1997, 19 (1): 17-18, 32
 - 22 姬妍茹, 田玉杰, 苑志辉, 等. 用组织培养法繁殖野生亚麻的研究 [J]. 中国麻作, 2001 (4): 8
 - 23 孙万仓, 党占海, 安贤慧, 等译. 亚麻育种程序 [M]. 世界油料作物, 1990, 516-519
 - 24 Cunha A, et al. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax [J]. Plant science Limerck 1997, 124 (1)
 - 25 Cunha A, et al. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyls explants of flax (*Linum usitatissimum* L): effect of carbon source, total inorganic and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin [J]. Journal of plant physiology 1999, 155 (4-5)
 - 26 Roger D, et al. Basic chitinases are correlated with the morphogenic response of flax cell [J]. phylogia plantarum, 1998, 103 (2)
 - 27 王玉富, 刘燕, 乔广军, 等. 亚麻外源 DNA 导入后代的过氧化物同工酶分析 [J]. 中国麻作, 1996, 18 (3): 6-8
 - 28 王玉富, 刘燕, 杨学, 等. 亚麻外源 DNA 导入后代的遗传和变异研究 [J]. 中国麻作, 1999, 21 (3): 7-11
 - 29 王玉富, 周思君, 刘燕, 等. 利用农杆菌介导法进行亚麻转基因培养的研究 [J]. 中国麻作, 2000, 22 (1): 14-16
 - 30 王玉富, 周思君, 刘燕, 等. 亚麻转基因植株的再生及生根培养的研究 [J]. 中国麻作, 2000, 22

- (3): 25-27
- 31 王毓美,徐运远,贾敬芬. 亚麻遗传转化体系的建立及几丁酯酶基因导入的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(30): 346-351
 - 32 Nazir Basiran, et al. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *agrobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoot via a callus phase[J]. *Plant Cell Report*, 1987, 6: 396-399
 - 33 S. Rakousky, et al. T-DNA induced mutation and somaclonal variants of flax [J]. *Natural Fibers, Special Edition*, 1998, 2: 244-246
 - 34 S. Rakousky, et al. Hygromycin B-an alternative in flax transformant selection [J]. *Biologia Plantarum*, 1999, 42(3): 361-369
 - 35 A. V. Poliakov, et al. The testing of flax (*Linum usitatissimum*) resistance to herbicides [J]. *Natural Fibers, Special Edition*, 2001, 2: 11
 - 36 Jeffrey G Ellis. Identification of Region in Alleles of the Flax Rust Resistance Gene L That Determine Differences in Gene-for-Gene specificity[J]. *The plant cell*, 1999, 11, March
 - 37 Clap JP. Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic method, totods, new jersey USA: Humana Press, 1996
 - 38 Williams JGK, et al. DNA polymorphisms arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6535
 - 39 Welsh J, et al. Fing printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18(22): 7213-7219
 - 40 许莉,周涵韬,夏涛,等. 水稻光敏核不育基因分子标记的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版) 1998, 11, 37(6): 941-944
 - 41 李子银,林兴华,谢岳峰,等. 利用分子标记定位农垦 58S 的光敏核不育基因[J]. 植物学报, 1999, 41(7): 731-735
 - 42 干滢,曾凡亚,赵云,等. 甘蓝型油菜“79.7”细胞核雄性不育基因 RAPD 分子标记初步研究[J]. 西南农业学报, 1999, 12: 111-115
 - 43 张超良,孙世孟,金德敏,等. RAPD 技术在 12 个玉米骨干自交系快速鉴定中的应用[J]. 作物学报, 1998, 24(6): 718-722

- 44 陈绍江, 杨庆凯, 王金陵, 等. 大豆育种过程中亲子遗传关系的 RAPD 初报[J]. 东北农业大学学报, 1996, 27 (2): 137-141
- 45 Delourme, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed[J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 741-748
- 46 Haley S D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools in common bean[J]. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1994b, 119: 122-125
- 47 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[J]. 遗传学报, 2002, 9 (10): 922-927
- 48 薄天岳, 叶华智, 李晓兵, 等. 亚麻抗枯萎病基因 FuJ7(t) 的分子标记[J]. 中国农业科学, 2003, 36 (3): 287-291
- 49 刘永胜, 朱立煌, 孙敬三, 等. 水稻籼粳杂种生殖障碍的基因定位分析[J]. 植物学报, 1997, 39 (12): 1099-1104
- 50 Lin S Y, et al. Segregation distortion via male gametes in hybrids between indica and japonica or widecompatibility varieties of rice[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 812-818
- 51 王春明, 安井秀, 吉村醇, 等. 水稻 F₂ 不育和抽穗期 QTL 分析[J]. 遗传学报, 2002, 29 (4): 339-342
- 52 Zhang D-P (张端品), Deng X-A (邓训安), Yu G-X (余功新), 等. Chromosomal Localization of photoperiod-sensitive genic male sterile gene in Nongken 58S[J]. *J Huazhong Agriculture Univ (华中农业大学学报)*, 1990, 9: 407-419
- 53 Lin X-H (林兴华), Yu G-X (余功新), Zhang D-P (张端品), 等. Determining the map position of photoperiod-sensitive genic male sterile gene on chromosome 5 in Nongken 58S[J]. *J Huazhong Agri Univ (华中农业大学学报)*, 1996, 15: 1-5 (in Chinese)
- 54 Bharaj T S, et al. Chromosomal location of fertility-restoring genes for wild abortive cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice[J]. *Euphytica*, 1995, 83: 169-173
- 55 Shnijo C. Genetic studies of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Sci Bull Colliv Agric Univ Ryukyus*, 1975, 22: 1-57

- 56 邓晓建,周开达,李仁端,等. 水稻完全显性早熟性的发现和基因定位[J]. 中国农业科学, 2001, 34(3): 233-239

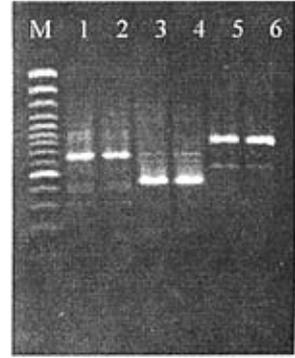
附 录



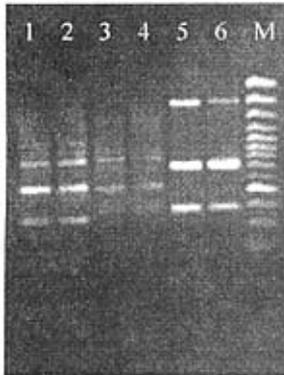
H02,H04,H07



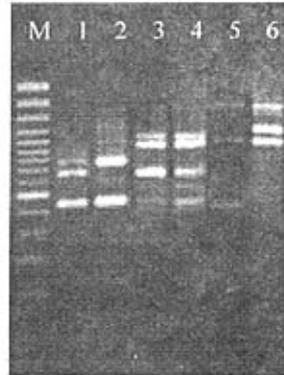
G05,G06,G07



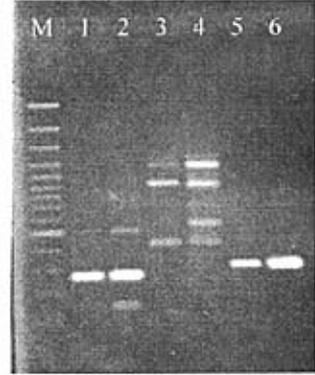
G02,G03,G04



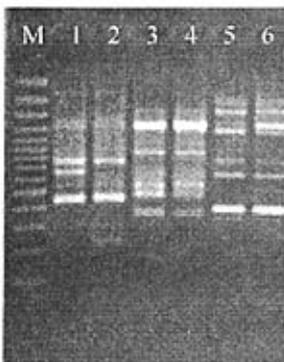
M01,M17,M18



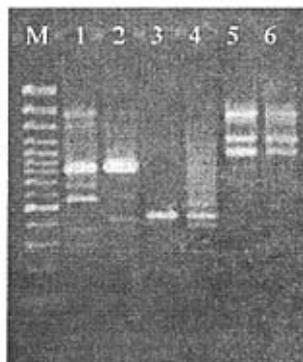
G06,G18,H14



A11,A14,A05



G06,G08,G12



G04,H13,H14



B06,B11,B14

注： 以上图为部分引物筛选的电泳图，图中M均为100 bp DNA Ladder Plus；单号均为可育，双号均为不育。

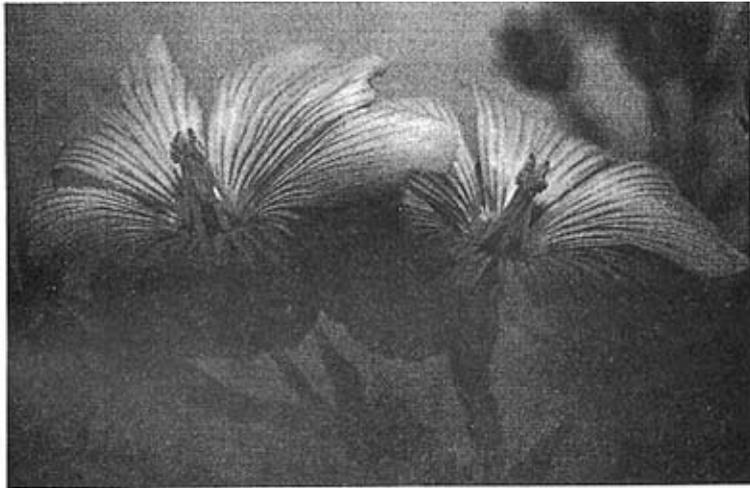


图1 可育花

可育株花呈深紫色，正常开花，有花粉。

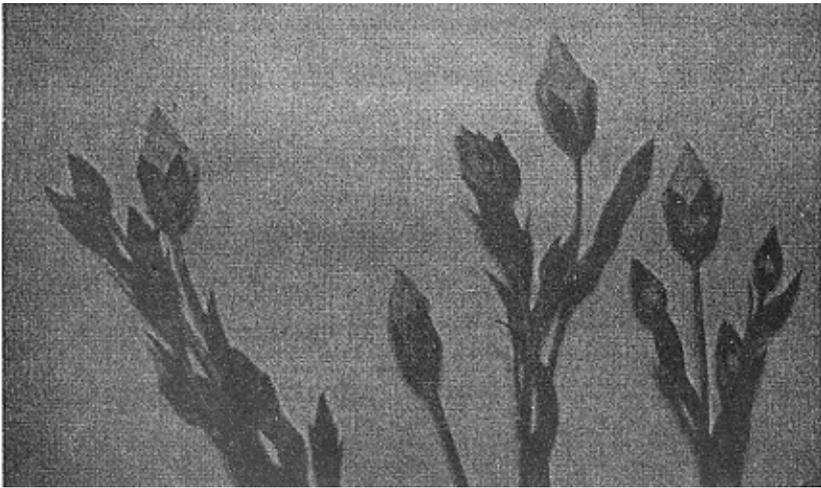


图2 不育花

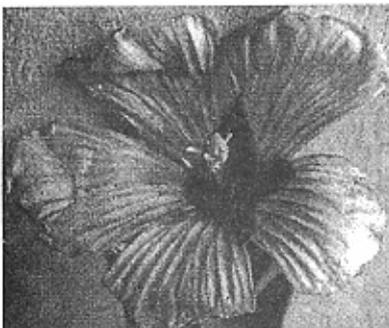


图3 不育花

不育株的花形态有两种：图2是花瓣相互盘绕，不能展开，紧紧包住柱头，不易脱落，影响柱头外露；图3是正常开花，柱头外露。两种花的花药都瘦小、光滑无花粉，花都呈淡紫色。



图 4 田间观察记载

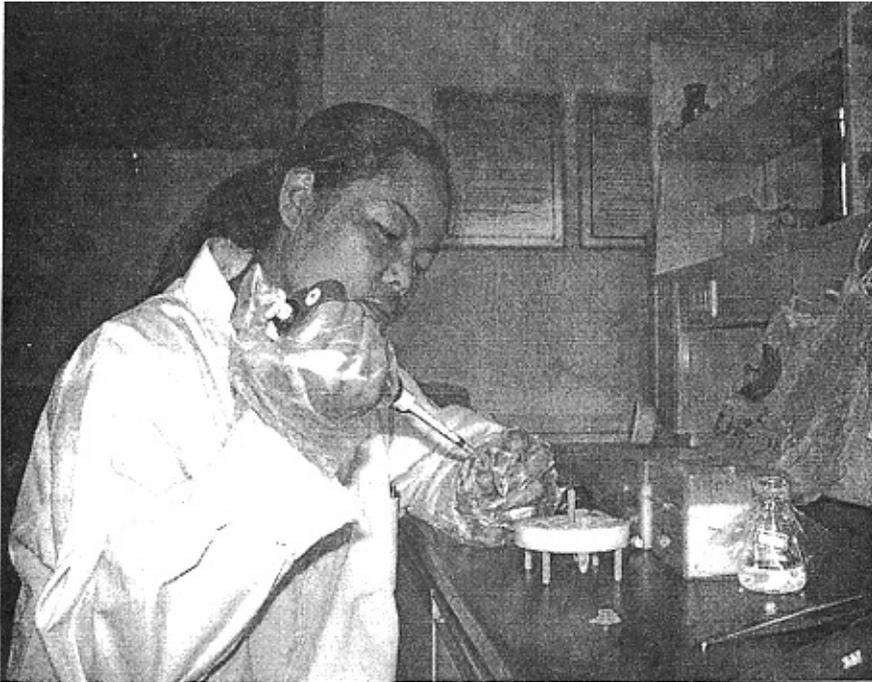


图 5 回收差异片段

作者简介

高风云，女，1977年7月生，内蒙古乌盟化德县人。1999年9月至2006年7月，在内蒙古农业大学农学院攻读本科和硕士学位。2003年至2006年攻读硕士学位期间发表的文章有：

1. 高风云，张辉，斯钦巴特尔. 亚麻分子标记技术研究进展. 内蒙古农业科技, 2006(2): 30-31.
2. 高风云，张辉，斯钦巴特尔. 亚麻显性雄性核不育基因 RAPD 标记的研究初报. 华北农学报, (待发).