

# 两种独行菜种子 cDNA-SRAP 反应体系的建立及优化

李 佳, 张 娜, 赖 晓 辉, 李 群

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:**以 2 种独行菜种子为试材, 采用 cDNA-SRAP 技术, 研究了 dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、上下游引物、cDNA 模板、*Taq* DNA 聚合酶浓度等 5 个因素对独行菜 cDNA-SRAP 反应体系扩增结果的影响, 以期得到适合 2 种独行菜种子的 cDNA-SRAP 反应体系, 并且对 cDNA-SRAP 扩增条件进行了优化。结果表明: 优化的最佳 cDNA-SRAP 反应体系 (20  $\mu$ L) 为  $10\times$  PCR buffer, cDNA 模板用量 100 ng,  $Mg^{2+}$  浓度  $1.75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTPs 浓度  $0.275\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物浓度  $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶用量 0.5 U; 利用优化的 cDNA-SRAP 反应体系能够扩增获得清晰、数目多的条带, 可用于后续深入研究 2 种独行菜不同处理下差异表达基因。

**关键词:**独行菜; cDNA-SRAP; 单因素试验; 正交实验设计

**中图分类号:**S 636.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0099-05

独行菜和抱茎独行菜是新疆具有代表性的 2 种早春短命植物, 均为十字花科独行菜属植物<sup>[1]</sup>。因为新疆特殊的地理环境及气候环境, 所以这片地域孕育了多种早春短命植物, 这其中独行菜属植物研究较多。而独行菜属又是十字花科的模式属, 是其中相对较大的属<sup>[2]</sup>。但对其研究大都集中在低温萌发相关的生理生化变化<sup>[3]</sup>、种子表面结构<sup>[4]</sup>、独行菜相关功能基因克隆<sup>[5-6]</sup>等, 周茜等<sup>[7]</sup>在 2016 年完成了独行菜种子转录组的高通量测序及分析。该研究主要针对 2 种不同的独行菜——独行菜与抱茎独行菜。这 2 种独行菜属植物生长形态方面极为相似, 亲缘关系也相近, 但是在分布上却存在较大的差异, 独行菜分布范围相对抱茎独行菜较为广泛。并且前期研究表明在低温处理下 2 种独行菜种子的萌发情况差异较大。因此, 该试验同时对 2 种独行菜属植物的不同环境刺激下差异表达基因进行筛选。

相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种基于 PCR 的标记系统, 是一种显性标记, 由美国加州大学蔬菜系 LI 与 QUIROS

博士 2001 年在芸薹属作物中研究开发出来的。此技术通过设计特殊的双引物对基因的开放阅读框特定的区域进行 PCR 扩增, 上游引物 17 bp, 对外显子区域进行特异性扩增。下游引物长 18 bp, 对内含子区域、启动子区域进行特异性扩增。由于不同个体, 不同物种的内含子、启动子和间隔区的长度不同从而产生多态性<sup>[8]</sup>。差异基因的筛选常用的效果较好、研究积累较多的是 cDNA-AFLP 技术, 但 cDNA-SRAP 技术较 cDNA-AFLP 操作步骤简便、高效, 并且资源时间相对节约, 重复性好、易测序、便于克隆目标片段等特点<sup>[9]</sup>。故而该研究选用 cDNA-SRAP 技术进行试验, 以期为进一步研究 2 种独行菜种子不同环境刺激下差异表达基因研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 2012 年采自新疆乌鲁木齐雅玛里克山的独行菜、抱茎独行菜种子,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

SRAP 引物为参考文献中的序列, 由华大基因合成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 2 种独行菜种子 RNA 的提取与检测 采用试剂盒法提取 2 种独行菜种子 RNA, 试剂盒为百泰克植物总 RNA 提取试剂盒。提取 RNA 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并通过紫外分光光度计检测  $OD_{260}/OD_{280}$ , 从而确定 RNA 浓度和纯度。

1.2.2 单链 cDNA 的合成及检测 根据 RNA 提取检

**第一作者简介:**李佳(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物学。E-mail:1589847368@qq.com.

**责任作者:**李群(1971-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物逆境生理与分子机制等研究工作。E-mail:liqun\_007@126.com.

**基金项目:**新疆维吾尔自治区重大科技专项科技援疆资助项目(200840102-40); 国家自然科学基金资助项目(31160051/C020407)。

**收稿日期:**2016-09-21

测结果挑选质量较好的 RNA 进行反转录合成单链 cDNA,后用 *EFla* 内参基因扩增,检测单链 cDNA 是否合成成功。

1.2.3 单因素优化试验 研究模板 cDNA、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物 me1+em3 浓度、*Taq* DNA 聚合酶 5 个因素的浓度用量对 cDNA-SRAP 体系的影响(表 1)。单因素影响试验过程中,当对某一因素一定梯度范围摸索优化时,其它各因素都保持不变,得到的相关试验结果中该因素的最适(依电泳检测结果条带判别)浓度,则将其视为这一因素较合适浓度并且带入下一个因素的梯度摸索试验,依次进行,重复 3 次,验证结果是否稳定。扩增程序为开始 94 °C 变性 1 min,反应前 5 个循环为 94 °C 1 min,接着 35 °C 1 min,72 °C 1 min,然后继续 35 个循环,复性温度提高到 50 °C,最后延伸 7 min,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色后,使用凝胶成像系统拍照保存,并分析试验结果。

表 1 独行菜 cDNA-SRAP 反应体系中  
单因素水平优化变化值

Table 1 Univariate value of cDNA-SRAP reaction  
system in *Lepidium apetalum* wild

因素 Factor	1	2	3	4	5	6	7
cDNA 模板 Template cDNA /(ng · (20 μL) <sup>-1</sup> )	40	60	80	100	120	140	160
$Mg^{2+}$ /(mmol · L <sup>-1</sup> )	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
dNTPs/(mmol · L <sup>-1</sup> )	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
引物 Primer/(μmol · L <sup>-1</sup> )	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase/(U · (20 μL) <sup>-1</sup> )	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

1.2.4 cDNA-SRAP 反应体系的正交实验设计 通过单因素检测试验发现,DNTPs 及  $Mg^{2+}$  对 PCR 的结果影响相对较为明显,所以将得到的 DNTPs 及  $Mg^{2+}$  2 个因素在单因素试验基础确定的范围上再进行进一步的适宜浓度的细化及优化。而上下游引物浓度和 cDNA 模板浓度则可使用单因素试验结果中较好的 3 个浓度,采用  $L_9(3^4)$  正交设计,检测 dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、引物 me1+em3 及 cDNA 模板对 SRAP 扩增结果的影响,从中筛选出最优的组合,正交设计组合方案如表 2 所示。扩增程序同单因素筛选试验相同,3 次重复。

1.2.5 cDNA-SRAP 最佳扩增程序确定的检验 利用筛选的最佳组合体系和引物 me1+em3 对不同独行菜 cDNA 样品进行 PCR 扩增,检测该组合体系的稳定性,3 次重复。

## 2 结果与分析

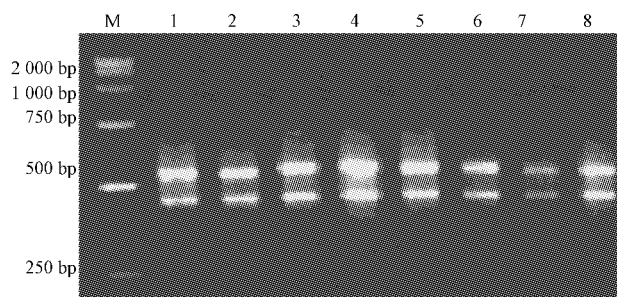
### 2.1 提取 RNA 的质量检测结果

$OD_{260}/OD_{280}$  均在 2.0 左右,且琼脂糖凝胶电泳检测结果显示(图 1),28S、18S 条带明显且前者亮度约为后者亮度 1 倍。证明 RNA 可满足后续试验需求。

表 2 cDNA-SRAP 反应体系的  
 $L_9(3^4)$  正交实验设计

Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal design of cDNA-SRAP  
amplification system

编号 No.	上下游引物 Primer /(μmol · L <sup>-1</sup> )	dNTPs /(mmol · L <sup>-1</sup> )	$Mg^{2+}$ /(mmol · L <sup>-1</sup> )	cDNA 模板 Template cDNA /(ng · (20 μL) <sup>-1</sup> )
1	0.75	0.175	1.75	80
2	0.75	0.225	2.25	100
3	0.75	0.275	2.75	120
4	1.00	0.175	2.25	120
5	1.00	0.225	2.75	80
6	1.00	0.275	1.75	100
7	1.25	0.175	2.75	100
8	1.25	0.225	1.75	120
9	1.25	0.275	2.25	80



注:M, DL 2 000 DNA Marker, 下同;1~4. 独行菜 RNA 提取结果;5~8. 抱茎独行菜 RNA 提取结果。

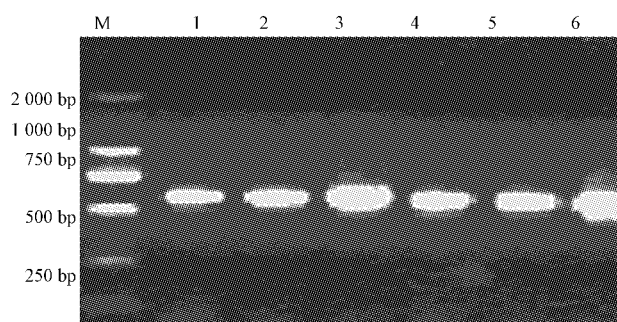
Note:M, DL 2 000 Marker, the same below;1~4. *Lepidium apetalum* wild extracted result;5~8. *Lepidium perfoliatum* extracted result.

图 1 2 种独行菜 RNA 提取 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 RNA extracted by 1% agarose gel electrophoresis

### 2.2 cDNA 第一链合成内参基因 EFla 扩增检测结果

根据课题组前期研究结果,2 种独行菜均可以 *EFla* 基因作为内参基因,并且结果稳定。故采用 *EFla* 基因



注:1~3. 独行菜 EFla PCR 扩增结果;4~6. 抱茎独行菜 EFla PCR 扩增结果。

Note:1~3. *Lepidium apetalum* Wild EFla PCR product result;4~6. *Lepidium perfoliatum* EFla PCR product result.

图 2 总 RNA 的单链 cDNA 反转录检测

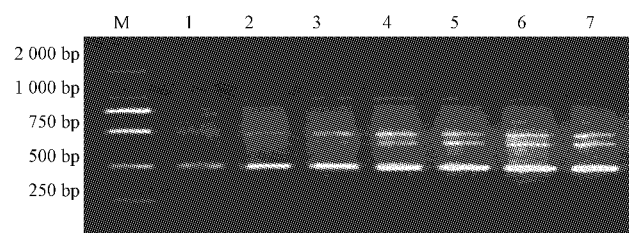
Fig. 2 Detection of the single stand cDNA reverse  
transcription of total RNA

来验证模板 cDNA 第一链的合成结果。由图 2 可知, cDNA 合成质量较好, 可满足后续试验需求。

### 2.3 单因素优化试验结果

#### 2.3.1 cDNA 模板浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

由图 3 可知, cDNA 模板浓度从  $40 \sim 160 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$  时, 呈现如下变化, 当浓度过低时条带数目较少, 且清晰度较低, 而当浓度为  $80 \sim 120 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$  时条带较多且清晰度较高, 当浓度再增加时条带数目及清晰度变化不大, 故而初步确定其最适反应浓度范围为  $80 \sim 120 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 。



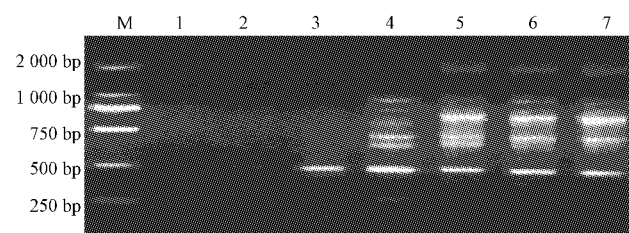
注: 1~7 表示 cDNA 模板浓度依次为 20、40、60、80、100、120、140、 $160 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 。

Note: 1-7 mean cDNA template concentrations 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140,  $160 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 。

图 3 cDNA 模板浓度对 cDNA-SRAP 反应的影响

Fig. 3 Effect of cDNA template concentrations on cDNA-SRAP reactions

2.3.2  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响 由图 4 可知, 当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $0.5 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 扩增无明显条带; 当浓度为  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时出现了明显条带但条带数目较少, 而当浓度继续升高为  $2.0 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时条带数目增多且亮度变亮, 再继续增加浓度条带及亮度基本保持不变, 故而初步确定  $\text{Mg}^{2+}$  浓度在  $2.0 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  较为合适。



注: 1~7 表示  $\text{Mg}^{2+}$  浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

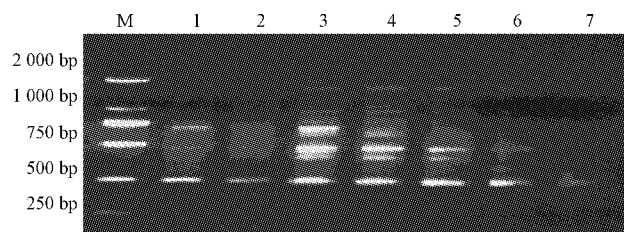
Note: 1-7 mean  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0,  $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 4  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 cDNA-SRAP 反应体系的影响

Fig. 4 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations on cDNA-SRAP reactions

2.3.3 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响 由图 5 可知, 当 dNTPs 浓度为  $0.05 \sim 0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  扩增不完全, 扩增结果中条带较少且亮度较暗; 当 dNTPs

浓度为  $0.15 \sim 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 扩增的条带数量增多且亮度变亮条带清晰; 而当 dNTPs 浓度继续升高到  $0.30 \sim 0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 扩增结果中条带数目反而减少且清晰度也降低; 故而初步确定 dNTPs 浓度在  $0.20 \sim 0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  较为合适。



注: 1~7 表示 dNTPs 浓度依次为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、 $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

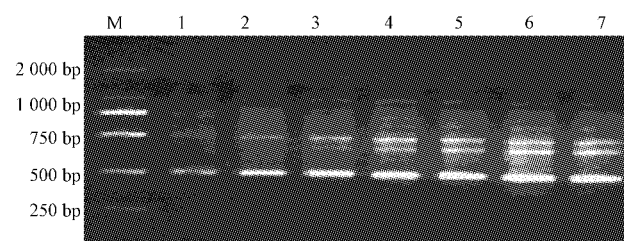
Note: 1-7 mean dNTPs concentrations 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30,  $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 5 dNTPs 浓度对 cDNA-SRAP 反应的影响

Fig. 5 Effect of dNTPs concentrations on cDNA-SRAP reactions

#### 2.3.4 上下游引物浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

由图 6 可知, 当引物浓度为  $0.25 \sim 0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 扩增结果条带少且清晰度低; 而当引物浓度升高到  $1.00 \sim 1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 条带清晰亮度好且数目增多, 而浓度继续增加时结果显示其条带数目及清晰度均不再增加, 故而初步确定引物浓度为  $1.00 \sim 1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  较为合适。



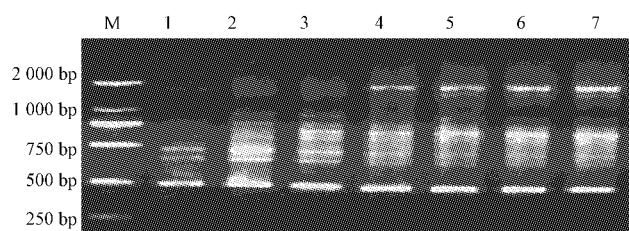
注: 1~7 表示引物浓度依次为: 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Note: 1-7 mean primer concentrations 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50,  $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 6 引物浓度对 cDNA-SRAP 反应的影响

Fig. 6 Effect of primer concentrations on cDNA-SRAP reactions

2.3.5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 SRAP-PCR 反应体系的影响 由图 7 可以看出, 当 *Taq* DNA 聚合酶为 0.1 U 时扩增大片条带较为模糊且条带较少, 而随着 *Taq* DNA 聚合酶的浓度升高, 条带增多且清晰度升高, 而因 *Taq* DNA 聚合酶价格相对较高, 故处于经济等各方面综合考虑, *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.5 U 即可满足试验需求, 故确定 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.5 U。



注:1~7 表示 *Taq* DNA 聚合酶浓度依次为 0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5  $\text{U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 。

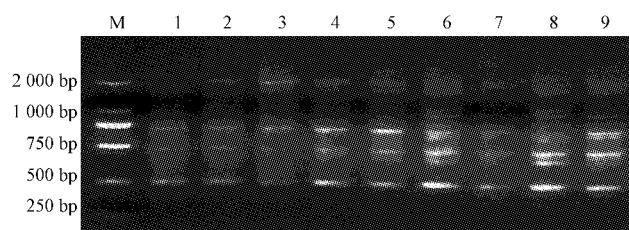
Note:1-7 mean *Taq* DNA polymerase concentration 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\text{U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ .

图7 *Taq* DNA 聚合酶用量对 cDNA-SRAP 反应的影响

Fig. 7 Effect of *Taq* DNA polymerase concentrations on cDNA-SRAP reactions

#### 2.4 正交实验设计结果

由图8可以看出,1、2号组合扩增条带较少,且大片段扩增条带很模糊;3、4、5号组合扩增虽然大小片段均可扩增出来,但是条带较少且清晰度较低,组合6扩增条带较多且清晰度提高,组合7、8大片段扩增条带清晰度低,组合9扩增条带较组合6稍少一些。另外,试验设置3次重复,结果发现组合6扩增结果较为稳定,故而正交实验选择组合6的条件进行后续SRAP扩增。即最终确定cDNA-SRAP试验优化后反应体系为 $10 \times \text{PCR buffer}$ , dNTPs浓度 $0.275 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA聚合酶用量 $0.5 \text{ U}$ , 引物浓度 $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 浓度 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , cDNA模板用量 $100 \text{ ng}$ 。



注:1~9 为各因素不同组合电泳结果图(组合对应见表2)。

Note:1-9 mean every factor different combinations agarose gel electrophoresis (The combination shown in Table 2).

图8 正交实验设计 cDNA-SRAP 反应体系的扩增结果

Fig. 8 Products of SRAP amplification system with orthogonal design

#### 2.5 优化 cDNA-SRAP 体系稳定性检测

使用不同cDNA模板进行SRAP-PCR扩增,部分结果如图9,大部分模板进行扩增后均可得到数目多且清晰的条带,故而该体系是可以应用于后续试验中。

### 3 讨论与结论

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)的扩增反应常受引物、DNA模板、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP及*Taq* DNA聚合酶等多种因素的影响,不

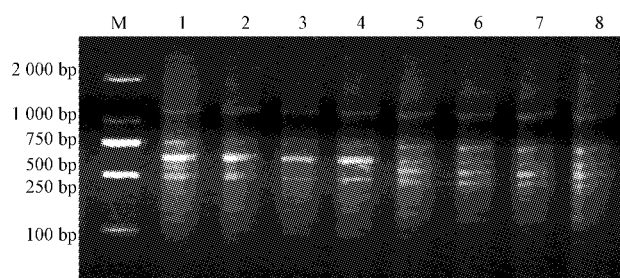


图9 不同 cDNA 扩增结果

Fig. 9 Amplification products in different cDNA

同因素之间的组合也会影响该试验结果。这种新型的PCR技术与cDNA-AFLP目的相似过程却相对简便且重复性好,但是目前仅在少数植物研究中有应用,如斑蝥<sup>[10]</sup>、甘蔗黑穗病研究<sup>[11]</sup>,不同生长点棉花差异基因的研究<sup>[12]</sup>等,且因为SRAP引物的特殊性,不同物种体系也大不相同,所以要建立适宜的cDNA-SRAP反应体系方可进行试验。而该研究是针对同缘近属2种独行菜进行的研究,故需建立适用于2种独行菜种子的cDNA-SRAP反应体系。因此,该研究针对这些影响因子进行优化设计试验,并且建立了适用于独行菜种子且在报茎独行菜中也同样稳定的体系。结果表明,上下游引物、DNA模板浓度、 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度、dNTPs浓度及*Taq* DNA聚合酶等试剂浓度对PCR扩增反应结果均有不同程度的影响,并且使用正交实验设计手段找寻到了最适扩增组合,得到了适用于2种独行菜的稳定的cDNA-SRAP扩增体系。

目前,已有的建立cDNA-SRAP反应体系主要是在玉米<sup>[13]</sup>、苜蓿<sup>[14]</sup>、石榴<sup>[15]</sup>等植物。而在该研究中,针对同缘近属2种独行菜的种子进行试验,可看出不同的 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度,不同dNTPs浓度以及不同的浓度组合方式对cDNA-SRAP反应体系最终扩增结果影响还是比较明显的,其中 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度过低扩增不出来条带可能是因为过低浓度的 $\text{Mg}^{2+}$ 影响了*Taq* DNA聚合酶的活性,使酶活性降低而导致低浓度扩增不出来条带;而dNTPs也不是随着浓度升高扩增结果条带越多越清晰,反而是过高的浓度会使结果条带变少且清晰度降低。原因可能在PCR反应中,使用高浓度dNTP,会增加非靶位置的启动和延伸时的核苷酸错误掺入,浓度过低则影响扩增产率。该研究首先对dNTPs浓度确定一个范围,然后在这个范围上具体更进一步做了细化优化。

*Taq* DNA聚合酶的用量也直接影响到试验结果,考虑到*Taq* DNA聚合酶用量多会增加试验成本,且也有可能增加非特异性扩增的产物;而用量少则会使酶与这个反应过程整体不匹配,使酶提前消耗,那么也会造成一定程度的浪费。故该研究最终确定*Taq* DNA

聚合酶用量为 0.5 U。

该研究结果表明,不同的 cDNA-SRAP 反应体系扩增的结果有一定的差异,PCR 反应体系的合适与否则直接影响后续 SRAP 扩增试验的准确性,避免资源及时间上的浪费,且试验扩增产物最终要使用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行条带的分离及差异条带的筛选。在最适体系研究过程中,一方面要参考资料结合试验保证扩增体系的完整性,另外,也要考虑试验资源时间等消耗的问题。研究试验的时间是有限的,要综合各方面因素考虑,寻找到在有限时间内达到预期效果且节约资源成本的高效率科研。因此,该研究在单因素试验找出了各因素较合适的浓度范围以后,在此基础上又对影响较大的因素进行了正交设计分析,最终确定了最佳的反应体系,并且建立了适用于 2 种独行菜种子的 cDNA-SRAP 反应体系稳定可靠,可为后续的差异片段的筛选及克隆提供参考依据。

#### 参考文献

- [1] 任珺,陶玲.新疆北部短命植物的特征分析[J].草业科学,2005,22(5):19-24.
- [2] 孙稚颖,李法曾.中国独行菜族(十字花科)部分属种的分子系统学研究[J].西北植物学报,2007,27(8):1674-1678.
- [3] 孟君,李群,李冠.两种独行菜种子萌发生理特性研究[J].生物技术,2008,18(2):32-35.
- [4] 袁祯燕,多力坤·买买提玉素甫,黄培佑.早春短命植物独行菜天然种衣与水分的关系[J].种子,2006,25(9):1-3.
- [5] 赵琼珍,师秋菊,李群.独行菜 CBF 基因的克隆及其植物表达载体的构建[J].种子,2012,31(4):4-6.
- [6] 葛凤伟,田永芝,曾卫军,等.独行菜 *eEF-1a* 基因片段分离克隆及 RT-PCR 分析[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2014(2):22-26.
- [7] 周茜,赵惠新,李萍萍,等.独行菜种子转录组的高通量测序及分析[J].中国生物工程杂志,2016,36(1):38-46.
- [8] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [9] 吴建明,李杨瑞,杨柳,等. cDNA-AFLP 和 cDNA-SRAP 技术在植物基因差异表达上的应用及其分析比较[J]. 生物技术通报, 2009(11): 52-55.
- [10] QUE Y X, XU L P, LIN J W, et al. cDNA-SRAP and its application in differential gene expression analysis; a case study in *Erianthus arundinaceum* [J]. Biomed Research International, 2012, 2012(1): 390107.
- [11] HUANG N, ZHANG Y Y, XIAO X H, et al. Identification of smut-responsive genes in sugarcane using cDNA-SRAP[J]. Genetics and Molecular Research Gmr, 2015, 14(2): 6808-6818.
- [12] LIU C, YUAN D, ZHANG X, et al. Isolation, characterization and mapping of genes differentially expressed during fibre development between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* by cDNA-SRAP[J]. Journal of Genetics, 2013, 92(92): 175-181.
- [13] 苏亮,白建荣,王秀红.玉米 cDNA-SRAP 反应体系的优化[J].山西农业科学,2010,38(8):6-9.
- [14] 何庆元,吴萍,张晓红,等.不同秋眠性苜蓿 SRAP 体系优化及遗传多样性分析[J].草业学报,2011,20(2):201-209.
- [15] 张四普,汪良驹,吕中伟.石榴叶片 SRAP 体系优化及其在白花芽变鉴定中的应用[J].西北植物学报,2010,30(5):911-917.

## Establishment and Optimization of cDNA-SRAP Reaction System by Orthogonal Design for Two Species of *Lepidium* L.

LI Jia, ZHANG Na, LAI Xiaohui, LI Qun

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** A cDNA sequence-related amplified polymorphism (SRAP) reaction system of two species *Lepidium* L. were established and optimized by orthogonal experimental design and single factor analysis of different concentration of dNTPs,  $Mg^{2+}$ , primer, *Taq* DNA polymerase and DNA template was conducted. The results showed that the optimal reaction system for the two species of *Lepidium* L. was followed as 0.275 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.5 U *Taq* DNA polymerase, 1.0 μmol · L<sup>-1</sup> primer, 100 ng template cDNA in total 20 μL of reaction solution. Using the optimal system of cDNA-SRAP, clear stable and repeatable bands could be amplified from two species of *Lepidium* plants for analyzing gene differential expression.

**Keywords:** *Lepidium* L.; cDNA-SRAP; single-factor experiment; orthogonal experimental design