

· 工艺与制剂 ·

## 杜仲 SSR-PCR 反应体系的优化

糜亚男<sup>1,2</sup>, 张水寒<sup>1\*</sup>, 蔡媛<sup>1</sup>, 梁雪娟<sup>1</sup>, 蒋超<sup>3</sup>

(1. 湖南省中医药研究院 中药研究所, 长沙 410013; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;  
3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立杜仲简单重复序列-聚合酶链式反应(SSR-PCR)的优化反应体系, 为杜仲种质间的遗传差异及亲缘关系分析提供参考。方法: 选择 *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA,  $Mg^{2+}$ , 引物及 dNTP 浓度为考察因素, 利用单因素试验和  $L_{16}(4^5)$  正交试验优选杜仲的 SSR-PCR 反应体系, 运用 SPSS 软件对试验结果进行分析。结果: 各因素水平变化对反应体系影响顺序依次为  $Mg^{2+} > Taq$  DNA 聚合酶  $>$  引物  $>$  dNTP  $>$  模板 DNA。优化的 PCR 反应体系为  $10 \times$  PCR 缓冲液  $2 \mu L$ , *Taq* DNA 聚合酶  $0.5 U$ ,  $Mg^{2+}$  浓度  $1.25 mmol \cdot L^{-1}$ , dNTP 浓度  $0.2 mmol \cdot L^{-1}$ , 引物浓度  $0.3 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 模板 DNA 用量  $60 ng$ , 定容至  $20 \mu L$ 。结论: 利用该体系进行扩增, 所得谱带明亮清晰, 稳定性和重复性良好, 适用于杜仲不同居群间亲缘关系和遗传多样性分析。

**[关键词]** 杜仲; 微卫星标记; 聚合酶链式反应; 反应体系; 引物

**[中图分类号]** R283.6; R282.5; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0001-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020001

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0939.001.html>

**[网络出版时间]** 2014124 9:39

**Optimization of SSR-PCR Reaction System in Eucommiae Cortex** MI Ya-nan<sup>1,2</sup>, ZHANG Shui-han<sup>1\*</sup>, CAI Yuan<sup>1</sup>, LIANG Xue-juan<sup>1</sup>, JIANG Chao<sup>3</sup> (1. *Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China*; 2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*; 3. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize simple sequence repeat-polymerase chain reaction (SSR-PCR) system for providing a reference to genetic diversity and phylogenetic analysis among germplasms of Eucommiae Cortex. **Method:** Orthogonal design and single factor tests were adopted to optimize SSR-PCR system of Eucommiae Cortex with *Taq* DNA polymerase, template DNA,  $Mg^{2+}$ , primers and dNTP concentration as factors, test data were analyzed by SPSS software. **Result:** Effects of each factors were in the order of  $Mg^{2+} > Taq$  DNA polymerase  $>$  primers  $>$  dNTP  $>$  DNA template. Optimal reaction system was as follows:  $10 \times$  PCR buffer of  $2 \mu L$ , *Taq* DNA polymerase of  $0.5 U$ ,  $Mg^{2+}$  of  $1.25 mmol \cdot L^{-1}$ , dNTP concentration of  $0.2 mmol \cdot L^{-1}$ , primers of  $0.3 \mu mol \cdot L^{-1}$  and DNA template of  $60 ng$  in  $20 \mu L$  reaction solution. **Conclusion:** Bands are bright and clear with good stability and reproducibility by amplification of this optimized SSR-PCR system, it is suitable for genetic diversity and phylogenetic analysis among germplasms of Eucommiae Cortex.

**[Key words]** Eucommiae Cortex; microsatellite markers; polymerase chain reaction; reaction system; primer

杜仲又名思仙、木棉, 其皮、叶供药用, 具有补肝肾、强筋骨、安胎等功效。特有的杜仲胶在通讯、医

用、体育等方面更具有广泛的应用价值<sup>[1]</sup>。我国作为现存杜仲的原产地, 拥有世界 99% 的杜仲资源,

**[收稿日期]** 20140731(012)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B08)

**[第一作者]** 糜亚男, 在读硕士, 从事中药制剂及杜仲种质资源研究, Tel: 15084781637, E-mail: myn0306@126.com

**[通讯作者]** \* 张水寒, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源、中药制剂及质量标准研究, Tel: 0731-88881651, E-mail: zhangshuihan0220@126.com

具有独特的资源优势<sup>[2]</sup>。在此基础上广泛收集不同产区的杜仲种质材料,运用分子标记技术对杜仲资源进行遗传学研究,对保护药用植物的生物多样性及中药资源的可持续发展具有重要意义。微卫星标记又称简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR),是通过基因组中微卫星序列的重复基序数目差异来检测多态性的一种有效方法,能够直接反应生物种群间甚至是个体间基因组的 DNA 片段差异,具有多态性高、重复性好、共显性等优点<sup>[3-4]</sup>,现已在动植物遗传多样性分析、物种鉴定及分子标记辅助育种等领域得到广泛应用<sup>[5-8]</sup>。分析过程中 SSR-聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增结果的准确性和可靠性易受反应体系各组分的影响,并且不同物种间适宜的 SSR 反应条件也不尽相同。故本实验综合运用单因素试验和正交试验建立一套准确性高,稳定性强且适用于大批量杜仲种质材料微卫星标记的 SSR-PCR 反应体系,为后续杜仲种质多态性研究提供参考。

## 1 材料

BioPhotometer plus 型核酸蛋白仪 (Eppendorf 公司), MyGene L96 型 PCR 扩增仪 (杭州朗基科学仪器有限公司), EPS-300 型电泳仪 (上海天能科技有限公司), VE-180 型垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司), GIS-1000B 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

杜仲叶于 2013 年分别采集自湖南慈利、江西定南、陕西略阳、贵州遵义、重庆秀山和湖南桑植共 6 个产地,经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的叶。

Taq DNA 聚合酶,脱氧核糖核苷三磷酸混合液 (dNTP), 10 × PCR 缓冲液均购自 Takara 公司; 30% 丙烯酰胺溶液和标准相对分子质量 DNA (100 bp plus DNA ladder) 均购自北京索莱宝科技有限公司, GelRed 荧光染料 (美国 Biotium 公司), 水为无菌超纯水。引物从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站下载的 EST (表达序列标签) 序列经 Primer 3 等生物信息学软件设计而来,由上海生工生物技术有限公司合成,编号 C93, C115, 引物序列分别为 C93-F (5'-CAAGGTTGAAGGCAGGATT-3'), C93-R (5'-GCATAAAACAAGAAGGGGAAG-3'), C115-F (5'-CGCTCGCCATACCCATTC-3'), C93-R (5'-GCCGACC TTGACGGAAAA-3')。

## 2 方法与结果

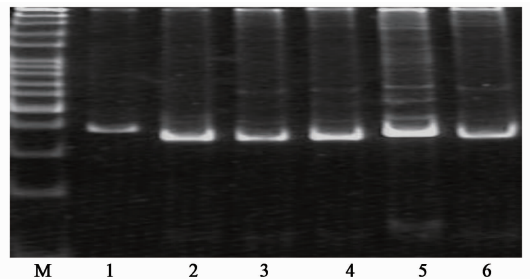
2.1 杜仲叶基因组 DNA 的提取 分别取 6 份不同

产地的杜仲叶片,使用天根生物公司 (北京) 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, DNA 分别采用核酸蛋白仪和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质量浓度和质量,于 -20 °C 保存备用。

2.2 SSR-PCR 基本反应体系组成及扩增程序 以湖南慈利产地的杜仲叶为 DNA 模板,采用 20 μL 反应体系进行 SSR 扩增,其中含 10 × PCR 缓冲液 2 μL, dNTP 0.2 mmol · L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol · L<sup>-1</sup>, 引物上下游各 0.4 μmol · L<sup>-1</sup>, Taq DNA 聚合酶 0.5 U, DNA 模板 30 ng, 加水补足至 20 μL。PCR 扩增程序参照黄海燕等<sup>[2]</sup>略作调整为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 结束程序并保存。

2.3 单因素试验考察 优化反应引物选用 C93, 选择 Taq DNA 聚合酶, 模板 DNA, Mg<sup>2+</sup>, 引物及 dNTP 浓度为考察因素,在保持其他因素不变的情况下,改变单一因素进行扩增。取扩增产物 3 μL 和上样缓冲液 1 μL 混匀,点样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上样孔中,以 100 bp DNA ladder 作为对照相对分子质量标准,在 1 × TBE 缓冲液中恒压 60 V,电泳时间 135 min,电泳后用荧光染料染色 30 min,在凝胶成像系统下进行观察、拍照。

2.3.1 Taq DNA 聚合酶用量 设计 Taq DNA 聚合酶用量梯度分别为 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 U, 见图 1。结果显示当 Taq DNA 聚合酶用量 0.5 U 时,扩增出的条带较暗 (泳道 1); 当增至 1.0 U 时,非特异性条带增多 (泳道 3); 达 1.5 U 时,背景加深 (泳道 5); 当用量为 2.0 U 时,扩增背景模糊且条带明显减少 (泳道 6)。表明用于杜仲叶 SSR 扩增的适宜 Taq DNA 聚合酶用量 0.5 ~ 1.0 U。



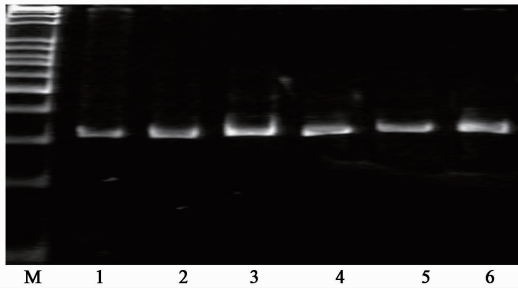
M. marker; 1 ~ 6. Taq DNA 聚合酶用量分别为 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 U

图 1 Taq DNA 聚合酶用量对杜仲 SSR-PCR 反应的影响

Fig. 1 Effects of Taq polymerase concentrations on SSR-PCR of *Eucommiae Cortex*

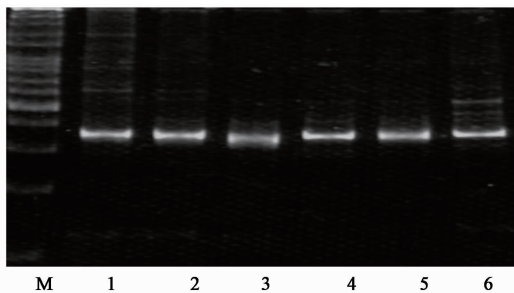
2.3.2 模板 DNA 用量 由图 2 可知,6 个 DNA 用量梯度水平 (10, 20, 40, 60, 120, 180 ng) 均能扩增出

比较稳定清晰的特异性条带,且相互之间影响差异均不显著。在 DNA 用量 10 ng 时,扩增谱带亮度相对较弱。结果说明模板 DNA 适用的用量范围较宽,对 SSR-PCR 扩增结果的影响不明显。为节约材料成本,正交试验中模板用量的水平分别设定为 30, 40, 50, 60 ng。



M. marker; 1~6. DNA 用量分别为 10, 20, 30, 40, 50, 60 ng  
图 2 模板 DNA 用量对杜仲 SSR-PCR 反应的影响  
Fig. 2 Effects of template DNA dosage on SSR-PCR of *Eucommiae Cortex*

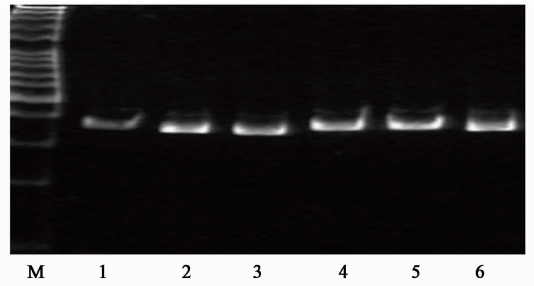
**2.3.3  $Mg^{2+}$  浓度**  $Mg^{2+}$  浓度的变化会影响 PCR 中 DNA 聚合酶的活性、产物的特异性及扩增的真实性等。由图 3 可知,在设置的梯度范围内均能扩增出明亮的目的条带,但当  $Mg^{2+}$  浓度为 0.4 ~ 0.8 mmol·L<sup>-1</sup> 时,有较多非特异性条带;当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.2 ~ 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 时,非特异性条带型不明显,引物二聚体较少(泳道 3~5);当  $Mg^{2+}$  浓度增至 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> 时,非特异性条带及引物二聚体明显。故确立 SSR 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度 1.25 ~ 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>。



M. marker; 1~6.  $Mg^{2+}$  浓度分别为 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>  
图 3  $Mg^{2+}$  浓度对杜仲 SSR-PCR 反应的影响  
Fig. 3 Effects of  $Mg^{2+}$  concentrations on SSR-PCR of *Eucommiae Cortex*

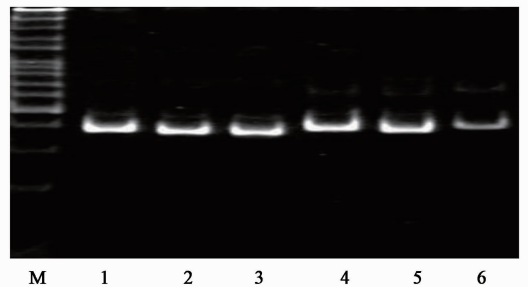
**2.3.4 引物浓度** 由图 4 可知,设计的 6 个引物浓度梯度得到的扩增条带差异不显著。当引物浓度为 0.05  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,扩增条带的亮度相对较暗;在 0.25 ~ 1.05  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,扩增条带逐渐清晰。考虑到在 SSR-PCR 反应中,过高的引物浓度会引起非特

异性扩增,使背景增多,故正交设计的引物浓度水平选定 0.3 ~ 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



M. marker; 1~6. 引物浓度分别为 0.05, 0.25, 0.45, 0.65, 0.85, 1.05 mmol·L<sup>-1</sup>  
图 4 引物用量对杜仲 SSR-PCR 反应的影响  
Fig. 4 Effects of primer concentrations on SSR-PCR of *Eucommiae Cortex*

**2.3.5 dNTP 浓度** 由图 5 可知, dNTP 浓度在 0.05 ~ 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 时均能扩增出目的条带,但之后随着 dNTP 浓度的增加,达 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 时,出现了非特异性条带(泳道 4~6);当 dNTP 浓度在 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 时条带变暗,这可能是由于 dNTP 含量高时与 *Taq* DNA 聚合酶争夺  $Mg^{2+}$ , 使聚合酶活性下降所致,故确定 dNTP 浓度在 0.05 ~ 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>。



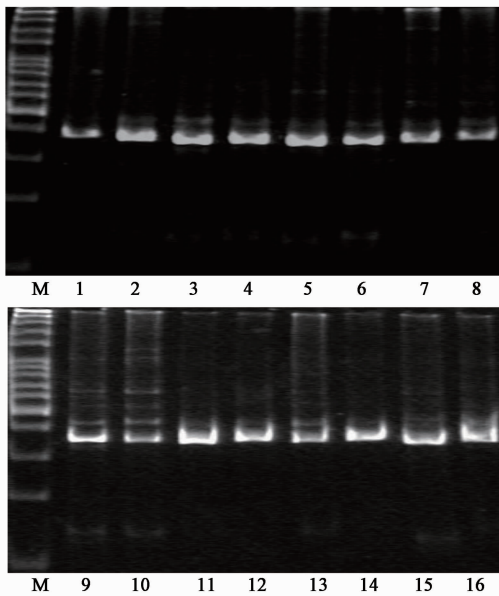
M. marker; 1~6. dNTP 浓度分别为 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>  
图 5 dNTP 用量对杜仲 SSR-PCR 反应的影响  
Fig. 5 Effects of dNTP concentrations on SSR-PCR of *Eucommiae Cortex*

**2.4 正交试验** 在单因素试验基础上,选择 *Taq* DNA 聚合酶,模板 DNA,  $Mg^{2+}$ , 引物及 dNTP 浓度为考察因素采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交表进行试验。PCR 反应体系、基本扩增程序和产物检测方法与单因素试验相同,试验重复 2 次。试验结果按李娟玲等<sup>[9]</sup>的方法处理,即对电泳条带的灵敏度和特异性从高到低打分,最好的处理记 16 分,最差的记 1 分,试验安排及结果见表 1 和图 6,将评分结果用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,见表 2。

表 1 杜仲 SSR-PCR 反应体系正交试验分析

Table 1 Orthogonal design analysis for SSR-PCR of Eucommiae Cortex

No.	A Taq DNA 聚合酶/U	B DNA 用量 /ng	C Mg <sup>2+</sup> 浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	D 引物浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	E dNTP 浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	评分/分
1	0.5	30	1.25	0.3	0.05	14.0
2	0.5	40	1.50	0.4	0.10	10.5
3	0.5	50	1.75	0.5	0.15	7.5
4	0.5	60	2.00	0.6	0.20	9.0
5	0.6	30	1.50	0.5	0.20	5.5
6	0.6	40	1.25	0.6	0.15	5.5
7	0.6	50	2.00	0.3	0.10	3.0
8	0.6	60	1.75	0.4	0.05	7.5
9	0.7	30	1.75	0.6	0.10	3.0
10	0.7	40	2.00	0.5	0.05	1.0
11	0.7	50	1.25	0.4	0.20	15.0
12	0.7	60	1.50	0.3	0.15	13.0
13	0.8	30	2.00	0.4	0.15	7.5
14	0.8	40	1.75	0.3	0.20	16.0
15	0.8	50	1.50	0.6	0.05	10.5
16	0.8	60	1.25	0.5	0.10	12.0



M. marker; 1 ~ 16. 样品

图 6 杜仲正交试验各组 SSR-PCR(重复试验 I)

Fig. 6 SSP-PCR of orthogonal test samples of Eucommiae Cortex (repeated test I)

由图 6 可知,5 个考察因素以不同浓度组合在一起,扩增效果大不相同。利用统计软件 SPSS 17.0 对数据进行方差分析,结果表明各因素对 SSR-PCR 反应的影响均达到了极显著水平,各因素对杜仲

表 2 杜仲 SSR-PCR 反应体系正交试验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test for SSR-PCR of Eucommiae Cortex

变异来源	f	SS	MS	F	P
A	3	174.094	58.031	116.548	<0.01
B	3	36.094	12.031	24.163	<0.01
C	3	181.844	60.615	121.736	<0.01
D	3	140.594	46.865	94.121	<0.01
E	3	79.344	26.448	53.117	<0.01
重复试验	1	0.031	0.031	0.063	0.81
误差	15	7.469			

注:  $F_{0.01}(3,15) = 5.42$ 。

表 3 PCR 反应各因素水平间的多重比较

Table 3 Multiple comparisons among each levels of PCR

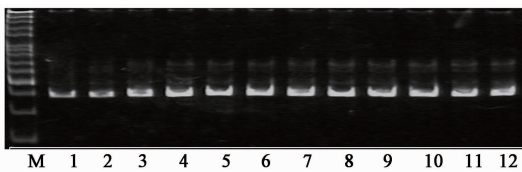
水平	A	B	C	D	E
1	10.250 <sup>1)</sup>	7.500 <sup>1)</sup>	11.625 <sup>1)</sup>	11.500 <sup>1)</sup>	8.250 <sup>1)</sup>
2	5.375 <sup>2)</sup>	8.250 <sup>2)</sup>	9.875 <sup>2)</sup>	10.125 <sup>2)</sup>	7.125 <sup>2)</sup>
3	8.000 <sup>3)</sup>	9.000 <sup>3)</sup>	8.500 <sup>3)</sup>	6.500 <sup>3)</sup>	8.375 <sup>1)</sup>
4	11.500 <sup>4)</sup>	10.375 <sup>4)</sup>	5.125 <sup>4)</sup>	7.000 <sup>4)</sup>	11.375 <sup>3)</sup>

注: <sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>, <sup>3)</sup>, <sup>4)</sup> 表示同因素不同水平间存在统计学差异。

SSR-PCR 扩增的影响顺序为  $C > A > D > E > B$ 。对各因素水平间进行均值估计和成对比较发现,各因

素水平间的差异均达到极显著水平。由表 3 可知,  $Mg^{2+}$  浓度在  $1.25 \sim 2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时, 结果均值呈递减趋势; 当  $Mg^{2+}$  浓度  $1.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时, 与其他 3 个水平间的差异均达到了显著水平, 故  $Mg^{2+}$  浓度的最佳水平为  $1.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。在  $20 \mu L$  反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶用量在  $0.6 \sim 0.8 \text{ U}$  时, 反应结果随着聚合酶的增加而递增; 当聚合酶用量为  $0.5 \text{ U}$  时, 其反应比  $0.6, 0.7 \text{ U}$  时效果好, 故确定 *Taq* DNA 聚合酶加入量  $0.5 \text{ U}$ 。在引物的 4 个水平范围内, 评分结果均值呈下降趋势, 当引物浓度为  $0.3 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$  时, 与其他 3 个梯度间的差异均达到显著水平, 故确定引物浓度的最佳水平  $0.3 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 。试验中 dNTP 浓度为  $0.05, 0.15 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时, 评分结果差异不显著, 浓度为  $0.1 \sim 0.2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时, 扩增反应均值随 dNTP 浓度的增加而增加, 故确定 dNTP 浓度  $0.2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。模板 DNA 浓度虽然在单因素试验中对 PCR 影响不很明显, 但正交试验中 4 个水平间差异均达到了显著水平, 用量为  $60 \text{ ng}$  时, 结果均值最高, 故确定 DNA 用量  $60 \text{ ng}$ 。

**2.5 退火温度优化** 利用确立的优化反应体系对引物 C93 的退火温度进行梯度检测, 设置退火温度范围  $46 \sim 62 \text{ }^\circ\text{C}$ , PCR 仪自动生成  $46.0, 46.3, 47.4, 48.8, 50.4, 52.1, 53.8, 55.5, 57.2, 58.6, 59.6, 60.0 \text{ }^\circ\text{C}$  共 12 个温度梯度进行试验。由图 7 可知, PCR 扩增条带随着退火温度的降低, 目的条带亮度增强, 同时非特异性条带也逐渐明显。退火温度在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  时条带清晰明亮, 非特异性条带干扰少, 故确定引物 C93 的退火温度  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。



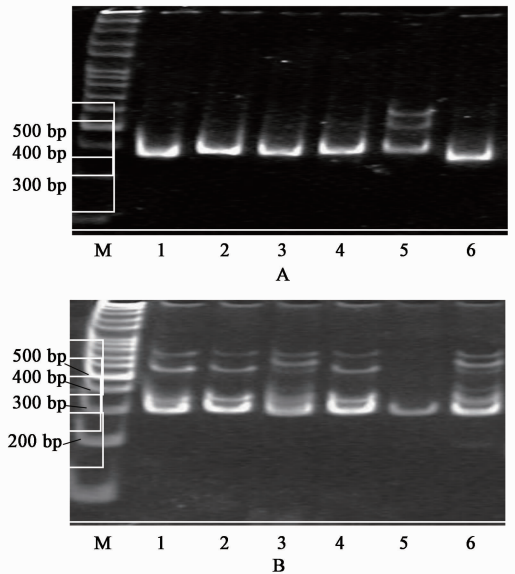
M. marker; 1 ~ 12. 退火温度分别为  $60.0, 59.6, 58.6, 57.2, 55.5, 53.8, 52.1, 50.4, 48.8, 47.4, 46.3, 46.0 \text{ }^\circ\text{C}$

图 7 退火温度对引物 C93 扩增结果的影响

Fig. 7 Effect of annealing temperature on amplified results of C93 for *Eucommiae Cortex*

**2.6 SSR-PCR 反应体系的稳定性检测** 利用所选的 2 对 SSR 引物及 6 份不同产地的杜仲基因组 DNA 对优化的杜仲 SSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测。以不同引物在各自最适退火温度下分别对不同产地的杜仲材料进行扩增, 结果见图 8。引物 C93 和 C115 均扩增出清晰且特异性高的谱带, 说明

优化的杜仲 SSR-PCR 反应体系稳定可靠, 实用性强。此外, 重庆秀山产地的杜仲叶 DNA 与引物 C93 扩增出的条带多态性较高, 而与引物 C115 扩增出的条带和其他产地相比只有 1 条, 故初步推断秀山产区的杜仲微卫星位点与其他产区相比具有一定差异性。



A. 引物 C93; B. 引物 C115; M. marker; 1 ~ 6. 模板 DNA 分别来自于湖南慈利、江西定南、陕西略阳、贵州遵义、重庆秀山和湖南桑植

图 8 引物 C93 和 C115 的杜仲 SSR-PCR 反应优化体系扩增

Fig. 8 SSP-PCR optimization results of primer C93 and C268 for *Eucommiae Cortex*

### 3 讨论

由于参与 SSR 反应体系的因素较多, 而各因素条件的变化均可能对扩增结果产生或多或少的影响。本文中 5 个主要因素影响杜仲 SSR-PCR 反应的大小次序为  $Mg^{2+} > Taq$  聚合酶  $>$  引物  $>$  dNTP  $>$  DNA 模板。而蔡胜文等<sup>[10]</sup>对仁用杏进行 SSR-PCR 反应体系优化时发现, 各影响因素显著性依次为  $Mg^{2+} >$  dNTP  $>$  引物  $> Taq$  聚合酶  $>$  DNA 模板。黄丽芳等<sup>[11]</sup>优化芒果 SSR-PCR 反应体系, 结果表明各因素作用大小的顺序为 DNA 模板  $>$  dNTP  $>$  引物  $> Mg^{2+} > Taq$  聚合酶。说明不同物种间 SSR 反应体系中各影响因素的作用有所不同。此现象还表现在 ISSR, RAPD 等分子标记的 PCR 反应体系中<sup>[9, 12-13]</sup>。任风鸣等<sup>[13]</sup>认为原因可能是由引物或物种的特异性引起, 或是受到试验某一因素水平范围大小的影响。

目前, 关于其他不同物种的 SSR-PCR 体系研究较多<sup>[14-17]</sup>, 但大部分研究者采用单因素试验法, 不仅试验次数较多, 而且不能考虑到各因素间可能存

在的交互作用。如  $Mg^{2+}$  在反应体系中决定了 *Taq* DNA 聚合酶活性及合成稳定性的同时,还会结合体系中 dNTP, DNA 模板及引物,从而影响其他因素的作用<sup>[18]</sup>。若单独采用正交试验设计对体系进行优化,则必须考虑各影响因素水平设计范围的合理性、试验结果评价的客观性等问题。故本文结合单因素试验和正交试验优化反应体系。

本文运用 2 对微卫星引物对 6 份不同产地杜仲样本进行验证试验,结果表明重庆秀山产地的杜仲样本对引物 C93 的扩增表现出杂合基因型,对引物 C115 的扩增则表现出纯合基因型,与其他产地扩增结果不同。初步揭示了不同产地杜仲种质资源的遗传差异,展现了微卫星标记在杜仲遗传多样性、亲缘关系等研究领域的优越性。

#### [参考文献]

[1] 杜红岩. 我国的杜仲胶资源及其开发潜力与产业发展思路[J]. 经济林研究, 2010, 28(3): 1-6.

[2] 黄海燕, 杜红岩, 乌云塔娜, 等. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学, 2013, 49(5): 176-181.

[3] 朴红梅, 王玉民, 刘宪虎, 等. 简单重复序列的研究与应用[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(6): 11-15.

[4] Amos W, Rubinstzein D C. Microsatellites are subject to directional evolution[J]. Nat Genet, 1996, 12(1): 13-14.

[5] 李鑫, 李继萍, 柴宝峰. 微卫星标记的发展及植物研究中的应用[J]. 郑州航空工业管理学院学报: 社会科学版, 2004, 23(6): 199-200.

[6] 宋国华, 刘田福, 张建红. 微卫星 DNA 分子标记及其在实验动物遗传分析中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35(4): 381-383.

[7] 郭瑞星, 刘小红, 谭振波, 等. 植物 SSR 标记的发展及

其在遗传育种中的应用[J]. 玉米科学, 2005, 13(2): 8-11.

[8] 罗冉, 吴委林, 张旻, 等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 137-143.

[9] 李娟玲, 刘国民, 曹嵩晓, 等. 利用单因子和正交设计双重实验法优化鹧鸪茶 RAPD-PCR 反应体系[J]. 农学学报, 2011, 1(4): 14-21.

[10] 蔡胜文, 孙浩元, 杨丽, 等. 仁用杏远缘杂交后代 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 50-54.

[11] 黄丽芳, 雷新涛, 姚全胜, 等. 芒果 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 热带作物学报, 2010, 31(3): 410-415.

[12] 赵春梅, 金荣荣, 刘英, 等. 甜瓜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(4): 146-150.

[13] 任风鸣, 胡开治, 刘燕琴, 等. 传统中药金钱草 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2233-2238.

[14] 朱世杨, 罗天宽, 张小玲, 等. 水稻 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3441-3443, 3447.

[15] 张发, 万勇善, 刘凤珍. 花生 SSR-PCR 体系的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 37-41.

[16] 张文娜, 王忆, 孔瑾, 等. 甜樱桃品种 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生物技术通报, 2009(11): 103-107.

[17] 陈争, 姜小凤, 童再康. 光皮桦 EST-SSR PCR 反应体系的优化[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(6): 960-965.

[18] 李长春, 阳天泉, 戴余军, 等. 正交设计优化莲藕 ISSR-PCR 反应体系研究[J]. 北方园艺, 2011(1): 121-123.

[责任编辑 刘德文]