

· 论著 ·

鼠曲草简单重复序列间扩增反应体系的建立及优化

江圣圭¹, 董志颖², 李卿³, 赵英魁⁴, 黄豆豆⁴, 孙连娜^{1,2}(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 3. 海军军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 4. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 通过建立并优化鼠曲草简单重复序列间扩增(ISSR-PCR)反应体系,为鼠曲草后续遗传多样性研究提供实验依据。方法 本研究首先采用单因素实验法和全面实验法优化鼠曲草 ISSR-PCR 反应体系,然后在最适体系下,分步进行引物及其退火温度的筛选,最后验证该体系的可行性。结果 ISSR-PCR 最适反应体系包括 10 μl Premix *Taq* DNA 聚合酶、0.3 μmol/L 引物、10 ng DNA 模板、灭菌水加至 20 μl;从 100 条通用引物中最终筛选出 10 条引物;验证结果表明该体系稳定性高、重复性好,且选定引物多态性好。结论 本研究首次建立了鼠曲草 ISSR-PCR 扩增体系,并筛选出合适的引物,为鼠曲草后续遗传多样性研究夯实了基础。

[关键词] 鼠曲草;简单重复序列间扩增;体系优化;引物筛选

[中图分类号] R282 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)01-0042-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201909048

Establish and optimization of inter-simple sequence repeat PCR reaction system of *Gnaphalium affine*

JIANG Shenggui¹, DONG Zhiying², LI Qing³, ZHAO Yingkui⁴, HUANG Doudou⁴, SUN Lianna^{1,2}(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Navy Medical University, Shanghai 200003, China; 4. School of Pharmacy, Navy Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To provide the experimental basis for the subsequent genetic diversity research through establishing and optimizing the inter-simple sequence repeat PCR (ISSR-PCR) reaction system of *Gnaphalium affine*. **Methods** The single-factor experimental method and full experimental method were used to optimize the ISSR-PCR reaction system of *Gnaphalium affine*. Under the optimal system, after screening primers and corresponding annealing temperatures, the systematic feasibility was verified. **Results** The optimal ISSR-PCR reaction system was consisted of 10 μl Premix *Taq* DNA polymerase, 0.3 μmol/L primer, 10 ng DNA template, and sterilized water added to 20 μl. Finally, 10 primers were screened from 100 universal primers, and verification results indicated the system had high stability, good reproducibility, and the selected primers had good polymorphism. **Conclusion** The ISSR-PCR amplification system of *Gnaphalium affine* was established for the first time and the primers with appropriate annealing temperatures were filtered out, which provided a reference for the subsequent genetic diversity research of *Gnaphalium affine*.

[Key words] *Gnaphalium affine*; inter-simple sequence repeat PCR; system optimization; primer screening

鼠曲草 (*Gnaphalium affine* D. Don) 为菊科 (Compositae) 鼠曲草属 (*Gnaphalium*) 的一年生草本, 亦称鼠鞠草、佛耳草、清明菜、鼠耳草等, 是一种药食同源的植物。我国的鼠曲草主要分布在黄

河流域以南, 它是我国南方民间传统食物“鼠曲粿”的食材来源; 同时, 也是一味传统中药, 最早记载于《名医别录》, 具有止咳化痰、祛风平喘的功效。由于其兼具营养和药用价值, 对鼠曲草的研究主要集中在化学成分^[1-3]、药理作用^[4-6] 以及营养价值的开发利用等方面。课题组前期研究^[7] 表明, 不同产地鼠曲草的化学成分含量存在差异, 因此, 拟采用简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 分子标记手段探究其内在原因。

DNA 分子标记可以从核苷酸序列水平反映物

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373954), 上海市科委资助课题项目(13ZR1448800)

[作者简介] 江圣圭, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源与品质评价, Email: jasmine_jsg@163.com

[通讯作者] 孙连娜, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药资源活性评价及新药研发, Email: sssnmr@163.com

种遗传变异差异,具有方便、可靠、准确等优势。ISSR技术是在简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)的基础上发展而来的,ISSR与SSR相比于其他分子标记手段,具有稳定可靠、操作简单等优点^[8]。此外,ISSR相较于SSR,具有多态性高、引物通用、无须测序及设计引物等优势^[9]。采用分子标记手段探究居群间的差异具有便捷、干扰小等优点。为了从分子水平阐明不同产地鼠曲草之间的差异,本研究首先对鼠曲草ISSR-PCR反应体系进行优化,其次在最适反应体系的基础上筛选

引物及相应的退火温度,最后采用不同产地鼠曲草的基因组DNA进行体系验证,为进一步开发利用鼠曲草提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 样品来源

2017年春,从我国不同省市采集鼠曲草植株(表1),样品由课题组孙连娜副教授鉴定为鼠曲草*Gnaphalium affine* D. Don,摘下叶片,经液氮冻冻后保存于-80℃冰箱中,备用。

表1 鼠曲草样品信息表

样品编号	取样地	取样时间	样品编号	取样地	取样时间
S1	福建宁德	2017-03-08	S5	湖南衡阳	2017-04-03
S2	湖北恩施	2017-03-28	S6	安徽金寨	2017-04-07
S3	云南普洱	2017-02-25	S7	福建泉州	2017-04-05
S4	湖南长沙	2017-03-31	S8	浙江台州	2017-04-08

1.2 仪器与试剂

植物基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);DK-8D三孔电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司);5418R低温高速离心机(德国Eppendorf公司);NanoDrop 2000超微量分光光度计(美国Thermo公司);Mastercycler Pro梯度PCR仪(德国Eppendorf公司);JS-350多功能水平电泳槽、JS-Power 600电泳仪、JS-2000全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司);ISSR通用引物(Genewiz公司);Premix Taq DNA聚合酶、6×Loading Buffer、DL15000 DNA Marker、DL2000 DNA Marker(Takara Bio公司);溴化乙锭(ethidium bromide, EB;上海博光生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 基因组DNA的提取及检测

采用试剂盒法从鼠曲草叶片中提取基因组DNA,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,经超微量分光光度计测定其浓度及纯度后,置于-20℃冰箱内备用。

2.2 鼠曲草ISSR-PCR反应体系的建立

在反应体系中加入预混酶、DNA模板、引物,并用灭菌水补至20 μl。按照PCR程序完成扩增后,以DL2000 DNA Marker为对照,EB为指示剂,采用1.6%琼脂糖凝胶,在“55 V, 90 min”电泳条件下对扩增条带进行分离。

2.3 鼠曲草ISSR-PCR反应体系的优化

首先通过单因素法,以来自福建泉州的鼠曲草样品(S7)作为DNA模板,序列为(CA)₈G的818作为引物,分别确定DNA模板量及引物浓度的最优值;然后以单因素实验结果为中心,进行全面考察实验,以“位点清晰、稳定性高、多态性好”为标准,最终确定鼠曲草ISSR-PCR最适反应体系。

2.4 引物筛选及退火温度的确定

根据公式 T_m 值(解链温度)= $4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 计算出各引物的 T_m 值,并按 T_m 值将100条引物进行排序并且分类。选用福建宁德(S1)和湖北恩施(S2)的鼠曲草样品作为考察对象,采用最适反应体系,以 T_m 值为中心,在 $(T_m - 2) \sim (T_m + 4)$ 范围内设置6个温度,同时进行引物筛选及退火温度筛选,确定各引物的 T_c 值(中心温度),剔除扩增条带数为0或1的引物,完成初筛。

以来自福建宁德的鼠曲草样品(S1)作为模板,选取 $T_c - 2$ 、 T_c 、 $T_c + 2$ 这3个温度,采用最适反应体系对通过初筛的引物进行考察,以“位点清晰、稳定性高、多态性好”为标准,完成二次筛选并确定最佳退火温度。

2.5 鼠曲草ISSR-PCR反应体系的验证

采用前述实验确定的最适反应体系、引物及退火温度,对8个居群的鼠曲草DNA模板进行ISSR分子标记以验证体系的稳定性。同时,根据电泳结果以“位点清晰、稳定性高、多态性好”为标

准对通过二筛的引物再次进行筛选。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 的提取及检测

经试剂盒法提取得到的基因组 DNA 电泳结果(图 1)显示:条带完整,无明显弥散;且经微量分光光度计检测其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.7~1.9 之间,表明提取的 DNA 纯净,无核酸、肽类干扰,可用于后续实验。

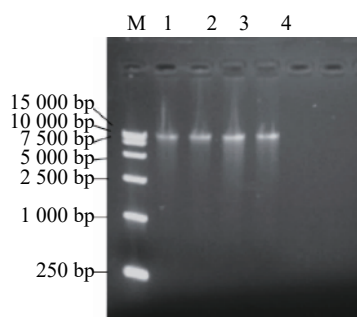


图 1 鼠曲草基因组 DNA 的电泳图谱

M.DL15000 DNA Marker; 1~4.鼠曲草基因组 DNA; bp.DNA 片段长度单位

3.2 鼠曲草 ISSR-PCR 反应体系的建立

ISSR-PCR 反应体系包含 dNTPs、Mg²⁺、Taq DNA 聚合酶、引物、DNA 模板。相关研究表明, DNA 模板、Taq DNA 聚合酶、引物的用量是 ISSR-PCR 反应体系的主要影响因素^[10-12]。并且多项关于 dNTPs、Mg²⁺、Taq 酶的优化实验结果表明预混酶体系(表 2)可以满足实验需求^[12-14]。因此,本实验采用 Premix Taq DNA 聚合酶,不另加 dNTPs 和 Mg²⁺,这也在一定程度上简化了实验步骤,并减小了实验误差。

表 2 预混酶的组成及浓度

预混酶组成	组分浓度
TaKaRa Taq	1.25 U/25 μl
dNTPs	0.4 mmol/L
Tris-HCl, pH8.9	20 mmol/L
KCl	100 mmol/L
MgCl ₂	3 mmol/L

结合相关文献^[10-14]确定鼠曲草 ISSR-PCR 初始反应体系为: 10 μl Premix Taq 酶、0.8 μmol/L 引物、30 ng DNA 模板、灭菌水加至 20 μl; PCR 扩增程序为: ①94 °C 预变性 5 min; ②94 °C 变性 30 s, 退火温度下复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共循环

38 次; ③72 °C 延伸 10 min。

3.3 鼠曲草 ISSR-PCR 反应体系的优化

3.3.1 单因素法考察引物浓度和 DNA 模板量

当 DNA 模板量不变时,不同引物浓度扩增出的条带情况(图 2)显示:引物浓度为 0.3 μmol/L 时,扩增条带清晰稳定;引物浓度为 0.4 μmol/L 时,可以检测出模糊的扩增条带。此外,引物浓度 <0.3 μmol/L 或 >0.4 μmol/L 时,均无扩增条带。

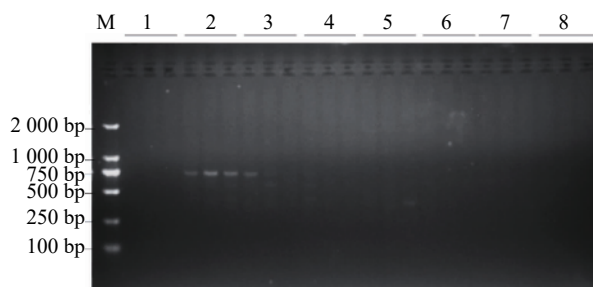


图 2 不同浓度引物对 ISSR-PCR 反应的影响

M.DL2000 DNA Marker; 1~8.引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 μmol/L; bp.DNA 片段长度单位

当引物浓度不变时,不同 DNA 模板量的扩增情况(图 3)显示:DNA 模板量为 10~40 ng 时,均可检测出扩增条带,且模板量为 10 ng 时扩增出 2 条条带,其余均为 1 条;DNA 模板量 >40 ng 时,无扩增条带。

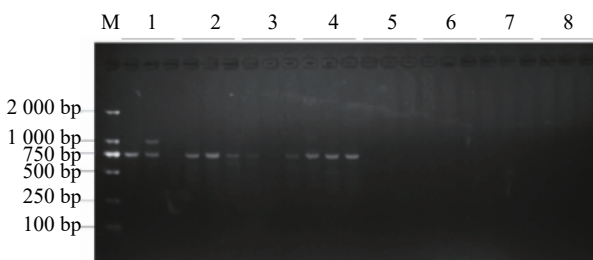


图 3 不同 DNA 模板量对 ISSR-PCR 反应的影响

M.DL2000 DNA Marker; 1~8.DNA 模板量分别为 10、20、30、40、50、60、70、80 ng; bp.DNA 片段长度单位

3.3.2 全面实验确定 ISSR-PCR 最适反应体系

围绕单因素实验结果,分别设置 4 个引物浓度值及 4 个 DNA 模板量,进行 16 组实验(表 3)。全面实验结果(图 4)显示:当 DNA 模板量为 10 ng 时,不同引物浓度下的扩增条带稳定,且重复性好;当 DNA 模板量为 15 ng 时,仅 6、7 两组扩增出条带;当 DNA 模板量为 20 ng 时,虽然各组均扩增出条带,但是条带亮度不稳定;当 DNA 模板量为 25 ng 时,仅 14 未扩增出条带。综上,10 ng DNA 模板组(1~4)扩增出的条带最为清晰且稳定性最好,0.30 μmol/L 引物浓度组在各 DNA 模板量下均

表3 引物和DNA模板的全面实验考察

编号	DNA模板量(ng)	引物浓度($\mu\text{mol/L}$)	编号	DNA模板量(ng)	引物浓度($\mu\text{mol/L}$)
1	10	0.25	9	20	0.25
2	10	0.275	10	20	0.275
3	10	0.30	11	20	0.30
4	10	0.375	12	20	0.375
5	15	0.25	13	25	0.25
6	15	0.275	14	25	0.275
7	15	0.30	15	25	0.30
8	15	0.375	16	25	0.375

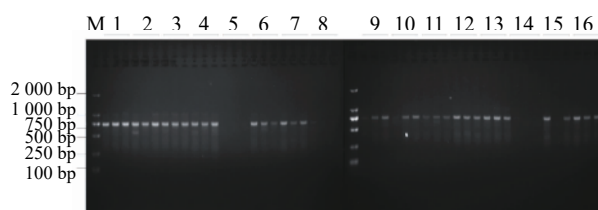


图4 引物和DNA模板的全面实验扩增结果

M.DL2000 DNA Marker; 1~16.全面实验编号(表3);
bp.DNA片段长度单位

扩增出条带, 呈现出的稳定性强于其余浓度, 因此确定最适反应体系包含 10 ng DNA 模板量和 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 且此结果与单因素实验结果一致。

3.4 引物筛选及退火温度的确定

引物初筛是对比相同引物、不同退火温度下的扩增情况。经初筛剔除 58 条引物, 包含 27 条 T_m 值过高($>57^\circ\text{C}$)或 T_m 值过低($<48^\circ\text{C}$)的引物。此外, 通过初筛发现, 由于数个退火温度连续值呈现出的扩增情况类似(图5), 难以确定最佳退火温度。因此, 有必要进行二次筛选。

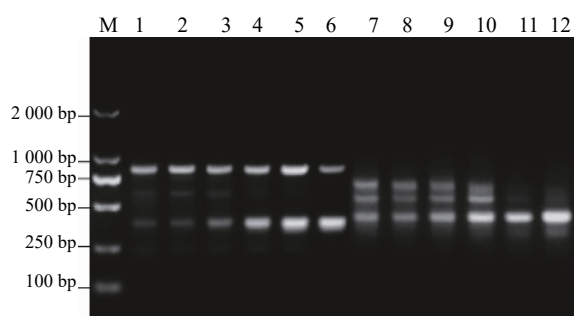


图5 引物初筛的部分扩增结果

M.DL2000 DNA Marker; 1~6.引物 851 的退火温度依次为 51.9、52.9、54.0、55.4、56.9、58.5 $^\circ\text{C}$; 7~12.引物 857 的退火温度依次为 51.9、52.9、54.0、55.4、56.9、58.5 $^\circ\text{C}$;
bp.DNA片段长度单位

根据初筛确定中心温度值 T_c , 即能呈现出最佳扩增状态的温度范围的中间值。设置 T_c-2 、 T_c 、 T_c+2 这 3 个退火温度, 对通过初筛的 42 条引物进

行二次筛选, 大部分引物的 T_c 值和 T_m 值相同。引物二筛既能横向对比不同引物、相同退火温度下的扩增情况(图6), 又能纵向对比相同引物、不同退火温度下的扩增情况, 并确定引物的最佳退火温度。

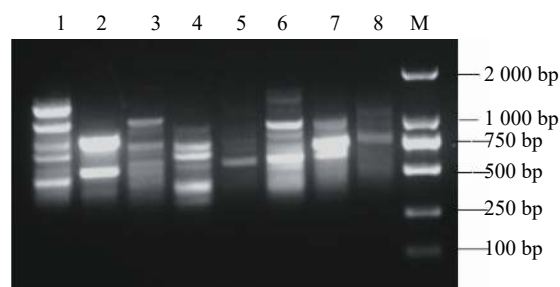


图6 引物二筛的部分扩增结果

M.DL2000 DNA Marker; 1~8.引物($T_c=50.0^\circ\text{C}$)依次为 816、825、807、810、812、817、819、821; 退火温度均设定为 52.0 $^\circ\text{C}$; bp.DNA片段长度单位

引物经二筛后剔除 25 条引物, 并且确定了余下 17 条引物的最佳退火温度(表4)。

3.5 鼠曲草 ISSR-PCR 反应体系的验证

验证结果表明该体系稳定可靠, 适合用于进一步遗传多样性分析; 此外, 最终确定了 10 条引物, 它们分别是 810、816、834、846、847、848、857、861、878、891(图7)。

4 讨论

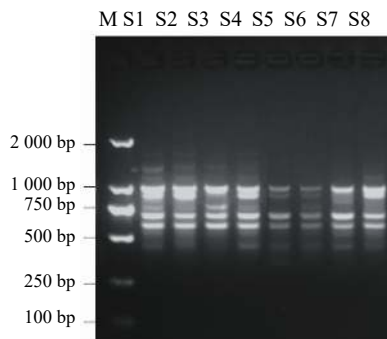
由于分子标记具有稳定性好、操作简单等优点, 被广泛用于基因标记、遗传多样性等方面的研究^[15]。对于 ISSR 分子标记技术, 反应体系各参数的变化会影响条带的清晰程度甚至有无^[16], 因此对反应体系进行优化具有必要性。本研究重点对 DNA 模板量、引物浓度、引物及退火温度进行筛选优化。

体系优化实验结果均仅呈现单一条带, 这可能与优化实验选用的 DNA 模板及引物有关。此外,

表4 通过二筛引物的序列及最佳退火温度

引物	序列(5'→3')	退火温度(°C)	引物	序列(5'→3')	退火温度(°C)
810	(GA) ₈ T	52.0	848	(CA) ₈ RG	56.0
816	(CA) ₈ T	48.0	855	(AC) ₈ YT	54.0
818	(CA) ₈ G	54.0	856	(AC) ₈ YA	50.0
825	(AC) ₈ T	50.0	857	(AC) ₈ YG	56.0
826	(AC) ₈ C	54.0	861	(ACC) ₆	58.0
834	(AG) ₈ YT	50.0	863	(AGT) ₆	46.0
842	(GA) ₈ YG	54.0	878	(GGAT) ₄	50.0
846	(CA) ₈ RT	50.0	891	HVH(TG) ₇	46.0
847	(CA) ₈ RC	56.0			

注: R=(A/G); Y=(C/T); H=(A/C/T); V=(A/C/G)

图7 引物891对不同居群鼠曲草DNA模板的扩增结果
M.DL2000 DNA Marker; S1~S8.样品编号(表1); bp.DNA片段长度单位

体系优化实验结果表明引物浓度对条带亮度及清晰度的影响不是按固定规律进行的,还受DNA模板量的影响。当DNA模板量在一定范围内扩增情况相同时,应选择DNA模板量的最小值^[13]。在全面实验中,仅模板量为10 ng时,在各引物浓度下扩增稳定,表明在该条件下扩增受引物浓度的影响较小,整个扩增过程稳定性强。推测其原因是较低的DNA模板量能与引物更加充分地结合,随之更加稳定地扩增。

当进行引物及退火温度筛选时,在保证有效退火的前提下,选择较高的退火温度,以此增加反应的特异性^[13]。本研究引入了 T_c 值,此举不仅对首轮筛选进行查漏补缺,还节约了实验成本,也提高了实验的准确性。此外,通过二次筛选的引物(表3)以CA和GA重复单元为主,这提示我们:鼠曲草基因组DNA中的微卫星序列可能以GT和CT重复单元为主,且菊科植物存在相似重复单元^[17]。综上,本实验最终确定了一个稳定性强、重现性好的反应体系,并筛选出了扩增位点清晰、多态性好的适用引物,为鼠曲草后续遗传多样性研究夯实了基础。

【参考文献】

- [1] LI J L, HUANG D D, CHEN W S, et al. Two new phenolic glycosides from *Gnaphalium affine* D. Don and their anti-complementary activity[J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 7751-7760.
- [2] ZHANG H J, LI L N, ZHOU J, et al. Effects of *Gnaphalium affine* D. Don on hyperuricemia and acute gouty arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 304-311.
- [3] LIN Y, LIU P G, LIANG W Q, et al. Luteolin-4'-O-glucoside and its aglycone, two major flavones of *Gnaphalium affine* D. Don, resist hyperuricemia and acute gouty arthritis activity in animal models[J]. *Phytomedicine*, 2018, 41: 54-61.
- [4] SEONG Y A, HWANG D, KIM G D. The anti-inflammatory effect of *Gnaphalium affine* through inhibition of NF- κ B and MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW_{264.7} cells and analysis of its phytochemical components[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2016, 74(3): 407-417.
- [5] LIN W Q, XIE J X, WU X M, et al. Inhibition of xanthine oxidase activity by *Gnaphalium affine* extract[J]. *Chin Med Sci J*, 2014, 29(4): 225-230.
- [6] ZHANG W, WU C Z, FAN S Y. Chemical constituents from *Gnaphalium affine* and their xanthine oxidase inhibitory activity[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(5): 347-353.
- [7] 高俊斌, 王璇, 陈燕红, 等. HPLC法同时测定鼠曲草中7种成分[J]. *中成药*, 2018, 40(5): 1116-1119.
- [8] GOULÃO L, OLIVEIRA C M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers[J]. *Euphytica*, 2001, 122(1): 81-89.
- [9] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [10] 任梦云, 陈彦君, 张盾, 等. 山萆菴ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(12): 5006-5014.

(下转第62页)

- [2] 赵东杰. 中西医结合疗法对老年晚期非小细胞肺癌临床疗效的影响[J]. 中外医疗, 2017, 36(9): 167-169.
- [3] 王丽丽, 石磊, 钱祥, 等. 化疗联合清肺合剂改善非小细胞肺癌患者免疫功能的临床研究[J]. 中华全科医学, 2017, 15(7): 1166-1168.
- [4] 尚兴平, 齐敏. 益气养阴法联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(21): 203-205.
- [5] 柯军. 迷迭香酸抑制肺癌A549细胞的增殖及侵袭的实验研究[J]. 甘肃医药, 2015, 34(4): 255-258.
- [6] 贺天临, 谢国群, 陈洁, 等. 夏枯草消瘤合剂联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌30例[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(5): 29-32.
- [7] 马雪曼, 于明薇, 张甘霖, 等. 小鼠Lewis肺癌不同部位皮下移植瘤模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 386-390.
- [8] 靳福鹏, 张梅, 李平, 等. 益气养阴解毒方对小鼠Lewis肺癌生长抑制作用的实验研究[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(1): 72-74.
- [9] 钱超尘, 温长路, 赵怀舟, 等(校). 金陵本《本草纲目》新校正[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- [10] 严东, 谢文剑, 李春, 等. 夏枯草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 49-54.
- [11] 张朝晖, 徐正顺, 焦龙华, 等. CyclinD1, P16, Rb蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(14): 1271-1274.
- [12] 王前, 邓晶, 蒋永新. CyclinD1的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(2): 350-353.
- [13] CHOI Y J, LI X Y, HYDBRING P, et al. The requirement for Cyclin D function in tumor maintenance[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(4): 438-451.
- [14] MASAMHA C P, BENBROOK D M. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of Cyclin E2 in ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16): 6565-6572.
- [15] OGINO S, NOSHO K, IRAHARA N, et al. A cohort study of Cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(13): 4431-4438.
- [16] ISHIKAWA T, FURIHATA M, OHTSUKI Y, et al. Cyclin D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(1): 92-97.
- [17] LI H Y, XIAO W W, MA J W, et al. Dual high expression of STAT3 and CyclinD1 is associated with poor prognosis after curative resection of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7989-7998.
- [18] 夏靖华, 李维妙, 王雪娇, 等. CyclinD1与CyclinD3在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(8): 615-621.
- [19] 梁瑞韵, 廖增顺, 江山平, 等. CyclinD1和VEGF在非小细胞肺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 癌症, 2003, 22(1): 86-90.
- [20] 付冉, 王艳林, 黄利鸣. p16表达异常与肿瘤关系的研究进展[J]. 生命的化学, 2017, 37(4): 585-589.
- [21] 冯蓓, 冯艳, 杨小平, 等. P16在肺癌方面的研究进展[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2015, 13(1): 70-73.
- [收稿日期] 2018-12-24 [修回日期] 2019-09-22
[本文编辑] 李睿旻

(上接第46页)

- [11] 任凤鸣, 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.
- [12] 唐辉, 陈宗游, 史艳财, 等. 正交设计优化地枫皮ISSR-PCR反应体系[J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.
- [13] 张福生, 郭顺星. 金线莲ISSR反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [14] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2006, 42(6): 26-31.
- [15] CUI C J, LI Y, LIU Y L, et al. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers[J]. *C R Biol*, 2017, 340(2): 76-86.
- [16] WU W F, CHEN F X, YEH K, et al. ISSR analysis of genetic diversity and structure of plum varieties cultivated in southern China[J]. *Biology (Basel)*, 2018, 8(1): E2.
- [17] 刘蕤, 杨际双. 菊属11个野生种和12个栽培品种遗传关系的ISSR分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 874-882.
- [收稿日期] 2019-09-12 [修回日期] 2019-10-21
[本文编辑] 李睿旻