

例对 6-姜辣素测定的影响, 优选最佳色谱条件。考察了乙腈-甲醇-水(43: 5: 52)<sup>[10]</sup>、甲醇: 水(55: 45)<sup>[17]</sup>以及乙腈-甲醇-水(40: 5: 55)为流动相系统进行实验筛选, 结果发现以乙腈-甲醇-水(40: 5: 55)为流动相系统的分离度较好, 干扰的杂质峰较少。

#### 参考文献:

- [1] 杨 鹏, 王彦晖. 温胆汤调畅气机的作用[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 646.
- [2] 李继端. 温胆汤临床应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(5): 527.
- [3] 江 玲. 温胆汤临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 16(1): 208.
- [4] 刘 明, 颜 勤. 温胆汤异病同治脾胃病[J]. 陕西中医, 2003, 24(7): 657.
- [5] 沈艳莉, 吴 俊, 何 力. 加味温胆汤治疗中风后肺部感染 30 例临床观察[J]. 中国临床医生杂志, 2008, 36(3): 57.
- [6] 李 征, 张 燕. 温胆汤临床新用[J]. 白求恩军医学院学报, 2005, 3(2): 127.
- [7] 刘西强. 温胆汤方证研究[D]. 南京中医药大学博士学位论文, 2010.
- [8] 王 姝, 梁翠茵. 生姜药理作用的研究进展[J]. 卫生职业教育, 2014, 32(22): 148.
- [9] Kawai T, Kinoshita K, Koyama K, et al. Anti-emetic principles of *Magnolia obovata* bark and *Zingiber officinale* rhizome [J]. *Planta Med*, 1994, 60(1): 17.
- [10] 王维皓, 王智民, 徐丽珍, 等. HPLC 法测定生姜中有效成分 6-姜辣素的含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 31.
- [11] 张雪红, 李华昌. 姜辣素的研究进展[J]. 矿冶, 2003, 12(4): 96.
- [12] 王 梦, 钱红美, 苏简单. 干姜乙醇提取物解热镇痛及体外抑菌作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(5): 299.
- [13] 王丽霞, 杨事维, 李 彬, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取生姜姜辣素的抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2014, 8: 96.
- [14] 余 悦, 白筱璐, 李兴平, 等. 干姜油的解热作用[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(3): 28.
- [15] 钮翠然, 陆 娟, 宋丽丽, 等. RP-HPLC 法测定干姜中 3 种姜酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 2008.
- [16] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评法”中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925.
- [17] 孟喜成, 杨 青, 王青兰. 高效液相色谱法测定十滴水水中 6-姜辣素的含量[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(2): 188.

#### ◇国药鉴别◇

## 水母雪莲 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

王 钧<sup>1,2</sup>, 王建科<sup>1,2</sup>, 石 琳<sup>1,2</sup>, 胡延萍<sup>1</sup>, 杨文韬<sup>3</sup>, 李 毅<sup>1</sup>, 王 莉<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810000; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 山东大学生命科学学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 目的 优化并建立适合于水母雪莲的 ISSR-PCR 反应体系并筛选出稳定的 ISSR 引物。方法 采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交设计方法, 以 TaqDNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度 5 种因素 4 个水平对水母雪莲 ISSR-PCR 反应体系进行优化; 并对反应体系进行验证。采用优化后的反应体系筛选出条带清晰且稳定的 ISSR 引物, 通过退火温度梯度试验确定最佳退火温度。结果 最终确立了水母雪莲 20 μl ISSR-PCR 最佳反应体系, 即包含 TaqDNA 聚合酶 0.7 U、dNTP 0.125 mmol/L、引物 0.3 μmol/L、模板 DNA 40 ng、Mg<sup>2+</sup> 1.5 mmol/L。在此基础上, 从 84 条 ISSR 引物中筛选出条带清晰且稳定的 8 条引物, 并通过梯度 PCR 反应确定最佳退火温度。结论 经过 11 份水母雪莲种质验证, 证明所建立的体系稳定可靠, 可用于后续水母雪莲遗传多样性分析和种质资源鉴定。

**关键词:** 水母雪莲; ISSR-PCR; 正交设计; 反应体系; 引物筛选

**DOI 标识:** doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.08.039

**中图分类号:** S567 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2016)08-1903-04

水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim 是菊科凤毛菊属植物, 多年生草本, 高 5~20 cm, 全株密被白色绵毛, 生于海拔 3700~5200 m 的高山流石滩, 主要分布于青海、西藏、云南、四川、甘肃等地; 克什米尔、尼泊尔也有分布<sup>[1]</sup>, 是一种具有极高药用价值的高原药材。经药理学研究证明, 水母雪莲中所含黄酮类化合物、生物碱类物质具有消炎镇痛、抗疲劳以及扩张血管的功效; 此外, 其甲醇提取物对癌细胞生长有抑制作用<sup>[2,3]</sup>。水母雪莲生长环

境恶劣、生长周期漫长, 生物量极低。加之具有极高的药用价值, 近年来人们对其采挖量逐年上升, 因此野生资源状况不容乐观。如今, 水母雪莲已经被列为我国三级保护植物, 同时也被录入青海省第二批重点保护野生植物名录。因此, 急需对其种质资源和遗传多样性进行研究, 为制定保护策略提供理论支持。

ISSR 分子标记技术是将 1~4 个嘌呤或者嘧啶碱基加锚到 SSR 的 3 或 5 端, 然后以此为引物, 扩增两个方向相反但序列相同的 SSR 之间的一段 DNA 序列, 是一种快速、准确, 产生大量多态位点的方法, 可用于大规模 DNA 指纹分析, 在植物种质资源鉴别中发挥巨大作用<sup>[4,5]</sup>。由于此技术是基于 PCR 反应的一种标记, 扩增结果易受到多种因素的影响, 为了获得重现性好、可靠性高的图谱, 还需对各因素的最佳反应水平进行探索, 建立稳定可靠的反应体系<sup>[6]</sup>。本研究以水母雪莲总 DNA 为模板, 利用正交试验方法对其 ISSR 反应体系进行优化, 建立 ISSR-PCR 反应体

收稿日期: 2015-12-15; 修订日期: 2016-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300269);

青海省(应用)基础研究计划(No. 2013-N-756)

作者简介: 王 钧(1993-), 男(汉族), 山东威海人, 中国科学院西北高原生物研究所读硕士研究生, 主要从事植物生物技术研究工作。

\* 通讯作者简介: 王 莉(1976-), 女(汉族), 山东邹平人, 中国科学院西北高原生物研究所副研究员, 博士学位, 主要从事植物生物技术研究工作。

系,为进一步利用 ISSR 分子标记进行水母雪莲遗传多样性分析和种质资源鉴定提供参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料 实验材料为本实验室水母雪莲组培苗,每一植株采集新鲜叶片装入加有硅胶的自封袋中干燥后置于 -20℃ 冰箱保存。

实验所用 Taq DNA 聚合酶、dNTP、buffer 缓冲液均为宝生物工程(大连)有限公司生产;引物为哥伦比亚大学设计的 UBC 引物。

1.2 方法

1.2.1 水母雪莲基因组总 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法提取水母雪莲总 DNA<sup>[7]</sup>。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,Nano-Drop 2000c 微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.2.2 水母雪莲 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计 采用  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计方法,对反应体系中的 TaqDNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度 5 因子进行 5 因素 4 水平筛选(表 1)。

UBC810(5'-GAGAGAGAGAGAGAT-3') 作为引物,根据表 1 设计配置 20 $\mu$ l 反应体系进行扩增,扩增程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 20 s,52.2℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 80 s,循环 38 次;72℃ 延伸 6 min,4℃ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶(0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭)电泳后在凝胶成像系统中拍照。按照条带

清晰度、条带数目、背景亮度等指标划为 16 个处理进行打分,条带丰富、亮度高、背景暗的处理记为 16 分,相反最差的记为 1 分。评分情况经 DPS 7.05 统计软件进行极差与方差分析。

1.2.3 ISSR-PCR 退火温度优化 采用筛选出的最佳反应体系,在引物  $T_m$  值上下波动 3℃,设置 8 个梯度,对引物 UBC817 及 UBC862 进行退火温度优化,其他扩增程序不变。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后进行紫外成像检测电泳结果。

1.2.4 ISSR-PCR 反应体系稳定性检测及引物筛选 用引物 UBC817 和 UBC862 对水母雪莲不同个体进行 ISSR-PCR 扩增以检测所筛选体系稳定性并进行引物筛选。

2 结果

2.1 水母雪莲 DNA 提取结果 水母雪莲总 DNA 溶液经 Nano-Drop 2000c 微量紫外分光光度计测定 OD 值为 1.8~2.0 之间,纯度较高。琼脂糖凝胶电泳显示条带清晰,且无拖尾现象(图 1),证明所提取的水母雪莲基因组 DNA 完整,可以满足后续实验要求。

2.2 ISSR-PCR 正交试验数据分析 ISSR-PCR 正交试验扩增产物电泳结果如图 2 所示。试验中 16 个处理均扩增出条带,但条带数目及亮度等有明显差异,14 号处理电泳结果优于其它处理组合,说明不同因子组合影响 ISSR-PCR 反应结果。3 次重复评分结果见表 1。

表 1 ISSR-PCR 反应体系正交实验设计

编号	因素					评分结果		
	TaqDNA 聚合酶 /U·(20 $\mu$ l) <sup>-1</sup>	脱氧核糖核苷三磷酸 /mmol·L <sup>-1</sup>	模板 DNA /ng	引物 / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	镁离子 /mmol·L <sup>-1</sup>	重复 1	重复 2	重复 3
1	0.4	0.100	20	0.3	1.35	2	1	1
2	0.4	0.125	40	0.4	1.50	4	3	2
3	0.4	0.150	60	0.5	1.65	5	7	3
4	0.4	0.175	80	0.6	1.80	3	2	4
5	0.5	0.100	40	0.5	1.80	6	6	7
6	0.5	0.125	20	0.6	1.65	7	5	8
7	0.5	0.150	80	0.3	1.50	1	4	5
8	0.5	0.175	60	0.4	1.35	8	10	9
9	0.6	0.100	60	0.6	1.50	11	9	6
10	0.6	0.125	80	0.5	1.35	15	11	11
11	0.6	0.150	20	0.4	1.80	10	13	10
12	0.6	0.175	40	0.3	1.65	13	14	14
13	0.7	0.100	80	0.4	1.65	9	8	12
14	0.7	0.125	60	0.3	1.80	16	16	15
15	0.7	0.150	40	0.6	1.35	12	12	13
16	0.7	0.175	20	0.5	1.50	14	15	16

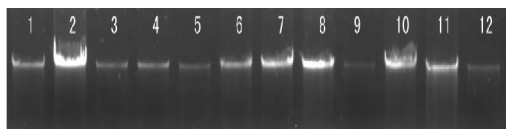
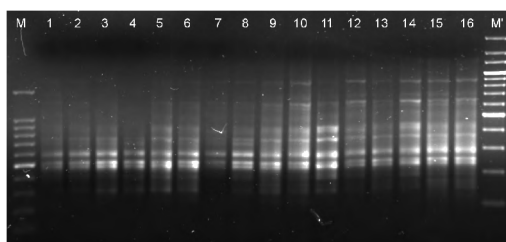


图 1 水母雪莲基因组 DNA 电泳图



M: 100 bp 标准分子量标记; M': 200 bp 标准分子量标记;  
1~16 为处理组合编号(见表 1)

图 2 ISSR-PCR 正交试验电泳结果(引物为 UBC810)

根据得分计算水母雪莲 ISSR-PCR 反应的各因素在每一水平的分数之和(T)与平均值(X),以及各因素在不同水平上评分平均值的极差 R(表 2)。

表 2 ISSR-PCR 反应各因素极差分析

计算结果	TaqDNA 聚合酶	脱氧核糖核苷三磷酸	模板 DNA	引物	镁离子
T1	37.0000	78.0000	102.0000	102.0000	105.0000
T2	76.0000	113.0000	106.0000	98.0000	90.0000
T3	137.0000	95.0000	115.0000	116.0000	105.0000
T4	158.0000	122.0000	85.0000	92.0000	108.0000
X1	3.0833	6.5000	8.5000	8.5000	8.7500
X2	6.3333	9.4167	8.8333	8.1667	7.5000
X3	11.4167	7.9167	9.5833	9.6667	8.7500
X4	13.1667	10.1667	7.0833	7.6667	9.0000
R	10.0833	3.6667	2.5000	2.0000	1.5000

T<sub>1</sub>~T<sub>4</sub> 为每一因素同一水平下的总和; X<sub>1</sub>~X<sub>4</sub> 为每一因素同一水平下的平均值; R 为极差

极差  $R$  代表某一因素对反应的影响程度,  $R$  值越大, 表示该因素对反应影响越显著, 反之则表示该因素对反应影响越不显著。极差分析结果显示水母雪莲 ISSR-PCR 反应中各因素浓度变化对扩增情况的影响由大到小依次为 TaqDNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度和  $Mg^{2+}$  浓度。

最大平均值  $X$  反映了某一因素的最佳反应浓度, 据此得出水母雪莲 ISSR-PCR 反应的五种因素理论最适浓度水平分别为 TaqDNA 聚合酶 0.7 U/20  $\mu$ l、dNTP 0.175 mmol/L、模板 DNA 60 ng、引物 0.5  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  1.8 mmol/L。

方差分析结果显示各因素对 PCR 扩增结果的影响差异显著(表 3)。F 值与  $R$  值相一致, TaqDNA 聚合酶浓度对试验结果影响最大, 而  $Mg^{2+}$  浓度对试验结果影响最小。P 值显示出 TaqDNA 聚合酶、dNTP、模板 DNA 对试验结果的影响达到了极显著水平 (\*\*  $P < 0.01$ ), 引物的影响达到了显著水平 (\*  $P < 0.05$ ), 而  $Mg^{2+}$  的影响不显著 (\*  $P > 0.05$ )。

表 3 ISSR-PCR 反应各因素方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
TaqDNA polymerase	771.8333	3	257.2778	116.5031	0.0001
dNTP	95.5000	3	31.8333	14.4151	0.0001
DNA	39.5000	3	13.1667	5.9623	0.0024
Primer	26.0000	3	8.6667	3.9245	0.0171
$Mg^{2+}$	16.5000	3	5.5000	2.4906	0.0780
Error	70.6667	32	2.2083		

为进一步确定各因素最适反应浓度, 对除了  $Mg^{2+}$  之外的剩下四种因素进行 Duncan 多重比较(表 4)。在表 4 中, TaqDNA 聚合酶浓度四水平差异显著; dNTP 浓度水平 2 和水平 4 二者差异不显著, 水平 1 和水平 3 差异显著; 模板 DNA 水平 1、水平 2、水平 3 三者之间差异不显著, 而三者与水平 4 差异显著; 引物浓度水平 1 与水平 3 无显著差异, 水平 1、水平 2、水平 4 之间无明显差异。

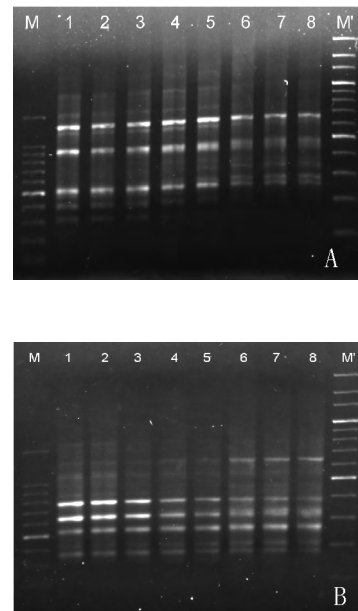
本次试验中 TaqDNA 聚合酶浓度水平是影响水母雪莲 ISSR-PCR 反应的最重要因素, 由图 2 可知, 随着 TaqDNA 聚合酶浓度的增加, 扩增出的条带相应增加, 结合表 4 分析结果最终确定水平 4 (0.7U) 为 TaqDNA 聚合酶最佳浓度水平; 图 2 电泳结果中 dNTP 水平 2 和水平 4 差异不大, 与表 4 分析结果相同, 从经济学的角度考虑, 选择水平 2 (0.125mmol/L) 为 dNTP 最佳浓度水平; 模板 DNA 水平 1、2、3 所扩增出的条带均明显亮于水平 4, 结合表 4 分析结果选择中间水平即水平 2 (40ng) 为模板 DNA 最佳浓度水平; 引物浓度四水平在电泳结果未表现出明显差异, 因此根据表 4 Duncan 多重比较结果选择水平 1 (0.3 $\mu$ mol/L) 为引物最佳浓度水平。

表 4 ISSR-PCR 反应各因素水平间 Duncan 多重比较

TaqDNA 聚合酶	脱氧核糖		模板		引物		
	均值	核昔三磷酸 /mmol · L <sup>-1</sup>	均值	DNA /ng	均值	引物 / $\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	
0.7	13.1667 <sup>a</sup>	0.175	10.1667 <sup>a</sup>	60	9.5833 <sup>a</sup>	0.5	9.6667 <sup>a</sup>
0.6	11.4167 <sup>b</sup>	0.125	9.4167 <sup>a</sup>	40	8.8333 <sup>a</sup>	0.3	8.5000 <sup>ab</sup>
0.5	6.3333 <sup>c</sup>	0.150	7.9167 <sup>b</sup>	20	8.5000 <sup>a</sup>	0.4	8.1667 <sup>b</sup>
0.4	3.0833 <sup>d</sup>	0.100	6.5000 <sup>c</sup>	80	7.0833 <sup>b</sup>	0.6	7.6667 <sup>b</sup>

综上所述, 水母雪莲 ISSR-PCR 反应体系各因素最佳浓度为: 20  $\mu$ l 反应体系中包含 TaqDNA 聚合酶 0.7U、dNTP 0.125mmol/L、模板 DNA 40 ng、引物 0.3  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L。

2.3 引物退火温度对水母雪莲 ISSR-PCR 扩增的影响 引物退火温度对试验结果的影响见图 3。结果显示引物退火温度对水母雪莲 ISSR-PCR 扩增结果影响显著。引物 UBC817 退火温度降低, 条带数目减少且亮度减弱, 扩增特异性差; 当温度高于 52 $^{\circ}$ C 时小分子核酸条带数目增多, 亮度高。退火温度为 52 $^{\circ}$ C 时, 扩增条带清晰稳定, 所以 UBC817 最佳退火温度为 52 $^{\circ}$ C; 引物 UBC862 与引物 UBC817 退火温度试验结果相似, 当退火温度为 57 $^{\circ}$ C 时扩增条带清晰、丰富且稳定, 背景较暗, 可以作为 UBC862 退火温度。



M 为 100 bp 分子量标记, M 为 200 bp 分子量标记;  
1~8 为 8 个温度梯度, A. UBC817 分别为 53 $^{\circ}$ C、  
52.7 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、50.8 $^{\circ}$ C、49.4 $^{\circ}$ C、48.2 $^{\circ}$ C、47.4 $^{\circ}$ C、47 $^{\circ}$ C;  
B. UBC862 分别为 58 $^{\circ}$ C、57.7 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、55.8 $^{\circ}$ C、  
54.4 $^{\circ}$ C、53.2 $^{\circ}$ C、52.4 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C

图 3 UBC817 和 UBC862 退火温度实验

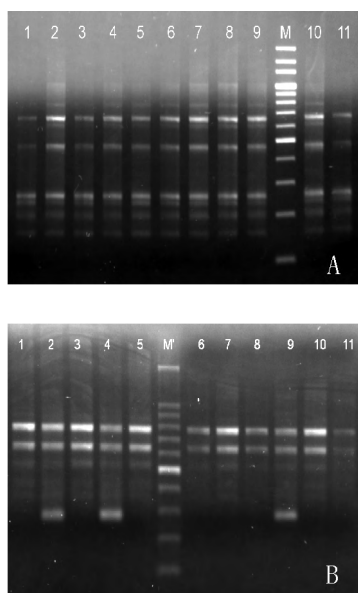
2.4 ISSR-PCR 最优体系验证和筛选引物结果 采用所筛选出的反应体系和引物 UBC817、UBC862 对水母雪莲不同个体进行 ISSR-PCR 扩增, 结果显示能够得到清晰、稳定且丰富的特异条带(图 4), 证明所优化筛选的反应体系稳定可靠。

利用本次优化的反应体系从 84 条引物中筛选到 8 条引物, 扩增结果均清晰稳定, 并通过退火温度试验分别确定了每种引物的最佳复性温度(表 5)。

### 3 讨论

ISSR 分子标记技术本身依托于 PCR 反应, 因而会受到 PCR 扩增底物诸如 TaqDNA 聚合酶、dNTP、模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$  浓度以及其它反应条件的影响, 但影响程度在不同物种间有着显著差异。在本次研究中, TaqDNA 聚合酶浓度是影响水母雪莲 ISSR-PCR 反应的最主要因素, 随着酶量增加条带数目也相应增加, 但要避免浓度过高所导致的非特异性条带增多以及条带弥散现象。此外, 酶量不足则会引起扩增量减少, 条带亮度低<sup>[6,8,9]</sup>。因此在设计时既要保证酶量充足又要避免酶量过大而降低扩增特异性。引物浓度对扩增产物的质量有直接影响, 浓度过高则错配和非特异性扩增几率增加, 极易形成引物二聚体; 浓度太低则无法进行有效扩增<sup>[9]</sup>。dNTP 作为 PCR 反应扩增原料, 浓度较低则不足以

支撑完成既定循环,浓度较高不仅会造成浪费而且其磷酸根会与体系中  $Mg^{2+}$  结合从而降低  $Mg^{2+}$  有效浓度<sup>[10,11]</sup>。此外,  $Mg^{2+}$  主要是通过改变 TaqDNA 聚合酶活性来影响 ISSR-PCR 反应,  $Mg^{2+}$  浓度过高,扩增产物特异性下降,背景噪音强;  $Mg^{2+}$  浓度过低,扩增产率下降,甚至扩增失败<sup>[8,12]</sup>。在本次研究中  $Mg^{2+}$  对反应体系影响最小,这与王帅等<sup>[13]</sup>的研究不同。模板 DNA 作为 PCR 扩增的底物之一,其浓度在许多研究中对试验结果影响较小<sup>[14-16]</sup>,而在本次研究中对 ISSR-PCR 扩增结果有很大的影响。试验中设定的模板浓度太高会导致非特异性扩增加强,电泳背景模糊,条带出现弥散;浓度过低,扩增出的条带亮度低或无扩增产物。但总体来说,模板 DNA 浓度的适宜范围较宽泛<sup>[12]</sup>。此外,各因素对试验影响大小不仅与物种有关,而且不同处理组合中各因素相互影响也会造成明显差异。



M 为 200 bp 分子量标记; M 为 100 bp 分子量标记;  
A: 引物 UBC817; B: 引物 UBC862  
图 4 UBC817 和 UBC862 对不同水母雪莲个体 ISSR-PCR 扩增结果

表 5 筛选出的引物序列和退火温度

引物	序列(5'→3')	退火温度/℃
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	52
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55.8
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	57
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	57
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	57
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	50
873	GAC AGA CAG ACA GAC A	51
880	GGA GAG GAG AGG AGA	50

Y = (C, T)。Note: Y = (C, T)

另外,退火温度是影响水母雪莲 ISSR-PCR 反应的关键因素,这与许多研究结果相同<sup>[17]</sup>。引物退火温度制约 PCR 产物特

异性与产量,退火温度高会使特异性增强,但温度过高引物难以与模板结合牢固,降低扩增产率;退火温度低则使产量增加,但过低会增加错配几率,特异性降低,因此筛选合适的退火温度也是水母雪莲 ISSR-PCR 反应的关键。

#### 4 结论

本次试验采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验方法对影响水母雪莲 ISSR-PCR 反应的主要因素: Taq DNA 聚合酶、dNTPs、模板 DNA、引物、 $Mg^{2+}$  5 种因素进行优化筛选,最终确立了适合于水母雪莲的最佳 ISSR-PCR 反应方法,即在 20  $\mu$ l 反应体系中,包含 0.7 U TaqDNA 聚合酶, 0.125mmol/L dNTP, 0.3  $\mu$ mol/L 引物, 40 ng DNA 模板, 1.5mmol/L  $Mg^{2+}$ 。同时,筛选出扩增效果较好的 8 条引物并逐一确定了各引物的最佳复性温度。经水母雪莲不同个体扩增后,证明该体系稳定可靠,可用于后续遗传学分析。

#### 参考文献:

[1] 刘尚武. 青海植物志(第 3 卷) [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1996: 468.

[2] 杨伟鹏, 林娜, 刘春芳, 等. 水母雪莲总黄酮和水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清中炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6): 41.

[3] 赵存方, 耿进霞, 王沛. 水母雪莲对小鼠抗疲劳和抗氧化作用的实验研究 [J]. 华北国防医药, 2009, 21(4): 1.

[4] 赵谦, 杜虹, 庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(11): 123.

[5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传, 2002, 24(5): 613.

[6] 李喜凤, 邱天宝, 张红梅, 等. 蒲公英 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序的建立与优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 119.

[7] 张晓祥, 王玲, 寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(36): 46.

[8] 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.

[9] 包蕊, 胡延萍, 王莉, 等. 华扁穗草 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选 [J]. 中国草地学报, 2014, 36(6): 46.

[10] 杨路存, 陈桂琛, 周国英, 等. 四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化 [J]. 生物技术通报, 2010, 26(9): 123.

[11] 欧立军, 颜旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353.

[12] 李嵘, 王喆之. 丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化 [J]. 广西植物, 2008, 28(5): 599.

[13] 王帅, 彭书明, 阳小成, 等. 入侵植物春飞蓬 DNA 的提取及 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 河南科学, 2015, 33(3): 369.

[14] 潘坤, 王文泉, 吴翼, 等. 椰子 ISSR 体系优化 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(4): 24.

[15] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91.

[16] 曾黎辉, 洪自同, 许家辉, 等. 龙眼 ISSR 反应体系的建立和优化 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 111.

[17] 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.