

# 中华补血草 ISSR-PCR 体系的构建与正交优化

丁 鸽<sup>1</sup> 张代臻<sup>2</sup> 于延球<sup>2</sup> 赵玲玲<sup>1</sup> 张蓓蓓<sup>1</sup>

(1. 盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003)

(2. 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 盐城师范学院, 江苏 盐城 224002)

[摘要] 为获得中华补血草 ISSR 的最佳反应体系, 采用正交试验设计, 对影响 ISSR 反应的模板含量、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、Taq 酶浓度、扩增程序及退火温度等多种因子进行优化筛选. 通过各因子的组合研究, 分析非特异性条带的产生原因并进行条件优化, 建立了可用于中华补血草 ISSR-PCR 分析的稳定可靠的反应体系: 25  $\mu$ L PCR 反应体积, 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 2 mmol/L  $MgCl_2$ , dNTP 100  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 为 20 ng, Taq 聚合酶 1.5 U, 随机引物 0.4  $\mu$ mol/L, 退火温度 52 $^{\circ}C$  ~ 58 $^{\circ}C$ . 所建立的中华补血草 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、检测多态性能力较强、重复性好等特点, 可以较好地应用于中华补血草的遗传多样性及物种保护的研究.

[关键词] 中华补血草, ISSR, 反应体系, 正交优化

[中图分类号] Q946 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2012)03-0093-05

## Establishment and Optimization of the Method of ISSR Fingerprinting Marker on *Limonium Sinense*

Ding Ge<sup>1</sup> Zhang Daizhen<sup>2</sup> Yu Yanqiu<sup>2</sup> Zhao Lingling<sup>1</sup> Zhang Beibei<sup>1</sup>

(1. Department of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

(2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Normal University, Yancheng 224002, China)

**Abstract:** To obtain the optimal amplification of ISSR conditions for *Limonium sinense*, the effects of the concentrations of DNA templates, magnesium, dNTP, Taq DNA polymerase and annealing temperature were tested and optimized by orthogonal designed experiment. The reliable ISSR-PCR systems for *L. sinense* was established by analyzing the reasons for occurrence of differential bands and optimizing reaction conditions. The optimal amplification conditions for *L. sinense* was 25  $\mu$ L PCR reaction volume, 10  $\times$  Buffer was 2.5  $\mu$ L, the concentration of magnesium was 2 mmol/L, dNTP was 100  $\mu$ mol/L, the concentration of DNA templates was 20 ng, Taq DNA polymerase was 1.5 U, primer was 0.4  $\mu$ mol/L. The appropriate annealing temperature was 52 $^{\circ}C$  ~ 58 $^{\circ}C$ . The ISSR-PCR systems, which were established in this paper for studying *L. sinense*, could provide clear reliable abundant polymorphisms molecular markers and were proved suitable for studying genetic diversity and conservation of *L. sinense*.

**Key words:** *Limonium sinense*, ISSR, reaction system, orthogonal optimization

中华补血草(*Limonium sinense*)为蓝雪科(Plumbaginaceae)、补血草属(*Limonium*)多年生草本植物,分布于江苏、福建、山东、台湾等地的沿海滩涂. 中华补血草根或全草入药,具有健脾补血、活血止血、抗菌消炎、调经之功效,用于治疗感冒、失血和血热月经过多等症<sup>[1,2]</sup>. 中华补血草既能药用,又可观赏,是江苏沿海分布的一种经济价值较高的盐生植物资源<sup>[3]</sup>. 2001年2月13日农业部第一次常务会议讨论通过,将中华补血草列入《中华人民共和国农业植物新品种保护名录(第三批)》<sup>[3]</sup>. 近年来,随着人们对沿海滩涂湿地的开发利用,如围垦造田、过度淡水养殖、工业污染等,一些盐生和湿地植物品种正悄然消失或濒临灭

收稿日期: 2012-03-28.

基金项目: 国家自然科学基金(31000142)、江苏省自然科学基金(BK2011421)、盐城工学院科研项目基金、盐城工学院博士启动基金(XKR2010003).

通讯联系人: 丁 鸽, 副教授, 研究方向: 药用植物资源多样性及成分. E-mail: dingzyc@yahoo.com.cn

绝. 因此, 寻找可靠的 DNA 分子指纹标记方法对中华补血草的遗传多样性和种质保存进行研究就显得尤为重要.

ISSR(Inter-simple sequence repeat) 称为简单重复序列间区标记技术, 是由 Zietkiewicz 于 1994 年提出来的, 以锚定的微卫星 DNA 为引物, 扩增得到相邻 SSR 间区域的扩增片段<sup>[4]</sup>. 近年来, ISSR 标记技术由于具有操作简单、快速、无需预知受试基因组序列、稳定性和重复性高、引物设计简单等优点, 广泛应用于药用植物遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制、物种鉴定、亲缘关系分析、植物育种等领域<sup>[5-10]</sup>. 利用 ISSR 方法研究中华补血草的遗传差异时, 发现反应的各种因素变化会直接影响实验结果的稳定性. 为此, 必须对中华补血草 ISSR 的反应体系进行优化, 建立中华补血草 ISSR 反应的可靠体系, 为进一步研究中华补血草的遗传多样性、开发利用这一珍贵药用资源提供理论依据和技术支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用中华补血草材料采自江苏大丰麋鹿国家级自然保护区.

### 1.2 基因组 DNA 的提取与定量

取中华补血草新鲜叶片 0.1 g, 在液氮中研成粉末. 利用德国 QIAGEN 试剂盒提取高质量的模板 DNA, 用 1% 的琼脂糖电泳检测(TBE 系统). 提取后的 DNA 用紫外吸收法和琼脂糖电泳双重检测 DNA 浓度和纯度, 用于 PCR 扩增反应.

### 1.3 ISSR 反应体系正交设计

为了确定 PCR 反应中 5 个因素(Taq 酶、Mg<sup>2+</sup>、模板 DNA、dNTP、引物)的最佳水平组合, 采用正交设计 L16(4<sup>5</sup>) 进行试验, 以 I2((AC)<sub>8</sub>AT) 为实验引物, L16(4<sup>5</sup>) 正交设计见表 1.

表 1 中华补血草 ISSR 反应因素水平 L16(4<sup>5</sup>) 正交试验设计

Table 1 L16(4<sup>5</sup>) orthogonal design of factors and levels of PCR reaction of *Limonium sinense*

试验号	Taq 酶/ U	Mg <sup>2+</sup> / (mmol/L)	模板 DNA/ng	dNTP/ (μmol/L)	引物/ (μmol/L)	试验号	Taq 酶/ U	Mg <sup>2+</sup> / (mmol/L)	模板 DNA/ng	dNTP/ (μmol/L)	引物/ (μmol/L)
1	1.0	1.0	10	80	0.2	9	2.0	1.0	40	160	0.4
2	1.0	1.5	20	100	0.4	10	2.0	1.5	60	120	0.2
3	1.0	1.8	40	120	0.6	11	2.0	1.8	10	100	0.8
4	1.0	2.0	60	160	0.8	12	2.0	2.0	20	80	0.6
5	1.5	1.0	20	120	0.8	13	2.5	1.0	60	100	0.6
6	1.5	1.5	10	160	0.6	14	2.5	1.5	40	80	0.8
7	1.5	1.8	60	80	0.4	15	2.5	1.8	20	160	0.2
8	1.5	2.0	40	100	0.2	16	2.5	2.0	10	120	0.4

扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 54℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 40 次, 最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存.

### 1.4 ISSR 扩增中各影响因素

#### 1.4.1 Mg<sup>2+</sup> 含量

共同的 PCR 反应条件: 25 μL PCR 反应体积, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 9.0, Taq 酶 1.5 U, dNTP 100 μmol/L, 引物 0.4 μmol/L, DNA 模板约 20 ng. 不同浓度的 Mg<sup>2+</sup>: (1) 1.0 mmol/L; (2) 1.5 mmol/L; (3) 1.8 mmol/L; (4) 2.0 mmol/L.

#### 1.4.2 dNTP 浓度

共同的 PCR 反应条件: 25 μL PCR 反应体积, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 9.0, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, Taq 酶 1.5 U, 引物 0.4 μmol/L, DNA 模板约 20 ng. 不同浓度的 dNTP: (1) 80 μmol/L; (2) 100 μmol/L; (3) 120 μmol/L; (4) 160 μmol/L.

#### 1.4.3 引物浓度

共同的 PCR 反应条件: 25 μL PCR 反应体积, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 9.0, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, Taq 酶 1.5 U, dNTP 100 μmol/L, DNA 模板约 20 ng. 不同浓度的引

物: (1) 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ; (2) 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ; (3) 0.6  $\mu\text{mol/L}$ ; (4) 0.8  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 1.4.4 Taq 酶单位

共同的 PCR 反应条件: 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体积, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 9.0 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , dNTP 100  $\mu\text{mol/L}$ , 引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板约 20 ng. 不同浓度的 Taq 酶: (1) 1 U; (2) 1.5 U; (3) 2 U; (4) 2.5 U.

#### 1.4.5 模板 DNA 浓度

共同的 PCR 反应条件: 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体积, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 9.0 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , Taq 酶 1.5 U, dNTP 100  $\mu\text{mol/L}$ , 引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ . 不同浓度的模板 DNA: (1) 10 ng; (2) 20 ng; (3) 40 ng; (4) 60 ng.

#### 1.5 PCR 产物的检测

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶 (0.5  $\times$  TBE 0.5 mg/L EB) 电泳, 在紫外凝胶成像系统 (UVP GDS-8000) 上观察并记录电泳结果.

## 2 结果

### 2.1 正交试验结果

从 PCR 结果分析, 第 1、5、9、13、14 组几乎无扩增条带或只有微弱条带, 可能由于反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度较低; 第 6 组扩增产物少且有非特异性条带产生, 可能由于 dNTP 浓度过高; 第 7、11 组扩增条带数量不稳定, 可能是由于模板过高、过低以及引物浓度过高造成; 第 3、4、10、15、16 组扩增条带较多、信号较好, 但多态性相对较低; 第 12 组扩增产物不稳定, 可能由于 Taq 酶较多所致; 第 2、8 组扩增效果较好, 条带较清晰.

### 2.2 各因素对 ISSR 结果的影响

#### 2.2.1 $\text{Mg}^{2+}$ 和 dNTP 浓度的选择

当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度在 1.5 mmol/L ~ 2 mmol/L、dNTP 浓度在 80  $\mu\text{mol/L}$  ~ 160  $\mu\text{mol/L}$  时均有扩增条带, 但条带的多少、真伪有明显差异; 只有当 dNTP 的浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 2 mmol/L 时可以得到清晰的条带, 且没有非特异性扩增.

表 2  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP 组合浓度对 ISSR 结果的影响

Table 2 Effect of combined concentration of  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP on ISSR

dNTP 浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 mmol/L		1.5 mmol/L		1.8 mmol/L		2 mmol/L	
	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照	正常扩增	负对照
80	-	-	-	-	+	+/-	++	+/-
100	-	-	+	-	+	+/-	++	-
120	+	-	++	+	++	+	++	++
160	-	-	+	+	++	+	++	+

注: + 表示有扩增条带, ++ 表示扩增条带多, +/- 表示扩增条带不稳定, - 表示无扩增条带.

#### 2.2.2 DNA 模板量和引物浓度的调整

图 1 表明 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 模板 DNA 量在 10 ng ~ 60 ng 时都能扩增出相同的带型, 模板量在 20 ng 时扩增产物最为清晰稳定, 当模板量大于 40 ng 时扩增产物开始模糊. 所以在中华补血草的 ISSR 分析中, 我们采用的 DNA 模板量为 20 ng.

在其他因素不变而 DNA 模板量为 20 ng 时, 只有引物浓度为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  时, 扩增效果最佳; 随着引物浓度的提高, 扩增条带变得模糊, 二聚体增多, 且出现一定的非特异性条带 (表 3).

#### 2.2.3 Taq 酶的选择

在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 加入 1 U ~ 1.5 U Taq 酶都可以获得重复清晰的条带, 且无非特异性条带, 以 1.5 U 时条带最清晰 (图 2). 但当 Taq 酶含量  $\geq 2$  U 时, 条带变得不清晰, 背景开

表 3 模板用量为 20 ng 时不同引物浓度下的扩增结果  
Table 3 Amplification of 20 ng of template with different primers' concentration

引物浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	正常扩增	负对照
0.2	+	-
0.4	++	-
0.6	++	+
0.8	++	+/-

注: + 表示有扩增条带, ++ 表示扩增条带多, +/- 表示扩增条带不稳定, - 表示无扩增条带.

始模糊,出现了非特异性条带.

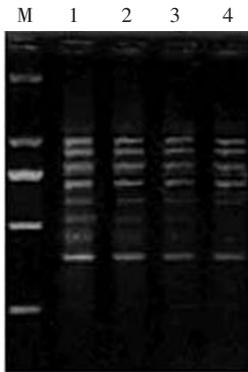


图1 模板浓度梯度对 ISSR 扩增结果的影响

Fig.1 Effect of template concentration gradient on the results of ISSR amplification

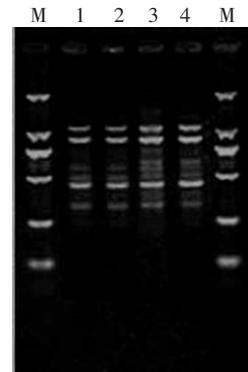


图2 不同 Taq 酶浓度的扩增结果

Fig.2 Amplification results with different concentration of Taq enzyme

#### 2.2.4 退火温度的调整

在进行退火温度的优化时,首先采用最简单的方法( $T_m = 4(G + C) + (A + T)$ )估算引物-模板对的  $T_m$  值,然后以  $T_m$  值为基准,  $2^\circ\text{C}$  为间隔、上下浮动,从高于  $T_m$  值  $6^\circ\text{C}$  到低于  $T_m$  值  $6^\circ\text{C}$  的一系列反应筛选出最佳退火温度.实验结果表明,大部分引物的最适退火温度高于理论退火温度.

### 3 讨论

ISSR 标记技术以其操作简单、稳定性好、多态性高等优点,成为植物资源保护和种质资源保存常用的分子标记,已成功用于植物遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制、分子生态学研究等领域<sup>[11-14]</sup>.在对药用植物中华补血草进行研究之前,建立其 ISSR-PCR 反应的可靠体系是必要的.

PCR 反应中,  $\text{Mg}^{2+}$  是 Taq 酶的激活剂,其浓度的变化能影响反应的特异性和扩增片段的产率,是 ISSR 反应中的一个主要变化因素.  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过低时,酶活力显著降低,产物减少;  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过高时会导致非特异性扩增产物的积累.相对来说,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度是一个容易控制的参数,因为所有的浓度变化都可以在不同的反应管中同时进行<sup>[15,16]</sup>.目前实验所用的 Taq DNA 聚合酶,附带单独的  $\text{MgCl}_2$  溶液,可以简化  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的调节<sup>[17,18]</sup>.本实验结果表明,  $\text{Mg}^{2+}$  在  $2\text{ mmol/L}$  时扩增最好,扩增带型没有变化.

dNTP 是反应中磷酸基团的主要来源,是 DNA 合成的原料.在 PCR 反应中, dNTP 浓度过高可加快反应速度,但同时也会增加碱基的错误掺入率和实验成本.反之,低浓度的 dNTP 会导致反应速度的下降,但可提高实验的精确性.此外,由于 dNTP 直接螯合相应数量的  $\text{Mg}^{2+}$ ,它们浓度的任何改变都会影响有效  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度<sup>[15,16]</sup>.本实验表明,当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度在  $1.5\text{ mmol/L} \sim 2\text{ mmol/L}$ 、dNTP 浓度在  $80\text{ }\mu\text{mol/L} \sim 160\text{ }\mu\text{mol/L}$  时均有扩增条带.但只有当 dNTP 的浓度为  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $2\text{ mmol/L}$  时可以得到清晰的条带,且没有非特异性扩增.

DNA 模板量也是影响 ISSR-PCR 扩增效果的主要因素之一.模板质量浓度过低,无扩增产物或产物不稳定;模板质量浓度过高,又会导致扩增条带模糊并且会增加非特异性产物的出现<sup>[15,16]</sup>.在本研究中,模板 DNA 量在  $10\text{ ng} \sim 60\text{ ng}$  时都能扩增出相同的带型,模板量在  $20\text{ ng}$  时扩增产物最为清晰稳定.

引物与模板比会对 PCR 的特异性产生影响.PCR 反应中引物与模板比太高,倾向于产生非特异产物,而且容易形成引物二聚体;如果比例太低,PCR 的反应效率就会大大降低<sup>[15,16]</sup>.在本实验中,当其他因素不变, DNA 模板量为  $20\text{ ng}$ 、引物浓度为  $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$  时,扩增效果最佳,没有非特异性条带出现.

退火温度对 ISSR 条带的数量和强弱也会产生一定的影响.因退火温度的改变,在同一 PCR 反应中,产生错配的程度也有所不同.通常较低的温度在保证引物与模板结合稳定性的同时,会使引物与模板之间未完全配对的一些位点间得到扩增,即产生一定的错误扩增.因此,在允许的范围内,选择较高的退火温度可减少引物与模板之间的非特异性结合,提高反应的特异性<sup>[15,16]</sup>.

通过对上述条件的优化,筛选出适宜于中华补血草 ISSR-PCR 分析的反应体系,组成为:  $10 \times \text{Buffer}$

2.5  $\mu\text{L}$  2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , Taq 酶 1.5 U, dNTP 100  $\mu\text{mol/L}$ , 引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板量约 20 ng, 总体积为 25  $\mu\text{L}$ . 反应循环参数为: 94 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min, 94 $^\circ\text{C}$  变性 50 s, 52 $^\circ\text{C}$  ~ 58 $^\circ\text{C}$  复性 50 s, 72 $^\circ\text{C}$  延伸 1.5 min, 循环 40 次, 最后 72 $^\circ\text{C}$  延伸 7 min, 4 $^\circ\text{C}$  保存. 利用此优化系统, 对中华补血草进行扩增, 可得到条带清晰、多态性丰富的扩增条带(图 3), 可用于中华补血草的遗传多样性及种质资源保护分析.

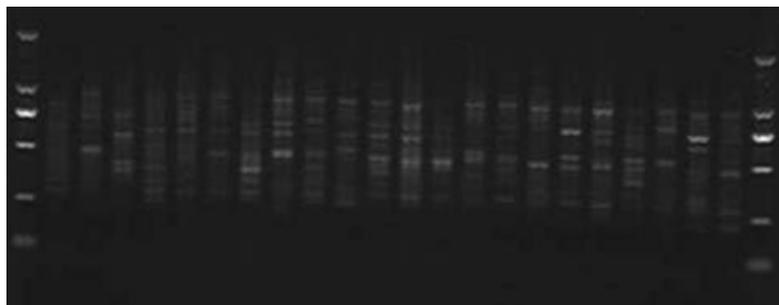


图 3 I2 引物对中华补血草的扩增结果

Fig.3 Amplification of *Limonium sinense* with primer I2

### [参考文献]

- [1] 陈炳华, 李均, 郭巧茹, 等. 中华补血草多酚提取物对自由基的清除能力[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(3): 36-42.
- [2] Lin L C, Chou C J. Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense* [J]. *Planta Medica*, 2000, 66(4): 382-383.
- [3] 董必慧. 江苏沿海滩涂中华补血草的保护性研究[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(6): 28-30.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-193.
- [5] 罗群, 马丹炜, 王跃华. 川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1554-1557.
- [6] 徐红, 王燕燕, 魏丹红, 等. 不同产地丹参药材的 ISSR 分析与鉴别[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6): 454-457.
- [7] Kojoma M, Iida O, Makino Y, et al. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. *Planta Medica*, 2002, 68(1): 60-63.
- [8] Jian S G, Shi S H, Zhong Y, et al. Genetic diversity among South China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis[J]. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 2002, 13(14): 272-276.
- [9] He J, Wang H, Li D Z, et al. Genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, a traditional Chinese medicinal herb, detected by ISSR markers[J]. *Planta Medica*, 2007, 73(12): 1316-1321.
- [10] Ge X J, Zhang L B, Yuan Y M, et al. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Biodiversity and Conservation*, 2005, 14(4): 849-861.
- [11] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102(5): 726-732.
- [12] Casasoli M, Mattioni C, Cherubini, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102(8): 1190-1199.
- [13] Jin Y, Zhang W J, Fu D X, et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(8): 995-1002.
- [14] Li H S, Chen G Z. Genetic diversity of *Sonneratia alba* in China detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(5): 515-521.
- [15] Dieffenbach C W, Dveksler G S. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [16] 王培训, 周联, 赖小平. 分子生物学技术与中药鉴别[M]. 广州: 世界图书出版社, 2002.
- [17] 沈洁, 丁小余, 丁鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 II-SSR 指纹标记方法的建立与优化[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291-294.
- [18] 贺佳, 丁小余, 褚必海, 等. 泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2006, 29(3): 86-90.

[责任编辑: 黄 敏]