

子一样的分子量,再次证明了我们之前的推断,干扰物极有可能是羟基积雪草苷的同分异构体。结合相关文献的报道^[7],推断干扰峰为积雪草苷 B,它与羟基积雪草苷是一对乌苏烷型和齐墩果烷型结构异构的同分异构体。

3.2 异构体的分离:目前对于 HPLC 法拆分异构体的方法主要有手性试剂衍生、采用手性柱、手性流动相添加剂法等,其中手性流动相添加剂法有其独特的优点。据文献报道,潘见等^[8]采用 β -环糊精流动相添加剂法来分离测定积雪草总苷元中的羟基积雪草酸。因此我们尝试采用同样的方法来分离积雪草总苷中的羟基积雪草苷和积雪草苷 B。试验证明, β -环糊精的加入,使各异构体与 β -环糊精形成不同空间位阻的包含物,得到了不同的保留时间。而且随着 β -环糊精浓度的增加,羟基积雪草苷峰与积雪草苷 B 峰的分离度越高,而流动相的 pH 值对于色谱峰形、分离效果等均无显著影响。由于高浓度的 β -环糊精水溶液存在溶解性的问题(1.85 g/100 mL, 25 °C),在权衡了各浓度 β -环糊精条件下的分离效果后,最终选择乙腈 2 mmol/L β -环糊精溶液(24:76)作为流动相条件。

4 结论

本实验对积雪草药材及其总苷的测定方法进行了研究。通过在流动相中添加 β -环糊精,成功地区

分了样品中的异构体,建立了样品中羟基积雪草苷和积雪草苷的定量测定方法;同时,在此基础上建立了积雪草总苷的 HPLC 特征图谱,所得图谱中共确定了 6 个共有峰,非共有峰面积所占总面积均小于 5%,各共有峰的相对保留时间均十分稳定。各批号样品的相似度均在 0.95~1.00,表明不同批号样品间具有很高的相似度。方法快速简便、结果准确、重现性好,为积雪草药材及其总苷的质量控制提供了有价值的参考。

参考文献:

- [1] 秦路平,庄卫国,郑汉臣,等.积雪草研究进展[J].国外医药·植物药分册,1997,12(4):154-157.
- [2] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等.RP-HPLC 法测定积雪草中积雪草苷和羟基积雪草苷[J].中草药,2007,38(3):455-456.
- [3] 陆兴毅,冯丽娟.HPLC 法测定积雪草总苷中羟基积雪草苷和积雪草苷的含量[J].中国药师,2008,11(1):62-63.
- [4] 张锐,彭杨锐.高效液相色谱-蒸发光散射测定积雪草苷霜软膏中羟基积雪草苷和积雪草苷[J].中草药,2007,38(3):386-387.
- [5] 邹节明,周艳林,吴敏菊.HPLC-ELSD 法测定三金片和三金胶囊中积雪草苷和羟基积雪草苷的含量[J].药物分析杂志,2005,25(10):1250-1252.
- [6] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等.积雪草化学成分研究[J].中草药,2005,36(12):1761-1763.
- [7] 潘见,开桂青,袁传勋,等. β -环糊精流动相添加剂法分离测定积雪草总苷元中的羟基积雪草酸[J].色谱,2007,25(3):316-318.

三叶木通 AFLP 反应体系的建立及优化

王喆¹,张铮^{1,2,3*},褚会娟¹,王喆之^{1,2,3}

(1. 陕西师范大学生命科学学院,陕西 西安 710062; 2. 陕西师范大学 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室,陕西 西安 710062; 3. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室,陕西 西安 710062)

摘要:目的 为研究三叶木通种质资源遗传多样性,建立并优化三叶木通 AFLP 反应体系。方法 以三叶木通叶片为材料,对影响 AFLP 反应体系中连接、预扩增和选择性扩增的各因素进行分析,建立优化的 AFLP 反应体系。结果 建立三叶木通 AFLP 反应优化体系:连接体系加入 T_4 连接酶 2 U, Mse I 接头 100 pmol, Eco R I 接头 10 pmol;预扩增反应总体积 20 μ L,加入连接产物 2.0 μ L, E -0、 M -0 各 100 ng, dNTPs 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 1.875 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 2 U;选择性扩增反应总体积 20 μ L,加入 5 μ L 稀释 100 倍的预扩增产物, E_3 、 M_3 各 50 ng, dNTPs 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 1.875 mmol/L, Taq DNA 酶 1.5 U。结论 建立适用于三叶木通种质资源遗传多样性研究的 AFLP 反应优化体系。

关键词:三叶木通; AFLP; 优化

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)12-2074-05

收稿日期:2010-02-02

基金项目:陕西省科技攻关项目(2010K17-05)

作者简介:王喆(1985—),女,河北省石家庄市人,硕士,研究方向为植物遗传多样性。E-mail: wzyeta@gmail.com

* 通讯作者 张铮 研究方向为植物遗传 E-mail: zhangzheng@snnu.edu.cn

Establishment and optimization of AFLP reaction system for *Akebia trifoliata*WANG Zhe¹, ZHANG Zheng^{1,2,3}, CHU Huijuan¹, WANG Zhe zhi^{1,2,3}

(1 College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Shaanxi Normal University,

Xi'an 710062, China; 3. National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Xi'an 710062, China)

Abstract: Objective To establish and optimize the AFLP reaction system for genetic diversity analysis on *Akebia trifoliata*. **Methods** The leaves of *A. trifoliata* were used to analyze the influencing factors of the ligation, the pre-amplification, and the selective amplification of AFLP, so that the optimal AFLP reaction system could be built up. **Results** The optimal AFLP reaction system has been set up: added 10 pmol of *EcoR* I adapter, 100 pmol of *Mse* I adapter, and 2 U of T4 DNA ligase in the ligation mixture; The pre-amplification mixture (20 μ L) contained 2.0 μ L of ligation products, 100 ng of each pre-selective primer, E-0 and M-0, 0.250 mmol/L of dNTPs, 1.875 mmol/L of Mg^{2+} , 2 U of *Taq* DNA polymerase; the selective amplification mixture (20 μ L) contained 5 μ L of 1:100 diluted pre-amplification products, 50 ng of each selective primer, E₃, M₃, 0.250 mmol/L of dNTPs, 1.875 mmol/L of Mg^{2+} , 1.5 U of *Taq* DNA polymerase. **Conclusion** The study on *A. trifoliata* could establish and optimize the AFLP reaction system which can be used in the research of genetic diversity of the species in future.

Key words: *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.; AFLP; optimization

三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 为木通科木通属落叶木质藤本植物, 主要分布在我国河北、山西、山东、河南、陕西南部、甘肃东南部至长江流域各省区, 其根、藤茎、叶、花、果均可入药, 有利尿、抗肿瘤、抗菌等功效^[1-2]。目前对三叶木通的研究主要集中在化学成分、药用价值、生物学特征、栽培技术和资源分布等方面, 对其遗传结构的研究仅局限于构建 RAPD 反应体系阶段^[3-6]。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP), 是 Vos 创立的一项检测 DNA 多态性的分子标记技术^[7], 因其具有多态性丰富、无需预知序列信息、稳定性好、DNA 用量少等优点, 目前已广泛应用于种质资源鉴定、遗传多样性研究和遗传连锁图谱的构建等方面^[8-9], 然而尚未见 AFLP 应用于三叶木通的相关报道。本研究以三叶木通为材料, 对 AFLP 分析过程中的主要影响因素进行单因素多水平分析, 建立并优化了三叶木通 AFLP 反应体系, 为今后研究其遗传多样性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 实验所用三叶木通采自陕西师范大学三叶木通种质资源圃。

1.2 试剂: 限制性内切酶 *Mse* I 和 *EcoR* I (NEB 公司), T4 连接酶 (MBI 公司), *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司), DL2000 Marker (西安润德生物技术有限公司), 引物和接头由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 主要仪器: Microfuge 22R 离心机、DU 730 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter 公司), PTC-200 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), Tanon-1600 数码凝胶图像处理系统 (上海天能科技有限公司), DYCZ-20F 型 DNA 序列分析电泳槽、DYY-12 型电泳仪电源 (北京市六一仪器厂)。

1.4 基因组 DNA 的提取: 根据席在星等^[6]的 CTAB 法做了改良, 叶片研磨后用缓冲洗涤液 (0.25 mL/L NaCl, 0.2 mol/L Tris-Cl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1% PVP, 4% 巯基乙醇) 清洗, 氯仿异戊醇抽提前先用等体积苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提 1 次, 用 50% 体积的 5 mol/L NaCl 替换 NaAc。取 3 μ L 提取的基因组 DNA 样品于 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 (5 V/cm)。

1.5 双酶切体系: 总体积 20 μ L, 包括 500 ng 基因组 DNA、NEB Buffer 4 2 μ L、100 $\times$ BSA (10 mg/mL) 0.2 μ L、*EcoR* I 3 U、*Mse* I 3 U。37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 6 h, 65 $^{\circ}$ C 变性 20 min。取 5 μ L 酶切产物于 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 (5 V/cm)。

1.6 连接体系^[10]: 酶切产物 7.5 μ L, 缓冲液 2.0 μ L, 连接体系总体积 20 μ L, ddH₂O 补足。对影响连接体系的 2 个因素, 即连接酶用量和接头浓度进行优化 (表 1)。22 $^{\circ}$ C 连接反应 2 h, 65 $^{\circ}$ C 变性 10 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 预扩增体系优化: 用不含有任何选择性碱基的 E-0/M-0 引物组合进行预扩增反应, 反应总体积 20 μ L。对影响预扩增体系的各主要因素设置梯度实

表 1 不同连接体系

Table 1 Different ligation systems

体系	<i>Eco</i> R I 接头	<i>Mse</i> I 接头	<i>T</i> ₄ 连接酶
1	1 0	1 0	0 2
2	2 0	2 0	0 2
3	2 0	2 0	0 4
4	2 5	2 5	0 4
5	2 5	2 5	0 5

验 (表 2)。PCR 扩增程序: 94 ℃、2 min; 94 ℃、30 s, 56 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 30 个循环; 72 ℃、5 min。预扩增产物于 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 (5 V/cm)。

1.8 选择性扩增体系优化: 根据前期预实验对 64 对引物组合的初步筛选结果, 从中选用条带相对丰富且稳定的 E-ACT/M-CAG 引物组合, 反应总体积 20 μL。对影响选择性扩增体系的各主要因素设置梯度实验 (表 3)。PCR 扩增程序: 94 ℃、2 min; 94 ℃、30 s, 65 ℃、30 s (每循环降低 0.7 ℃), 72 ℃、1 min, 共 13 个循环; 72 ℃、5 min; 94 ℃、30 s, 56 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 共 23 个循环。选择性扩增产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 (5 V/cm)。

表 2 预扩增体系优化的各因素变量梯度

Table 2 Variable gradient for optimizing every factors of pre amplification system

序号	连接产物/ μL	引物量/ ng	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	dNTPs 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	<i>Taq</i> 酶量/ U
1	1 0	50	0.625	0.063	0.5
2	2 0	75	1.250	0.125	1.0
3	3 0	100	1.875	0.188	1.5
4	4 0		2.500	0.250	2.0
5			3.125	0.313	

表 3 选择性扩增体系各因素优化的变量梯度

Table 3 Variable gradient for optimizing every factors of selective amplification system

序号	预扩产物 稀释倍数	引物量/ ng	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	dNTPs 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	<i>Taq</i> 酶量/ U
1	10	30	0.625	0.063	0.5
2	20	40	1.250	0.125	1.0
3	50	50	1.875	0.188	1.5
4	100		2.500	0.250	2.0
5	200		3.125	0.313	

1.9 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 取 100 mL 60 g/L PA 胶, 120 μL TEMED 和 300 μL 100 g/L APS 混匀制胶, 恒功率 85 W 预电泳 1 h。取 4 μL 选择性扩增产物加入等体积变性上样液 (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯酚), 混匀, 95 ℃ 变性 5 min, 上样量 8 μL, 恒功率 50 W 电泳 150 min。

1.10 银染检测: 对 Bassan^[11] 方法进行改进, 缩短

了银染时间。①固定: 2 L 10% 冰醋酸固定 10 min。②漂洗: 超纯水清洗 2 次, 每次 2 min。③染色: 2 L 0.1% 硝酸银 (用前加 37% 甲醛 1.5 mL) 染色 15 min。④漂洗: 超纯水清洗 5 s。⑤显色: 2 L、4 ℃ 预冷的显影液 (30 g NaOH, 1.6 g NaH₂PO₄·H₂O, 用前加 8 mL 37% 甲醛) 显色 10 min。⑥终止: 2 L、10% 冰醋酸终止 5 min。⑦漂洗: 超纯水清洗 5 min, 室温干燥, 照相。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取: 模板 DNA 的质量直接影响酶切以及连接反应是否充分, 因此, 高质量模板 DNA 的获取是 AFLP 成功的关键。本研究所用的改良 CTAB 法得到 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.7~1.8, 且电泳结果 (图 1) 显示 DNA 无降解, 条带清晰, 无 RNA, 无拖尾, 适于 AFLP 分析。

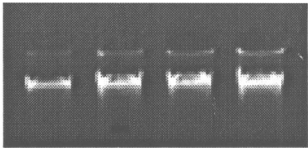
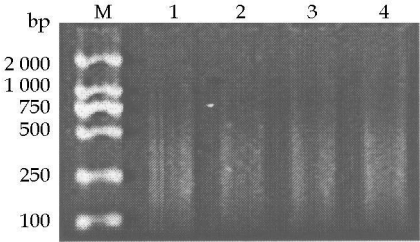


图 1 基因组 DNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of genomic DNA

2.2 酶切体系: 由图 2 可见, 基因组 DNA 经过双酶切后在 100~500 bp 形成均匀的弥散带, 说明基因组 DNA 被限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Mse* I 彻底酶切。



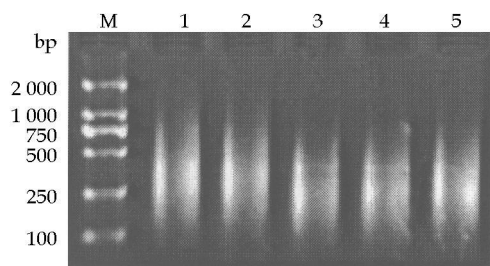
M- Marker 1~4 酶切产物

M- Marker 1—4 digestion products

图 2 基因组 DNA 双酶切电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of genomic DNA digested by two restricted enzyme

2.3 连接体系: *T*₄ 连接酶用量和接头浓度是影响连接体系的关键因素, 不同连接体系的优劣可以通过电泳其预扩增产物进行比较^[10]。图 3 显示, 1 和 2 泳道条带范围在 100~1000 bp, 3~5 泳道条带范围在 100~500 bp, 可见增加接头浓度和 *T*₄ 连接酶量后可降低非特异性扩增。连接体系 3、4 和 5 产物经过预扩增后得到的产物在凝胶上显示差别不大, 考虑到经济节约, 选择体系 3, 即 *T*₄ 连接酶量 2 U、*Eco*R



M: Marker 1~5 连接体系 1~5 的预扩增产物结果图

M: Marker 1~5 electrophoresis of pre-amplification system from 1~5 ligation system

图 3 不同连接体系的预扩增电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis of pre-amplification system from different ligation systems

I 接头量 10 pmol 和 *Mse* I 接头量 100 pmol。

2.4 预扩增体系

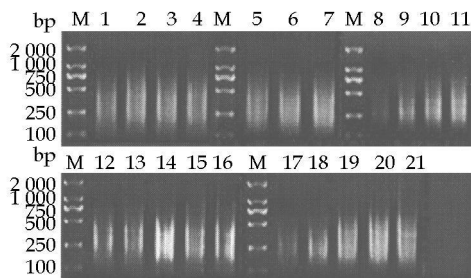
2.4.1 模板浓度对预扩增的影响: 由图 4 (1~4 泳道分别表示模板量 1.0、2.0、3.0 和 4.0 μ L) 可见模板浓度对预扩增结果影响不大, 产物均在 100~500 bp。考虑到经济节约及实验效果, 选择模板量 2.0 μ L 作为预扩增体系。

2.4.2 引物浓度对预扩增的影响: 本实验对引物量设置 50、75、100 ng 梯度实验, 图 4 (5~7 泳道分别表示引物量 50、75、100 ng) 显示引物量增加对预扩增产物片段范围影响不大, 但加大引物量, 可略微提高产物的量, 因此选择预扩增引物量 100 ng。

2.4.3 Mg^{2+} 浓度对预扩增的影响: Mg^{2+} 浓度对扩增反应的影响主要表现在影响酶的活性、扩增的真实性以及产物的特异性, 因此选择合适的 Mg^{2+} 浓度是扩增的关键因素之一。由图 4 (12~16 泳道分别表示 Mg^{2+} 浓度 0.625、1.250、1.875、2.500、3.125 mmol/L) 可见, 当 Mg^{2+} 浓度为 1.875 mmol/L 时, 预扩增结果相对较好。

2.4.4 dNTPs 浓度对预扩增的影响: dNTPs 可与 Mg^{2+} 结合从而降低游离的 Mg^{2+} 浓度, 不同浓度的 dNTPs 会对扩增产生显著的影响。图 4 (17~21 泳道分别表示 dNTPs 浓度 0.063、0.125、0.188、0.250、0.313 mmol/L) 显示, 当 dNTPs 浓度低于 0.188 mmol/L 时, 扩增产物量少; 当 dNTPs 浓度为 0.250 mmol/L 时, 预扩增结果相对较好。

2.4.5 *Taq* DNA 聚合酶量对预扩增的影响: 由图 4 (8~11 泳道分别表示 *Taq* DNA 聚合酶量 0.5、1.0、1.5 和 2.0 U) 可见, 当 *Taq* 酶量为 0.5 U 时, 扩增产物量少, 随着酶量增加, 预扩增产物量逐渐加大, 且片段范围均在 100~500 bp, 因此, *Taq* DNA 聚合酶量选择 2 U。



M: Marker 1~21 不同预扩增体系电泳结果

M: Marker 1~21 electrophoresis of different pre-amplification system

图 4 不同预扩增体系电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of different pre-amplification systems

最终确定三叶木通 AFLP 预扩增体系: 连接产物 2.0 μ L, *E*-0 量 100 ng, *M*-0 量 100 ng, dNTPs 浓度 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 1.875 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶量 2 U, ddH₂O 补至 20 μ L。

2.5 选择性扩增体系

2.5.1 预扩产物稀释倍数对选择性扩增的影响: 由图 5 (1~5 泳道分别表示模板稀释倍数 10、20、50、100 和 200 倍) 可见, 当模板浓度很高时, 出现非特异性扩增产物 (图 5: 1 泳道), 随着模板稀释倍数的加大, 非特异性扩增产物量逐渐减少, 但当模板稀释 200 倍时, 扩增产物量较小。因此, 选择稀释 100 倍的预扩增产物作为选择性扩增的模板。

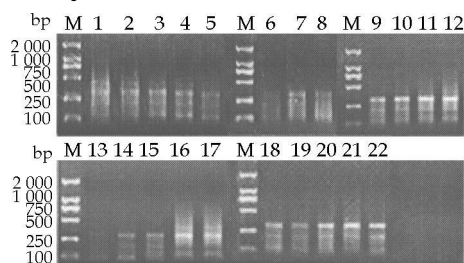
2.5.2 引物浓度对选择性扩增的影响: 由图 5 (6~8 泳道分别表示引物量 30、40 和 50 ng) 可见, 随着引物量增加, 扩增产物量加大, 且片段范围均在 100~500 bp, 因此为保证扩增产物量, 选择引物量 50 ng。

2.5.3 Mg^{2+} 浓度对选择性扩增的影响: 随着 Mg^{2+} 用量增加, 扩增产物量加大 (图 5: 13~17 泳道分别表示 Mg^{2+} 浓度 0.625、1.250、1.875、2.500、3.125 mmol/L), 且片段范围均在 100~500 bp, 但当 Mg^{2+} 浓度达到 2.500 mmol/L 时, 扩增产物出现非特异性扩增, 因此确定选择性扩增 Mg^{2+} 浓度 1.875 mmol/L。

2.5.4 dNTPs 浓度对选择性扩增的影响: 由图 5 (18~22 泳道分别表示 dNTPs 浓度 0.063、0.125、0.188、0.250、0.313 mmol/L) 可见, 随着 dNTPs 浓度的增加, 扩增产量增加, 且片段范围均在 100~500 bp, 当 dNTPs 浓度为 0.250 mmol/L 时, 扩增产物量最大。随着 dNTPs 浓度增加到 0.313 mmol/L, 由于和 Mg^{2+} 的结合, 导致扩增产物略微减少, 因此, 选择 dNTPs 浓度 0.250 mmol/L。

2.5.5 *Taq* DNA 聚合酶量对选择性扩增的影响:

由图5(9~12泳道分别表示 *Taq* DNA 聚合酶量 0.5、1.0、1.5、2.0 U) 可见随着 *Taq* 酶量增加, 扩增产物量增加, 但当酶量增加到 2 U 时, 扩增产物片段范围也相应增加。因此, 在保证扩增产物量和没有非特异性扩增的前提下, 选择 *Taq* DNA 聚合酶量 1.5 U。



M- Marker 1~22 不同选择性扩增体系电泳结果
M- Marker 1-22 electrophoresis of different selective amplification systems

图5 不同选择性扩增体系电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis of different selective amplification systems

最终确定三叶木通 AFLP 选择性扩增体系: 预扩增产物稀释倍数 100 倍, E_3 量 50 ng, M_3 量 50 ng, dNTPs 浓度 0.250 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 1.875 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶量 1.5 U, ddH₂O 补至 20 μ L。

2.6 银染结果: 不同引物组合的选择性扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测, 结果(图6)显示, 条带清晰、丰富, 多态性好, 可用于三叶木通遗传多样性分析。

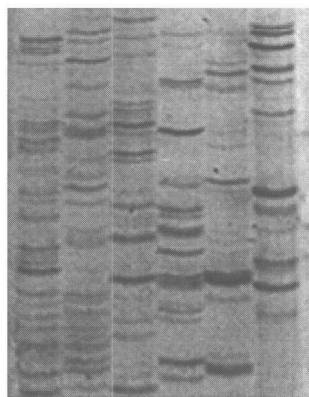


图6 不同引物组合选择性扩增产物的银染结果(局部)

Fig. 6 Silver stained results of selective amplification products with different primer combinations (partial)

3 讨论

AFLP 分子标记技术由于其操作复杂, 流程长, 所用药品和仪器多, 涉及因素多, 且不同植物的反应体系有差异, 因此对影响三叶木通 AFLP 反应体系的各关键因素的优化分析就显得尤为重要。本实验

着重分析基因组 DNA 的提取, 并对扩增反应中的主要因素进行优化。

三叶木通叶片中含有大量的多糖和酚类物质, 常规方法难以得到高质量的基因组 DNA。本实验对 DNA 提取方法改良中, 增加洗涤步骤、苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提和 NaCl 处理有效地避免了酚类物质和多糖的干扰, 获得了完全符合 AFLP 要求的基因组 DNA。

扩增反应中, 模板浓度、引物量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶量均能够影响扩增的效果, 其中以 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶量的影响最为明显。 Mg^{2+} 影响 *Taq* 酶的活性, dNTPs 可与 Mg^{2+} 结合等, 因此, 三者的配比关系, 尤其是 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度的配比对扩增的影响更为重要。经过单因素多水平综合分析, 三叶木通 Mg^{2+} 和 dNTPs 最适浓度分别为 1.875 和 0.250 mmol/L。

银染效果直接影响 AFLP 图谱分析, 显影液用 NaOH 代替 Na_2CO_3 , 可提供更强的碱性环境, 促进显影液的显影能力, 缩短了显影时间, 同时加入少量的 NaH_2PO_4 有效地控制了显影过程, 从而得到背景清晰, 对比度好的银染结果。

本实验通过对影响三叶木通 AFLP 反应中的连接、预扩增以及选择性扩增中的各因素进行了梯度优化分析, 建立了适用于三叶木通种质资源遗传多样性的 AFLP 反应优化体系。

参考文献:

- [1] 应俊生, 陈德昭. 中国植物志 [M]. 第二十九卷. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] 王 晔, 鲁 静, 林瑞超. 三叶木通藤茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 459-498.
- [3] 刘桂艳, 王 晔, 马双成, 等. 木通属植物木通化学成分及药理活性研究概况 [J]. 中国药杂志, 2004, 39(5): 330-332.
- [4] 刘占朝. 三叶木通研究进展综述 [J]. 河南林业科技, 2005, 25(1): 20-22.
- [5] 李秀华, 肖娅萍, 谢 娇. 三叶木通种质资源形态多样性研究 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 88-93.
- [6] 席在星. 三叶木通 RAPD 最佳反应体系的研究 [J]. 实验室研究与探讨, 2006, 25(6): 608-610.
- [7] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acid Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [8] 耿盼盼, 杨冬之, 王勇波, 等. 华细辛 AFLP 发硬体系的建立和优化 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 625-629.
- [9] 李 珊, 赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 830-836.
- [10] 连 莲, 魏志刚, 杨传平. 白桦 AFLP 体系的建立及优化 [J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 1-4.
- [11] Bassan B J, Caetano A G, Gresshoff P M, et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80-83.