

## 4 种楠木 AFLP 反应体系优化建立

周生财<sup>1</sup>, 黄华宏<sup>1</sup>, 童再康<sup>1</sup>, 吴小林<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省庆元县实验林场, 浙江 庆元 323800)

**摘要:** 采用核酸电泳缓冲液(TNE)结合十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取的高质量楠木 *Phoebe* 基因组脱氧核糖核苷酸(DNA)可满足扩增片段长度多态性(AFLP)分析的要求。利用浙江楠 *Phoebe chekiangensis* 基因组 DNA 优化建立楠木 AFLP 反应体系如下: 酶切反应 300 ng 基因组 DNA, 0.3 μL 缓冲液 4, 0.3 μL 牛血清白蛋白(100 × BSA), 50 nkat *EcoRI*, 25 nkat *MseI*, 双蒸水加至 30.0 μL 放置 37 °C 恒温箱酶切 4 h, 聚合酶链式反应(PCR)仪上 65 °C 15 min; 连接反应 20.0 μL 酶切产物, 2.5 μL T4 缓冲液, 666.8 nkat T4 连接酶, 5 pmol *EcoRI* 接头, 10 pmol *MseI* 接头, 双蒸水加至 25.0 μL, 16 °C 连接过夜 (10 ~14 h); 预扩增反应 2.0 μL 连接产物, 2.0 μL 10 × 缓冲液, 31.25 nmol 镁离子, 16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶, 4 pmol 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP), 预扩增引物(E+A, M+C)各 6 pmol, 双蒸水加至 20.0 μL; 选扩增反应稀释 40 倍的预扩产物 2.0 μL, 2.0 μL 10×缓冲液, 31.25 nmol 镁离子, 4 pmol dNTP, 16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶, 选扩增引物(M+CNN)15 pmol, 选扩增引物(E+ANN)12 pmol, 双蒸水加至 20.0 μL。利用上面体系在 64 对选扩引物中筛出 13 对适于浙江楠 AFLP 分析的最佳引物组合。图 5 表 3 参 24

**关键词:** 林木育种学; 浙江楠; 紫楠; 桢楠; 闽楠; DNA 提取; AFLP

**中图分类号:** S722.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2013)05-0789-08

## Optimization of an AFLP protocol with four *Phoebe* species

ZHOU Shengcai<sup>1</sup>, HUANG Huahong<sup>1</sup>, TONG Zaikang<sup>1</sup>, WU Xiaolin<sup>2</sup>

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Experimental Forest Farm of Qingyuan County, Qingyuan 323800, Zhejiang, China)

**Abstract:** To meet the needs of an amplified-fragment-length-polymorphism (AFLP) protocol, high quality genome DNA was extracted from *Phoebe chekiangensis*, *Phoebe sheareri*, *Phoebe zhennan*, and *Phoebe bournei* seedlings with improved cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) methods. For optimization of restriction system (30.0 μL), the genome DNA, 300 ng; was buffered with 0.3 μL; bovine serum albumin (BSA), 0.3 μL; *EcoRI*, 50 nkat; and *MseI*, 25 nkat; and incubated at 37 °C for 4 h; then the restriction enzyme was killed with 65 °C for 15 min. The best ligation system (25.0 μL) was with 20.0 μL of the digestion products; T4 buffer, 2.5 μL; T4 ligase, 666.8 nkat; *EcoRI* adapter, 5 pmol; and *MseI* adapter, 10 pmol; and left at 16 °C overnight (10–14 h). The optimal preamplification system (20.0 μL) included 2.0 μL ligation products; 10 × buffer, 2.0 μL; Mg<sup>2+</sup>, 31.25 nmol; *Taq* DNA polymerase; 16.67 nkat; dNTP, 4 pmol; pre-amplification primers (E+A), 6 pmol; and pre-amplification primers (M+C), 6 pmol. Also, the best selective amplification system (20.0 μL) was 2.0 μL, 1/40 pre-amplification products; 10 × buffer, 2.0 μL; Mg<sup>2+</sup>, 31.25 nmol; dNTP, 4 pmol; *Taq* DNA polymerase, 16.67 nkat; amplification primers (M+CNN), 15 pmol; and amplification primers (E+ANN), 12 pmol. Moreover, screening with the optimized AFLP reaction system resulted in 13 pairs of suitable amplification primers for AFLP analysis of *Phoebe*

收稿日期: 2012-10-08; 修回日期: 2013-03-12

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2012C12908-4)

作者简介: 周生财, 从事林木资源调查和选育研究。E-mail: zhoushengcai4515@126.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

*chekiangensis*. [Ch, 5 fig. 3 tab. 24 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Phoebe chekiangensis*; *Phoebe shearerii*; *Phoebe zhennan*; *Phoebe bournei*; DNA extraction; AFLP

楠木属 *Phoebe* 属樟科 Lauraceae, 约 94 种, 分布于亚洲热带及亚热带。中国楠木属植物有 34 种 3 变种, 分布于长江流域及以南地区, 以浙江、福建、江西、湖北、贵州、云南、四川、广西、广东为多, 在中国亚热带地区天然常绿阔叶林中呈零星分布, 也有少量以楠木建群种的群落存在, 现为中国三级濒危植物<sup>[1-3]</sup>。本研究的研究对象为浙江楠 *Phoebe chekiangensis*, 紫楠 *Ph. shearerii*, 桢楠 *Ph. zhennan* 和闽楠 *Ph. bournei* 等 4 种楠木属植物。目前, 对其研究主要集中在生理生态及人工引种栽培方面<sup>[4-9]</sup>。温强等<sup>[10]</sup>以闽楠叶片为材料, 研究了闽楠基因组脱氧核糖核苷酸(DNA)提取方法及随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)反应条件; 田晓俊等<sup>[11]</sup>以闽楠和润楠属 *Machilus* 的红楠 *Machilus thunbergii* 基因组 DNA 为模板, 对扩增片段长度多态性(AFLP)分析各环节的条件进行优化, 建立了适于闽楠、红楠的 AFLP 分析的反应体系; 张伟等<sup>[12]</sup>研究了桢楠 DNA 提取和 RAPD 条件的优化。AFLP 结合了限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)和 RAPD 技术的优点, 具有高效、快速、稳定、可靠等特点<sup>[13-14]</sup>, 已被广泛用于遗传多样性分析、植物种质鉴定、目的基因定位、遗传图谱构建、基因差异表达分析等研究<sup>[15-20]</sup>。AFLP 体系过程较复杂, 针对不同的物种具有一定的特殊要求, 因而实验体系的优化或建立成为 AFLP 分子标记检测研究的基础工作。本研究以 4 种楠木为材料, 探讨 AFLP 分子标记各步骤的影响因素, 对 AFLP 反应体系各关键因素进行正交设计并单因素试验优化, 建立了稳定的 AFLP 分析体系, 为研究楠木遗传多样性、亲缘关系、遗传分化及对种源区划、种质资源保存和遗传育种改良提供技术支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验材料为浙江省庆元县实验林场培育的 4 种 1 年生楠木叶片。采摘后用冰盒带回实验室, 置于-30℃冰柜备用。

1.1.2 试剂和仪器 主要试剂: *Mse*I, *Eco*RI, T4 连接酶, 购自纽英伦公司; *Taq* DNA 聚合酶, 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP), 镁离子, 购自上海生工生物工程(上海)有限公司; 100 bp DNA 梯状(ladder)和 DL2000 标记(marker), 购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物及接头由上海生工生物工程(上海)有限公司合成; 银染试剂购自北京鼎国公司; 其他试剂为实验常规药品。Tissuelyser-48 多样品组织研磨机, HITACH-CF16RX II 离心机, 数控超低温恒温槽, NanoDrop 微量分光光度计 (ND-1000), Bio-RAD S1000TM Thermal Cycler PCR, Gel DocTM 凝胶成像系统, Ts-2000A 脱色摇床, Bio-RAD 电泳仪, Sequi-GenGT 核酸测序电泳系统, GS-800 Calibrated Densitometer 扫描仪。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与质量检测 本研究基于已有的文献资料, 结合核酸缓冲液(TNE) (100 mmol·L<sup>-1</sup> 三羟甲基氨基甲烷盐酸(tris-HCL), 0.25 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钠, 20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸(EDTA), 体积分数为 2%β-巯基乙醇), 对比十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[21]</sup>、十二烷基磺酸钠(SDS)法<sup>[22]</sup>、CTAB-硅珠吸附法<sup>[23]</sup>提取楠木基因组 DNA, 并用 NanoDrop 微量分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度, 同时每个样品取 5.0 μL, 加 1.0 μL 6×上样缓冲液混合后, 于 10.0 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.2 AFLP 反应体系优化 ①基因组 DNA 的酶切与连接。采用 *Eco*RI 和 *Mse*I 双酶切, 以浙江楠基因组 DNA 为反应底物, 参考文献[18]初步确定酶切反应体系为: 300 ng 基因组 DNA, 3.0 μL 10×缓冲液 4, 0.3 μL 牛血清白蛋白(100×BSA), 50 nkat *Eco*RI, 25 nkat *Mse*I, 加双蒸水至 30.0 μL, 置 37℃恒温箱酶切 1~6 h; 聚合酶链式反应(PCR)仪上 65℃15 min 灭活限制性内切酶, 4℃保存。连接反应体系为: 20.0 μL 酶切产物, 2.0 μL 10×T4 缓冲液, 666.8 nkat T4 连接酶, 5 pmol *Eco*RI 接头, 10 pmol *Mse*I 接头(表 1), 加双蒸水至 25.0 μL, 16℃连接过夜(10~14 h)。②预扩和选扩反应的正交试验设计优化。预扩增反应采用 20.0 μL 体系, 运用正交试验设计对体系中的连接产物、dNTP、镁离子、*Taq* DNA 聚合酶、预扩增引物(E+A、M+C)(表 1)的用量进行优化, 采用 6 因素 5 水平设计试验, 因素水平设置参考

表 1 AFLP 接头及引物序列  
Table 1 Adapter and primer sequences in the AFLP experiment

AFLP 接头及引物	序列
<i>Eco</i> RI 接头（双链）	5'-CTC GTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGG TTAA-5'
<i>Mse</i> I 接头（双链）	5'-GACG ATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTC AT-5'
<i>Eco</i> RI 预扩增引物：E+A	5'-GACTGCGTACCAATT A-3'
<i>Eco</i> RI 选扩增引物：E+ANN	5'-GACTGCGTACCAATT ANN-3'
<i>Mse</i> I 预扩增引物：M+C	5'-GATGAGTCCTGAGTA C-3'
<i>Mse</i> I 选扩增引物：M+CNN	5'-GATGAGTCCTGAGTA CNN-3'

$L_{25}(5^6)$ 正交试验设计表(表 2)。预扩增 PCR 反应程序为 94 ℃预变性 5 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，25 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min，16 ℃保存。取 2.0 μL 预扩增产物加 6×上样缓冲液混合后，在 60.0 g·L<sup>-1</sup> 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳检测预扩增效果。选扩增反应采用 20.0 μL 体系，运用正交试验设计对体系中预扩产物稀释 40 倍后的模板、dNTP、镁离子、*Taq* DNA 聚合酶、选扩增引物(E+ANN、M+ CNN)(N 指代 dAMP 脱氧腺苷、dTTP 脱氧胸苷、dCMP 脱氧胞苷及 dGMP 脱氧鸟苷)引物(表 1)的用量进行优化，采用 6 因素 5 水平设计试验，因素水平设置参考  $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计表(表2)。选扩增PCR 反应程序为 94 ℃预变性 5 min；94 ℃ 30 s，65 ℃ 30 s(每循环降低-0.7 ℃)，72 ℃ 1 min，13 个循环；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，25 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min，16 ℃保存。取 2.0

表 2 预扩/选扩反应体系的正交试验设计方案  
Table 2 Orthogonally experimental design for pre-amplification / selective amplification system

编号	连接产物/预扩产物 稀释 40 倍/μL	镁离子/μL (25.0 mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTP/μL (2.5 mmol·L <sup>-1</sup> )	E+A/E+ANN/ μL(10.0 μmol·L <sup>-1</sup> )	M+C/M+CNN/ μL (10.0 μmol·L <sup>-1</sup> )	<i>Taq</i> /μL (83.35 mkat·μL <sup>-1</sup> )
1	1	1.00	1.0	0.2/0.3	0.2/0.6	0.10
2	1	1.25	1.3	0.4/0.5	0.4/1.0	0.15
3	1	1.50	1.6	0.6/0.7	0.6/1.4	0.20
4	1	1.75	1.9	0.8/0.9	0.8/1.8	0.25
5	1	2.00	2.2	1.0/1.1	1.0/2.2	0.30
6	2	1.00	1.3	0.6/0.7	0.8/1.8	0.30
7	2	1.25	1.6	0.8/0.9	1.0/2.2	0.10
8	2	1.50	1.9	1.0/1.1	0.2/0.6	0.15
9	2	1.75	2.2	0.2/0.3	0.4/1.0	0.20
10	2	2.00	1.0	0.4/0.5	0.6/1.4	0.25
11	3	1.00	1.6	1.0/1.1	0.4/1.0	0.25
12	3	1.25	1.9	0.2/0.3	0.6/1.4	0.30
13	3	1.50	2.2	0.4/0.5	0.8/1.8	0.10
14	3	1.75	1.0	0.6/0.7	1.0/2.2	0.15
15	3	2.00	1.3	0.8/0.9	0.2/0.6	0.20
16	4	1.00	1.9	0.4/0.5	1.0/2.2	0.20
17	4	1.25	2.2	0.6/0.7	0.2/0.6	0.25
18	4	1.50	1.0	0.8/0.9	0.4/1.0	0.30
19	4	1.75	1.3	1.0/1.1	0.6/1.4	0.10
20	4	2.00	1.6	0.2/0.3	0.8/1.8	0.15
21	5	1.00	2.2	0.8/0.9	0.6/1.4	0.15
22	5	1.25	1.0	1.0/1.1	0.8/1.8	0.20
23	5	1.50	1.3	0.2/0.3	1.0/2.2	0.25
24	5	1.75	1.6	0.4/0.5	0.2/0.6	0.30
25	5	2.00	1.9	0.6/0.7	0.4/1.0	0.10

$\mu\text{L}$  预扩增产物加  $6\times$  上样缓冲液混合后, 在  $60.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳检测选扩增效果。③选扩反应的单因素试验设计。在预扩体系优化基础上, 以正交设计试验优化的选扩体系进行单因素设计试验。对某一因素进行单因素设计时, 其他因素采用正交优化的水平。以最终优化的预扩和选扩反应体系对退火温度进行  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  波动范围优化试验, PCR 仪上  $62.5\sim 67.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $53.5\sim 58.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  范围间自动生成 12 个温度梯度。取  $2.0\text{ }\mu\text{L}$  预扩增产物加  $6\times$  上样缓冲液混合后, 在  $60.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳检测预扩增效果。④引物组合多态性和通用性检测。以优化的 AFLP 反应体系对 8 份浙江楠基因组 DNA 进行引物多态性及通用性的筛选分析。选扩增产物与上样缓冲液(体积分数为 98% 甲酰胺;  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸 (EDTA), pH 8.0;  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  溴酚蓝;  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  二甲苯青 FF) 等体积混合,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 6 min, 立刻置于冰上待用, 采用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染方法进行检测<sup>[24]</sup>。显带后在 GS-800 Calibrated Densitometer 扫描仪上扫描, 选择具有清晰、易读电泳条带的引物作为 AFLP 反应的最佳引物。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取与质量检测

高质量的基因组 DNA 是进行 AFLP 分析的关键因素, 普通 CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 纯度低, 电泳拖带严重; CTAB 结合硅珠法提取的 DNA 纯度好, 但得率低, 且过程繁琐、毒性高; 本实验发现, 采用 TNE 结合 CTAB 法具有高质、快速和低毒的优点, 且提取的 DNA 所测  $D(\lambda)60/D(\lambda)280$  均为  $1.8\sim 2.0$ ,  $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂糖电泳条带整齐一致, 表明杂质去除较干净, 纯度较高, 可用于 AFLP 分析(图 1)。

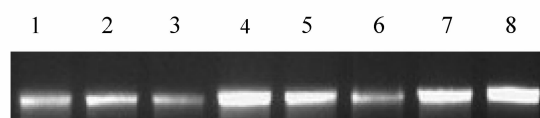
### 2.2 AFLP 反应体系优化

2.2.1 酶切与链接 基因组 DNA 酶切是否完全直接影响实验结果的分析, 酶切不完全会造成相应的指纹片段的缺失, 降低 AFLP 的分析精度<sup>[14]</sup>。实验中以  $300\text{ ng}$  DNA 为模板进行不同时间的酶切处理, 经琼脂糖凝胶电泳发现, 酶切 1 h DNA 不能酶切完全, 酶切 2 h, 3 h 后在  $2\text{ }000\text{ bp}$  到  $1\text{ }500\text{ bp}$  之间仍有弥

散片段, 酶切 4 h, 5 h, 6 h 后 DNA 均弥散在  $1\text{ }500\text{ bp}$  之下, 因而采用 4 h 酶切处理。实验也证明, 4 h 酶切产物选扩增后图谱带型较好。连接反应则按照描述的方法操作。

2.2.2 预扩和选扩反应正交试验设计优化 预扩增反应是采用 E+A 引物和 M+C 引物初步对酶切片段进行扩增, 体系中各因素用量均与最终结果相关。正交试验处理的实验产物在  $60.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  非变性聚丙烯酰胺凝胶上检测发现, 预扩增片段在  $100\sim 800\text{ bp}$  扩增信号较强, 各样品间相对一致, 说明基因组 DNA 的提取和酶切连接体系比较合适; 6 因素仅取值在两端的水平组合选择性片段扩增量或者较少(泳道 1, 9, 10, 18), 或者背景太深(泳道 8, 23)而带型模糊不清, 其他组合均有较好带型(图 2)。经对比分析认为, 预扩增反应体系各因素水平范围宽泛。据经济适用原则, 确定最佳预扩增反应体系为:  $0.6\text{ }\mu\text{L}$  M+C( $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.6\text{ }\mu\text{L}$  E+A( $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $2.0\text{ }\mu\text{L}$  连接产物,  $1.25\text{ }\mu\text{L}$  镁离子( $25.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $1.6\text{ }\mu\text{L}$  dNTP( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.2\text{ }\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶( $83.35\text{ mkat}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $2.0\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$  缓冲液, 加双蒸水至  $20.0\text{ }\mu\text{L}$ 。选扩反应是采用 E+ANN 和 M+CNN 对预扩增片段进行再次扩增。使用上述优化过的预扩体系产生的预扩产物进行选择性扩增体系优化, 正交试验处理的产物在  $60.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  非变性聚丙烯酰胺凝胶上检测发现, 选扩增片段在  $50\sim 500\text{ bp}$  扩增信号较强; 6 个因素不同水平组合对选扩反应影响较大, 仅实验组合 6, 7, 11, 16, 18, 19, 21, 22 相对带型较好(图 3)。经对比分析认为, 选扩体系重要的影响因素依次是 M+CNN, E+ANN, 预扩产物, 镁离子, dNTP, *Taq* DNA 聚合酶; 初步确定最佳选扩反应体系为  $1.2\text{ }\mu\text{L}$  M+ CNN,  $1.2\text{ }\mu\text{L}$  E+ANN,  $2.0\text{ }\mu\text{L}$  稀释 40 倍的预扩产物、 $2.0\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$  缓冲液、 $1.25\text{ }\mu\text{L}$  镁离子,  $1.6\text{ }\mu\text{L}$  dNTP,  $0.2\text{ }\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶, 加双蒸水至  $20.0\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2.3 选扩反应的单因素实验优化 由正交试验结果知: 预扩产物用量, dDTP, E+ANN 及 M+CNN 对选扩体系影响较大, 采用单因素试验设计进一步研究, E+ANN 水平调整为 0.6, 0.9, 1.2, 1.5,  $1.8\text{ }\mu\text{L}$



泳道1, 2: 浙江楠 DNA; 泳道3, 4: 闽楠 DNA; 泳道5, 6: 紫楠 DNA; 泳道7, 8: 桢楠 DNA

图 1 改良 CTAB 法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted by the improved CTAB method



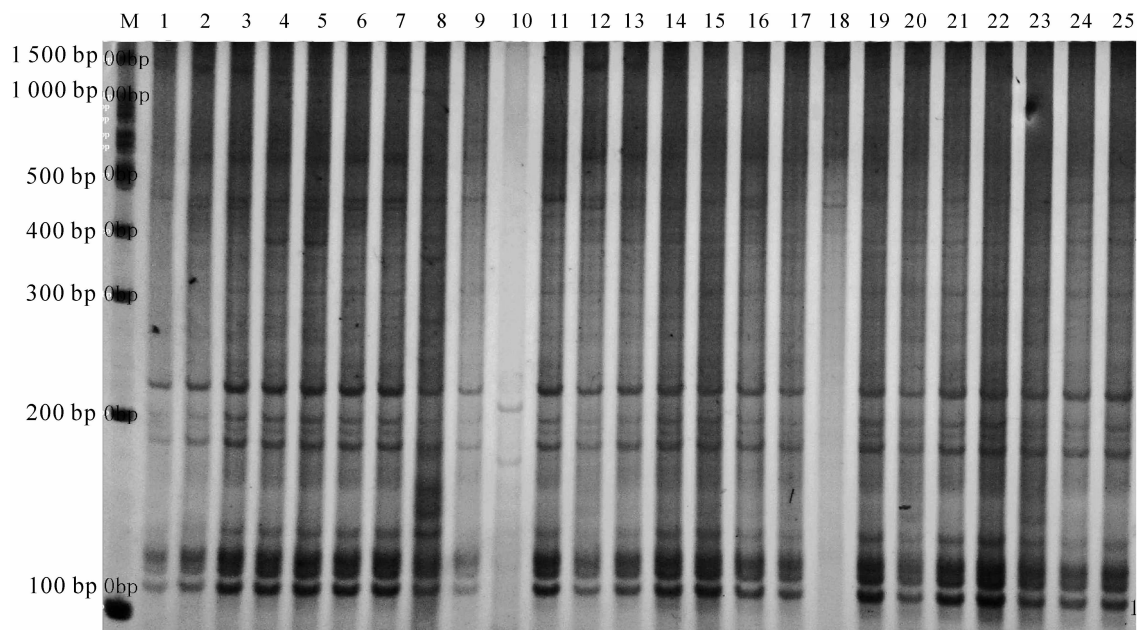


图 2 预扩增体系的正交试验电泳图谱

Figure 2 Electrophoresis pattern of orthogonal tests for pre-amplification

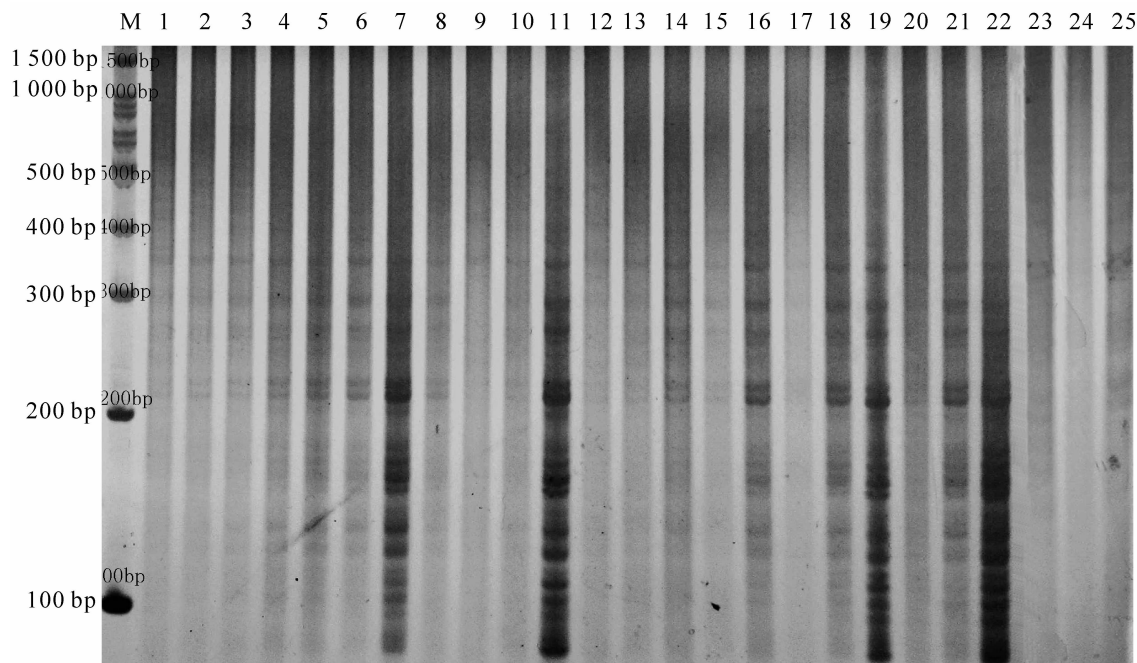
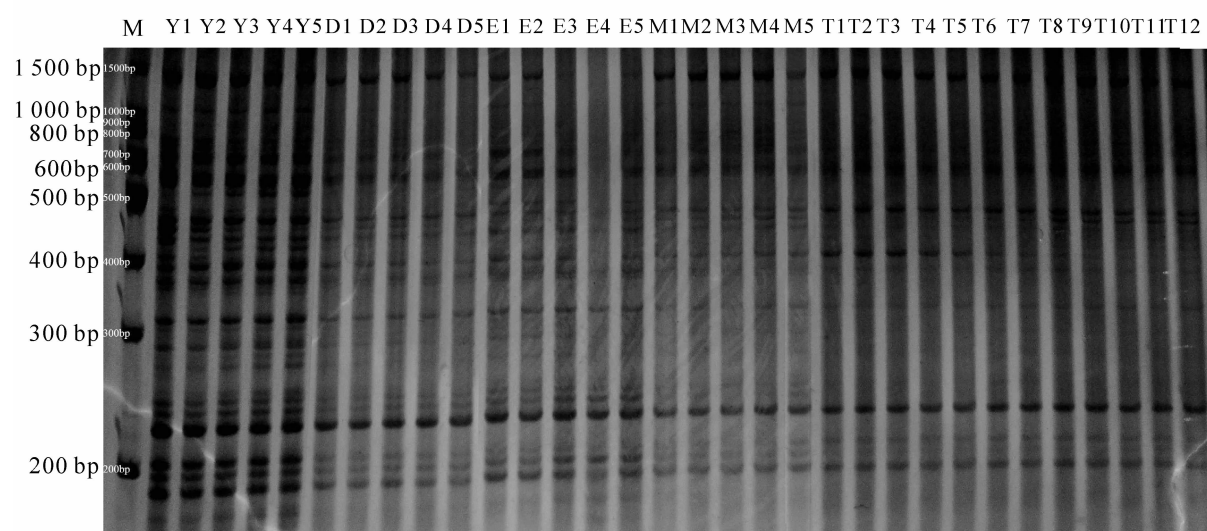


图 3 选扩体系的正交试验电泳图谱

Figure 3 Electrophoresis pattern of Orthogonal tests for selective amplification

( $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。选扩体系中单因素不同水平试验电泳图谱显示(图 4)：各因素水平控制良好，较好带型均出现在因素中值附近；预扩增产物、dNTP 和退火温度在一定水平内对反应体系影响均明显，M+ANN 的用量要稍大于 E+ANN。进一步优化的选扩增反应体系为： $1.5\text{ }\mu\text{L}$  M+CNN( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )， $1.2\text{ }\mu\text{L}$  E+ANN( $10.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )， $2.0\text{ }\mu\text{L}$  稀释 40 倍的预扩产物， $2.0\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$ 缓冲液， $1.25\text{ }\mu\text{L}$  镁离子( $25.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )， $1.6\text{ }\mu\text{L}$  dNTP( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )， $0.2\text{ }\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶( $83.35\text{ mkat}\cdot\text{L}^{-1}$ )，双蒸水加至  $20.0\text{ }\mu\text{L}$ 。退火温度采用中值  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

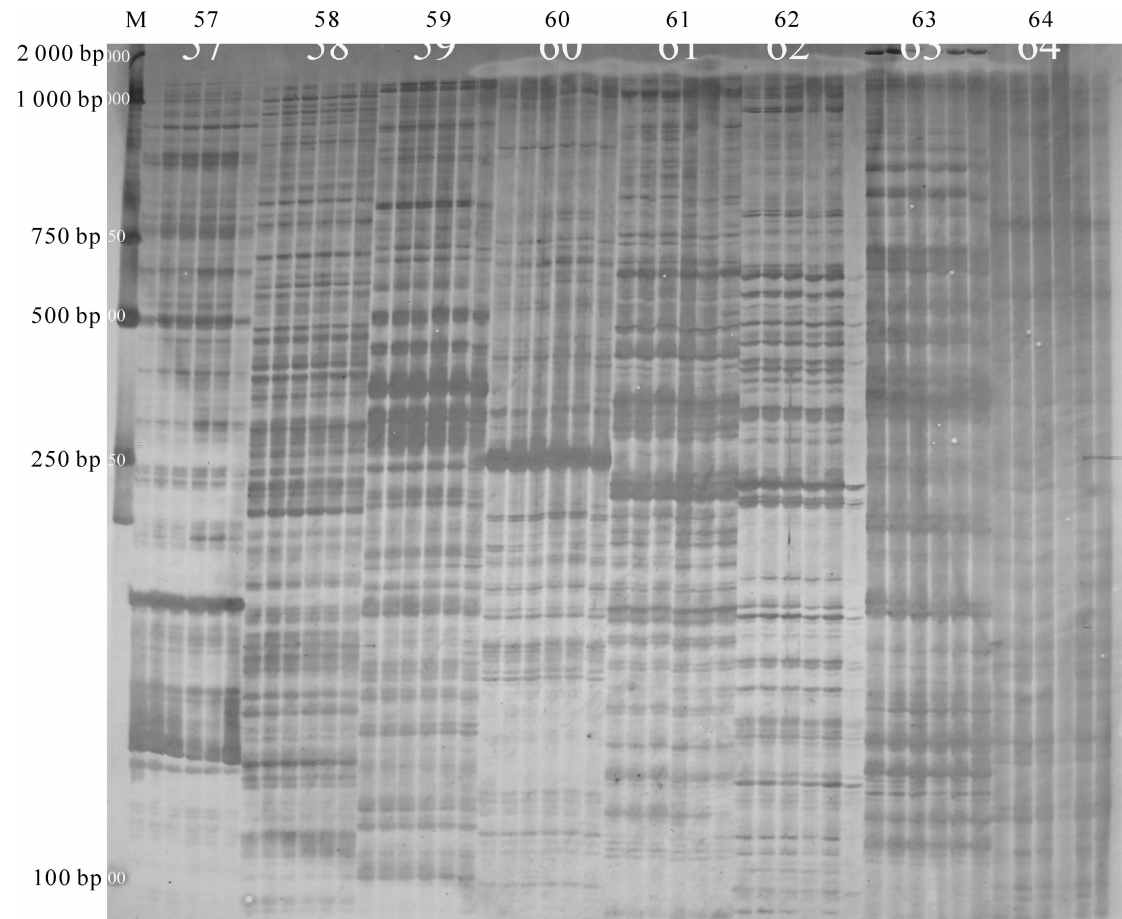
2.2.4 引物筛选 利用随机选取的 8 个浙江楠 DNA 样品对 64 对选扩引物组合进行筛选，基于聚丙烯酰胺凝胶上显示的条带数、清晰度及重复性情况，选出 32 对引物组合，经进一步试验研究，有 13 对(表 3 中“++”示意)是做浙江楠 AFLP 分析的最佳选扩引物组合(图 5)。



稀释40倍的预扩增产物梯度Y1~Y5: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0  $\mu$ L; dNTP梯度D1~D5: 1.0, 1.3, 1.6, 1.9, 2.2  $\mu$ L; E+ANN梯度E1~E5: 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8  $\mu$ L; M+ANN梯度M1~M5: 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8  $\mu$ L; 退火温度梯度T1~T12: 53.5~58.5, 62.5~67.5  $^{\circ}$ C。

图 4 选扩增体系的单因素不同水平试验电泳图谱

Figure 4 Electrophoresis pattern of different factor based on gradients test for amplification



阿拉伯数字为选扩引物组合代码(表 3)

图 5 引物组合筛选结果图

Figure 5 Selected primer pairs

3 讨论

楠木属植物含有较多生物碱、多糖、多酚及芳香类物质，对比温强等<sup>[10]</sup>研究的闽楠DNA 提取方法，

表 3 选扩引物组合筛选结果

Table 3 Selected primer pairs

引 物	E-AAC	E-AAG	E-ACA	E-ACT	E-ACC	E-ACG	E-AGC	E-AGG
M-CAA	1 <sup>-</sup>	2 <sup>++</sup>	3 <sup>-</sup>	4 <sup>-</sup>	5 <sup>+</sup>	6 <sup>+</sup>	7 <sup>++</sup>	8 <sup>-</sup>
M-CAC	9 <sup>-</sup>	10 <sup>+</sup>	11 <sup>-</sup>	12 <sup>-</sup>	13 <sup>+</sup>	14 <sup>-</sup>	15 <sup>-</sup>	16 <sup>-</sup>
M-CAG	17 <sup>+</sup>	18 <sup>-</sup>	19 <sup>+</sup>	20 <sup>+</sup>	21 <sup>-</sup>	22 <sup>-</sup>	23 <sup>-</sup>	24 <sup>-</sup>
M-CAT	25 <sup>++</sup>	26 <sup>-</sup>	27 <sup>++</sup>	28 <sup>-</sup>	29 <sup>-</sup>	30 <sup>+</sup>	31 <sup>-</sup>	32 <sup>+</sup>
M-CTA	33 <sup>-</sup>	34 <sup>-</sup>	35 <sup>-</sup>	36 <sup>+</sup>	37 <sup>++</sup>	38 <sup>++</sup>	39 <sup>-</sup>	40 <sup>+</sup>
M-CTA	41 <sup>-</sup>	42 <sup>-</sup>	43 <sup>++</sup>	44 <sup>-</sup>	45 <sup>-</sup>	46 <sup>-</sup>	47 <sup>++</sup>	48 <sup>+</sup>
M-CTG	49 <sup>+</sup>	50 <sup>++</sup>	51 <sup>+</sup>	52 <sup>-</sup>	53 <sup>-</sup>	54 <sup>++</sup>	55 <sup>-</sup>	56 <sup>+</sup>
M-CTT	57 <sup>+</sup>	58 <sup>+</sup>	59 <sup>+</sup>	60 <sup>++</sup>	61 <sup>++</sup>	62 <sup>++</sup>	63 <sup>+</sup>	64 <sup>-</sup>

说明：“+”表示筛选出的符合要求的引物组合；“-”表示被淘汰的引物组合；“++”最佳选择引物组合。

本试验用体积分数为 2%β-巯基乙醇的 TNE 2 次重复洗涤，能够很好地去 除黏稠状物质，再用预冷的异丙醇沉淀 CTAB 提取缓冲液中的 DNA，-20 ℃放置 10 min 即可得到高纯度 DNA。37 ℃条件下用核酸缓冲液（TE）（10 mmol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl，1 mmol·L<sup>-1</sup>EDTA，体积分数为 2%核糖核酸酶）充分溶解 DNA，1.2 万 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min，上清液中 DNA 质量最佳。

对比2009 年田晓俊等<sup>[11]</sup>建立的闽楠、红楠 AFLP 反应体系，本试验采用正交结合单因素不同水平实验设计，可兼顾到各因素间的交互作用，且有多处进行了优化：*Mse*I 在缓冲液 4 中的活性高于缓冲液 2，可少用 8.335 nkat 的 *Mse*I；有必要取 6.0 μL 酶切产物琼脂糖检测酶切效果，选用 30.0 μL 酶切体系较合适；此外，本实验连接产物不必稀释，预扩增反应体系少用了 8.75 pmol 镁离子；选扩增反应中多用 3.00 pmol M+CNN；PCR 反应复性时间少一半，为 30 s。

Vos 等<sup>[14]</sup>研究发现，AFLP 主要扩增两端同时是 *Mse* I 和 *Eco*R I 酶切黏性末端的片段，实验中要用 2 倍于 *Eco*R I 接头的 *Mse* I 接头做连接反应。这是因为 *Eco*RI 的酶切位点是 6 个碱基，*Mse*I 的是 4 个碱基，依据 4 种碱基随机排列组合概率，*Mse*I 的酶切位点要明显多于 *Eco*RI，则 *Mse*I 用量少于 *Eco*RI 理论上是可行的。本试验表明这样的接头浓度要求是正确的，且 M+ANN 的用量仅稍稍多于 E+ANN 的试验结论符合 AFLP 反应原理。试验表明预扩反应各因素的水平比选扩宽泛，也与 AFLP 反应原理相符。通过正交试验分析发现，预、选扩反应体系中不同实验因素的影响力是一致的，依次为 M+C/M+CNN，E+A/E+ANN，模板，镁离子，dNTP，*Taq* DNA 聚合酶。

鉴于种间差异，适用于闽楠、紫楠及桢楠 AFLP 分析的最佳选扩引物组合有可能与浙江楠的有所不同，但只需依照本优化体系筛选即可。

参考文献：

[1] 李锡文. 中国樟科植物的地理分布[J]. 植物分类学报, 1979, 17(3): 24 – 40.  
LI Xiwen. The geographical distribution of Chinese Lauraceae plants [J]. *Acta Phytotax Sin*, 1979, 17(3): 24 – 40.

[2] 李锡文. 中国植物志：第 31 卷[M]. 北京：科学出版社，1982：7 – 68.

[3] 国家环保局，中国科学院植物研究所. 中国植物红皮书：稀有濒危植物：第 1 册[M]. 北京：科学出版社，1992：1 – 735.

[4] 徐世松. 浙江楠种群生态及引种栽培研究[D]. 南京：南京林业大学，2004.  
XU Shisong. *Studies on Population Ecology and Introduction Cultivation of Phoebe chekiangensis* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004.

[5] 史晓华，史忠礼. 浙江楠种子休眠生理初探[J]. 浙江林学院学报，1990，7(4)：377 – 382.  
SHI Xiaohua, SHI Zhongli. Studies on seed dormancy physiological of *Phoebe chekiangensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1990, 7(4): 377 – 382.

[6] 李冬林，丁彦芬，向其柏. 浙江楠引种育苗技术[J]. 林业科技开发，2003，17(3)：43 – 45.  
LI Donglin, DING Yanfen, XIANG Qibai. Introduction and raising seedling of *Phoebe chekiangensis* Shang [J]. *China For Sci Technol*, 2003, 17(3): 43 – 45.

[7] 吴小林，张玮，周志春，等. 浙江省 3 种楠木主要天然种群的群落结构和物种多样性[J]. 浙江林业科技，2011，31(2)：25 – 31.  
WU Xiaolin, ZHANG Wei, ZHOU Zhichun, *et al.* Community structure and species diversities of natural popula-



- tions of *Phoebe bournei*, *Ph. chekiangensis* and *Machilus pauhoi* in Zhejiang Province [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2011, **31**(2): 25 – 31.
- [8] 邹惠渝, 吴大荣. 闽楠种群生态学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 8 – 20.
- [9] WU Darong, WANG Bosun. Seed and seeding ecology of the endangered *Phoebe bournei* (Lauraceae) [J]. *Acta Ecol Sin*, 2001, **21**(11): 1751 – 1759.
- [10] 温强, 叶金山, 陈际伸, 等. 闽楠基因组 DNA 提取及 RAPD 条件优化[J]. 江西林业科技, 2005(2): 5 – 7.  
WEN Qiang, YE Jinshan, CHEN Jishen, *et al.* Genomic DNA extraction and optimizing conditions for RAPD analysis in *Phoebe bournei* [J]. *J Jiangxi For Sci Technol*, 2005(2): 5 – 7.
- [11] 田晓俊, 温强, 汪信东, 等. 闽楠、红楠 AFLP 反应体系建立[J]. 林业科技开发, 2009, **23**(3): 38 – 42.  
TIAN Xiaojun, WEN Qiang, WANG Xindong, *et al.* Establishment and optimization of AFLP reaction for *Phoebe bournei* and *Machilus thunbergii* [J]. *China For Sci and Technol*, 2009, **23**(3): 38 – 42.
- [12] 张炜, 龙汉利, 贾廷彬, 等. 桢楠 DNA 提取和 RAPD 条件的优化[J]. 四川林业科技, 2011, **32**(4): 55 – 57, 62.  
ZHANG Wei, LONG Hanli, JIA Tingbin, *et al.* DNA Extraction and optimization of RAPD reaction system for *Phoebe zhennan* [J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 2011, **32**(4): 55 – 57, 62.
- [13] SMITH J J, SCATTERING J S, LEDBETTER J R. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campers* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1994, **31**: 35 – 145.
- [14] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acids Res*, 1995, **23**(21): 4407 – 4414.
- [15] 张俊红, 黄华宏, 童再康, 等. 光皮桦 6 个南方天然群体的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2010, **18**(3): 233 – 240.  
ZHANG Junhong, HUANG Huahong, TONG Zaikang, *et al.* Genetic diversity in six natural populations of *Betula luminifera* from southern China [J]. *Biodiversity Sci*, 2010, **18**(3): 233 – 240.
- [16] 姜岳忠, 董玉峰, 马玲, 等. 山东省主栽杨树品种的 AFLP 分析与鉴定[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2010, **41**(1): 17 – 22.  
JIANG Yuezhong, DONG Yufeng, MA Ling, *et al.* AFLP analysis and identification of main *Populus varieties* in Shandong Province [J]. *J Shandong Agric Univ Nat Sci Ed*, 2010, **41**(1): 17 – 22.
- [17] 张瑞萍, 吴俊, 李秀根, 等. 梨 AFLP 标记遗传图谱构建及果实相关性状的 QTL 定位[J]. 园艺学报, 2011, **38**(10): 1991 – 1998.  
ZHANG Ruiping, WU Jun, LI Xiugen, *et al.* Construction of AFLP genetic linkage map and analysis of QTLs related to fruit traits in pear [J]. *Acta Horti Sin*, 2011, **38**(10): 1991 – 1998.
- [18] 尤卫艳, 黄华宏, 童再康, 等. 光皮桦 AFLP 分子标记体系的建立[J]. 生物技术, 2008, **18**(6): 42 – 45.  
YOU Weiyan, HUANG Huahong, TONG Zaikang, *et al.* Establishment of AFLP molecular labeling technique system for *Betula luminifera* [J]. *Biol Technol*, 2008, **18**(6): 42 – 45.
- [19] BECKET J. Combined mapping of AFLP markers in barley [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, **249**: 65 – 73.
- [20] 李东, 吴先军, 陈新. 热胁迫下丹参转录组 cDNA-AFLP 分析[J]. 中草药, 2011, **42**(10): 2083 – 2091.  
LI Dong, WU Xianjun, CHEN Xin. cDNA-AFLP analysis on transcriptome of *Salvia miltiorrhiza* under heat stress [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2011, **42**(10): 2083 – 2091.
- [21] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, **19**: 11 – 15.
- [22] 郝会海, 李燕玲, 杜志军, 等. 利用简化的 SDS 法提取杨树基因组 DNA[J]. 河北林果研究, 2006, **21**(4): 363 – 366.  
HAO Huihai, LI Yanling, DU Zhijun, *et al.* A quick method of extracting poplar genomic DNA [J]. *Hebei J For Orch Res*, 2006, **21**(4): 363 – 366.
- [23] 张博, 张露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 的提取方法[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, **28**(1): 13 – 15.  
ZHANG Bo, ZHANG Lu, ZHUGE Qiang, *et al.* A rapid and simple method of total DNA extraction from tree [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2004, **28**(1): 13 – 15.
- [24] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLE S G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, **196**: 80 – 83.