

陆敏佳,莫秀芳,王勤,等. 藜麦基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):42-45.

藜麦基因组 DNA 提取方法的比较

陆敏佳,莫秀芳,王勤,陆国权,蒋玉蓉

(浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江杭州 311300)

摘要:为了快速获取高质量的藜麦基因组 DNA,采用改良的 CTAB 法、SDS 法和高盐低 pH 值法等 3 种方法分别提取藜麦不同组织(叶、茎、根部)的基因组 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法测定比较所提 DNA 的质量和产量,同时进行了 PCR-SSR、SSCP 等分子检测。用不同方法提取藜麦不同组织部位 DNA 的结果表明:不同提取方法的凝胶检测条带均比较清晰,且无明显降解;改良的 CTAB 法所提取的 DNA 产率最高,SDS 法其次,而高盐低 pH 值法最低;不同方法提取的叶片 DNA 产率均明显高于根部和茎部;改良的 CTAB 法和高盐低 pH 值法所提取的 DNA 质量较好,多酚类化合物和多糖等杂质去除得比较完全。PCR-SSR 和 SSCP 检测结果表明:不同方法和不同组织所提取的 DNA 均能跑出良好的条带,适合进行后续分子生物学研究。

关键词:藜麦;DNA 提取方法;分子检测;SSR;SSCP

中图分类号: S512.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0042-04

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd),又称南美藜、藜谷、奎奴亚藜等,是一年生的藜科草本作物,原产于南美洲安第斯山脉海拔 2 800~4 200 m 的地区,分布于 12°N~39°S 的范围,在安第斯山脉已有 5 000 多年的种植历史,被印加人称为“谷物之母”^[1]。藜麦蛋白质含量高,具有近乎完美的氨基酸组成,含有较高的钙磷铁,是联合国 FAO 唯一认定的完美营养食品,被誉为“未来的超级谷物”“营养黄金”“有机谷类之王”等^[2-3]。研究表明,长期食用藜麦,对心脏病、高血压、高

血糖、高血脂等有很好辅助治疗作用,此外还有增强免疫力、修复体力、补充营养、减肥等功效^[4-5]。联合国大会宣布 2013 为“国际藜麦年”,旨在让世界更多地关注藜麦的生物多样性和营养价值在提供粮食和营养安全等方面所发挥的作用。藜麦的营养和开发利用价值在最近几十年才得到人们的广泛认识和重视。目前,藜麦的研究主要集中在生物学特性^[6-7]、化学成分^[8-9]、抗逆性等生理学特性^[10-11]方面。与国外相比,我国对藜麦的研究还较少,尤其在藜麦分子生物学方面的研究几近空白。获取高质量的 DNA 样品是植物分子生物学研究的基础,而研究者对不同植物以及相同植物不同部位的 DNA 提取、处理方法又有所区别^[12-16],目前尚无关于藜麦基因组 DNA 提取方法的报道。本研究用改良的 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 值法 3 种不同方法分别提取藜麦的幼叶、茎、根部基因组 DNA,同时进行 SSR 和 SSCP 等分子标记检测,旨在筛选出一种快速、简便且可获得高质量 DNA 分子的提取方法,为进一步开展藜麦分子生物学研究提供参考。

收稿日期:2013-08-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301372);浙江省重大科技专项计划(编号:2011C12030);浙江农林大学创新训练计划(编号:201301004)。

作者简介:陆敏佳(1992—),女,浙江嘉兴人,研究方向为种子科学。
E-mail:1035660826@qq.com。

通信作者:蒋玉蓉,博士,主要从事植物分子育种和种质创新研究。
E-mail:yurongjiang746@126.com。

[2]杨超.大豆植株再生和遗传转化技术体系的研究[D].南京:南京农业大学,2009.

[3]Cheng T Y, Saka H, Voqui - Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters,1980,19:91-99.

[4]肖文言,王连铮.大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生[J].作物学报,1994,20(6):665-669,769.

[5]王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):255-259.

[6]Yoshida T. Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds[J]. Breeding Science,2002,52:1-8.

[7]邱承祥,武天龙.6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究[J].大豆科学,2003,22(1):32-35.

[8]Wang P, Wang G, Jing J I, et al. A novel system for proliferation, maintenance and plantlet germination from somatic embryo of soybean[J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(2):154-158.

[9]林树柱,曹越平,卫志明,等.6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研

究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2005,23(2):138-142.

[10]李海燕,武小霞,刘森,等.大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J].大豆科学,2007,26(5):709-712.

[11]孙文丽,刘昱辉,吴元华,等.大豆胚尖再生体系的建立及转基因初步研究[J].湖北农业科学,2008,47(6):615-618.

[12]张东旭,张洁,商蕾,等.大豆胚尖再生体系的研究[J].河北农业大学学报,2008,31(4):7-13.

[13]武小霞,李静,姜成涛,等.大豆子叶节再生中植物生长调节剂浓度及基因型筛选[J].中国油料作物学报,2011,33(2):123-129.

[14]谢从华,柳俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:236.

[15]朱学艺,梁晓芳,李红芳.激素对大豆悬浮细胞系愈伤组织诱导的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2008,47(4):562-566.

[16]李大玮, Schmid J, Keller E R. 植物生长调节剂的使用和大豆愈伤组织的诱导及保持[J].遗传,1989,11(2):1-4,49.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为藜麦品种 PI596293,由浙江农林大学农学院提供。叶片的采集:取种植于田间的藜麦幼嫩叶片。茎、根部的采集:取 PI596293 种子置于发芽纸上,在 25 °C 气候箱中培养 12 d,分别取茎、根部用于 DNA 提取。

1.2 主要试剂

试验试剂:EDTA、Tris、CTAB、PVP 40、SDS、 β -巯基乙醇等均购自 Sigma 公司;无水乙醇、氯仿、异丙醇、氯化钠、醋酸钠、醋酸钾等为国产分析纯;TaqDNA 聚合酶、dNTP、DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;引物由华大基因公司合成。

1.3 DNA 提取方法

分别取约 0.15 g 藜麦幼嫩的叶、茎、根于 2 mL 离心管中(设 3 次重复),用长柄镊子夹住离心管管盖放入液氮中速冻 5 s,取出并用插有玻璃棒的电钻快速充分研磨。

1.3.1 CTAB 法 加入 600 μ L 预热的 CTAB 提取液[含 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、0.02 mol/L EDTA(pH 值 8.0)、2% CTAB、2% PVP40、1 mol/L NaCl、0.2% β -巯基乙醇],置于 65 °C 水浴 50~60 min,期间颠倒混匀数次;冷却至室温后加入等体积的氯仿-异戊醇-无水乙醇(76:4:20),颠倒混匀后于 10 000 r/min 离心 10 min;吸上清液,加 2 倍体积的冰乙醇颠倒混匀,再将絮状 DNA 挑出并用 70% 乙醇洗涤 2 次;风干后加入 80 μ L ddH₂O 溶解,4 °C 冰箱保存。

1.3.2 SDS 法 加入 800 μ L 预热的提取缓冲液[含 0.5 mol/L NaCl、0.1 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、0.05 mol/L EDTA(pH 值 8.0)、0.01 mol/L β -巯基乙醇],再加入 80 μ L 20% SDS(使终浓度为 2%),振荡混匀后置于 65 °C 水浴中 30 min,不停颠倒混匀;取出静置至室温,加入 0.3 mL 5 mol/L 的醋酸钾混匀,冰浴 20 min 后在 10 000 r/min 条件下离心 10 min;加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),颠倒混匀后于 12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 0.7 倍体积的预冷冰异丙醇,轻轻颠倒混匀后于 -20 °C 放置 20 min;12 000 r/min、常温离心 10 min,收集沉淀,用 70% 乙醇洗 2 次;风干 DNA 并溶于 60 μ L ddH₂O 中,于 4 °C 保存备用。

1.3.3 高盐低 pH 值法 加入预热的 1 mL 提取缓冲液(含 0.1 mol/L NaAc、0.05 mol/L EDTA、0.5 mol/L NaCl、2.5% PVP、3% SDS、1% β -巯基乙醇),于 65 °C 水浴 30 min;取出静置至室温后于 10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 2/3 体积的 25 mol/L KAC(pH 值 4.8),冰上放置 30 min 后于 10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),反复颠倒混匀后于 10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 0.6 倍体积的 -20 °C 异丙醇,轻轻混匀后置于 -20 °C 沉淀 20 min;8 000 r/min 离心 10 min,所得沉淀用 70% 乙醇洗 2 次;DNA 风干后溶于 60 μ L ddH₂O 中,置于 4 °C 冰箱备用。

1.4 DNA 纯度、浓度及得率检测

用 NanoDrop/ND1000 核酸蛋白质分析仪分别测定 DNA 样品浓度、 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值(≈ 1.8 表示为纯 DNA; > 1.9 表示有 RNA 污染; < 1.6 表明样品中存在蛋白质或酚污染)。同

时计算产率,即 DNA 得率,公式为:DNA 得率($\mu\text{g/g}$) = DNA 量(μg)/取材量(g)。各取 3 μ L DNA 溶液,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下观察并拍照。

1.5 基因组 DNA 的 PCR 检测

参考 Jarvis 等的研究结果^[17],设计了 SSR 引物 KCAA003、KAAT009。引物 KCAA003 的上游序列(5'→3')为 ACCTTTCGGCTGCTCAGATA,下游序列(5'→3')为 TGCTGATGTTGTTGCAGATG;引物 KAAT009 的上游序列(5'→3')为 AGTTGCCAACATGCAGAGC,下游序列(5'→3')为 CGACGACGCAAGACATTAGA。PCR 反应体系:1.5 μ L 10 \times PCR buffer、1 μ L 模板 DNA、0.3 μ L SSR 引物、0.25 μ L dNTPs(10 mmol/L)、0.15 μ L Taq 酶、11.5 μ L ddH₂O。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用凝胶成像系统拍照。

1.6 SSR 分子检测

取 1 μ L PCR 扩增产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,恒功率 80 W,检测时间 30 min。电泳结束后,将胶浸入固定液(10% 乙醇、0.05% 冰醋酸)中,在摇床上固定 10 min,用蒸馏水冲洗 2 遍;然后用 0.2% AgNO₃ 染色 20 min,再用蒸馏水漂洗 1~2 次(不得超过 30 s);最后用显色液(含 30 g/L NaOH、13.6 mL/L 甲醛)显色至条带清晰,再用蒸馏水洗脱 3 次停显。

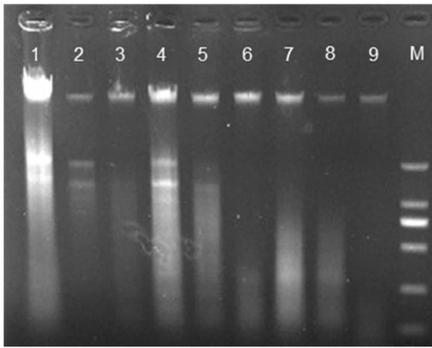
1.7 SSCP 分子检测

将 PCR 扩增产物与变性上样液(含 98% 去离子甲酰胺、pH 值为 8.0 的 10 mmol/L EDTA、0.025% 二甲苯氰、0.025% 溴酚蓝)按 1:5 的比例加入 0.5 mL 微量离心管中,混匀。将样品在 98 °C 变性 10 min 后立即取出,置于冰浴中骤冷 10 min。取约 5 μ L 变性样品上样,用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶于 4 °C 恒温电泳(恒功率 80 W,12 h)检测。然后进行固定、银染和显影,方法步骤同上。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量的凝胶电泳检测

用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量是一种常用的检测手段^[18]。由图 1 可以看出:用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测不同方法提取的藜麦基因组 DNA 的结果表明,不同组织中提取的 DNA 都能扩增出明显的条带,但叶片中的 DNA 浓度明显高于茎和根。3 种方法所提取的 DNA 样品的浓度、纯度及得率见表 1。综合分析试验可知:改良的 CTAB 法提取的 DNA 得率最高,叶片、茎、根中的 DNA 得率分别为 824.5、209.3、254.1 $\mu\text{g/g}$;改良的 SDS 法提取的 DNA 得率次之,分别为 496.0、207.2、231.4 $\mu\text{g/g}$;而高盐低 pH 值法提取的 DNA 得率最低,分别为 322.6、112.0、156.2 $\mu\text{g/g}$ 。3 种方法提取的叶片 DNA 得率均为茎、根部的 2 倍以上,凝胶检测结果与分光光度计的检测结果一致。由表 1 还可以看出:CTAB 法提取的 DNA $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 介于 1.7~1.8 之间,说明蛋白、酚类、多糖等杂质和 RNA 都去除得较干净;SDS 法提取的 DNA $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值表明,该法提取的基因组 DNA 质量较好,基本无 RNA 和蛋白混染;而高盐低 pH 值法的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值表明,该法提取的叶片 DNA 可能有 RNA 污染或有降解。

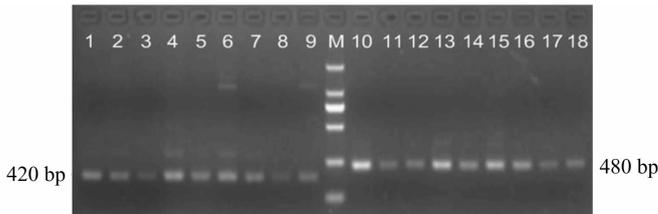


1~3—CTAB法提取的叶、茎、根DNA样品；4~6—SDS法提取的叶、茎、根DNA样品；7~9—高盐低pH值法提取的叶、茎、根DNA样品；M—DL 2000 DNA marker

图1 3种方法从藜麦叶、茎、根中提取的基因组DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

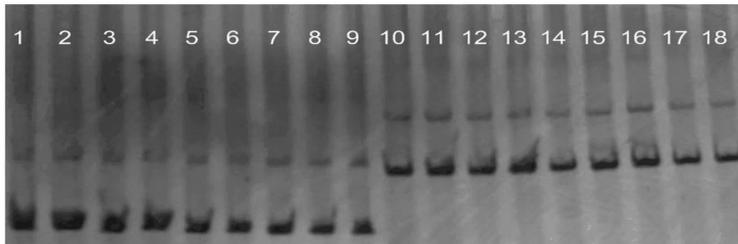
2.2 分子检测

2.2.1 PCR-SSR检测 将各DNA浓度调成约300 ng/ μ L, 分别用2个SSR引物进行PCR扩增,结果(图2)表明,用不



1~3, 10~12—CTAB法提取的叶、茎、根DNA样品；4~6, 13~15—SDS法提取的叶、茎、根DNA样品；7~9, 16~18—高盐低pH值法提取的叶、茎、根DNA样品；1~9—KCAA003引物的PCR检测；10~18—KAAT009引物的PCR检测；M—DL2000 DNA Marker

图2 3种方法从藜麦叶、茎、根中提取的基因组DNA的PCR产物检测的琼脂糖凝胶电泳图谱

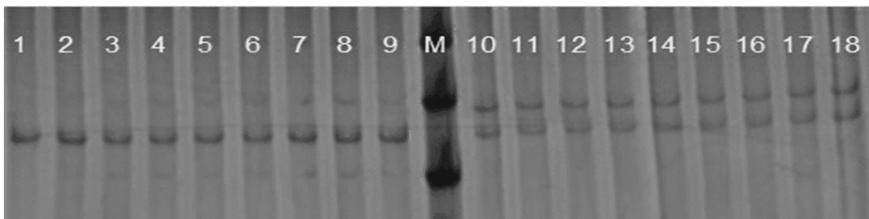


1~3, 10~12—CTAB法提取的叶、茎、根DNA样品；4~6, 13~15—SDS法提取的叶、茎、根DNA样品；7~9, 16~18—高盐低pH值法提取的叶、茎、根DNA样品；1~9—KCAA003引物的SSR检测；10~18—KAAT009引物的SSR检测

图3 3种方法从藜麦叶、茎、根中提取的基因组DNA的SSR检测结果

2.2.2 SSCP分析 SSCP(single strand conformation polymorphism,单链构象多态性)是以构象为基础的检测基因组中单核苷酸变异(SNP)的一种方法,具有快速、简便、灵敏等特点,可

将双链水平无法检测的DNA微小差异在单链水平上检测出来^[19]。由图4可见,通过显影,不同方法提取的不同组织DNA的PCR产物在变性后均能在12%凝胶中跑出清晰条带。



1~3, 10~12—CTAB法提取的叶、茎、根DNA样品；4~6, 13~15—SDS法提取的叶、茎、根DNA样品；7~9, 16~18—高盐低pH值法提取的叶、茎、根DNA样品；1~9—KCAA003引物的SSCP检测；10~18—KAAT009引物的SSCP检测；M—DL 2000 DNA Marker

图4 3种方法从藜麦叶、茎、根中提取的基因组DNA的SSCP检测

表1 不同方法提取藜麦不同部位的DNA浓度与纯度

方法	材料	DNA 浓度 (μ g/mL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 得率 (μ g/g)
CTAB 法	叶	1 546.0	1.79	824.5
	茎	392.5	1.71	209.3
	根	476.5	1.73	254.1
SDS 法	叶	1 240.0	2.04	496.0
	茎	518.0	1.88	207.2
	根	578.5	1.65	231.4
高盐低 pH 值法	叶	806.5	1.98	322.6
	茎	280.0	1.72	112.0
	根	390.5	1.92	156.2

同方法从藜麦不同组织提取的DNA中均能扩增出清晰条带,可以很好地用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。由图3的SSR结果可以看出:条带清晰,无杂带和非特异性带,说明所选的2个引物有很好的特异性,提取的DNA质量满足SSR分子标记要求,可用于分子标记技术为基础的分子辅助育种。

3 结论与讨论

植物基因组 DNA 的提取方法目前有 CTAB、SDS、高盐低 pH 值法、尿素法、柠檬酸钠法等^[20]。建立简单快速且能获得高质量 DNA 的提取方法,对利用 SSR 和 SSCP 等分子标记研究和揭示藜麦种质资源遗传多样性和遗传特征显得尤为重要。藜麦含有多糖、多酚及其他次生代谢产物^[21-23],这些次生物质在 DNA 提取过程中会与核酸形成复合物,影响 DNA 的质量和产量。本试验结果表明,改良的 CTAB、SDS 和高盐低 pH 值法提取的藜麦不同组织部位的 DNA 均能满足 PCR-SSR 和 SSCP 等后继的分子生物学分析。但不同方法提取叶片 DNA 的产率显著高于根和茎部,因此宜采用叶片进行藜麦基因组 DNA 的提取。

本研究表明,改良的 CTAB 法提取的基因组 DNA 产率最高,且较有效地去除了蛋白质和多糖物质,能够获得较纯的 DNA,这与在其他植物中 DNA 提取方法比较的研究结果一致^[20,24-26]。本试验在改良的 CTAB 和高盐低 pH 值提取液中加了 PVP-40、PVP(聚乙烯吡咯烷酮),它们是酚的络合物,能与多酚形成一种不溶的络合物,因而能够有效去除多酚,减少 DNA 中酚的污染;同时它们可以与多糖结合,因此通过离心可以有效去除多糖,从而提高 DNA 的纯度^[27],然而后者提取的 DNA 产率相比较低。

本研究所用的 3 种方法都用电钻粉碎取代了手工研磨,节约了劳动力和成本。相比而言,改良的 CTAB 法叶片的 DNA 得率高,而提取时间比其他 2 种方法少 20~30min 左右,可大量节省科研工作时间,对将来开展藜麦图谱构建、QTL 分析等有很好的辅助作用。本研究提取的对象是藜麦幼嫩组织,下一步将对其老叶的 DNA 提取方法作改进研究。

参考文献:

[1]朱剑宏. 南美藜的化学组成和营养价值[J]. 成都大学学报:自然科学版,2002,21(2):24-28.

[2]Oshodi A A, Ogungbenle H N, Oladimeji M O. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999, 50(5):325-331.

[3]Comai S, Bertazzo A, Bailoni L, et al. The content of proteic and non-proteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours [J]. Food Chemistry, 2007, 100(4):1350-1355.

[4]Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa*—An Indian perspective [J]. Industrial Crops and Products, 2006, 23(1):73-87.

[5]Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(15):2541-2547.

[6]贡布扎西, 旺姆, 张崇玺, 等. 南美藜在西藏的生物学特性表现 [J]. 西南农业学报, 1994, 7(3):54-62.

[7]Menegueti QA, Brenzan MA, Batista MR, et al. Biological effects of hydrolyzed quinoa extract from seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. [J]. Journal of Medicinal Food, 2011, 14(6):653-657.

[8]Abugoch James L E. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composi-

tion, chemistry, nutritional, and functional properties [M]//Advances in Food and Nutritional Research, 2009, 58:1-31.

[9]Ogungbenle HN. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2003, 54(2):153-158.

[10]Ruiz-Carrasco K, Antognoni F, Coulibaly A K, et al. Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(11):1333-1341.

[11]Hariadi Y, Marandon K, Tian Y, et al. Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(1):185-193.

[12]王传堂, 黄粤, 杨新道, 等. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果 [J]. 花生学报, 2002, 31(3):20-23.

[13]周浩, 闫彩霞, 郭凌超, 等. CATB 法少量快速提取花生基因组 DNA [J]. 山东农业科学, 2012, 44(7):8-9, 15.

[14]张长远, 孙妮, 胡开林. 苦瓜品种亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(4):515-519.

[15]刘桂丰. 遗传学实验原理与技术 [M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2004:26-27.

[16]姚丹, 闫伟, 关淑艳, 等. 高盐低 pH 值法提取大豆不同组织 DNA 的效果 [J]. 河南农业科学, 2009(12):50-54.

[17]Jarvis D E, Kopp O R, Jellen E N, et al. Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Journal of Genetics, 2008, 87(1):39-51.

[18]任良真, 张春宝, 赵洪银, 等. 一种改良的快速高质大豆基因组 DNA 提取方法 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(9):38-41.

[19]杜军凯, 余桂红, 王秀娥, 等. 赤霉病主效抗性 QTL 区域 SSCP 标记的发掘与验证 [J]. 麦类作物学报, 2010, 30(5):829-834.

[20]伍艳芳, 徐海宁, 肖复明, 等. 陈山红心杉基因组 DNA 提取方法的比较与分析 [J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(3):517-521, 527.

[21]Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt E K, et al. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and backing [J]. Food Chemistry, 2010, 119(2):770-778.

[22]Hirose Y, Fujita T, Ishii T, et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4):1300-1306.

[23]Cordeiro L M C, Fátima Reinhardt V, Baggio C H, et al. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: structure and gastroprotective activity [J]. Food Chemistry, 2012, 130(4):937-944.

[24]陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取 [J]. 遗传, 2004, 26(4):529-531.

[25]管长娟, 梁维维, 陈全家, 等. 高质提取棉花总 DNA 的方法及引物多态性应用 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1):29-31.

[26]徐建堂, 祁建民, 陈涛, 等. 适合于胞质基因组扩增的红麻成熟叶片 DNA 提取改良方法 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2):347-351.

[27]田丽波, 谷幸幸, 商桑, 等. 苦瓜基因组 DNA 的提取及 ISSR 扩增体系的优化 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(4):88-93.