

张智强,周天华,徐 皓. 延胡索不同部位 DNA 提取方法的优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):33-36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.009

延胡索不同部位 DNA 提取方法的优化

张智强,周天华,徐 皓

(陕西理工学院生物科学与工程学院,陕西汉中 723000)

摘要:采用 CTAB 法、改良 CTAB 法、SDS 法、改良 SDS 法 4 种方法,对延胡索叶片及块茎进行了 DNA 提取。用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳方法检测 DNA 的质量、纯度和得率,并对 4 种提取方法进行了比较。结果表明:改良的 CTAB 法 D 值平均为 1.88,得率较高,适合延胡索叶片的 DNA 提取;SDS 法 D 值平均为 1.78,DNA 纯度好,降解少,适合延胡索块茎的 DNA 提取。

关键词:CTAB 法;SDS 法;DNA 提取;延胡索;叶片;块茎

中图分类号:Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0033-03

延胡索别称元胡,为罂粟科紫堇属植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)的干燥块茎,性味辛温,味苦,归肝、脾经,能行血中气滞,具有理气止痛、活血化瘀的功效^[1-2]。临床常用于胸肋、皖腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻、跌打肿痛等症^[3]。延胡索主要分布于浙江、江苏、安徽、陕西等地,以浙江东阳、磐安、缙云和永康等地和江苏南通地区栽培面积最大,近年来陕西汉中地区的栽培面积也在不断扩大。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基磺酸钠(SDS)是提取植物基因组 DNA 常用的试剂。CTAB 和 SDS 都可以破坏植物细胞膜,以便于细胞内容物的释放,此外 CTAB 可以与核酸结合成复合物,有利于将 DNA 与变性的蛋白及多糖分开,SDS 可以与蛋白质、多糖等形成复合物,经离心与 DNA 分开^[4]。关于 CTAB 法与 SDS 法提取植物基因组 DNA,学者们已在不同领域做了相关研究及方法的改进。王冠明等对 CTAB 法做了相应的改进,结果表明改进的 CTAB 法更适合麦冬基因组 DNA 提取^[5];黄东亮等分别用浓度为 0.75%~6.00% 的 SDS 对甘蔗基因组 DNA 进行提取,结果表明 1.5% SDS 更适合甘蔗基因组 DNA 的提取^[6]。CTAB 法和 SDS 法在提取植物基因组 DNA 方面应用领域广泛,已经用于栎属植物、樟科植物、禾本科植物水稻、苔藓植物等的 DNA 提取。

目前关于延胡索基因组 DNA 提取方法研究并不多,本试验以延胡索为材料,以如何获得高质量、高纯度、高得率 DNA 为目的,对提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析和紫外吸收进行纯度、得率和质量完整度分析,比较 CTAB 法、改良的 CTAB 法、SDS 法、改良的 SDS 法对延胡索不同部位基因组 DNA 的提取效果,选出最适合获得延胡索基因组 DNA 的提取方法,为延胡索生物学研究和遗传多样性分析提供依据。

收稿日期:2015-05-10

基金项目:陕西省教育厅重点实验室科研计划(编号:13JS020);陕西理工学院校级科研项目(编号:slgky13-40);陕西理工学院校级研究生创新基金(编号:SLGYCX1518)。

作者简介:张智强(1989—),男,陕西韩城人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:634690944@qq.com。

通信作者:徐 皓,硕士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为植物资源开发与利用。E-mail:xhxbdx@126.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)由陕西省城固县提供。使用前将延胡索的叶片用自来水清洗 3 次、超纯水清洗 3 次,然后自然风干备用。块茎作相同处理后浸泡于 70% 乙醇中约 2 h,用超纯水清洗 2 次,自然风干备用。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:生物组织研磨机(Restch MM400)、核酸测定仪(Eppendor Biophotomeper plus)、离心机(Centrifuge 5415R)、电泳仪(北京六一-6C)、恒温水浴锅(XMTD-822)、优普超纯水机(UPH-II-40)、BIO-RAD 凝胶成像系统(Gel DOCTM XR+)、制冰机(GRANT)等。

主要试剂:CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、SDS(十二烷基磺酸钠)、PVP-40T(聚乙烯吡咯烷酮)、维生素 C、Tris、HCl、EDTA、KAc、NaAc、NaCl、 β -巯基乙醇、BE(溴化乙锭)、DNA Marker(D2000)。CTAB 提取缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、50 mmol/L EDTA、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L β -巯基乙醇;SDS 提取缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、50 mmol/L EDTA、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L β -巯基乙醇、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇等。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取方法 (1)CTAB 法:本研究参照 Doyle 等方法^[7]进行试验。

(2)改良的 CTAB 法:①取 0.2 g 左右新鲜叶片放入 1.5 mL 的离心管中,并在离心管中放入 1 粒钛合金小珠,放置于 0℃1 h 以上,取出后立即置于生物材料研磨机中研磨 3 min;②加入 1 mL 预处理液[0.2 mol/L Tris-HCl、0.05 mol/L EDTA(pH 值 8.0)、0.25 mol/L NaCl、0.7% PVP(W/V)、1% β -巯基乙醇(V/V)]混匀,静置 10 min,8 000 r/min 离心 2~3 min,去上清;③重复步骤②;④加入 800 μ L 65℃已预热的 2×CTAB 提取缓冲溶液[2% CTAB(W/V)、1.4 mol/L NaCl、0.02 mol/L EDTA(pH 值 8.0)、0.1 mol/L Tris-HCl、0.3% β -巯基乙醇(V/V)]充分混匀,在 65℃水浴中保温 30 min;⑤向离心管中加入 600 μ L 三氯

甲烷-异戊醇(24:1),抽提 10 min;⑥于 20 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液转入新的“U”形离心管中;⑦加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),抽提 10 min,重复此步骤 1 次;⑧取上清液转入 1.5 mL 剪头离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,放于-20 ℃的冰箱 30 min,在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min;⑨用 70% 乙醇漂洗沉淀 2 次,倒置离心管自然风干;⑩加入 200 μL 0.1×TE(pH 值 8.0)溶解 DNA,放入 4℃冰箱备用。

(3) SDS 法:参照王关林等的方法^[8]进行试验。
(4)改良的 SDS 法:①称取 0.2 g 左右的新鲜叶片放入 2 mL 的“U”形离心管中,放置 0 ℃冰箱 1~2 h 后取出迅速研磨;②加入 1 mL 提取缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、50 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L β-巯基乙醇]混匀,静置 10 min,8 000 r/min 离心 2~3 min,去上清;③重复步骤②,再加入 900 μL 提取缓冲液;④向离心管中加入 100 μL 的 10% SDS 提取液[2% SDS (W/V)、100 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、50 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)、500 mmol/L NaCl、10 mmol/L β-巯基乙醇],充分混匀,于 65 ℃水浴中保温 30 min(间隔摇晃 2~3 次);⑤取出离心管凉至室温,加入 160 μL (5 mol/L)乙酸钾,充分混匀,冰浴中放置 30 min;⑥加入 700 μL 的三氯甲烷-异戊醇(24:1)抽提 5 min 放置片刻,于 4 ℃下 8 000 r/min 离心,取上清转入新离心管中;⑦重复步骤⑥ 1 次;⑧向离心管中加入 2 倍体积的无水乙醇,放于-20 ℃的冰箱 30 min,在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min;70% 乙醇漂洗沉淀 2 次,倒置离心管自然风干;⑩加入 200 μL 0.1×TE(pH 值 8.0)溶解 DNA,

放入 4 ℃冰箱备用。
1.3.2 DNA 的检测方法 分别采用紫外分光光度法、琼脂糖凝胶电泳法检测所得 DNA 的质量和得率。
(1)紫外分光光度计检测:提取的 DNA 用核酸测定仪(Eppendor Biophotomeper plus)分光光度计进行定量检测。取 50 μL 0.1×TE 作为空白对照,依次加入 DNA 样品置于比色皿中,记录相应 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值,计算 DNA 得率。
(2)电泳检测:用琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA(电泳缓冲液用 1×TBE 溶液),用美国 BIO-RAD 公司生产的 Gel DOCTM XR+凝胶成像系统检测和照相,保存。

2 结果与分析

纯的双链 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 应大于 1.8,纯 RNA 应达 2.0^[9],如果样品中有蛋白质或酚类污染 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 将明显低于 1.8^[10]。0.1×TE 溶解后经紫外分光光度计检测,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均为 1.8~1.9,产率达 100 ng/μL,基本上没有蛋白质等杂质污染^[11]。植物组织中所含的多糖和蛋白质等对总 DNA 样品的影响也很大,提取样品中含有较多多糖, DNA 沉淀溶解在 0.1×TE 后形成黏稠溶液,电泳时形成明显拖带^[12]。

2.1 4 种方法对延胡索不同部位 DNA 提取结果分析
对同一产地的延胡索叶片及块茎进行了 10 个批次的试验,并且在每个批次中,对延胡索的同一部位做了 5 个平行试验。
用紫外分光光度计分别检测了 CTAB 法、改良的 CTAB 法、SDS 法、改良的 SDS 法对延胡索叶片及块茎基因组 DNA 的提取结果(表 1)。

表 1 4 种方法对延胡索不同部位 DNA 提取结果

部位	批次	CTAB 法			改良 CTAB 法			SDS 法			改良 SDS 法		
		$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{230\text{ nm}}$	得率 (μg/g)	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{230\text{ nm}}$	得率 (μg/g)	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{230\text{ nm}}$	得率 (μg/g)	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{230\text{ nm}}$	得率 (μg/g)
叶片	1	1.61	0.79	81.33	1.96	1.36	85.12	1.53	—	195.51	1.64	—	94.14
	2	1.52	0.56	70.77	1.99	1.44	86.95	1.43	—	403.52	1.36	0.62	158.25
	3	1.49	0.84	62.23	1.71	1.10	88.66	1.57	—	273.80	1.56	0.77	174.18
	4	1.43	0.97	72.37	1.78	1.10	94.62	1.40	0.65	176.33	1.50	0.67	125.00
	5	1.56	1.11	74.41	1.81	0.70	64.54	1.29	—	460.00	1.55	0.49	85.54
	6	1.53	1.13	49.42	1.93	0.95	89.55	1.27	—	395.31	1.43	0.41	92.73
	7	1.34	0.95	75.34	1.91	1.53	93.30	1.50	—	357.16	1.62	0.44	89.61
	8	1.72	1.56	91.66	1.79	1.25	75.48	1.44	1.20	325.06	1.54	—	90.58
	9	1.72	1.34	132.80	2.03	1.05	93.71	1.64	1.62	236.31	1.70	0.58	99.40
	10	1.54	1.17	88.93	1.87	1.24	102.28	1.52	1.40	359.34	1.45	0.73	128.40
	平均	1.55	1.04	79.93	1.88	1.17	87.42	1.46	1.22	318.23	1.54	0.59	113.78
块茎	1	1.99	1.58	117.20	2.01	1.62	152.39	1.90	1.30	409.40	1.81	1.20	167.28
	2	1.83	1.39	138.49	1.88	1.52	115.49	1.71	0.91	169.15	1.86	1.00	289.17
	3	2.03	1.69	57.83	2.08	1.51	108.99	1.75	1.07	253.03	1.75	1.13	376.17
	4	1.92	1.65	239.57	2.13	1.90	96.73	1.97	1.28	242.14	1.80	1.09	286.35
	5	1.88	1.76	298.10	2.13	1.64	91.37	1.68	1.17	373.94	1.70	—	311.52
	6	2.00	1.89	383.72	1.87	1.46	85.46	1.75	1.13	415.90	2.17	1.68	134.53
	7	1.80	1.52	338.08	2.01	1.72	118.02	1.62	1.54	243.54	2.01	1.78	118.02
	8	1.83	1.40	78.10	1.88	1.36	153.67	1.63	1.21	224.89	1.97	1.53	111.13
	9	1.91	1.52	104.05	1.97	1.57	96.66	1.90	1.06	280.73	2.00	1.65	153.67
	10	1.90	1.61	86.21	2.03	1.63	70.68	1.85	1.66	409.29	2.03	1.77	96.66
	平均	1.91	1.60	184.14	2.00	1.59	108.95	1.78	1.23	302.20	1.91	1.43	204.45

由表 1 可知,对延胡索叶片采用 CTAB 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.34 ~ 1.72 之间,平均值为 1.55,平均得率为 79.93 $\mu\text{g/g}$;采用改良的 CTAB 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.71 ~ 2.03 之间,平均值为 1.88,平均得率为 87.42 $\mu\text{g/g}$;采用 SDS 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.27 ~ 1.64 之间,平均值为 1.46,平均得率为 318.23 $\mu\text{g/g}$;采用改良的 SDS 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.36 ~ 1.70 之间,平均值为 1.54,平均得率为 113.78 $\mu\text{g/g}$ 。对延胡索块茎采用 CTAB 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.80 ~ 2.03 之间,平均值为 1.91,平均得率为 184.14 $\mu\text{g/g}$;采用改良的 CTAB 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.87 ~ 2.13 之间,平均值为 2.00,平均得率为 108.95 $\mu\text{g/g}$;采用 SDS 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.62 ~ 1.97 之间,平均值为 1.78,平均得率为 302.20 $\mu\text{g/g}$;采用改良的 SDS 法进行提取, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.70 ~ 2.17 之间,平均值为 1.91,平均得率为 204.45 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 4 种方法提取延胡索不同部位 DNA 的凝胶电泳结果

CTAB 法、改良 CTAB 法、SDS 法、改良 SDS 法提取延胡索叶片、块茎 DNA 的凝胶电泳结果见图 1 至图 8。可知改良 CTAB 法适合延胡索叶片 DNA 提取,SDS 法适合延胡索块茎 DNA 提取。

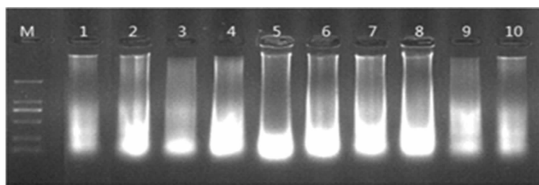


图1 CTAB 法提取延胡索叶片 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

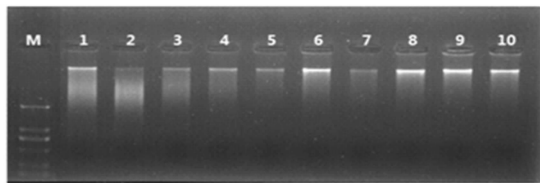


图2 改良 CTAB 法提取延胡索叶片 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

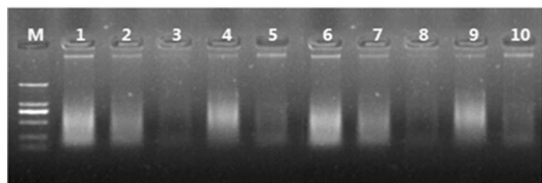


图3 SDS 法提取延胡索叶片 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

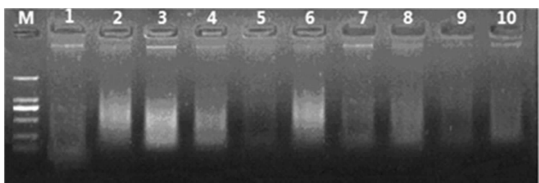


图4 改良 SDS 法提取延胡索叶片 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

3 讨论

影响植物基因组提取的因素有多种,如材料状况、细胞提

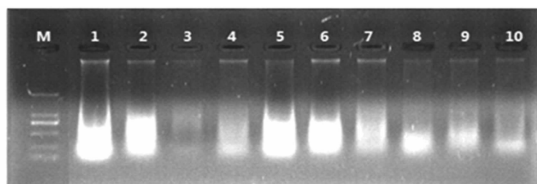


图5 CTAB 法提取延胡索块茎 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

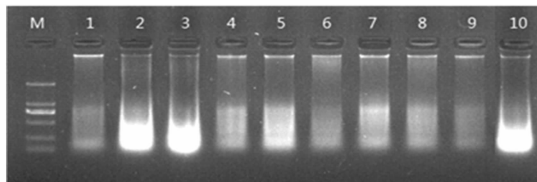


图6 改良 CTAB 法提取延胡索块茎 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

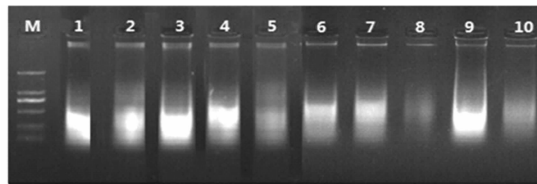


图7 SDS 法提取延胡索块茎 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

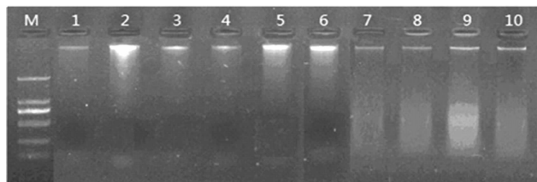


图8 改良 SDS 法提取延胡索块茎 DNA 的琼脂糖凝胶成像结果

取液用量、三氯甲烷/异戊醇的比例及用量和选用的方法都可影响植物基因组 DNA 的提取^[13]。本试验过程使用的三氯甲烷/异戊醇体积比及用量均相同,采用的延胡索材料来自相同的产地,材料状况及处理方式一致。

从 4 种方法对延胡索叶片 DNA 的提取效果看,CTAB 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.34 ~ 1.72 之间,平均值为 1.55, D 值不集中,得率较低,凝胶电泳结果显示拖尾现象严重。改良的 CTAB 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.71 ~ 2.03,平均值为 1.88, D 值集中,得率较高,凝胶电泳结果显示拖尾现象最少,表明改良的 CTAB 法提取的 DNA 较纯,完整度好。SDS 法虽然使 DNA 的得率提高,但 D 值不集中,不能有效除去酶类和多糖类杂质, DNA 降解严重^[14],所提取的 DNA 纯度差。凝胶电泳结果表明,改良的 SDS 法提取的 DNA 杂质多,降解较严重。所以,改良的 CTAB 法更适合延胡索叶片 DNA 的提取。

从 4 种方法对延胡索块茎 DNA 的提取效果看,CTAB 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.80 ~ 2.03 之间,平均值为 1.91,改良的 CTAB 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.87 ~ 2.13 之间,平均值为 2.00, D 值集中,表明两者提取的 DNA 含 RNA 较多,且这 2 种方法的电泳结果表明 DNA 降解较严重。SDS 法测得数据在 1.62 ~ 1.97 之间, D 值较集中,平均值为 1.78,表明 SDS 法纯度较好,电泳结果表明 DNA 降解最少。改良的 SDS 测得 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.70 ~ 2.17 之间,数据不集中,平均值为 1.91,且 DNA 有较多降解。所以 SDS 法更适于延胡索块茎 DNA 的

袁卫明,宋虎卫,杨益花,等. 枇杷 SRAP 标记体系优化及对枇杷矮化杂交种的鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):36-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.010

枇杷 SRAP 标记体系优化及对枇杷矮化杂交种的鉴定

袁卫明¹, 宋虎卫², 杨益花¹, 王化坤¹, 张云峰²

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 2150082;

2. 淮阴师范学院生命科学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300)

摘要:通过单因素分析试验对枇杷 SRAP 扩增程序中退火温度和扩增体系中 4 个主要因子 DNA、dNTPs、*Taq* 酶及 Primers 含量进行优化,在此基础上对枇杷矮化杂交种 861 品系的真实性及其与 8 个白沙枇杷品种间亲缘远近关系进行了 SRAP 标记鉴定与分析。结果发现:(1)优化后的枇杷 SRAP 体系(15 μ L)为:1.5 μ L 10 \times PCR buffer(Mg^{2+} plus), 9.9 μ L ddH₂O, 36 ng DNA, 1.2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 0.48 μ L 10 μ mol/L 上下游 Primer, 0.24 μ L 2.5 U/ μ L *Taq* 酶; SRAP 后 35 个循环中退火温度优化为 50 $^{\circ}$ C (引物 $T_m > 48$ $^{\circ}$ C 时)或 45 $^{\circ}$ C (引物 $T_m < 48$ $^{\circ}$ C 时)复性 1 min。(2)6 对 SRAP 引物在矮化杂种 861 品系中均扩增出父本特异带,表明其为真实杂种。(3)杂种 861 品系与 8 个白沙枇杷品种可被划分为 3 大类群(由近及远):5 个江苏枇杷资源品种群(包含杂种 861 及其父本)、浙江栽培品种宁海白和实生冠玉类群(3 个品种)。以上结果表明,优化后的 SRAP 体系能良好适用于枇杷杂种鉴定和亲缘关系分类等枇杷分子辅助育种工作。

关键词:枇杷;SRAP 标记;体系优化;矮化杂种;鉴定

中图分类号: S667.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0036-05

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 系蔷薇科苹果亚科 (Mloideae) 枇杷属 (*Eriobotrya*) 常绿乔木果树,果实营养丰富,并具有止咳、抗癌等药用价值,栽培经济价值高。我国是枇杷的起源地,种质资源丰富,原产于我国的枇杷属植物有 21 个大种类^[1-2],我国培育的枇杷栽培品种已超过 100 种^[3]。然而,目前我国枇杷栽培品种仍以大或中冠乔化稀植树体为主,缺少矮化密植品种,易导致管理不便,产量、品质和效益降低,

以及难以适应设施栽培等现实问题。我们经过多年的实践探索,从半矮化枇杷双亲品种甜种与白玉杂交的 F₁ 代植株在性状分离后,通过形态学鉴定获得了矮化性状突出、稳定的枇杷杂交株系 861。进一步利用分子标记技术对枇杷矮化杂交种真实性进行分子水平鉴定及评价,是加快枇杷矮化育种进程的必需工作。目前,RAPD、SSR 等分子标记技术已在桃^[4]、梨^[5]、杨梅^[6]、香橙^[7]、李^[8]、石榴^[9]等果树品种遗传多样性与亲缘关系评价、杂交后代鉴定等育种工作方面进行了应用。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是 2001 年由美国加州大学蔬菜系 Li 和 Quirós 发明的一种基于 PCR 反应的分子标记技术,具有简便、快速高效、共显性、产率高、重复性好、多态性丰富、成本低及无需预知物种序列信息等众多优点^[10-12]。SRAP 标记克

收稿日期:2014-11-21

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003073);江苏省科技支撑计划(编号:BE2010322);江苏省自然科学基金(编号:BK2011316)。

作者简介:袁卫明(1964—),男,江苏苏州人,研究员,主要从事枇杷栽培育种与技术推广工作。E-mail: ywm357@163.com。

提取。

参考文献:

- [1] 李小芳,罗庆洪,任文. 延胡索炮制前后生物碱含量测定及镇痛作用的对比研究[J]. 湖南中医药导报,2001,7(5):253-255.
- [2] 张玲,李海,李秀娟,等. HPLC 法测定元胡及配伍药对中元胡索乙素的含量[J]. 兰州大学学报:医学版,2007,2(2):48-51.
- [3] 徐建中,孙乙铭,俞旭平,等. 鲜元胡一体化加工炮制技术研究[J]. 中国中药杂志,2011,18(18):2484-2488.
- [4] 赵妹华,王富德,张世革,等. 提取纯化植物 DNA 的方法比较[J]. 国外农学:杂粮作物,1998,18(2):35-38.
- [5] 王冠明,韩烈保,马秀杰,等. 麦冬基因组 DNA 提取方法研究[J]. 生物技术通报,2010(6):100-106.
- [6] 黄东亮,覃肖良,廖青,等. 高质量甘蔗基因组 DNA 的简便快速提取方法研究[J]. 生物技术通报,2010(5):101-106.

- [7] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2002:742-743.
- [9] 王镜岩,朱圣庚,徐长发. 生物化学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002:507-508.
- [10] 朱玉贤,李毅,郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2007:172-173.
- [11] 吴娟,吴金平. 水稻基因组 DNA 微量提取[J]. 生物学杂志, 2007,24(4):55-57.
- [12] 郝朝运,刘鹏,郭卫东,等. 忍冬科部分植物 DNA 提取方法的研究[J]. 浙江师范大学学报:自然科学版,2006,29(1):92-98.
- [13] Sanbrook J. 分子克隆实验指南[M]. 北京:化工出版社,2005.
- [14] 应站明,应正河,潘伟华. 桉树科植物 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(8):3922-3924.