

李婧,曾媛,龚胜,等. 大花三色堇 FPNI-PCR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):72-75.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.019

大花三色堇 FPNI-PCR 反应体系的优化

李婧,曾媛,龚胜,李霆格,杨文汉,王健

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院,海南海口 570228)

摘要:融合引物与巢式聚合酶链式反应(fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR)是一种分离并扩增已知序列旁未知序列的有效方法。以大花三色堇(*Viola × wittrockiana* Gams.)为材料,为提高 FPNI-PCR 产物特异性,增加条带清晰度,降低非特异性条带的干扰,对 FPNI-PCR 反应体系中第 1 轮的模板 DNA 浓度进行对比,优化了第 3 轮反应中引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、缓冲液用量,筛选了第 3 轮特异性引物的退火温度,进一步完善了 FPNI-PCR 反应体系。各因素优化对比试验表明:FPNI-PCR 第 1 轮反应体系应以稀释后的 DNA 为模板,20 μ L 体系中,用量在 4.5 ~ 10 ng。第 3 轮最优反应体系为:20 μ L 反应体系中,特异性引物浓度 0.2 μ mol/L,引物 SP2 浓度 0.75 μ mol/L,*Taq* DNA 酶用量 1.0 U,dNTP 用量 2 μ L,10 \times buffer(20 mmol/L, Mg^{2+} plus)用量 2 μ L,模板 1 μ L(第 2 轮反应稀释 100 倍后取 1 μ L 为模板),ddH₂O 补足。第 3 轮反应中,退火温度为 64 $^{\circ}$ C 或 66 $^{\circ}$ C 时条带最为清晰。

关键词:大花三色堇;FPNI-PCR;体系优化

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0072-04

融合引物与巢式聚合酶链式反应(fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR)是一种基于热不对称交错 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)技术原理的 PCR 方法^[1],主要是利用目标序列旁的已知序列设计 3 个嵌套特异性引物,与给出的 9 个特殊设计的随机简并引物(arbitrary degenerate prime, AD)相结合,进行 1 次巢式反应,并在简并引物的基础上设计 2 个嵌套的特殊引物替换第 1 轮 PCR 所用随机引物用于第 2、3 轮的扩增。FPNI-PCR 中融合引物(fusion primer),即特殊设计的随机简并引物,由 3'端的随机寡核苷酸(arbitrary degenerate oligonucleotides)和 5'端可设计特异引物的一段序列组成,该序列用以替换初次 PCR 所用简并引物。经过热不对称循环后的产物含有特异引物结合位点,能有效降低产物稀释后非特异性扩增的影响^[2]。FPNI-PCR 具有高效灵敏、产物特异性高、重复性好、能够在较短的时间内获得目标片段等优点,是扩增基因侧翼序列特别是启动子的有效方法^[3]。

FPNI-PCR 与 TAIL-PCR 技术类似,其反应产物的稳定性、可重复性明显受到反应体系模板、引物、*Taq* DNA 聚合酶、Buffer 以及 3 轮退火温度等因素的影响^[4]。在进行 FPNI-PCR 反应获取未知序列时,有必要根据上述因素,对不同因素进行优化组合,以获得最优的反应结果。

大花三色堇(*Viola × wittrockiana* Gams.)是重要的冬春季花卉,有着十分丰富的花色和花斑类型,是研究植物花斑形成的理想植物^[5]。笔者所在实验室先前的研究表明,二氢黄酮

醇还原酶(dihydroflavonol reductase, DFR)和花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)基因是三色堇花斑由无色转向着色的关键性基因^[6]。关于 DFR 和 ANS 的相关研究发现,其启动子中含有的众多调控元件,与花色素调控密切相关^[7-9]。因而这 2 个基因的启动子结构特点,可能是花斑位置形成的一个关键性因素,其启动子的克隆,对于进一步研究三色堇色斑的形成具有十分重要的意义。FPNI-PCR 技术是克隆启动子序列的有效方法,而目前关于三色堇 FPNI-PCR 技术研究尚无相关报道,本研究以三色堇为材料,对其 FPNI-PCR 反应体系进行优化,为三色堇 *VwDFR* 和 *VwANS* 基因启动子的克隆提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大花三色堇品种“宾哥”,花色为黄底黑斑,栽培于海南大学园艺园林学院基地。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的提取 提取三色堇幼叶 DNA,步骤参考尚啸等的改良 CTAB 法^[10],仅核酸分离时改用加 1/10 体积的 5 mol/L NaAc。提取的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,电泳结果通过凝胶成像仪(Dolophin-Doc,美国)拍照,利用紫外分光光度计测浓度。小管分装 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 试验中用到的引物 包括 FPNI-PCR 反应体系中的第 1 轮、第 2 轮、第 3 轮的简并引物、特殊引物(表 1)^[11]以及根据 *VwANS* 基因设计的特异引物(表 2)。

1.2.3 FPNI-PCR 体系的优化 (1)模板 DNA 浓度筛选。将提取的 DNA 稀释 100、200 倍,然后将未稀释的 DNA 和稀释不同倍数的 DNA 作为第 1 轮 PCR 反应的模板,反应采用表 1 中的 FP5、FP6、FP7、FP9 这 4 条简并引物,反应程序见表 3,反应体系为 20 μ L,具体组分见参考文献[1]。

收稿日期:2015-09-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060265、31260488);海南大学中西部计划学科建设项目(编号:ZXBJH-XK008)。

作者简介:李婧(1990—),女,山东青岛人,硕士研究生,研究方向为园林植物分子育种。E-mail:1434835679@qq.com。

通信作者:王健,教授,主要从事植物遗传与种质资源研究工作。Tel:(0898)66276096;E-mail:wjhnau@163.com。

表 1 VwANS 基因启动子 FPNI - PCR 扩增的随机简并引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
FP1	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNTCGASTWTSGWGTT	1st PCR primer
FP2	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNGTCGASWGANAWGAA	1st PCR primer
FP3	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTWTGNAGWANCANAGA	1st PCR primer
FP4	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTAGWGNAGWANCAWAGG	1st PCR primer
FP5	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNGTAWAASGTNTSCAA	1st PCR primer
FP6	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNGACGASWGANAWGAC	1st PCR primer
FP7	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNGACGASWGANAWGAA	1st PCR primer
FP8	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTGTNCGASWCANAWGTT	1st PCR primer
FP9	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTNCAGCTWSCTNTSCTT	1st PCR primer
SP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	2nd PCR primer
SP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	3rd PCR primer

表 2 VwANS 基因启动子 FPNI - PCR 扩增巢式引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
GSP1	GCTTGCTTCCATAGCCTTGAAT	1st PCR primer
GSP2	GCGTGAATCTCTTTCTCCTCG	2nd PCR primer
GSP3	CAAAGATGTCCCAATGCTCGT	3rd PCR primer

(2) FPNI - PCR 反应退火温度的梯度筛选。根据设计的特异性引物 GSP3 的 T_M 值,对第 3 轮退火温度进行梯度筛选,筛选温度分别是 62、64、66 ℃。

(3) 引物、10 × buffer (20 mmol/L, Mg^{2+} plus)、*Taq* DNA 酶用量的对比。PCR 反应采用 20 μL 反应体系,分别对影响第 3 轮反应体系中的主要参数:引物、10 × buffer (Mg^{2+} plus)、*Taq* DNA 酶,设置不同的浓度梯度,具体参数值见表 3。此外,每 20 μL 反应体系中均含有 dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、特异性引物 0.2 μmol/L,模板为第 2 轮反应产物稀释 100 倍取 1 μL,加 ddH₂O 补足至 20 μL。逐一优化每个参数值,优化时,其他参数值均采用表 3 所列反应参数的第一水平值,引物采用参考文献 [1] 中的 FP5、FP6、FP7、FP9 这 4 条简并引物(表 1),反应程序见表 4。

表 3 FPNI - PCR 反应体系各因素与水平

FPNI - PCR 反应参数	梯度			
	1	2	3	4
<i>Taq</i> 酶 (U)	0.5	1.0	1.5	
10 × <i>Taq</i> buffer (Mg^{2+} plus) (μL)	1.50	1.75	2.00	
特异引物 (μmol/L)	0.25	0.50	0.75	1.00

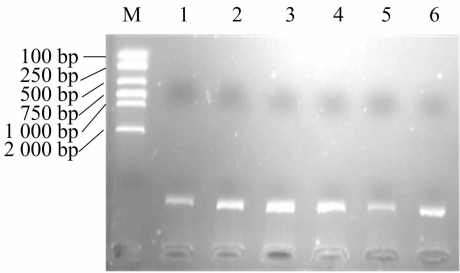
表 4 FPNI - PCR 反应程序

PCR 反应	循环数	温度状况
第 1 轮 PCR	1	95 ℃ 90s
	2	94 ℃ 10 s; 62 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
	1	94 ℃ 10 s; 25 ℃ 2 min; *, 72 ℃ 2 min
		94 ℃ 10 s; 62 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
		94 ℃ 10 s; 62 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
		94 ℃ 10 s; 44 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
第 2 轮 PCR	1	72 ℃ 5 min
	1	95 ℃ 90 s
	30	94 ℃ 10 s; 62 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
第 3 轮 PCR	1	72 ℃ 5 min
	1	95 ℃ 90 s
	12	94 ℃ 10 s; 62 ℃ 30 s; 72 ℃ 2 min
	1	72 ℃ 5 min

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取结果

以三色堇嫩叶为材料提取 DNA,经紫外分光光度计检测,浓度为 $(0.901 \pm 0.019) \mu\text{g/L}$, $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 介于 1.8 ~ 2.0 之间,说明样品 DNA 中杂质较少。0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示,点样孔无滞留,条带清晰明亮,无明显拖尾现象,说明 RNA 等杂质去除较干净。结果表明,采用改良 CTAB 法可以有效地提取三色堇幼叶的 DNA^[10],对于后续 PCR 反应有利。



M—DNA marker; 泳道 1~6—大花三色堇幼叶提取 DNA 样本

图 1 DNA 提取结果

2.2 DNA 的浓度对 FPNI - PCR 的影响

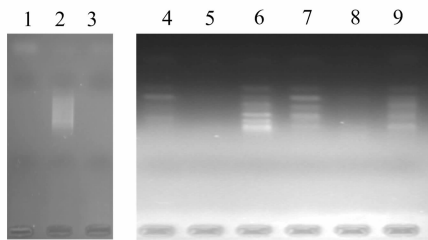
模板 DNA 的用量对 FPNI - PCR 反应有着非常直观的影响,过多或者过少都会造成产物的不稳定或者无法产生条带。普通方法提取的 DNA 通常含有杂质,而杂质对 PCR 产物的影响是非常显著的。为了获得清晰条带,降低非特异性扩增,本试验以 3 个浓度的 DNA 为模板,利用 FP5、FP7、FP9 这 3 种简并引物分别扩增,其他条件相同,结果如图 2 所示。

以未稀释 DNA 为模板,3 轮扩增后均无清晰条带(图 2)。将 DNA 模板分别稀释 100、200 倍,随着 DNA 稀释倍数的增加,简并引物 FP5 扩增出的条带数量明显增加,且条带清晰度明显提升;简并引物 FP9 扩增的结果,100 倍稀释比 200 倍稀释扩增条带数量更多、条带更加清晰(图 2)。同时,7 号引物在多个模板浓度下皆无明显条带,说明利用 FPNI - PCR 进行扩增时,模板的稀释倍数应配合不同的简并引物进行筛选,以期降低杂质等对反应的影响,才能获得更为清晰的条带。

2.3 退火温度对扩增产物的影响

通过对 5、7、9 号引物扩增反应的第 3 轮扩增的退火温度进行筛选,筛选温度为 62、64、66、68 ℃,结果见图 3。总体来

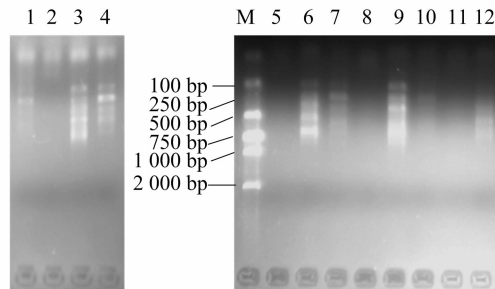
注: * 表示 25 ℃ 保持 120 s 后以 0.2 ℃/s 升温至 72 ℃。



泳道1~3—未稀释 DNA 模板; 泳道4~6—稀释 100 倍 DNA 模板; 泳道7~9—稀释200倍 DAN 模板。泳道1、4、7—由引物 FP5 扩增; 泳道2、5、8—由引物FP7扩增; 泳道3、6、9—由引物FP9扩增

图2 模板DNA浓度对FPNI-PCR反应的影响

看, 64、66 °C 反应效果更好, 但是不同引物反应的最佳退火温度不同, 如 FP5 引物 64 °C 下扩增效果较好, FP9 号中超过 700 bp 的条带, 在 66 °C 下更清晰。

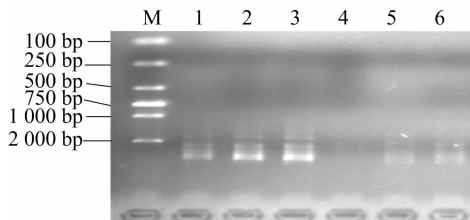


泳道1~3、4~6、7~9、10~12退火温度分别为 62、64、66、68 °C; 泳道1、4、7、10由引物FP5扩增; 泳道2、5、8、11由引物FP7扩增; 泳道3、6、9、12由引物FP9扩增

图3 FPNI-PCR反应体系中不同退火温度的扩增结果

2.4 Taq 酶的用量对 FPNI-PCR 的影响

Taq 酶在 PCR 反应体系中用量少, 却极为重要, Taq 酶的类型、用量, 甚至是生产商, 都会对 PCR 产物造成明显的影响。在本研究中, 分别对以 FP6 和 FP7 简并引物扩增获得的 PCR 产物进行 Taq 酶的优化, 其他条件全部相同, 结果如图 4 所示。试验发现, Taq 酶的用量对反应条带的数量和清晰度都有一定影响, 随着 Taq 酶用量的增加, FP6 和 FP7 扩增的 PCR 产物的量均有所提高, 但 FP6 更为明显, 能获得较为清晰的条带, 而 FP7 无明显的清晰条带。以简并引物 FP6 扩增, Taq 酶用量 1.5 U 时比 1.0 U 时条带亮度只略有提升, 且非特异性扩增也更为明显, 表明 Taq 酶用量 1.0 U 更为合适。



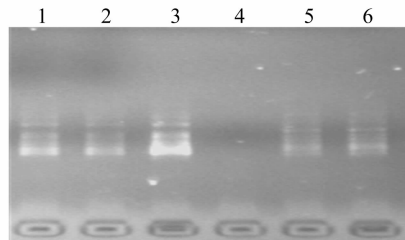
M—DNA marker; 泳道1~3—由引物FP6扩增; 泳道4~6—由引物FP7扩增; 泳道1和4、2和5、3和6, Taq 酶用量分别为0.5、1.0、1.5 U

图4 Taq 酶用量对FPNI-PCR 反应的影响

2.5 10 × Taq buffer (Mg²⁺ plus) 用量对 FPNI-PCR 的影响

分别以简并引物 FP6 和 FP7 进行扩增, 通过改变 10 × Taq buffer (Mg²⁺ plus) 用量, 其他条件均相同, 结果见图 5。结果显示, 以简并引物 FP6 扩增, 3 种缓冲液用量均获得条带,

但用量为 2 μL 时, 目的条带更为清晰; 以简并引物 FP7 扩增, 缓冲液为 1.5 μL 时无条带, 由 1.75 μL 增至 2 μL 时, 条带数量增加, 清晰度略有增加。

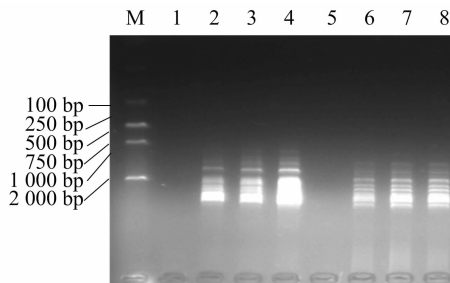


泳道 1~3、4~6 分别由引物 FP6、FP7 扩增; 泳道1和4、2和5、3和6所用 10×Taq buffer (Mg²⁺ plus) 缓冲液的量分别为 1.5、1.75、2 μL

图5 10 × Taq buffer (Mg²⁺ plus) 用量对 FPNI-PCR 的影响

2.6 引物浓度对 FPNI-PCR 的影响

以 FP6 和 FP7 这 2 种简并引物扩增, 对第 3 轮引物 SP2 浓度进行筛选。结果 (图 6) 显示, 引物浓度为 0.25 μmol/L 时, 均无条带, 随着引物浓度的上升, 条带数量、亮度明显增加, 非特异性扩增同样增加, 条带出现模糊现象。由图 6 可知, 以 FP6 和 FP7 为简并引物扩增, 第 3 轮引物 SP2 浓度为 0.75 ~ 1.0 μmol/L 时, 均有较好结果。但从节约成本、提高条带清晰度、减少非特异性扩增角度考虑, 0.75 μmol/L 时更佳。



泳道1~4、5~8分别由引物FP6、FP7扩增; 泳道1和5、2和6、3和7、4和8的SP2引物用量分别为 0.25、0.5、0.75、1.0 μL

图6 引物浓度对 FPNI-PCR 反应的影响

3 结论与讨论

3.1 结论

从试验结果来看, FPNI-PCR 适合以低浓度 DNA 为模板, 第 1 轮反应以稀释后的 DNA 为模板, 20 μL 体系中, 用量在 4.5 ~ 10 ng。对三色堇 FPNI-PCR 第 3 轮体系进行优化, 最优反应体系是: 20 μL 反应体系中, 特异性引物浓度 0.2 μmol/L, 引物 SP2 浓度 0.75 μmol/L, Taq DNA 酶用量 1.0 U, dNTP 用量 2 μL, 10 × buffer (20 mmol/L, Mg²⁺ plus) 用量 2 μL, 模板为第 2 轮反应稀释 100 倍后取 1 μL, ddH₂O 补足。第 3 轮反应经温度筛选, 退火温度 64 °C 或 66 °C 时条带最佳。

3.2 讨论

FPNI-PCR 是基于热不对称 PCR 技术原理的 PCR 方法, 共包括 3 轮 PCR 反应。其中, 第 1 轮反应中, 含 3 次高严谨反应, 目的是使高退火温度的特异性引物 SP1 与模板序列退火延伸; 1 次低严谨反应, 目的是使简并引物结合到较多的目的序列上; 5 次热不对称的高低特异性循环交替反应, 使目

的片段得以指数性扩增。第2、3轮为普通PCR反应,通过特异性嵌套引物进一步扩增目的条带。它与普通TAIL-PCR的主要区别在于给出了经过优化后的一系列简并引物,并在简并引物的基础上设计了嵌套的特殊引物FSP1、FSP2用于第2、3轮的扩增^[2]。特异性嵌套引物的存在,使非目的条带得不到大量扩增,而非目标序列中的发卡结构也能抑制其扩增,从而提高了目的片段扩增的准确性^[11]。

由于FPNI-PCR反应步骤较多,因此影响扩增结果的因素也较多。首先,第1轮的高低严谨热不对称反应是目标片段扩增的最初环节,而本试验证明,模板浓度是影响第1轮反应结果的关键因素。在研究中发现,低浓度的DNA模板更容易获得扩增结果,且模板DNA的稀释倍数对不同简并引物扩增的影响不同。在其他PCR反应的研究中同样发现,植物DNA模板的浓度对于目的片段的扩增具有很大的影响^[12]。在TAIL-PCR中,通常需要对模板进行稀释,才能获得较为清晰的条带^[4,13]。原因可能是DNA中所含杂质的影响,未稀释的高浓度DNA中所含杂质更多,影响条带扩增,另外,不同简并引物对模板的浓度要求也可能不同,所适应的模板浓度存在差异。

在FPNI-PCR反应中,第1轮扩增产物因条带杂、浓度低,往往无法通过凝胶成像显示,需要通过第2轮对目标条带的进一步扩增获得初步结果。通过第2轮产物凝胶成像,以有条带的第2轮稀释产物为模板,通过第3轮反应进一步扩增,以期获得较第2轮更为清晰的条带。因此,第3轮反应体系的优化对最终结果的获得具有重要作用。

本研究中,针对第3轮PCR反应中部分因素进行了优化,结果发现,与buffer(Mg^{2+} plus)、*Taq* DNA酶用量相比,引物的浓度影响最为显著,随着引物浓度的上升,条带数量、亮度明显增加。需要注意的是,较高的引物浓度虽有利于扩增,但会造成条带模糊、非特异性条带增加,这与其他PCR反应类似^[14],不利于与第2轮条带比对推测目的条带。虽然FPNI-PCR中融合引物特殊且相对较短,有利于与DNA模板结合扩增目的条带,但经过3轮反应虽然在一定程度上降低了非特异条带的干扰,但杂条带的影响仍是影响试验结果的重要原因^[15]。因此,在第3轮反应中选出最适当的引物浓度,具有十分重要的作用。含 Mg^{2+} 的buffer缓冲液主要对引物和模板的退火、*Taq* DNA酶的稳定起作用,当缓冲液低于一定限度不能产生条带,但用量过多也会使dNTP过量结合,非特异性条带增加,不利于反应^[16-17]。与缓冲液相对应,*Taq* DNA酶用量的多少,同样对PCR反应存在直接影响,不同的*Taq*酶需要配合相应的缓冲液使用,过少无法产生条带,过多也会造成非特异性扩增^[18-19]。在本试验中,较高的buffer浓度和*Taq* DNA酶均有利于扩增。

PCR反应中除各因素外,退火温度对目的条带的获取同样具有重要作用。相关研究发现,对热不对称PCR第3轮反应退火温度的优化,能有效地促进目的片段的富集^[20]。本试验第3轮PCR反应中,特异性引物的 T_m 值为65℃,通过温度筛选得出,退火温度为64℃或66℃时,条带更为清晰。

综上所述,本研究发现,在FPNI-PCR中通过优化反应体系中各因素的浓度或用量,筛选3轮PCR的退火温度,均能有效地增加目的条带的清晰度,减少非特异性扩增,为后续

研究打下良好基础,为其他物种基因启动子的研究提供一定的借鉴作用。

参考文献:

- [1] Wang Z, Ye S F, Li J J, et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning [J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 16697-16702.
- [2] 李昆鹏, 朱化彬, 郝海生, 等. 基于PCR方法的基因序列全长获取策略[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(11): 115-123.
- [3] 方子义. 蜡梅查尔酮合成酶基因(*CHS*)启动子及相关转录因子的克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [4] 郑 岑, 张立平, 唐忠辉, 等. TAIL-PCR技术及其在植物基因中的克隆[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 544-548.
- [5] 张其生, 包满珠, 卢兴霞, 等. 大花三色堇育种研究进展[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 128-133.
- [6] 李 琴. 三色堇花色素合成结构基因的克隆与表达差异分析[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [7] 唐杏姣, 韩科厅, 胡 可, 等. 菊花*CmDFR*与*CmANS*基因启动子序列克隆与瞬时表达分析[J]. 生物技术通报, 2012, 28(5): 81-88.
- [8] Dong W, You Y X, Niu L L, et al. Isolation and analysis of the promoter of an anthocyanin synthase gene from purple-fleshed sweet potato tubers [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(10): 2637-2649.
- [9] Gollop R, Even S, Colova - Tsoolova V, et al. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(373): 1397-1409.
- [10] 尚 啸, 王 健, 龚 胜, 等. 三色堇叶片DNA不同提取方法比较[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(20): 4999-5002.
- [11] 刘 慧, 刘贯山, 刘 峰, 等. 烟草T-DNA插入位点侧翼序列扩增方法的筛选与优化[J]. 中国烟草科学, 2014, 35(1): 96-101, 107.
- [12] 李宗菊, 熊 丽, 桂 敏, 等. 非洲菊基因组DNA提取及ISSR-PCR扩增模板浓度优化[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 439-444.
- [13] 罗静瑶, 陈云云, 谢 俊, 等. TAIL-PCR的技术改良及对香蕉*NBS-RGC5*基因侧翼序列的克隆[J]. 广东农业科学, 2013, 40(10): 143-145, 170.
- [14] 刘 阳, 杨淑霞, 李敏惠, 等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式PCR非特异性扩增[J]. 成都医学院学报, 2008, 3(2): 111-114.
- [15] 胡 丹. 月季“月月红”酵母单杂交cDNA文库及RrMYB7诱饵载体的构建[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [16] Liu X D, Zheng D, Zhou Y N, et al. Restriction endonucleases digesting DNA in PCR buffer[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(1): 58-60, 85-86.
- [17] 王 云, 秦 伟, 王永丰. 新疆野苹果S基因特异性PCR体系优化[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(11): 2023-2030.
- [18] 李谋强, 师桂英, 叶树辉, 等. ‘兰州百合’ISSR-PCR体系的优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2014, 49(6): 76-81.
- [19] 周雨晴, 杜沛霖, 傅 鹏, 等. 青天葵ISSR-PCR体系优化及引物筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 95-99.
- [20] 陈军营, 沈向磊, 辛玉茹, 等. 改良TAIL-PCR技术在小麦PMH⁺-ATPase基因启动子克隆中的应用[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(1): 1-5.