

李 军,郝彩琴,张 燃,等. 银柴胡不同材料总 DNA 提取方法的筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):43-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.010

银柴胡不同材料总 DNA 提取方法的筛选

李 军,郝彩琴,张 燃,冷晓红

(宁夏职业技术学院,宁夏银川 750021)

摘要:拟筛选最适合银柴胡叶片、鲜根和干根总 DNA 提取的方法,为同科、属及同类药材总 DNA 提取提供依据,并为银柴胡 DNA 条形码分子鉴定及分子生物学研究奠定基础。采用 2% 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)法、4% CTAB 法、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)法、试剂盒法、高盐低 pH 值法和尿素法共 6 种方法提取银柴胡叶片、鲜根和干根总 DNA,用琼脂糖凝胶电泳法、紫外分光光度计法及 PCR 扩增检测所提 DNA 的质量。试剂盒法提取银柴胡叶片、鲜根和高盐低 pH 值法提取干根总 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值分别为 1.875、1.848、1.878,电泳条带清晰,无拖尾。利用上述方法提取的 DNA 可以扩增出 ITS2 和 psbA-trnH 序列。用试剂盒法提取银柴胡叶片、鲜根和用高盐低 pH 值法提取银柴胡干根 DNA 是简便、快速的方法,用这些方法得到的 DNA 适合用于分子生物学的进一步研究。

关键词:银柴胡;DNA 提取;分子鉴定;筛选

中图分类号: S567.7⁺90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0043-03

银柴胡(别称银胡、山菜根、牛肚根、沙参儿、白根子等)是石竹科繁缕属植物银柴胡(*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge.)的干燥根^[1],味甘性寒,具有清虚热、除疳热的功效,临床用于阴虚发热、骨蒸劳热、小儿疳热等症^[2]。银柴胡作为 2015 年版《中华人民共和国药典》记载的传统中药^[3],在临床上的应用比较广泛,尤其是将其作为主要成分的传统中成药乌鸡白凤丸,在临床上有很好的口碑^[4]。

DNA 条形码技术(DNA bar-coding)作为中药材物种鉴定研究中的新方法,是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段对物种进行快速、准确的鉴定的技术^[5],且具有鉴定结果准确、可重复性良好、方法通用性强等优点。DNA 条形码鉴定技术已经在冬虫夏草、枸杞、羌活、党参、天南星、锁阳等中药材及其混伪品的鉴定中取得了良好的效果^[6],并已被收录进 2015 年版《中华人民共和国药典》^[3]。获取高质量的 DNA 是进行银柴胡 DNA 条形码研究的必要前提和关键环节。本研究以银柴胡叶片、鲜根和干根为材料,考察 6 种 DNA 提取方法,旨在寻找一种能够得到相对高产量、高纯度的适合于银柴胡总 DNA 提取的方法^[7-8],为后续银柴胡 DNA 条形码分子鉴定及分子生物学的深入研究提供技术依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

银柴胡叶片和鲜根于 2016 年 10 月采自宁夏回族自治区吴忠市同心县预旺镇南关村,叶片和一部分根趁鲜放入 -70 ℃ 冰箱中冷冻,备用,另一部分根自然晾干。以上样品

经宁夏大学李吉宁教授鉴定为石竹科繁缕属植物银柴胡(*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge.)的叶片及根。

1.2 仪器与试剂

My Cycler PCR 仪、Bio Gel Doc XR + 凝胶成像系统、Powerpac basic 琼脂糖凝胶电泳仪,购自美国伯乐有限公司;Sigma1-14 高速离心机,购自德国 Sigma 公司;Geno 2010 高通量组织研磨机,购自美国 SPEX SamplePrep 公司;Q6000 核酸蛋白检测仪,购自美国 Quawell 公司;TGL-16G 型低温冷冻离心机,购自上海安亭科学仪器厂;Mini10k 迷你离心机,购自珠海黑马医学仪器有限公司;SZ-1 涡旋混合器,购自常州国宇仪器制造有限公司;HHSY21-Ni4-C 恒温水浴锅,购自北京长源实验设备厂。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、聚乙烯吡咯烷酮 40(PVP-40,纯度 > 95%)、三羟甲基氨基甲烷(Tris,纯度 > 99.5%)。植物基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 所用 dNTPs(10 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、Mg²⁺(25 mmol/L)、10 × PCR buffer、DL 2000 marker,均购自天根生化科技(北京)有限公司;ITS2 和 psbA-trnH 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;琼脂糖为西班牙琼脂糖 Biowest Agarose;三氯甲烷、异戊醇、乙醇、异丙醇、无水乙醇、氯化钠、醋酸钠等为国产分析纯试剂。

1.3 DNA 提取方法

以银柴胡的叶片、鲜根和干根为材料,分别采用 2% CTAB 法、4% CTAB 法、SDS 法、试剂盒法、高盐低 pH 值法和尿素法共 6 种方法提取 3 种材料的 DNA。提取的 DNA 经紫外检测、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增确定最适方法。

1.3.1 2% CTAB 法 取银柴胡叶片(长 0.5 ~ 1.0 cm)、鲜根(长 0.2 ~ 0.5 cm)和干根(长 0.2 ~ 0.5 cm),经 70% 乙醇擦洗表面后放入 600 μL 2% CTAB 缓冲液[2% CTAB、100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、20 mmol/L EDTA、

收稿日期:2018-01-12

基金项目:宁夏回族自治区教育厅项目(编号:NGY2016259)。

作者简介:李 军(1982—),男,山西浑源人,硕士,副教授,主要从事中药开发与利用的研究。E-mail:lijunamy@126.com。

1.4 mol/L NaCl、2% 可溶性 PVP] 中, 并加入 2% β -巯基乙醇, 再加 2 枚直径为 0.45 mm 的小钢珠, 叶片和鲜根置于研磨仪上, 以 1 400 次/min 研磨 4 min, 干根以 1 600 次/min 研磨 6 min; 65 °C 水浴 30 ~ 45 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min; 在上清液中加入等体积三氯甲烷、异戊醇 (体积比为 24 : 1) 充分混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 重复以上步骤 1 ~ 2 次, 直到界面清晰为止; 在上清液中加入 2 ~ 3 倍体积的 -20 °C 预冷的异丙醇, 于 -20 °C 静置 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min; 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次后, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 沉淀晾干后加入 100 μ L TE 缓冲液 [由三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和 EDTA 配制而成] 溶解, -20 °C 保存备用。

1.3.2 4% CTAB 法 具体步骤参考“1.3.1”节, 提取液为 4% CTAB 缓冲液 [2% CTAB、100 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0)、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl、3% 可溶性 PVP、2% β -巯基乙醇]。

1.3.3 SDS 法 具体步骤参考“1.3.1”节, 提取液为 SDS 缓冲液 [10% SDS、50 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0)、100 mmol/L EDTA、1% 可溶性 PVP、2% β -巯基乙醇]。

1.3.4 试剂盒法 在材料中加入 GPI 缓冲液, 参照“1.3.1”节的方法研磨, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取 DNA, 详细操作参照试剂盒说明书。

1.3.5 高盐低 pH 值法 根据文献 [9] 的操作步骤进行试验, 材料处理方法同“1.3.1”节, 提取缓冲液含 0.1 mol/L NaAc、0.05 mol/L EDTA、0.5 mmol/L NaCl、3% PVP、3% SDS、1% β -巯基乙醇。

1.3.6 尿素法 在材料中加入尿素裂解液 [7 mmol/L 尿素、0.3 mol/L 氯化钠、0.034 mol/L 十二烷基肌氨酸钠、50 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0)、20 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)], 参照“1.3.1”节的方法研磨, 摇匀, 65 °C 水浴 20 ~ 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 将上清液移入另一新管中; 加入等体积的三氯甲烷、异戊醇 (体积比为 24 : 1) 溶液, 振荡数次混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; 重复上述步骤; 在上清液中加入 2/3 体积的 -20 °C 预冷的异丙醇, 混匀, -20 °C 沉淀 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 在沉淀中加入 200 μ L 70% 乙醇洗涤 2 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 沉淀晾干后加入 100 μ L TE 溶解, -20 °C 保存备用。

1.4 DNA 的质量检测

1.4.1 紫外检测 取 2 μ L 采用 6 种方法提取的银柴胡叶片、鲜根及干根 DNA 溶液, 用核酸蛋白检测仪分别测定 260、280 nm 处的吸光度。根据 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值判断 DNA 纯度, 根据 $D_{260\text{nm}}$ 计算 DNA 浓度。

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测 取 7 μ L DNA 母液加 1 μ L 上样缓冲液, 用 Gelred 进行染色, 上样于 1% 琼脂糖凝胶, 以 DL 2000 marker 为标准, 在 1 \times TAE 的电泳缓冲液中进行水平板电泳, 100 V 恒电压, 电泳约 30 min, 用凝胶成像系统进行拍照检测。

1.4.3 PCR 扩增检测 以试剂盒法提取银柴胡叶片和鲜根 DNA, 高盐低 pH 值法提取干根所得 DNA 为模板, 按照文献 [9] 中 ITS2 和 psbA - trnH 通用引物、25 μ L 反应体系和条件进行 PCR 扩增。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Bio

Gel DocTM XR + 凝胶成像分析系统拍照、分析。

2 结果与分析

2.1 提取银柴胡总 DNA 的紫外检测

由表 1 可知, 用试剂盒法、2% CTAB 法、4% CTAB 法提取得到的银柴胡叶片 DNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值均在 1.8 ~ 2.0 范围, 表明这 3 种方法得到的 DNA 质量较好。试剂盒法提取的 DNA 浓度较高, 高盐低 pH 值法提取的 DNA 浓度最低, 且 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值大于 2.0, 说明有酚类和糖类等的污染。SDS 法与尿素法提取到的 DNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值小于 1.8, 说明得到的 DNA 中存在蛋白质的污染。

表 1 银柴胡药材叶片总 DNA 提取纯度及浓度

提取方法	$D_{260\text{nm}}$	$D_{280\text{nm}}$	$D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值	DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2% CTAB 法	0.513	0.277	1.852	35.80
4% CTAB 法	0.487	0.254	1.929	32.70
SDS 法	0.912	0.559	1.632	42.90
试剂盒法	1.043	0.556	1.875	50.30
高盐低 pH 值法	0.117	5.85	2.053	5.85
尿素法	1.930	1.023	1.604	96.50

由表 2 可知, 对于银柴胡鲜根 DNA 的提取, 2% CTAB 法、4% CTAB 法和试剂盒法提取 DNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值均在 1.8 ~ 2.0 标准范围内, 表明其 DNA 纯度较高, 其中试剂盒法提取的浓度最高; 高盐低 pH 值法提取 DNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值在 2.0 以上, 说明有多糖、酚类等杂质污染。SDS 法和尿素法提取的 DNA 浓度较高, 其 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值均低于 1.8, 说明有蛋白质、有机物等杂质污染。

表 2 银柴胡鲜根总 DNA 提取纯度及浓度

提取方法	$D_{260\text{nm}}$	$D_{280\text{nm}}$	$D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值	DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2% CTAB 法	1.957	1.009	1.938	97.85
4% CTAB 法	0.625	0.341	1.832	38.60
SDS 法	1.947	1.096	1.776	98.50
试剂盒法	2.786	1.508	1.848	118.90
高盐低 pH 值法	1.426	0.689	2.070	71.30
尿素法	2.857	1.648	1.673	137.85

由表 3 可知, 对于干根 DNA 的提取, 试剂盒法和高盐低 pH 值法提取的 DNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值均在 1.8 ~ 2.0 范围, 表明其 DNA 纯度较高; 2% CTAB 法、4% CTAB 法和 SDS 法提取的 DNA 浓度相对较高, 其 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值均在 2.0 以上或小于 1.8, 说明有杂质污染。尿素法提取的 DNA 浓度最低, 说明提取效果欠佳。

表 3 银柴胡干根总 DNA 提取纯度及浓度

提取方法	$D_{260\text{nm}}$	$D_{280\text{nm}}$	$D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值	DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2% CTAB 法	1.812	0.869	2.086	86.9
4% CTAB 法	1.627	0.778	2.091	74.6
SDS 法	1.930	1.023	1.604	96.5
试剂盒法	0.875	0.472	1.852	43.2
高盐低 pH 值法	0.784	0.417	1.878	35.8
尿素法	0.358	0.163	2.196	17.9

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

由图1可知,试剂盒法所提银柴胡叶片DNA完整性较好,电泳条带单一;2%和4%CTAB法提取的DNA浓度较低,且稍有降解;SDS法和尿素法提取的DNA条带清晰,浓度高,但有拖尾,降解较严重;高盐低pH值法提取DNA泳道无条带,电泳未检出DNA。6种提取方法中,试剂盒法提取的DNA电泳条带最整齐明亮,说明DNA完整,该结果与紫外检测结果一致。因此,后续试验可以选择用试剂盒法提取银柴胡叶片DNA,用于中药条形码序列*ITS2*的扩增。

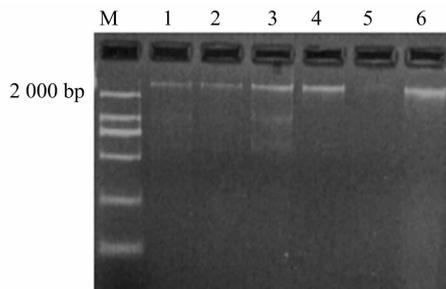


图1 银柴胡叶片6种方法提取DNA的电泳结果
M—DL2000 marker; 1—2% CTAB法; 2—4% CTAB法;
3—SDS法; 4—试剂盒法; 5—高盐低pH值法;
6—尿素法。图2、图3同

图1 银柴胡叶片6种方法提取DNA的电泳结果

由图2可知,试剂盒法提取DNA条带最亮,浓度最高,条带完整,提取效果最好。4%CTAB法提取的DNA条带单一,完整性好,但亮度不高,说明浓度低。其他3种方法提取的DNA都有降解,其中尿素法降解最严重,该结果与紫外检测结果一致。因此,后续试验可以选择用试剂盒法提取银柴胡鲜根DNA,用于中药条形码序列的扩增。

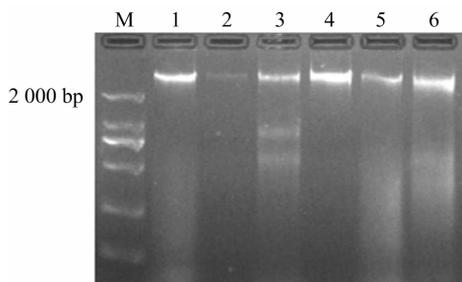


图2 银柴胡鲜根6种方法提取DNA的电泳结果

由图3可知,试剂盒法和高盐低pH值法提取干根的条带单一,降解较少,质量好,浓度高。未检测到尿素法提取的DNA,其他3种方法的DNA降解都较多。该结果与紫外检测结果一致。其中试剂盒法成本相对较高,故后续试验可以选择高盐低pH值法提取银柴胡干根的DNA,用于中药条形码序列的扩增。

2.3 PCR扩增检测

由图4可知,银柴胡叶片、鲜根和干根均可扩增出清晰的DNA条带,表明用对应方法提取银柴胡DNA的质量完全能够满足后续*ITS2*和*psbA-trnH*序列的PCR扩增反应要求。

3 讨论与结论

DNA条形码研究包括DNA提取、PCR扩增、DNA测序以及基于条形码数据库的序列比对等工作,获得高质量的基因组DNA,是进行DNA条形码研究的前提。目前,提取植物基

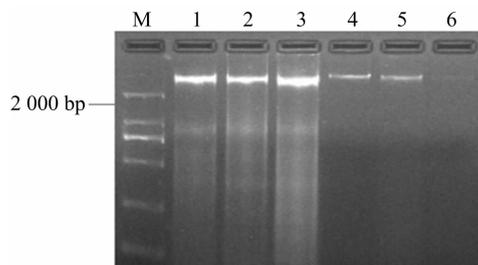
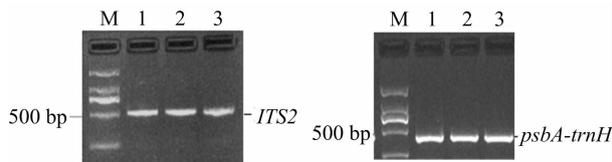


图3 银柴胡干根6种方法提取DNA的电泳结果



A—*ITS2*; B—*psbA-trnH*; M—DL2000 marker;
1—叶片; 2—鲜根; 3—干根

图4 银柴胡*ITS2*和*psbA-trnH*序列的PCR扩增结果

因组DNA的方法有很多,如CTAB法、SDS法、高盐低pH值法、尿素法、试剂盒法等^[10]。CTAB法能有效除去材料中的蛋白质、多糖和酚类等物质,但由于步骤多、试剂组成复杂、易污染等缺点,在使用上受到了一定的限制;SDS法操作简单、温和,但对于次生代谢物、多糖等含量较高的植物,提取出的基因组DNA质量往往不高;高盐低pH值法操作方便省时,所需样品量少,适用于濒危植物或干燥药材DNA的提取^[11-12];试剂盒法提取基因组DNA因其操作简单、快速,得到的总DNA纯度高,近年来已被广泛采用;尿素法操作温和、简单、快速,但其DNA质量不高^[13]。本研究选择6种常用的DNA提取方法,筛选出提取银柴胡叶片、鲜根和干根的最适方法,其中试剂盒法提取3种材料的DNA质量和浓度都较好,因后续试验中样品处理量较大,且费用有限,考虑到提取成本,银柴胡叶片和鲜根采用试剂盒法提取DNA,而干根采用高盐低pH值法提取DNA。在用试剂盒提取时也应注意:在漂洗吸附柱时,加入漂洗液后可静置1min后再进行离心,从而提高DNA的质量;加入TE缓冲液洗脱之前必须保证吸附材料彻底晾干,避免漂洗液中的乙醇等溶剂影响后续试验。用高盐低pH值法提取时,应将干根提前放于-70℃冷冻过夜,可以提高材料脆性,易于粉碎;加入提取液研磨后于65℃水浴,时间不宜过长,60min即可,太长会加快DNA的降解。

银柴胡根中富含多糖、多酚、纤维和贮藏物质等,极易氧化,且蛋白质含量高,DNA提取溶液浑浊,产率较低,在研磨前加入PVP和β-巯基乙醇可防止多元酚类物质氧化^[14]。另外,样品处理时组织研磨机的转速和时间会影响细胞破碎的效果,故对其进行了优化,既能使药材研磨完全,又能降低DNA的损失,选出的干根最佳研磨条件为1600次/min,研磨6min,提高了DNA的质量和产率。

从银柴胡鲜根中提取的DNA浓度较干根高,但纯度相对较低,原因可能是新鲜材料活性较高,DNA降解少,各种代谢产物和内含物含量高,在提取过程中不易去除干净;干根由于晾干过程时间长、温度高,造成DNA大量降解,因此得率低,完整性差。而叶片提取的DNA浓度低,可能与叶片比根取样量相对少有关。另外,以优选方法提取的银柴胡叶片、鲜根和

宋立立,顿宝庆,张亚楠,等. 果胶裂解酶基因与木聚糖酶基因的共表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):46-48.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.011

果胶裂解酶基因与木聚糖酶基因的共表达

宋立立¹, 顿宝庆², 张亚楠¹, 张兆英¹

(1. 沧州师范学院生命科学学院,河北沧州 061000;

2. 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/生物质能源研究中心,北京 100081)

摘要:利用重叠引物 PCR 方法将从海栖热袍杆菌中克隆得到的果胶裂解酶基因和从桔青霉 CR-2 菌株中克隆得到的木聚糖酶基因做重叠引物 PCR 扩增,扩增后得到融合基因 *plyxyl*,将其构建载体后转化到大肠杆菌菌株 BL21,克隆子经 IPTG 诱导在原核系统中实现了表达,pH 值为中性,诱导 6 h 后最高酶活性分别达 30.11 U/mL、2.03 IU/mL。

关键词:果胶裂解酶基因;木聚糖酶基因;原核系统;共表达

中图分类号: S188;Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0046-03

在酿酒行业中,作为原料的粮食外层有纤维素和木聚糖等半纤维素成分,从而影响对淀粉的利用率。利用木聚糖酶作用于半纤维素层,降低物料黏度,有利于提高淀粉的利用率,增加乙醇的产率^[1]。木聚糖酶通过水解木糖分子 1,4-糖苷键,将木聚糖水解为木寡糖等低木聚糖及少量木糖和阿拉伯糖,在食品、饲料、医药、能源、生物转化等行业中有着广泛的应用^[2-4]。果胶酶是可将果胶协同分解为半乳糖醛酸等小分子的一组酶的总称,存在于高等植物及微生物中,也分布在某些昆虫和原生动物中。根据果胶酶作用原理分为原果胶酶、果胶酯酶、水解酶、裂解酶^[5],其中水解酶和裂解酶统称解聚酶。果胶裂解酶在果酒的澄清和提高出酒率方面起着重

要作用^[6]。

近年来,蛋白融合技术越来越受到人们的关注,其中基因重叠延伸技术应用最为广泛,通过重叠 PCR 方法将木聚糖酶基因和果胶裂解酶基因连接在一起,转入大肠杆菌 BL21 原核系统中,实现了木聚糖酶-果胶裂解酶双功能酶的分泌表达,为工业化应用奠定了理论基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

海栖热袍杆菌购自中国农业科学院微生物菌种保藏中心;木聚糖酶基因来源菌桔青霉 CR-2 由笔者所在实验室筛选得到;pPAL7 表达载体购自 BIO-RAD(美国)公司;表达菌株 BL21 和克隆宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 由笔者所在实验室保存。限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶均购自 NEB(北京)有限公司;PGEM-Teasy 购自 Promega(北京)生物技术有限公司;DNA 回收试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购自宝生物

收稿日期:2017-03-27

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503135-16)。

作者简介:宋立立(1983—),女,河北沧州人,硕士,讲师,主要从事微生物发酵技术研究。E-mail:hbczsl@163.com。

干根总 DNA 能够扩增出 *ITS2* 和 *psba-trnH* DNA 条形码序列。本研究根据不同方法对银柴胡叶片、鲜根和干根 DNA 提取的检测结果,比较得出相对适合的银柴胡不同材料总 DNA 提取方法,为后续的 DNA 条形码分子鉴定及分子生物学研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 陈飞. 银柴胡与其伪品山银柴胡的鉴别[J]. 中医中药,2013,11(34):234-235.

[2] 李军. 银柴胡的鉴别及应用研究进展[J]. 安徽农学通报,2015,21(20):27-28.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015年版 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:317.

[4] 鲍瑞,杨彩霞,高立原,等. 银柴胡主要病虫害研究初报[J]. 中国农学通报,2006,22(5):381-383.

[5] Hebert P, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences,2003,270(1512):313-321.

[6] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究

方向[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2011,13(5):747-754.

[7] 纪宝玉,裴莉昕,陈随清,等. 山茱萸药材鲜品与干品总 DNA 提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):70-72.

[8] 周天华,陈征,李康,等. 开口箭 DNA 提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):10-13.

[9] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:14.

[10] 朱田田,晋玲,杜弢,等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):125-128.

[11] 高慧新,包道健,田慧. 广山药总 DNA 提取方法的比较[J]. 中国民族民间医药,2017,26(16):27-29.

[12] 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.

[13] 曹文波,郑璐璐,谢文海. 一种提取植物基因组 DNA 的方法——改良尿素法[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2008,42(3):448-451.

[14] 侯艳霞,汤浩茹,张勇,等. DNA 提取方法对一串红不同部位 DNA 提取的比较[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(1):94-100.