

· 资源与鉴定 ·

一种适用于不同发育期山楂果实总 RNA 提取的方法

闫述模¹, 袁媛¹, 杨滨², 陈敏^{1*}

(1. 道地药材国家重点实验室培育基地, 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 筛选从不同发育期山楂果实中提取 RNA 的最佳方法。方法: 对不同发育期山楂果实总 RNA 提取方法进行了探索, 考察了 Trizol 法、改良 Trizol 法、经典十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法和改良 CTAB 法提取 RNA 的效果, 采用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪检测 RNA 质量。结果: Trizol 法、改良 Trizol 法对成熟期山楂果实 RNA 提取效果不佳, 琼脂糖凝胶电泳检测几乎看不到条带; 经典 CTAB 法对各发育期样本 RNA 提取质量均不理想; 改良 CTAB 法对不同发育期山楂果实总 RNA 有良好的提取效果, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 均在 2.0 左右, 28 S 和 18 S 条带完整, 满足反转录和聚合酶链式反应 (PCR) 扩增反应的需求。结论: 建立的改良 CTAB 法是一种有效的山楂果实总 RNA 提取方法, 适用于不同发育期山楂果实 RNA 的提取, 为开展山楂有效成分的生物合成研究奠定了基础。

[关键词] 山楂果实; 不同发育期; 改良 CTAB 法; RNA 提取; 琼脂糖凝胶电泳

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0039-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140039

Good Method for Isolating Total RNA from Crataegi Fructus at Different Developmental Stages

YAN Shu-mo¹, YUAN Yuan¹, YANG Bin², CHEN Min^{1*}

(1. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To choose the best RNA extraction for Crataegi Fructus from different stage.

Method: In this paper, the Trizol, the modified Trizol, the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and the modified CTAB methods were compared to extract high purity and integrity RNA from Crataegi Fructus at different developmental stage. And the quality of RNA was analyzed by electrophoresis detection and the spectrophotometer.

Result: According to the result, high-grade RNA, with clear 18 S and 28 S, and the value of $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ was about 2.0, was isolated by using the modified CTAB method. Furthermore, the isolated RNAs from samples at different developmental stages were successfully used for the reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) of the ACTIN in hawthorn. **Conclusion:** It suggested that the modified CTAB method was useful for isolating RNA from Crataegi Fructus at different developmental stage.

[Key words] Crataegi Fructus; different developmental stage; modified CTAB; RNA extraction; agarose gel electrophoresis

[收稿日期] 20160124(005)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(2014AA022201)

[第一作者] 闫述模, 硕士, 从事中药资源与分子生药学研究, Tel: 15910419480, E-mail: ysmhoneyuckle@sina.com

[通讯作者] * 陈敏, 研究员, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 13811579776, E-mail: cm315keke@163.com

获得高纯度、完整性好的 RNA 是深入开展分子生物学研究的重要基础之一, RNA 的质量将直接影响 cDNA 合成、基因克隆、基因表达分析和功能基因筛选等后续研究的成败^[1], 如何快速获得高质量的 RNA 成为研究人员关注的热点。常用的 RNA 提取方法有异硫氰酸胍法, SDS 法, CTAB 法和试剂盒法等。植物中多糖、多酚等次生代谢产物会影响 RNA 的提取^[2], 同一种方法在不同植物材料中提取效果有所差异, 即使是同种植物材料在含有某种干扰因素(如不同组织或不同发育期)时, 其适用的 RNA 提取方法也可能不同, 因此对于某一植物材料其相应的 RNA 提取方法必须经过考察和探索才能确立^[3]。

山楂果实不同发育期多糖等代谢产物变化显著^[4-5], 影响了 RNA 的有效提取。为解决这一问题, 本研究以不同发育期山楂果实为材料, 对比 Trizol 法、改良 Trizol 法、经典 CTAB 法和改良 CTAB 法对山楂果实总 RNA 的提取效果, 以期找到一种有效的适用于不同发育期山楂果实总 RNA 提取的方法, 为开展山楂果实分子生物学水平的研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Vortex-2 型旋涡振荡器(美国 Scientific Industrial 公司), 5810 R 型离心机(德国 Eppendorf 公司), 4375786 型 ABI Veriti FAST 梯度 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司), DYCP-32B 型电泳系统(北京市六一仪器厂), ND-1000 型核酸蛋白定量仪(美国 Gene 公司), GeneGenius 型紫外凝胶成像分析仪(美国 Syngene 公司); 植物 RNA 专用 Trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号 1704C100), 植物可溶性糖含量试剂盒(微量法, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 BC0035), 焦炭酸二乙酯(DEPC, Sigma-Aldrich 公司, 批号 D5758), 聚乙二醇 6000(PEG6000, 批号 20071207)购自国药集团化学试剂有限公司。山梨醇(批号 2335C005), β -巯基乙醇(批号 M0482-100), 十六烷基三甲基溴化铵(CYAB, 批号 1182C402)购自 Amresco 公司。三羟甲基氨基甲烷(Tris, 批号 QL0227B20010), 乙二胺四乙酸(EDTA, 批号 A100322-0500)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

用于总 RNA 提取的所有配制的溶液均需经 0.1% DEPC 处理 12 h, 高压灭菌后方可使用。山梨醇预处理液配方: 聚乙二醇(PEG) 6000 (100 g · L⁻¹), Tris(0.1 mol · L⁻¹), EDTA(5 mmol · L⁻¹), 山梨醇(分别加入 0, 1.1, 3 mol · L⁻¹), β -巯基乙醇

(2%, 用前加入)。

1.2 样品 不同发育期山楂果实样品于 2014 年采自北京怀柔山区(表 1), 样品经中国中医科学院中药资源中心金艳助理研究员鉴定为山里红 *Crataegus pinnatifida* 的果实。所有样品保存于 -80 °C 冰箱中备用。

表 1 山楂果实样品信息

Table 1 Samples' information of *Crataegi Fructus*

No.	座果后天数/d	采集日期	多糖质量分数/%
1	60	2014-07-15	0.12
2	74	2014-07-29	2.03
3	87	2014-08-12	5.24
4	103	2014-08-28	7.72
5	115	2014-09-10	10.67
6	130	2014-09-25	13.26
7	148	2014-10-13	15.10

2 方法

2.1 RNA 提取

2.1.1 常规 Trizol 法 取山楂样品粉末约 100 mg, 置于 1.5 mL 的离心管中, 迅速加入 Trizol 试剂 1 mL, 振荡混匀, 冰上静置 10 min; 4 °C 离心 15 min (12 000 r · min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中(以下离心管均为 Rnase free 的进口离心管), 加入等体积苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1), 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 °C 离心 15 min (12 000 r · min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积三氯甲烷-异戊醇(24:1), 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 °C 离心 15 min (12 000 r · min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积预冷异丙醇, 轻轻混匀, -20 °C 静置 30 min; 4 °C 离心 15 min (12 000 r · min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 加入预冷的 75% 乙醇(用 DEPC 处理过的水配制) 1 mL, 清洗沉淀; 4 °C 离心 5 min (8 000 r · min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 冰上干燥 5 ~ 10 min; 加入 Rnase free 水溶液 50 μ L 溶解, 置于 -80 °C 冰箱中备用。

2.1.2 改良 Trizol 法 取山楂样品粉末约 100 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1.1 mol · L⁻¹ 山梨醇预处理液 1 mL, 振荡混匀, 静置 30 s, 4 °C 离心 1 min (8 000 r · min⁻¹), 弃上清, 迅速加入 Trizol 试剂 1 mL, 其余操作步骤同常规 Trizol 法。

2.1.3 经典 CTAB 法 取山楂样品粉末约 100 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 迅速加入 65 °C 预热的 CTAB 缓冲液 1 mL, 震荡混匀, 65 °C 水浴温育 30

min, 水浴期间上下颠倒摇匀 5~10 次; 冷却后, 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积苯酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1), 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积三氯甲烷-异戊醇 (24:1), 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入 1/4 体积 10 mol·L⁻¹ LiCl, 轻轻混匀, -20 ℃ 静置过夜; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 加入预冷的 75% 乙醇 (用 DEPC 处理过的水配制) 1 mL, 清洗沉淀; 4 ℃ 离心 5 min (8 000 r·min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 冰上干燥 5~10 min; 加入 Rnase free 水溶液 50 μL 溶解, 置于 -80 ℃ 冰箱中备用。

2.1.4 改良 CTAB 法 取山楂样品粉末约 100 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1.1 mol·L⁻¹ 山梨醇预处理液 1 mL, 振荡混匀, 静置 30 s, 4 ℃ 离心 1 min (8 000 r·min⁻¹); 弃上清, 样品迅速加入 65 ℃ 预热的 CTAB 缓冲液 1 mL, 震荡混匀, 65 ℃ 水浴温育 30 min, 水浴期间上下颠倒摇匀 5~10 次; 冷却后, 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于新 1.5 mL 离心管中, 加入 5 mol·L⁻¹ NaCl 200 μL, 轻轻混匀, 加入苯酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1) 溶液 500 μL, 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于新 1.5 mL 离心管中, 加入等体积三氯甲烷-异戊醇 (24:1), 涡旋振荡, 冰上静置 10 min; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 取上清液于新 1.5 mL 离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 轻轻混匀, -20 ℃ 静置 30 min; 4 ℃ 离心 15 min (12 000 r·min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 加入预冷的 75% 乙醇 (用 DEPC 处理过的水配制) 1 mL, 清洗沉淀; 4 ℃ 离心 5 min (8 000 r·min⁻¹), 用移液枪弃去上清液, 冰上干燥 5~10 min; 加入 Rnase free 水溶液 50 μL 溶解, 置于 -80 ℃ 冰箱中备用。

2.2 RNA 质量检测

2.2.1 RNA 浓度检测 取 RNA 样品 1 μL, 用核酸蛋白定量仪测量 RNA 样品浓度和吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{280\text{ nm}}$ 及 $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{230\text{ nm}}$, 并计算得率。

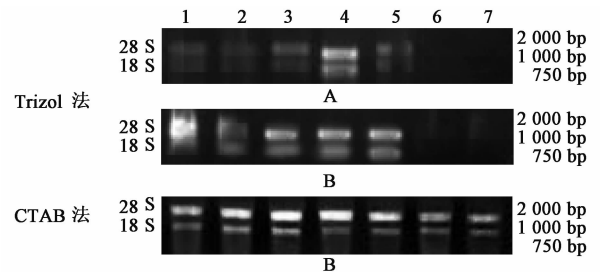
2.2.2 琼脂糖凝胶电泳 取 RNA 样品 3 μL, 用经 EB 染色的 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min, Syngene 型凝胶成像系统检测并照相。

2.3 cDNA 反转录 cDNA 第一链合成参照天根生化科技 (北京) 有限公司 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒操作说明书进行。

2.4 山楂果实 Actin 基因 PCR 扩增检测 根据山楂果实 Actin 基因序列 (Actin 基因为本实验室自行筛选) 设计引物。上游引物为 5'-CGAGGACGGGTAGATTCAGA-3', 下游引物为 5'-AAAGATTAGGCAAGCGGAGGAT-3'。PCR 反应使用 TAKARA Taq™ [TAKARA Biotechnology (DALIAN) CO., LTD] 试剂盒, 反应体系为 10 μL, 具体如下: 10×buffer 1 μL, dNTP Mix 0.4 μL, 正反引物 (10 mmol·L⁻¹) 各 0.1 μL, rTaq 酶 0.08 μL, 加 ddH₂O 至 10 μL, 混匀离心后扩增。PCR 扩增程序为: 94 ℃ 变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μL, 用 1% 琼脂糖凝胶在 200 V 条件下电泳 20 min, 采用 Syngene 型凝胶成像系统检测并照相。

3 结果

3.1 4 种方法提取山楂果实总 RNA 质量比较 4 种方法提取山楂果实总 RNA 质量检测结果及琼脂糖凝胶电泳结果如图 1, 表 2 所示。改良 CTAB 法提取的不同发育期山楂果实 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{280\text{ nm}}$ 均在 2.0 左右, $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{230\text{ nm}}$ 在 1.8 左右; RNA 样品 28 S 和 18 S 条带清晰完整, 说明该法能得到质量较好的 RNA, 纯度较高。采用常规 Trizol 法和改良 Trizol 法提取 RNA, 前 5 个发育期样本可以观察到 28 S 和 18 S 条带, 座果后 130 d 和座果后 148 d 果实几乎看不到条带。此外, 经典 CTAB 法提取的 RNA 样品, 电泳结果显示无条带, 核酸蛋白定量仪测定结果显示 $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{230\text{ nm}}$ 均 < 0.5。因此本研究选择改良 CTAB 法作为不同发育期山楂果实的总 RNA 提取的基本方法。



A. 未改良方法; B. 改良方法; CTAB 未改良法电泳无条带

图 1 4 种方法提取山楂果实总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoretic effect on agarose gel for RNA from *Crataegi Fructus* by four different methods

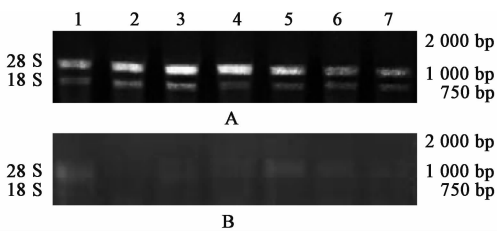
3.2 山梨醇预处理液浓度考察 本研究进一步考察了不同浓度山梨醇预处理液对山楂果实总 RNA 提取的影响 (图 2)。采用改良 CTAB 法, 不加山梨醇预处理液电泳图上看不到条带; 当山梨醇浓度为

表 2 4 种方法提取山楂果实总 RNA 质量检测

Table 2 Purity and yield of RNA extracted with four different methods from *Crataegi Fructus*

提取方法	No.	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Trizol	1	1.24	1.12	413.13
	2	1.35	0.84	377.90
	3	1.15	0.61	204.10
	4	1.5	0.17	47.42
	5	1.51	0.35	126.64
	6	2.12	0.09	37.57
	7	1.38	0.17	74.89
改良 Trizol	1	1.83	1.12	90.76
	2	1.97	1.89	58.75
	3	1.94	0.94	57.65
	4	1.93	1.42	162.33
	5	2.05	1.99	69.59
	6	2.04	0.30	2.06
	7	0.74	-	0.49
经典 CTAB	1	2.18	0.22	5.13
	2	1.44	0.18	4.67
	3	3.29	0.15	1.58
	4	1.8	0.24	8.04
	5	1.25	0.37	5.23
	6	1.01	0.27	2.27
	7	2.46	0.47	6.76
改良 CTAB	1	2.23	1.96	58.21
	2	2.19	1.73	34.33
	3	2.12	1.88	48.94
	4	2.05	1.87	54.59
	5	2.04	1.83	39.62
	6	1.98	1.80	46.58
	7	2.02	1.89	35.67

1.1 mol·L⁻¹时,28 S 和 18 S 条带清晰,且各样本间 RNA 整齐一致;但采用浓度为 3 mol·L⁻¹山梨醇预处理后,仅见微弱的 28 S 和 18 S 条带。



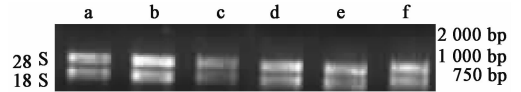
A. 1.1 mol·L⁻¹山梨醇预处理液;B. 3 mol·L⁻¹山梨醇预处理液

图 2 不同浓度山梨醇预处理液的提取效果

Fig. 2 Electrophoretic effect on agarose gel pretreated with sorbitol of different concentrations

3.3 重复性考察 取“座果后 103 d”的山楂样本,平行取该样品粉末 6 份,按照 2.1.4 项下方法操作。结果表明所有 RNA 样品 28 S,18 S 条带完整(图 3),说明改良 CTAB 法提取山楂果实总 RNA 具有很好的重复性。

3.4 不同发育期山楂果实总 RNA 的提取 使用改

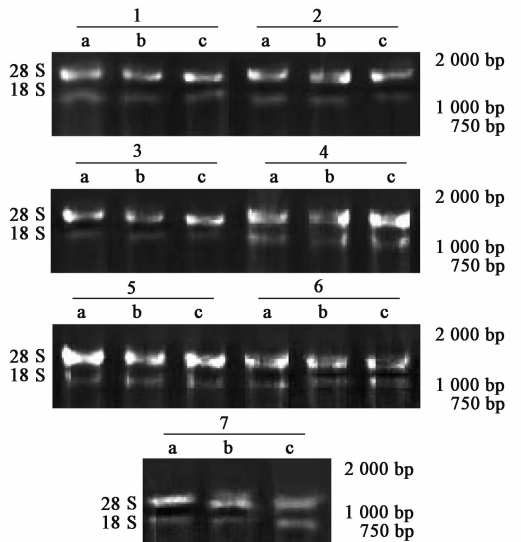


a,b,c,d,e,f. 平行的 6 份 RNA 样品

图 3 重复性考察电泳

Fig. 3 Electrophoretic effect on agarose gel for repeatability study

良 CTAB 法 + 山梨醇预处理分别对山楂果实各个发育期的不同样本(每个发育期选取 3 个样本)进行 RNA 提取(图 4)。所有 RNA 样品 28 S,18 S 条带完整,说明改良 CTAB 法可以提取不同发育期山楂果实总 RNA,且 RNA 有较高的质量。



a,b,c 分别代表各个发育期山楂果实的不同样本(图 5 同)

图 4 改良 CTAB 法提取不同发育期山楂果实总 RNA 的电泳

Fig. 4 Electrophoretic effect for RNA with modified CTAB method from *Crataegi Fructus* at different stages

3.5 RT-PCR 扩增检测分析 为检测改良 CTAB 法提取 RNA 的质量,以 3.4 项下 RNA 为模板反转录得到 cDNA,以山楂果实 Actin 基因序列设计引物,进行 PCR 扩增,检测总 RNA 的完整性。检测结果表明,扩增片段大小为 152 bp 与设计引物的预期产物片段大小一致,说明采用本研究建立的方法提取总 RNA 完全能满足山楂果实后续的基因克隆等分子生物学实验要求。见图 5。

4 讨论

植物中多糖、多酚等次生代谢产物会影响 RNA 的提取,在完整的组织细胞内,这些物质在空间上是与核酸分离的,但当组织被研磨、细胞被破碎后,这些物质就会与 RNA 相互作用。酚类化合物极易被氧化,其氧化产物可以与 RNA 进行不可逆地结合,导致 RNA 活性丧失;而多糖可以与 RNA 结合形成难溶的胶状物,与 RNA 共沉淀下来^[2],致使溶解产物时耗时

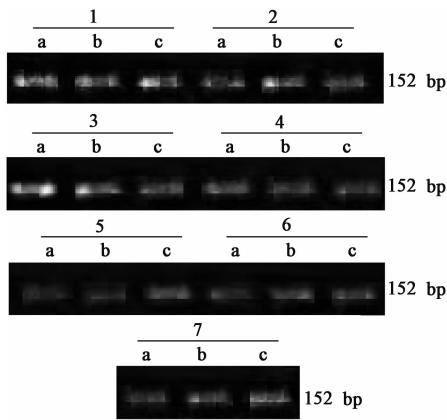


图 5 不同发育期山楂果实总 RNA 反转录 PCR 扩增
Fig. 5 Electrophoretic effect for RT-PCR from *Crataegi Fructus* at different stages

费力,也严重影响后续反转录、基因克隆等实验的结果。本文对山楂果实不同发育期样品的糖类成分进行了检测,在果实发育前期(“座果”-“座果后 103 d”),样品中多糖质量分数 < 10%;在果实即将成熟阶段,样品中含糖量快速上升,“座果后 115 d”多糖质量分数增加到 10%，“座果后 148 d”多糖质量分数 > 15%。说明山楂果实不同发育期多糖等代谢产物变化显著,影响了 RNA 的提取。

作为一种常用的 RNA 提取方法,Trizol 法成功应用于多种植物总 RNA 的提取^[6],但对果实、根等植物组织 RNA 提取效果并不理想,本研究结果显示,虽然 Trizol 法提取的 RNA 得率较高,但在电泳图上几乎没有条带,说明该方法提取的 RNA 纯度较差,鉴于提取过程中其沉淀呈黏稠状难于溶解,推测所提取的 RNA 可能与大量多糖等物质共存,结果假阳性偏高,不适用于不同发育期山楂果实总 RNA 的提取。

文献报道对经典 CTAB 法进行适当改良可以取得比 Trizol 法和经典 CTAB 法更好的 RNA 提取效果^[2,7]。作为一种渗透压稳定剂,亲水性很强的糖醇山梨醇已应用于富含多糖、多酚等次生代谢产物的植物组织总 RNA 的提取中^[8]。研究表明,在 RNA 提取过程中,以适宜浓度的山梨醇预处理液对样品进行清洗,有利于 RNA 的提取;山梨醇浓度太高会使细胞皱缩,不利于细胞破壁和裂解,反而降低 RNA 的得率。与经典 CTAB 法相比,本研究在加入 CTAB 提取缓冲液之前,先加入 $1.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山梨醇预处理液对样品进行清洗,去除了样品中的漂浮物,部分色素、多糖、多酚等次生代谢产物,同时使细胞膨大,利于加入 CTAB 提取缓冲液之后 RNA 的释

放。另外,在使用苯酚-三氯甲烷-异戊醇抽提前加入适量 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 能有效去除多糖等次生代谢产物^[8];使用苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)抽提可有效去除多酚类及蛋白等次生代谢产物;在沉淀步骤中,以异丙醇代替 LiCl 可改善沉淀效果,且大大缩短 RNA 提取时间。

此外乔燕春等^[9]比较了改良 Trizol 法和改良热硼酸法对山楂果实不同组织的提取效果,表明改良热硼酸法从山楂果肉、种核、种子 3 种组织中均可提取到高质量的 RNA。但其与本研究所提方法相比,材料用量大,需 3~5 g,且操作步骤比较多,一次完整的 RNA 提取需要 2 d 才能完成。

综上所述,本文所建立的改良 CTAB 法能从不同发育期的山楂果实中提取质量良好的 RNA,材料用量小,耗时短,且很好的去除了果实中多糖、多酚等杂质,可用于进一步的分子生物学研究,为开展山楂果实分子水平的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 黄璐琦,崔光红. 分子生药学[M]. 2 版. 北京:北京中医药大学出版社, 2006: 86.
- [2] 程小丽,魏胜利,刘春生,等. 大黄总 RNA 提取方法的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(5): 1214-1216.
- [3] 张晓丽,代红军. 植物 RNA 提取方法的研究进展[J]. 北方园艺, 2014(8):175-178.
- [4] Wu J Qi, Peng W, Qin R X, et al. *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology, and potential applications [J]. Molecules, 2014, 19(2): 1685-1712.
- [5] Liu P Z, Kallio H K, Lv D G, et al. Acids, sugars, and sugar alcohols in Chinese hawthorn (*Crataegus spp.*) Fruits [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(2): 1012-1019.
- [6] 陈静,高飞,周宜君,等. 改良 Trizol 法提取高质量蒙古沙冬青总 RNA[J]. 生物技术通报, 2013, (10): 87-92.
- [7] 郭秀莲,张正银,田萍,等. 杜鹃花叶片总 RNA 的改良 CTAB 法提取[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 29-31.
- [8] 徐秋红,章镇,佟兆国,等. 山梨醇对李果肉组织总 RNA 提取的影响[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2): 390-394.
- [9] 乔燕春,吕德国,郭栋梁,等. 山楂果实不同组织 RNA 提取方法比较及 cDNA-SRAP 分析体系的建立[J]. 果树学报, 2009, 26(6): 915-919.

[责任编辑 邹晓翠]