

累,导致多糖和蛋白质的量相应增加,试管苗生长代谢活动旺盛,生活力强。而生长8个月以后的试管苗,由于生物量积累速率减小,加之分蘖小苗需要消耗营养,所以生长后期试管苗多糖和蛋白质的量有所减少。从生物量积累、多糖的量、可溶性蛋白质的量、试管苗活力和生产成本等几个方面综合考虑,环草石斛成熟的种子播种后,生长8~10个月时的试管苗出瓶移栽较为合适。

3.4 试管苗的质量关系到移栽成活率、苗生长的好坏及最终药材的产量和质量,直接影响经济效益,所以进行种苗分级标准的研究非常有必要。环草石斛种子播种后,生长8~10个月时即可出瓶移栽,此时试管苗大小不等,分级后再利用能够切实保证种苗的质量。以苗高、茎粗和根数作为分级指标,将试管苗分为3个等级:1级苗苗高5 cm,茎粗0.25 cm,根数3条;2级苗苗高3 cm且<5 cm,茎

粗0.2 cm,根数2条;3级试管苗苗高2 cm且<3 cm,茎粗<0.2 cm,根数<2条。分级时,如果2项指标符合要求,而其中1项不符合者,作为下一等级苗处理。未达到3级标准的试管苗,生活力强的继续转接培养,而小老苗、畸形苗、黄化苗、霉污苗等丢弃、销毁,不使用。

参考文献:

- [1] 李凤华,宋锡全,王承录,等.贵州几种野生石斛的引种栽培和繁殖技术[J].贵州师范大学学报,2002,20(3):5-8.
- [2] 卢文芸,张宇斌,唐金刚,等.环草石斛快速繁殖研究[J].贵州师范大学学报,2004,22(4):15-18.
- [3] 毛堂芬,刘作易,金家兴,等.环草石斛试管苗壮苗培养的研究[J].种子,2005,24(6):21-22,44.
- [4] 乙引,张宇斌.粉花石斛的组织培养和植株再生[J].植物生理学报,2004,40(1):64.
- [5] 毛秀华,金家兴,刘作易,等.环草石斛种子萌发培养的研究[J].贵州农业科学,2004,32(3):48-49.
- [6] 李满飞,徐国钧,平田义正,等.中药石斛类多糖的含量测定[J].中草药,1990,21(10):10-12.

柴胡药材干根DNA提取及RAPD分析

南晓洁¹,郝媛媛²,赵良贵^{2*},韩榕¹,秦雪梅²

(1. 山西师范大学生命科学学院,山西 临汾 041004; 2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室,山西 太原 030006)

摘要:目的 探索一种适用于柴胡药材干根DNA提取的方法,为实现以分子标记方法辨别柴胡药材奠定基础。方法 比较研究了分别用CTAB法、SDS法和高盐低pH法等3种方法提取柴胡样品基因组DNA。柴胡药材干根经过PVP以及TNE缓冲液进行不同的预处理,以CTAB法抽提DNA。以EcoR / Mse双酶切琼脂糖凝胶电泳及RAPD扩增检测提取DNA的质量。采用NTSYS-pc软件计算Jaccard遗传相似系数,以非加权配对算术平均数法(UPGMA)建立聚类图。结果 常规DNA提取方法提取药材干根DNA溶液经4放置后,黏稠并褐变,严重影响酶切和RAPD扩增。样品预处理优化条件是研磨时加入3% PVP, TNE缓冲液于0浸提2次,每次30 min。以该优化的预处理方法处理6个柴胡药材干根样品,提取DNA条带清晰,酶切完全, RAPD扩增图谱清晰稳定,共获得有效扩增条带28条,其中多态性条带为20条,占71.43%。聚类分析表明,6个栽培品中,原产地为山西灵丘外地引种(LQWY)和甘肃陇西(LX)、山西灵丘(LQ)和山西方山(FSH)的亲缘关系较近,陕西商洛(SHL)和其他5个栽培品的亲缘关系较远。结论 柴胡药材干根经过预处理后,可采用常规的DNA提取方法抽提DNA,所提DNA适合于酶切、RAPD等分子标记分析。

关键词:柴胡;干根;DNA;RAPD

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)03-0447-05

Genomic DNA extraction and RAPD analysis from dried roots of *Bupleurum chinense*

NAN Xiao-jie¹, HAO Yuan-yuan², ZHAO Gen-gui², HAN Rong¹, QIN Xue-mei²

(1. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China; 2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: **Objective** To study the genomic DNA extraction from the dried roots of *Bupleurum*

* 收稿日期:2008-05-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570174)

作者简介:南晓洁(1983—),女,山西省大同市人,在读硕士研究生,从事植物学研究工作。E-mail: nanxiaojie @163.com

*通讯作者 赵良贵 Tel:(0351)7011499 E-mail: chungui @sxu.edu.cn

chinense. **Methods** Genomic DNA was extracted from the dried roots of *B. chinense* by means of three methods of routine CTAB, SDS, and low pH extraction medium with high salt. Based on CTAB method, the pretreatment of samples was modified by adding PVP to grind and TNE buffer to pre-extract. The DNA samples were analyzed by restriction *EcoR* / *Mse* double enzyme digestion, agarose gel electrophoresis, and RAPD amplification. The Jaccard coefficient was worked out by NTSYS-pc software, and a cluster dendrogram of six samples was established based on UPGMA. **Results** The DNA could be extracted, but not be completely restricted and effectively amplified, the solution of the DNA became ropy and brown by stored up at 4 °C, which was extracted from the dried roots by routine DNA extraction methods. After the samples of the dried roots were pretreated by PVP and TNE buffer, the DNA extracted by CTAB method could be completely restricted and effectively amplified. The pretreatment process was that samples of the dried roots were ground with 3 % PVP and then extracted with TNE buffer twice at 0 °C, each 30 min. The DNA extracted with the modified method from the six dried roots samples could be digested completely by restriction endonuclease. Moreover, the fingerprints were clear and stable by RAPD with three selected primers. A total of 28 bands were amplified, among which 20 bands were polymorphic, accounting for 71.43 %. The cluster analysis indicated that there was closer genetic relationship between LQWY and LX, LQ and FSH cultivars of *B. chinense*, respectively. The relationship of cultivar SHL was far from these of other five cultivars. **Conclusion** The DNA extracted by routine DNA extraction methods could be completely restricted and effectively amplified after the samples of the dried roots are pretreated by PVP and TNE buffer.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; dried roots; genomic DNA; RAPD

《中国药典》(2005 年版) 收载柴胡药材仅有柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzoneriifolium* Willd. 2 种植物, 而混用品种则有十余个, 仅通过性状、显微及理化鉴别方法较难鉴别各品种药材。分子标记技术广泛应用于中药资源遗传分析, 使药材鉴别成为可能。已有关于柴胡 ITS 序列^[1,2] 及 RAPD 分析^[3,4] 等遗传多样性的报道, 但供试材料均是柴胡幼嫩组织, 而对于含有大量次生代谢产物的药材干根, 经过加工、炮制、贮藏, 采用常规 DNA 提取方法提取药材干根 DNA 溶液黏稠并褐变, 严重影响酶切和 RAPD 扩增。虽然在上述方法基础上也有许多关于药材干根 DNA 改进方法的报道^[5~7], 但解决该问题尚未形成完整的思路。所以, 针对不同药材进行 DNA 提取方法的摸索是很有必要的。因此本实验探索适合于柴胡干根 DNA 提取方法并进行 RAPD 分析, 为柴胡药材辨别真伪奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂: 6 个栽培品种柴胡 *B. chinense* DC. 为两年以上生干燥根, 晾干或晒干, 采自山西陵川中药材规范化种植基地, 见表 1。DNA/ *Hind* III 酶切 Marker, Promega; 聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone K30, PVP K30)、十二烷基硫酸钠

表 1 供试样品材料

Table 1 Plant materials tested

序号	原产地	简称	种源
01	山西灵丘	LQWY	外地引种
02	山西灵丘	LQ	灵丘
03	山西陵川	LCH	陵川
04	山西方山	FSH	陵川
05	甘肃陇西	LX	不明
06	陕西商洛	SHL	不明

(sodium dedecyl sulfate, SDS), 上海生工生物工程有限公司; γ -巯基乙醇 (γ -mercaptoethanol), 美国 BBI; 十六烷基三乙基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、Tris、乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、无水乙醇、异丙醇和石英砂等均为国产分析纯试剂。

1.2 柴胡干根 DNA 的提取及酶切检测: 分别采用 CTAB 法^[8]、SDS 法^[9] 和高盐低 pH 法^[10] (图中分别简称为 CTAB、SDS、HSLpH) 提取样品 DNA。选用序号为 01 的柴胡干根, 用无菌手术刀片刮弃表皮, 剪碎混合称质量, 每份 0.08 g, 置于灭菌研钵中, 加入 2 倍质量的石英砂, 于冰浴快速研磨。用琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量并用限制性内切酶 *EcoR* 和 *Mse* (购自 MBI 公司) 进行双酶切检测, 酶切反应在 20 μ L 体系中进行, 其中含 4 μ L

50 ng/ μ L DNA 模板; 10 \times Buffer Tango™ (含 BSA) 4 μ L; *EcoR* (10 U/ μ L) 0.4 μ L; *Mse* (10 U/ μ L) 0.4 μ L; ddH₂O 补足。酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h, 65 $^{\circ}$ C 温育 3 h, 80 $^{\circ}$ C 处理 20 min, 1.4 % 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3 柴胡干根提取方法的优化: 样品预处理方法的优化, (1) 将除去表皮的柴胡干根样品剪碎, 每份称取 0.08 g, 分别置于含有一定量石英砂、灭菌、冰浴冷却的研钵中, 分别加入 CTAB 法抽提液体积 0、1 %、2 %、3 % (W/V) PVP 粉末, 冰浴快速研磨, 分别转入 2 mL 离心管中, 然后加入 1 mL CTAB 抽提液, 按 CTAB 法^[8]提取 DNA。(2) 在选定 PVP 加入量的条件下研磨样品, 转入 2 mL 离心管中, 加入 1.5 mL TNE 缓冲液 (即 100 mmol/L Tris、0.15 mol/L NaCl 和 20 mmol/L EDTA) 分别以不同温度和不同的浸提次数进行样品预处理, 每次 30 min, 温度分别设置为 0、25、37、65 $^{\circ}$ C, 提取次数分别为 1~3 次, TNE 缓冲液事先预温至相应温度, 然后按 CTAB 法^[8]提取 DNA。并设计对照试验, 即用 PVP 研磨样品后直接用 CTAB^[8]法提取 DNA。将选择的条件应用于 6 个柴胡干根样品 DNA 的提取。

1.4 柴胡样品 DNA 的检测: 将提取的 DNA 以 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测和限制性内切酶 *EcoR* / *Mse* 酶切, 酶切产物以 1.4 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 SYNGENE (GDS-8000, 英国) 凝胶成像系统观察、拍照。

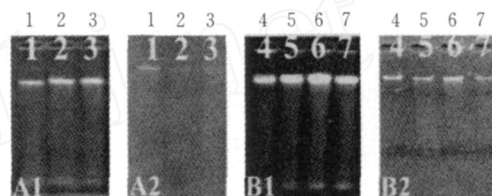
1.5 柴胡干根样品 RAPD 分析: 用优化的 CTAB 法提取 6 种柴胡干根基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 引物、扩增体系和反应程序按照文献方法进行 RAPD 分析^[3,11], 所选引物编号分别为 OPC-2、OPC-7、OPD-8 和 OPD-11 (由北京奥科生物技术公司合成), 扩增产物用 2.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 数据处理: 每个样品的扩增带按有 (1) 或无 (0) 记录, 从而得到原始数据矩阵, 计算多态性条带比率, 用 NTSYS-pc 软件计算各栽培品种间的 Jaccard 遗传相似系数, 按非加权配对算术平均法 (UPGMA) 建立各栽培品种间的聚类图。

2 结果与分析

2.1 柴胡干根 DNA 提取及检测: 分别以常规 CTAB 法、SDS 法和高盐低 pH 法提取柴胡干根 DNA, 该 3 种方法所提 DNA 溶液颜色深浅不一,

CTAB 法和 SDS 法所提 DNA 为浅黄色, 高盐低 pH 法为深黄色。对提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 3 种方法均能提出样品 DNA, 并呈一条明亮条带 (图 1-A1), 但提取的 DNA 经 *EcoR* / *Mse* 双酶切均不能被酶切 (图 1-A2)。经 4 $^{\circ}$ C 放置后, DNA 溶液均产生不同程度的黏稠, 颜色变深, 甚至呈褐色, 均不能被酶切和 PCR 扩增。由于 3 种方法均能提出样品 DNA, 因此, 选择 CTAB 法并进行柴胡干根 DNA 提取方法的优化。



1-CTAB 2-SDS 3-HSLpH 4-0 PVP
5-1 % PVP 6-2 % PVP 7-3 % PVP
3 种提取方法 (A1) 及其 *EcoR* / *Mse* 双酶切 (A2)
研磨时加入 PVP 的浓度 (B1) 及其 DNA 双酶切 (B2)
Methods of DNA extraction (A1) and fragments of enzyme
digestion of DNA (A2); Concentration of PVP (B1)
and fragments of enzyme digestion of DNA (B2)

图 1 柴胡干根 DNA 的提取及 *EcoR* / *Mse* 酶切

Fig. 1 Extraction of DNA from *B. chinense* dried roots and enzyme digestion by *EcoR* / *Mse*

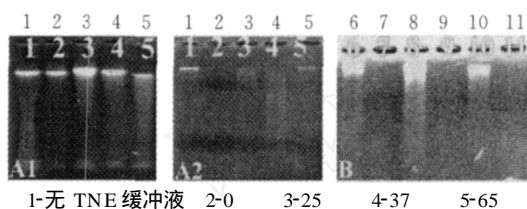
2.2 DNA 提取方法的优化

2.2.1 PVP 添加量对 DNA 提取的影响: 在研磨时分别加入 1 %、2 % 和 3 % PVP, 经 CTAB 法提取 DNA, 与未加 PVP 相比, 不同 PVP 添加量所提 DNA 基本无色, 而前者呈浅黄色。DNA 电泳检测, 结果表明: 添加不同量的 PVP, DNA 带型均呈单一主条带, 亮度基本一致 (图 1-B1), 但均不能被 *EcoR* / *Mse* 酶切完全 (图 1-B2)。经 4 $^{\circ}$ C 放置后, DNA 溶液均有不同程度的黏稠现象, 而 3 % PVP 呈颜色最浅, 因此, 选择 3 % PVP, 但是还需要进一步对样品中的代谢产物进行处理。

2.2.2 TNE 缓冲液浸提温度对提取 DNA 的影响: 选择 3 % PVP 研磨材料后, 以 TNE 缓冲液在不同温度下浸提 30 min, 然后经 CTAB 法提取 DNA, 检测结果表明, 在 4 个浸提温度下, DNA 带型均有一亮带 (图 2-A1), 但于 65 $^{\circ}$ C 浸提所提的 DNA 条带较暗, DNA 损失严重, 而在 25、37、65 $^{\circ}$ C 浸提所得 DNA 不能完全酶切, 0 $^{\circ}$ C 酶切充分 (图 2-A2), 故选择 0 $^{\circ}$ C 为最适浸提温度, 在 4 $^{\circ}$ C 静置后 DNA 溶液

颜色均较淡,但 0 浸提所得 DNA 溶液黏度较高,因此又增加了 0 浸提次数。

2.2.3 TNE 缓冲液浸提次数对提取 DNA 的影响:在 0 下用 TNE 缓冲液对研磨材料浸提不同次数,每次 30 min,再经 CTAB 法提取 DNA,检测结果如图 2-B 所示,洗涤不同的次数,DNA 带型均有一亮带,均能被 *EcoR* / *Mse* 酶切,但浸提 2 次后,4 静置后 DNA 溶液颜色均无色,黏度明显降低,因此,选择 0 下用 TNE 缓冲液对研磨材料浸提 2 次。



1-无 TNE 缓冲液 2-0 3-25 4-37 5-65
6、8、10-不同浸提次数,分别为 1、2、3 次
7、9、11-分别为 6、8、10 的双酶切片断
不同浸提温度(A1)及其 DNA 双酶切(A2)
不同浸提次数及其提取 DNA 双酶切(B)

1-without TNE buffer 2-0 3-25 4-37 5-65
6,8, and 10-different times of pre-washing: once, twice, and thrice, respectively; 7,9, and 11-fragments of enzyme digestion of 6,8, and 10, respectively
Pretreating temperature of TNE buffer (A1) and fragments of enzyme digestion of DNA (A2); Different times of pre-washing and fragments of enzyme digestion of DNA (B)

图 2 TNE 缓冲液预处理对 DNA 提取及 *EcoR* / *Mse* 酶切的影响

Fig. 2 Effects of TNE buffer on DNA extracted and enzyme digestion by *EcoR* / *Mse*

2.3 柴胡干根样品 RAPD 分析:用该优化的方法提取编号为 01~06 号(表 1)的 6 个柴胡干根样品 DNA,DNA 检测如图 3 所示,该法所提 DNA 均呈单一明亮条带,所得 DNA 经 *EcoR* / *Mse* 双酶切,酶切充分。以所提 DNA 为模板,按文献选择引物进行 RAPD 检测^[3,11],结果见图 4。4 条引物中,3 条引物能够有效扩增(图 4-A、B、C),共扩增出 28 个条带,多态性条带为 20 条,占总扩增条带数的 71.43%。扩增片段主要分布在 200~2 000 bp,约 280 bp 均有一条明亮的主条带,DNA 指纹图谱可将柴胡 *B. chinense* DC. 6 个不同的栽培品种干根进行区分和鉴别,并与幼叶获得的 DNA 指纹图谱一致(文中没有显示)。

2.4 柴胡种质资源的聚类分析:以 Jaccard 相似性

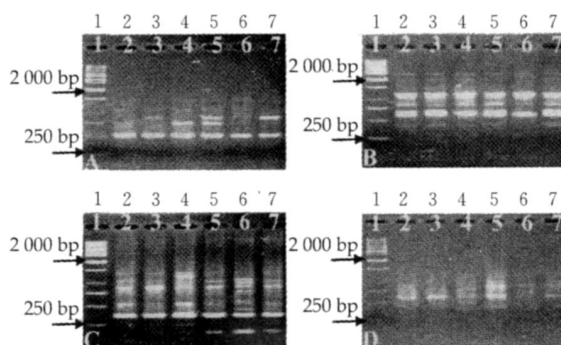
系数为依据,构建柴胡 6 个栽培品的聚类图(图 5)。由聚类图看出,6 个柴胡栽培品划分为明显的 3 个类群:类群 I 包括原产于山西灵丘(LQWY)和甘肃



M-λDNA/*Hind* III 酶切 Marker 1、3、5、7、9、11-01~06 号 6 个柴胡栽培品的干根 DNA 2、4、6、8、10、12-相应的双酶切片断
M-λDNA/*Hind* III Marker 1、3、5、7、9、11-genomic DNA of dried roots of six samples of *B. chinense* dried roots 2、4、6、8、10、12-fragments of double enzyme digestion

图 3 6 种柴胡干根 DNA 及 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切

Fig. 3 Extraction of DNA from six samples of *B. chinense* dried roots and enzyme digestion by *EcoR* I / *Mse* I



1-1 kb Ladder 2-7-01~06 号柴胡干根样品
1-1 kb Ladder 2-7-samples of 01 to 06 samples of *B. chinense* dried roots

图 4 引物 OPD-11(A)、OPC-7(B)、OPC-2(C)、OPD-8(D)对柴胡干根样品的 RAPD 扩增

Fig. 4 PCR Amplification of samples of *B. chinense* dried roots DNA by Primers OPD-11 (A), OPC-7 (B), OPC-2 (C), and OPD-8 (D)

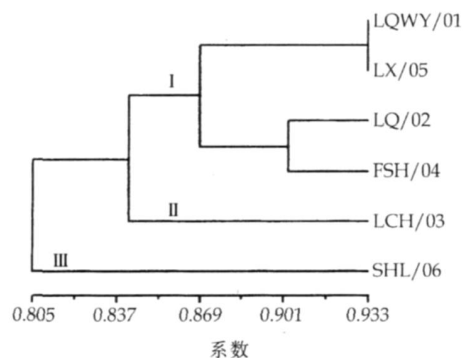


图 5 柴胡种质资源的 RAPD 聚类分析

Fig. 5 Dendrogram of RAPD cluster analysis for *B. chinense* germplasm

陇西(LX)的柴胡栽培品、原产于山西灵丘(LQ)和山西方山(FSH)的柴胡栽培品,前两者、后两者彼此首先聚在一起,表明亲缘关系较近;类群 为原产于山西陵川(LCH)的柴胡栽培品;与其他 5 个栽培品亲缘关系较远的陕西商洛(SHL)的柴胡栽培品单独聚为类群 。

3 讨论

高质量 DNA 的制备是开展分子生物学工作的基础。对于新鲜幼嫩的材料而言,植物基因组 DNA 的提取已有较为行之有效的方法,而中药材样品来源复杂,含有大量的多糖和多酚等次生代谢产物,严重影响 DNA 的提取质量。据文献报道^[5,6]:采用 CTAB 法、SDS 法、苯酚法、高盐低 pH 等方法提取不同药材干根的 DNA,所提 DNA 溶液黏稠、易褐变,酶切不完全,影响 PCR 扩增,导致 DNA 指纹图谱不一致,甚至不能扩增。在这些方法的基础上也有许多改进方法的报道^[5~7],已涉及黄连、石斛、西洋参、半夏、人参、三七等药材干根的 DNA 的提取,但解决该问题尚未形成完整的思路。因此,针对不同药材进行 DNA 提取方法的摸索是很有必要的。

针对柴胡而言,幼嫩的叶片和根等材料含次生代谢物较少,而药材干根中含有柴胡皂苷、多酚和多糖等多种次生代谢物,用常规方法在提取 DNA 过程中,次生代谢产物与 DNA 结合或残留在溶液中,影响所提 DNA 的双酶切和 PCR 扩增,4 静置黏稠呈胶状,氧化变色。因此针对这一问题,本研究通过以柴胡干根药材为材料,提出了含代谢产物量高的材料首先针对性地进行分离其代谢产物的思路,在该思路的指导下进行 DNA 的提取。本研究结合柴胡药材干根代谢产物丰富的特点,针对提取过程中多酚类物质与 DNA 结合并影响 DNA 质量的问题,首先在材料研磨时加入 PVP,它与多酚结合形成复合物可有效避免多酚物质的氧化及由多酚类化合物介导的 DNA 降解^[12]。而针对多糖会增加提取 DNA 黏稠度的现象,以 TNE 缓冲液浸提研磨后的样品并适当增加浸提次数,可有效地除去部分多酚和多糖等次生代谢物质,虽然提取 DNA 有损失,却明显提高了 DNA 的质量。但浸提温度较高时所得 DNA 质量较低,可能由于温度较高促使浸提液中的多酚等物质与核中的 DNA 结合。因此,本研究认为在样品研磨过程中加入 PVP 后,用 TNE 缓冲液浸提,减少了干扰 DNA 质量的物质。

本研究以琼脂糖凝胶电泳和双酶切为检测指标,柴胡药材干根样品预处理后经 CTAB 法提取获得了高质量的 DNA,优化的预处理条件为研磨材料时加入 3% PVP, TNE 缓冲液于 0 浸提 2 次,每次 30 min。以该方法提取了 6 个柴胡药材干根样品的 DNA,且酶切完全, RAPD 分析, 6 个北柴胡品种扩增图谱明显不同,多态性条带占 71.43%,条带清晰,多态性好,扩增结果与幼叶一致。因此,该法适合于柴胡干根材料基因组 DNA 的提取。DNA 提取前先进行预处理可最大程度地降低由大量次生代谢产物造成的对药用植物干组织 DNA 提取时的干扰,因而该法可广泛应用于含次生代谢产物量高的药用植物 DNA 的提取。

而从聚类结果来看,原产于山西陵川(LCH)和山西方山(FSH)的柴胡栽培品的种源都是陵川,但二者并没有聚到一起。原产于山西灵丘(LQWY 和 LQ)、方山(FSH)的栽培品聚为类群 ,亲缘关系较近,但同样原产于山西陵川(LCH)的栽培品单独聚为类群 ,而原产于陕西商洛(SHL)的栽培品单独聚为类群 ,由此看来,柴胡系统演化规律与其地理环境的相关性程度有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 谢晖,晁志,霍克克,等. 9 种柴胡属植物的核糖体 ITS 序列及其在药材鉴定中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1460-1463.
- [2] 武莹,刘春生,刘玉法,等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 732-734.
- [3] 梁之桃,秦民坚,王峥涛,等. 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药, 2002, 12(33): 1117-1119.
- [4] 王秀全,李玉新,李会成,等. 北柴胡种源地性的 RAPD 分析[J]. 中药材, 2003, 12(26): 855-856.
- [5] 王培训,黄丰,周联,等. 植物中药材总 DNA 提取方法的比较[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 18-22.
- [6] 陈大霞,李隆云,钱敏,等. 黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [7] Zeng J, Zou Y P, Bai J Y, et al. Preparation of total DNA from "Recalcitrant plant taxa" [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(6): 694-697.
- [8] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因和分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.
- [9] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 邹喻苹,汪小荃,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533.
- [11] 付杨,陈凤清,孙冬雪,等. 大叶柴胡愈伤组织继代培养及其 RAPD 分析[J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 2005, 37(2): 90-92.
- [12] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 1085.