



改良高盐高 pH 法提取大豆 DNA

杨学珍¹, 刘晓雪¹, 宋健², 乔虎平³, 邹娟⁴, 杨前玉⁵, 张帆², 王俊¹

(1. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025; 3. 百迈客生物科技有限公司, 北京 101300; 4. 湖北省农业科学院, 湖北 武汉 430064; 5. 湖北荃银高科种业有限公司, 湖北 荆州 434025)

摘要:大豆除了含有大量的脂类和蛋白质外, 还含有糖类和酚类物质, 为解决难于从大豆中提取高质量 DNA 和传统提取方法耗时长的的问题, 本研究以中豆 41 与天隆一号的幼嫩叶片(V3)和成熟种子作为材料, 对高盐低 pH 法进行改良, 提高其裂解液 pH 值, 同时结合冷冻裂解法缩短裂解时间, 使用不同 pH 值醋酸钠纯化 DNA, 并与经典 CTAB 法进行比较, 评价其提取 DNA 的效果及其应用范围。结果表明, 高盐高 pH 法对成熟种子的 DNA 提取效率较高, 且蛋白与 RNA 污染少。CTAB 法提取的 DNA 虽然完整性较高, 但是耗时较长, 蛋白与 RNA 污染较多。另外, 高盐高 pH 法提取的 DNA PCR 扩增条带清晰, 与常规 CTAB 法提取 DNA 扩增效果一致, 但其 DNA 质量不能满足高通量测序要求。综上, 改良的高盐高 pH 法是一种快速有效的大豆 DNA 提取方法, 可满足常规分子试验的要求。

关键词:大豆; DNA 提取; 高盐高 pH; CTAB

Extraction of Soybean DNA by Improved High Salt and High pH Method

YANG Xue-zhen¹, LIU Xiao-xue¹, SONG Jian², QIAO Hu-ping³, ZOU Juan⁴, YANG Qian-yu⁵, ZHANG Fan², WANG Jun¹

(1. College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. Biomarker Technologies, Beijing 103100, China; 4. Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 5. Hubei Win All Hi Technology Seed Industry Co., Ltd., Jingzhou 434025, China)

Abstract: Soybean contains substantial amount of protein and lipids, and sugar and phenols as well, which made the nucleic acid (DNA/RNA) extraction rather difficult and traditional DNA extraction methods are tedious and time-consuming. In the present study, high salinity and low pH methods was improved by elevating the pH value of lysis solution using mature seeds and leaves of Zhongdou 41 and Tianlong 1, respectively. The extraction process was shorten by the application of repeated freeze pyrolysis and DNA was purified by acetate sodium of distinct pH. The improved high salinity and high pH method was then evaluated in terms of effect, efficiency, and application scope in comparison with CTAB method. Results showed that the DNA extraction efficiency of high salinity and high pH method from seeds was significantly higher than CTAB with less contamination of protein and RNA residuals, but with less DNA integrity. Whereas, the CTAB yielded DNA with relatively higher DNA integrity but with more contamination and slower extraction speed. Besides, during the PCR amplification, the DNA extracted by high salinity and high pH showed clearly bands, which was similar with that by CTAB, however, which can not meet the standard of high throughput sequencing. The improved DNA extraction method was suitable for rapid DNA extraction in soybean, which could meet the demand of daily-use molecular experiments.

Keywords: Soybean; DNA extraction; High salt and high pH; CTAB

DNA 是遗传信息的载体, 是分子生物学研究的主要对象^[1]。植物 DNA 的提取在植物基因工程以及植物分子生物学研究中占有重要地位, DNA 的提取效率, 尤其是 DNA 的纯度会对试验结果产生严重影响^[2]。植物 DNA 提取已经成为一种非常成熟的技术, 但是不同的 DNA 提取方法在不同植物中提取效果不同, 比如大豆 DNA 提取过程中常常有蛋白质、糖类和其它物质的污染, 对研究结果造成不同程度的影响。

在大豆基因工程及分子生物学研究中, 不同研究方法对 DNA 的纯度和完整性要求不同, 比如在

PCR 扩增和聚丙烯凝胶电泳时对 DNA 纯度要求较低, 但在全基因组测序时对 DNA 纯度和完整性要求极高, 所以在不同的研究中选取适合的 DNA 提取方法有助于缩短试验时间, 提高试验效率。

大豆 DNA 提取方法较多, 比如高盐低 pH 值法、SDS 法和 CTAB 法等。DNA 提取的主要思路都是用去污剂将细胞壁、细胞膜及核膜破裂后, 用化学剂将蛋白质及多糖沉淀去除, 最后沉淀纯化 DNA^[3]。不同方法提取的 DNA 质量不同, 如果要得到高质量的 DNA, 首先要保证它的完整性, 避免其在提取过程中的降解, 其次要去除 RNA、多酚、多糖

收稿日期: 2019-12-16

基金项目: 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金(KF201808, KF201910)。

第一作者简介: 杨学珍(1994-), 女, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 1608355376@qq.com。

通讯作者: 王俊(1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 1608355376@qq.com。

及蛋白质的污染。

CTAB 法是最经典的 DNA 提取方法之一,提取的大豆 DNA 完整性和纯度都较高,但是此方法借助水浴加热裂解细胞壁,需要消耗大量的时间,去除 RNA 时也需要 RNase 辅助去除。在 PCR 扩增、PAGE 胶检测等常规分子试验中,花费太多的时间去提取 DNA 会延长试验周期。本研究对高盐低 pH 法进行改良,同时与经典的 CTAB 法进行比较。在高盐高 pH 提取 DNA 过程中用冻融法代替水浴加热裂解细胞壁,采用 pH 较高的裂解液使 RNA 在裂解过程中降解,又使用不同 pH 的醋酸钠纯化 DNA。本研究在 DNA 提取过程中能够节省较多时间,对加快试验进程、促进后续试验完成具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为中豆 41 和天隆一号,为中国农业科学院油料作物研究所提供。

1.2 主要试剂和仪器

六水合氯化镁、蔗糖、EDTA·2Na(乙二胺四乙酸二钠)购自国药集团化学试剂有限公司;氯化钾、无水醋酸钠购自西陇科学股份有限公司;Tris-base(三羟甲基氨基甲烷)购自湖北康迪斯化工有限公司;酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)和无水乙醇购自天津市天力化学试剂有限公司;10 × Easy Taq Buffer(含 MgCl₂)、High pure dNTPs(2.5 mmol·μL⁻¹)、Taq 聚合酶(5 U·μL⁻¹)、6 × Loading buffer 购自全式金生物技术有限公司。

主要仪器包括 Eppendorf 高速冷冻离心机(5430 R, Eppendorf 公司,德国);微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo Scientific, 美国);恒温数显水浴锅(HH-ZK8, 巩义市予华仪器有限责任公司);天平(FA1004, 天马衡基仪器有限公司);琼脂糖电泳仪(JY600C, 北京君意东方电泳设备有限公司);凝胶成像系统(JS680D, 上海元莘生物医药科技有限公司);高通量多样品组织研磨仪(xianou-24, 南京先欧仪器制造有限公司);梯度 PCR 仪(T100, Bio-rad 伯乐, 美国);磨豆机(MDJ-D4072, 小熊电器股份有限公司)。

1.3 试验设计

2019 年将大豆籽粒种植于长江大学农学院作物学田间试验中心(30°36'N, 112°15'E), 采集 V3 时期的幼嫩叶片, 称取 50 mg 大豆幼嫩叶片, 放入装有 1 粒 0.5 cm 直径钢珠的 2 mL 离心管中, 液氮速冻后用高通量研磨仪打碎, -80 °C 保存。选取干燥的大豆种子, 磨豆机打碎, 过 60 目筛后称取 50 mg

豆粉, 常温保存。

分别采用高盐高 pH 法与 CTAB 法提取中豆 41 和天隆一号叶片和籽粒的全基因组 DNA, 每种方法 3 次重复。

1.4 方法

1.4.1 高盐高 pH 法 高盐高 pH 提取液: 0.35 mol·L⁻¹ MgCl₂·6H₂O、4 mol·L⁻¹ KCl、2 mol·L⁻¹ C₁₂H₂₂O₁₁、2 mol·L⁻¹ Tris-base、0.25 mol·L⁻¹ EDTA·2Na, pH9.0。

醋酸钠: 3 mol·L⁻¹, 分别为 pH5.2 和 pH5.6。

破碎细胞壁: 在装有豆粉或者叶片的离心管中加入 900 μL 的高盐高 pH 提取液, 上下颠倒混匀后加入 2% 的 β-巯基乙醇, 液氮速冻后剧烈震荡至完全融化, 3 次重复, 使其充分释放 DNA。

去除酚类杂质: 加入 700 μL 的酚氯仿异戊醇(25:24:1), 震荡后静置分层, 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min。

去除蛋白等杂质: 吸取上清, 加入 500 μL 的氯仿异戊醇(24:1), 震荡后静置分层, 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min。重复此步骤一次。

沉淀核酸: 取上清, 加入 1/10 体积的醋酸钠(3 mol·L⁻¹, pH5.2), 混匀, 加入 2.5 倍溶液体积的无水乙醇(可提前放置于 -80 °C 预冷 1 h 以上), 混匀, 静置 5 min。

去除 RNA: 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清(RNA), 保留沉淀。

纯化 DNA: 加入 0.5 mL 醋酸钠(3 mol·L⁻¹, pH5.6), 溶解沉淀 5 min, 可用移液器吹打助溶, 然后 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。

沉淀 DNA: 将上清转入 2 mL 离心管, 加入 3 倍体积预冷的无水乙醇, 静置 5 min, 待 DNA 充分沉淀后, 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。

弃上清, 用 75% 乙醇洗涤 DNA 2 次, 通风橱内风干 10 min, 加入 100 μL ddH₂O 溶解沉淀, 并用 1% 琼脂糖凝胶检测。

1.4.2 CTAB 法 参照王关林等^[4]方法。配置提取缓冲液 0.2 g·L⁻¹ CTAB、1.4 mol·L⁻¹ NaCl、20 mmol·L⁻¹ EDTA、100 mmol·L⁻¹ Tris·Cl(pH8.0)。50 mL 离心管中加入 10 mL 提取缓冲液, 65 °C 预热。取 1~2 g 新鲜幼嫩叶片, 去除叶脉, 于液氮中(加入 0.1 g PVP 及少许石英砂)迅速研磨成粉。将冻粉迅速转入提取缓冲液中, 尽快用细玻璃棒混匀, 于 65 °C 保温 30 min。期间轻柔搅动 2~3 次。取出离心管, 冷至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 轻缓颠倒混匀, 静置 10 min。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。转移上清液于另一离心管中, 加入 2/3 倍体积的异丙醇, 轻缓颠倒混匀, 室温放置 15 min。

10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去上清液。用 2 mL 70% 的乙醇洗涤 2 次, 室温下微干, 溶于 500 ~ 700 μL TE 缓冲液。加入终体积 50 μg·mL⁻¹ 的 RNase, 37 ℃ 保温 1 h。用等体积的氯仿/异戊醇抽提 1 ~ 3 次。上清液中加入终体积为 0.2 ~ 0.4 mol·L⁻¹ NaCl 和 2 倍体积无水乙醇, 放置 1 h 左右, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 除去上清液。用 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 ~ 3 次, 自然干燥后溶于 50 ~ 100 μL TE 中备用。

1.4.3 DNA 质量检测 微量分光光度计检测: 使用 Nanodrop 2000 检测 2 种方法提取的 DNA 得率、A260/A280 及 A260/A230 值。

琼脂糖凝胶电泳检测: 使用 1.5% 的琼脂糖凝胶对 2 种方法提取的大豆叶片和豆粉 DNA 进行电泳检测, 110 V, 恒压电泳 30 min, 在凝胶成像系统 (JS680D, 上海元莘生物医药科技有限公司) 下观察, 成像分析。

1.4.4 PCR 扩增检测 将 2 种方法提取的大豆叶片和籽粒 DNA 原液稀释到 25 ng·μL⁻¹, 随机挑选 3 个 SSR 标记对其进行 PCR 扩增, 引物序列如表 1 所示, 通过扩增效果判断提取 DNA 质量。PCR 体系采用 20 μL 反应体系: 上下游引物各 2 μL (0.5 μmol·L⁻¹), 100 ng 模板 DNA, 2 μL 10 × Easy Taq Buffer (含 MgCl₂), 1.5 μL dNTPs (2.5 mM·μL⁻¹), 0.2 μL Taq 聚合酶 (5 U·μL⁻¹), 加无菌水至 20 μL。PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外凝胶成像仪系统分析。

表 1 PCR 扩增所用引物

引物名称	序列 (5'-3')
Primer name	Sequence (5'-3')
SSR1-F	TAGATCCGCTCGTGGGTATT
SSR1-R	CCTTCCATCATTTGTGTCAACTC
SSR2-F	GGAATTCCTTTTGTAGATGTTGAA
SSR2-R	GGTAGGAGCTGTTACACCCA
SSR3-F	GGGTGAAATGTCACATGGGT
SSR3-R	TTCTGACATTGGCAAAAGG

1.4.5 建库合格性检测 采用 λ-Hind III (TAKA-RA) 酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测样品合格性, 同时采用 SynergyHTX 酶标仪 (BioTek 伯腾) 统计样品合格率。由百迈客生物科技有限公司协助完成。

1.5 数据分析

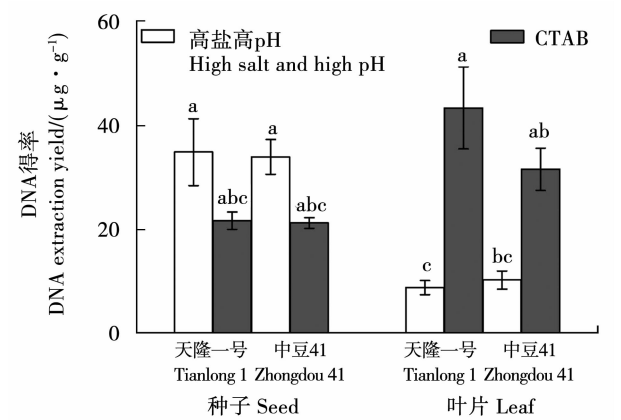
使用 SPSS 10.0 和 Excel 2013 软件、采用 ANOVA

和 LSD 法分析所得数据。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取 DNA 得率分析

为了评价高盐高 pH 法提取 DNA 的得率, 比较高盐高 pH 法与 CTAB 法提取大豆种子和叶片 DNA 的得率, 结果如图 1 所示: 高盐高 pH 法提取 2 个品种大豆种子 DNA 的得率均比 CTAB 法高。而以叶片为材料时, 高盐高 pH 法提取 2 个品种 DNA 的得率较 CTAB 法低。说明高盐高 pH 法更适合于提取大豆种子 DNA, CTAB 法更适合于提取大豆叶片 DNA。



不同小写字母表示处理间存在显著差异 ($P < 0.05$)。下同。

Different lowercase mean there are significant differences among different treatments ($P < 0.05$). The same below.

图 1 高盐高 pH 法与 CTAB 法提取 DNA 得率比较
Fig. 1 Comparison of DNA concentration extracted by high salt and high pH method and CTAB method

2.2 不同方法提取 DNA 质量分析

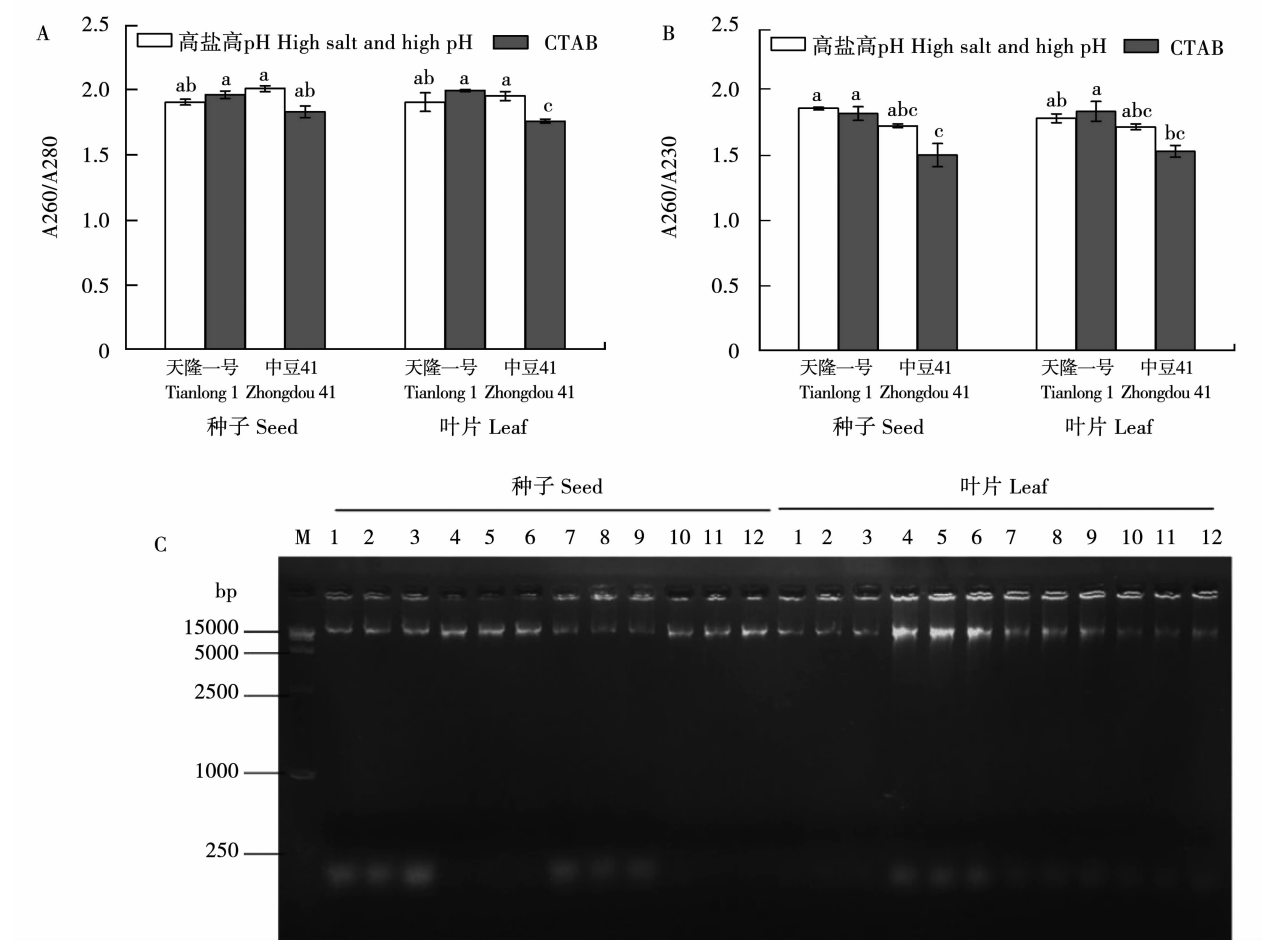
利用微量分光光度计检测 DNA 纯度的结果如图 2A 所示: 以叶片和种子为材料时, 上述 2 种方法提取 DNA 的 A260/A280 平均值基本均为 1.8 ~ 2.0。高纯度 DNA 的 A260/A280 比值应为 1.8 ~ 2.0, 当 A260/A280 < 1.8 时表明有蛋白质污染, 当 A260/A280 > 2.0 时表明有 RNA 污染^[4]。因此 2 种方法所提取的不同组织 DNA 的 A260/A280 均在正常范围之内。

利用微量分光光度计检测 DNA 纯度的结果如图 2B 所示: 高盐高 pH 法提取的 DNA 均为 A260/A230 < 2.0, 而 CTAB 法提取的 DNA 只有 1 个样本 A260/A230 > 2.0, 其余样本均 < 2.0。高纯度的 DNA A260/A230 比值为 2.5, 若比值 < 2.0 说明样品被碳水化合物 (糖类)、盐类或有机溶剂污染^[4]。因此高盐高 pH 法提取的 DNA 有较多的碳水化合物、盐类、或有机物的污染, 而 CTAB 法提取的 DNA

上述污染较少,纯度较高。

琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 2C 所示:以成熟种子为材料时,上述 2 种方法提取 DNA 的主带都清晰,但是 CTAB 法提取的 DNA 在没有加 RNase 时,能看到明显的 RNA 污染,蛋白污染也较高盐高

pH 法多。以大豆幼嫩叶片为材料时,上述 2 种方法提取 DNA 的主带均清晰,但是都伴随有少量降解和蛋白质等杂质污染。这一结果表明,高盐高 pH 法提取的 DNA 纯度较 CTAB 法高,而 CTAB 法提取的 DNA 虽然纯度不高,但是完整性较好。



A: A260/A280; B: A260/A230; C: 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA; 1~3: CTAB 法提取中豆 41 DNA; 4~6: 高盐高 pH 法提取中豆 41 DNA; 7~9: CTAB 法提取天隆 1 号 DNA; 10~12: 高盐高 pH 法提取天隆 1 号 DNA。
A: A260/A280; B: A260/A230; C: 1% agarose gel electrophoresis pattern; 1-3: DNA of Zhongdou 41 extracted by CTAB method; 4-6: DNA of Zhongdou 41 extracted by high salt and high pH method; 7-9: DNA of Tianlong 1 extracted by CTAB method; 10-12: DNA of Tianlong 1 extracted by high salt and high pH method.

图 2 两种方法提取 DNA 质量对比
Fig. 2 Comparison of DNA quality extracted by two methods

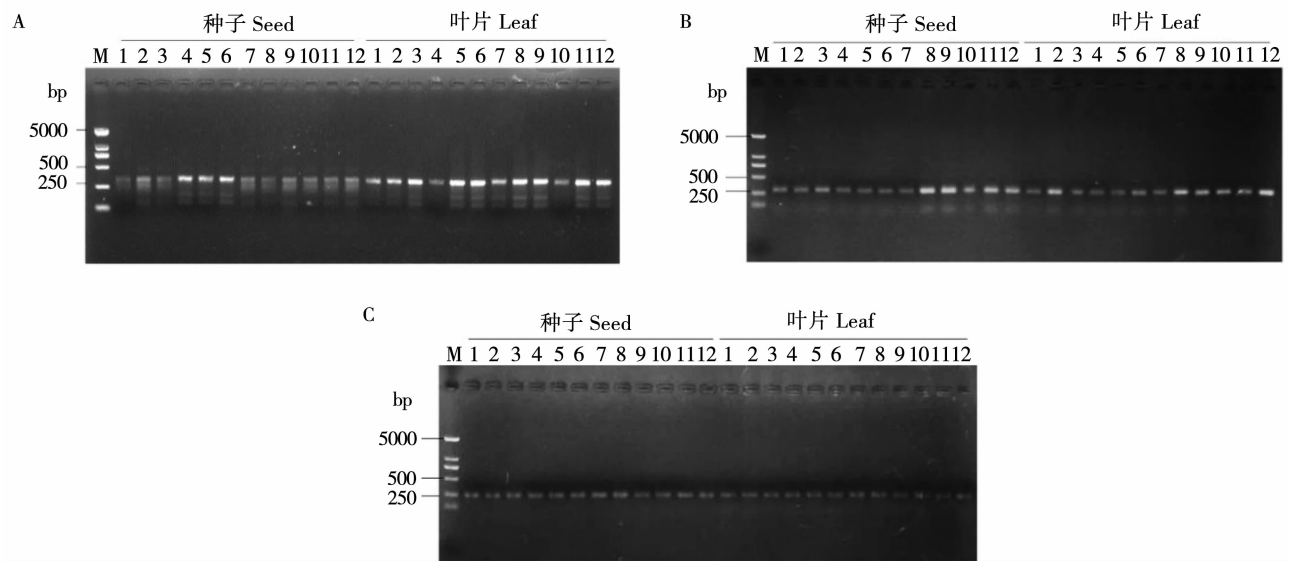
2.3 PCR 扩增结果

PCR 扩增对 DNA 模板的质量要求较高,因此 PCR 扩增成功率成为评判 DNA 质量的重要依据^[5]。随机选取 3 对 SSR 引物 SSR1, SSR2, SSR3, 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增结果如图 3 所示:以 2 种方法提取的 DNA 为模板进行的 PCR 扩增均获得了较清晰的扩增条带,说明 2 种方法提取的 DNA 均能满足 PCR 扩增要求。

2.4 建库合格性检测结果

随着高通量测序技术的发展,提取 DNA 用作建库分析越来越普遍,为了明确高盐高 pH 法是否能

适合于大豆 DNA 文库构建,本研究将 2 种方法提取的 DNA 通过 Nanodrop 琼脂糖凝胶电泳方法进行检 测。结果表明:高盐高 pH 法提取的大豆样本 DNA 降解严重,完整性较差,而 CTAB 法条带清晰,降解较少,完整性好(图 4 A)。对检测结果进行统计,可以看出高盐高 pH 法提取的 12 个样本都没有达到建库要求,而 CTAB 法提取的 12 个样本中有 9 个达到建库要求,合格率达到 75%(图 4 B)。综上所述,CTAB 法提取的大豆样本 DNA 完整性好,适合于建库测序等对 DNA 要求很高的试验,而高盐高 pH 法只适合于常规分子试验。

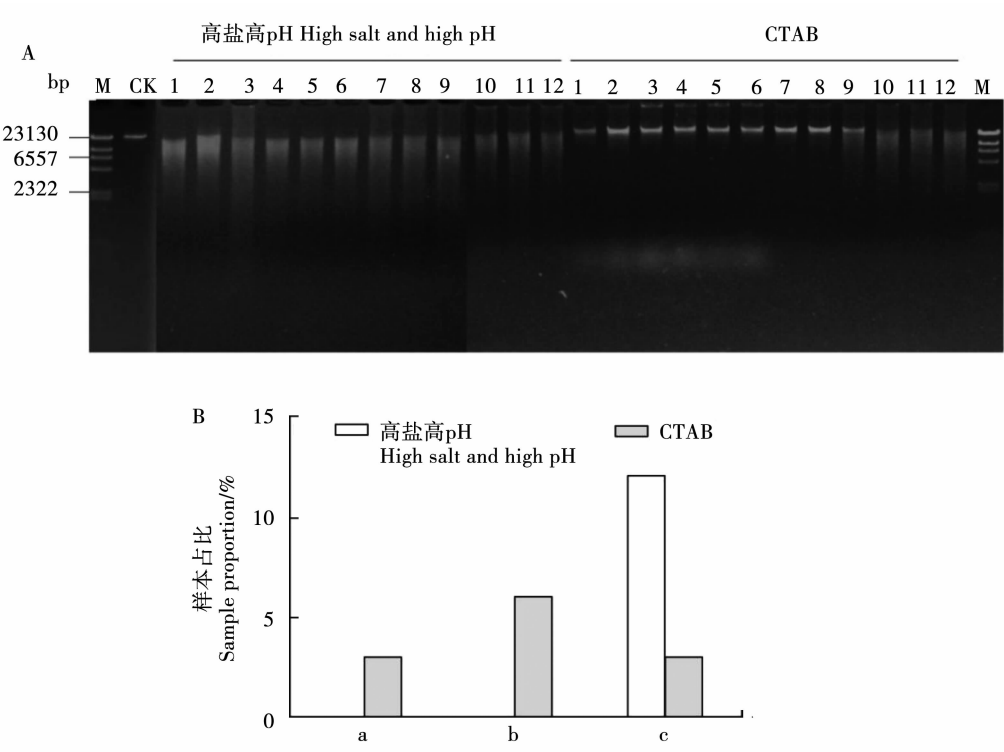


A:引物 SSR1 的 PCR 扩增结果; B:引物 SSR2 的 PCR 扩增结果; C:引物 SSR3 的 PCR 扩增结果; 1 ~3:CTAB 法提取的中豆 41 DNA; 4 ~6:高盐高 pH 法提取的中豆 41 DNA; 7 ~9:CTAB 法提取的天隆 1 号 DNA; 10 ~12:高盐高 pH 法提取的天隆 1 号 DNA。

A: PCR amplification with SSR1; B: PCR amplification with SSR2; C: PCR amplification with SSR3; 1-3: DNA of Zhongdou 41 extracted by CTAB; 4-6: DNA of Zhongdou 41 extracted by high salt and high pH method; 7-9: DNA of Tianlong 1 extracted by CTAB method; 10-12: DNA of Tianlong 1 extracted by high salt and high pH method.

图3 3对SSR引物扩增情况

Fig. 3 Amplification by three pairs of SSR primers



A: λ -Hind III 酶切后 1% 凝胶电泳检测; B:建库合格样本统计; a:质量满足建库要求; b:质量满足建库要求但完整性较差; c:样品降解严重。

A:1% gelelectrophoresis after λ -Hind III digestion; B:Statistics of qualified samples for database construction; a: The quality met the requirements for database construction; b:The quality met the requirements for database construction but the integrity was poor; c:The sample was seriously degraded.

图4 建库合格样本统计

Fig. 4 Statistical of qualified samples

3 讨论

本研究在 CTAB 法与高盐低 pH 法^[6]提取 DNA 的基础上进行改良,采用优化的高盐高 pH 法提取大豆幼嫩叶片与成熟种子 DNA,并与经典的 CTAB 法提取 DNA 效果进行比较。不同的 pH 对 DNA 与 RNA 有不同的影响,在碱性环境中,RNA 分子容易被降解,DNA 的抗性比较大;而在酸性环境中,相对来说 RNA 比 DNA 稳定^[7]。利用这一原理,本研究采用高 pH 值的盐溶液裂解细胞,减少了 DNA 的降解,并结合不同 pH 的醋酸钠溶液去除 RNA,与 CTAB 法相比减少了 RNase 的使用,节省了试验成本,缩短了水浴时间,加快了试验进程。由于植物细胞有较坚韧的细胞壁,且含有较多的多糖、脂类、多酚等次生代谢物,这些都有可能干扰 DNA 的提取^[8]。本研究采用高得率的盐溶液结合冻融法破坏坚韧的细胞壁,使细胞完全释放细胞质,同时在提取液中加入 2% 的 β -巯基乙醇使多酚氧化酶失活,防止酚类物质被氧化,又利用 pH5.2 与 pH5.6 的醋酸钠纯化得到纯度较高的 DNA。大豆成熟种子中含有较多的蛋白质与其它物质,不利于高质量 DNA 的提取^[9],本研究针对这一特点在提取过程中利用酚氯仿异戊醇与氯仿异戊醇多次抽提,效果较明显,得到的 DNA 杂质污染较少,电泳条带清晰。

高盐高 pH 法主要改进了以下几个方面的内容:(1)由于在碱性环境中 DNA 比较稳定,所以采用 pH9.0 的盐溶液减少 DNA 在裂解过程中的降解;(2)用酚氯仿异戊醇与氯仿异戊醇抽提 3 遍,彻底去除酚类物质、蛋白质、糖类物质对 DNA 的污染;(3)采用 pH5.2 和 pH5.6 的醋酸钠溶液纯化 DNA;(4)采用预冷的无水乙醇沉淀 DNA,防止 DNA 降解。高盐高 pH 法提取的大豆种子 DNA 纯度和得率都较 CTAB 法高,且试剂易得、耗时短,节省了 RNase 酶的使用,能够满足常规的分子试验要求,是一种高效的 DNA 提取方法。

此方法的不足之处在于:以大豆幼嫩叶片为材料时,高盐高 pH 法提取的 DNA 其得率与完整度较 CTAB 法差。原因可能是大豆幼嫩叶片的细胞壁较薄,在冻融过程中破坏了 DNA 的完整性,同时叶片中蛋白含量较种子中含量少,在使用氯仿异戊醇多次抽提时,会导致 DNA 得率减少。

4 结论

高盐高 pH 法与 CTAB 法提取的 DNA 均可满足常规分子试验对 DNA 的要求。2 种方法相比,

CTAB 法适用于大豆幼嫩叶片 DNA 的提取或建库测序等对 DNA 完整性要求较高的试验,但是在去除 RNA 时需要 RNase 辅助去除 RNA。而高盐高 pH 法利用高盐环境刺激植物细胞,并结合冻融法使细胞壁破裂释放细胞质,然后利用不同 pH 的 NaAC 纯化,得到高纯度的 DNA,满足常规分子试验,并且花费时间较短,此种方法更适合于大豆成熟种子 DNA 的提取。

参考文献

[1] 姚丹,闫伟,关淑艳,等. 高盐低 pH 值法提取大豆不同组织 DNA 的效果[J]. 河南农业科学, 2009, 38(12):50-54. (Yao D,Yan W,Guan S Y,et al. Effect of high salt and low pH method on DNA extraction from different tissues of soybean[J]. Henan Agricultural Science,2009,38(12):50-54.)

[2] 张继红,陶能国,张小云,等. 三种豆科植物总 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南农业科学, 2007(2):31-33. (Zhang J H,Tao N G,Zhang X Y,et al. Comparison of three methods for extracting total DNA from legumes[J]. Hunan Agricultural Science,2007(2):31-33.)

[3] 李金璐,王硕,于婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1):72-78. (Li J L,Wang S,Yu J,et al. An improved method for extracting plant DNA[J]. Acta Botanica,2013,48(1):72-78.)

[4] 王关林,方洪筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版, 2009. (Wang G L,Fang H J. Plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Publishing,2009.)

[5] 吴艳艳,代德艳,蔡春梅. 一种改良的大豆 DNA 提取方法[J]. 大豆科学,2015,34(1):112-115. (Wu Y Y,Dai D Y,Cai C M. An improved soybean DNA extraction method[J]. Soybean Science, 2015,34(1):112-115.)

[6] 刘少林,靖深蓉,郭立平,等. 用改进的高盐低 pH 法分离和纯化棉花叶绿体及叶绿体 DNA[J]. 棉花学报, 1997, 5(9): 16-18,24. (Liu S L,Jing S R,Guo L P,et al. Isolation and purification of chloroplast and chloroplast DNA from cotton using an improved high-salt and low-pH method[J]. Journal of Cotton, 1997, 5(9):16-18,24.)

[7] 杨荣武. 生物化学原理[M]. 北京:高等教育出版社, 2012. (Yang R W. Principles of biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press,2012.)

[8] 陈林杨,宋敏舒,查红光,等. 一种改良的植物基因组 DNA 通用提取方法[J]. 植物分类与资源学报, 2014, 3(36):375-380. (Chen L Y,Song M S,Cha H G,et al. An improved general method for extracting plant genomic DNA[J]. Journal of Plant Classification and Resources,2014,3(36):375-380.)

[9] 程文,夏正俊,冯献忠,等. 一种快速无损大豆种子 DNA 提取方法的建立和应用[J]. 植物学报, 2016, 1(51): 68-73. (Cheng W,Xia Z J,Feng X Z,et al. Establishment and application of a fast non-destructive soybean seed dna extraction method[J]. Acta Botanica, 2016,1(51):68-73.)