

文章编号: 1000-2286(2007)05-0732-04

柑橘类果树组织总 RNA 优异且通用的提取方法

叶庆亮^{1,2}, 彭爱红², 曹立², 江东², 钟广炎^{2*}

(1.西南大学 园林园艺学院 重庆 400716; 2.中国农业科学院 柑橘研究所, 重庆 400712)

摘要: 分别以柚类、柠檬、甜橙、枳壳和宽皮橘的果皮、果肉、枝皮、老叶、嫩叶、树根、子房、花瓣, 尤其是以果胶含量丰富的岩溪晚芦果皮等作试材, 将两次 LiCl 沉淀法加以改良, 加入适量 CaCl₂, 找到一种柑橘类果树总 RNA 优异且通用的提取方法, 所得 RNA 的质量和产量均较高。经差减文库构建、连接、电转化, 成功获得了目标片段。

关键词: 柑橘; RNA 提取; CaCl₂ 处理; 果胶; 减法文库

中图分类号: Q814.1 文献标识码: A

An Effective and General Protocol for the Isolation of Total RNA From the Tissues of Citrus Trees

YE Qing-hong^{1,2}, PENG Ai-hong², CAO Li², JIANG Dong², ZHONG Guang-yan^{2*}

(1.College of Horticulture and Landscape Designing, Southwest University, Chongqing 400712, China; 2.Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: Many samples, such as pulp, epicarp, tender leaves, old leaves, ovary, petal et al were tested respectively, especially the epicarp of Yanxiwanlu fruit very rich in polysacchrides. An effective and general protocol for the isolation of total RNA from the tissues of citrus trees was worked out. The protocol, based on two lithium chloride (LiCl) precipitations, is approved by some steps and added with appropriate CaCl₂ during RNA extraction. The results indicated that the RNA is of high quality, as confirmed by isolation of mRNA and subtraction construction of cDNA libraries.

Key words: Citrus; RNA extraction; CaCl₂ treatment; pectate; subtraction library

柑橘类果树植株组织间差异很大, 不同品种, 其组成组分也各异, 尤其是岩溪晚芦, 其果皮坚硬, 果胶含量相当高, 是苹果或梨的 10 倍以上^[1]。Nengguo TAO 等^[2]针对柑橘果肉总 RNA 的提取做了研究, 经过酒精脱水确能提出高质量的 RNA, 但用于柑橘其他组织则很不理想。尽管有报道^[3,4]能从某些柑橘品种或组织中提取一定质量的 RNA, 但经试验, 发现存在严重缺陷, 或 DNA 污染较重, 比例欠佳, 不利后续研究; 或须选择特定品种或组织才有一定效果。现有方法^[1-6]在提取岩溪晚芦果皮 RNA 时, 果胶干扰太重, 几乎无效。而高纯度、高质量的 RNA 是进行基因转录水平检测、cDNA 文库构建等分子生物学研究的必要前提。笔者根据岩溪晚芦本身特点, 将两次氯化锂沉淀方法加以改良, 参考 Valeriano Dal Cin 等^[1]人的实验, 加入适量氯化钙, 总结出了优异的可通用于柑橘类果树各组织总 RNA 的提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为中国农业科学院柑橘研究所国家柑橘种质资源圃保存的岩溪晚芦、道县野橘、台湾椪柑、五步红心柚、锦橙、尤力克柠檬、马叙葡萄柚、桃叶橙、纽荷尔脐橙、新生系三号椪柑、长寿金柑、旺苍大叶枳、南丰密橘、朱红橘、莽山野橘、武隆酸橘等的果皮、果肉、老叶、嫩叶、枝皮、树根、花瓣、子房等, 果实洗净后迅速削皮置液氮中, 然后转移至-80℃冰箱保存, 枝皮和树根采样后洗净剥下置液氮中; 叶片、子

收稿日期: 2007-05-21 修回日期: 2007-08-31

基金项目: 科技部“973”重大基础研究前期研究专项(2005CCA02900)和重庆市自然科学基金(SCTC2005BA1010)

作者简介: 叶庆亮(1973-)男, 硕士, 主要从事生物技术研究; * 通讯作者: 钟广炎, E-mail: ZHong_gy@yahoo.com.

房、花瓣现采现用; 除去果皮的果肉迅速置液氮中研磨。

1.2 试剂

TLE 提取液 (pH 8.2) (0.18 mol/L Tris-HCl, pH 8.2; 0.1 mol/L LiCl; 0.05 mol/L EDTA; 10 g/L SDS); 8 mol/L 氯化锂; 3 mol/L 醋酸钠; 0.5 mol/L 氯化钙。

1.3 方法

迅速取样液氮研磨, 约 5 g 粉末转入 50 mL 离心管, 加约 20 mL TLE 提取液, 混匀; 冰浴 30 min; 加 0.5 mol/L CaCl_2 (200~400 $\mu\text{L/g}$ 鲜重) 约 1.2 mL, 混匀, 静置 10 min; 4 °C, 12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min; 上清转至新管, 加 10 mL 苯酚/氯仿, 混匀后于 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min; 重复上一步 2~3 次, 至基本无界面可见; 上清转入新管中, 加 LiCl 至终浓度 2 mol/L, 轻轻混匀, -20 °C 沉淀过夜; 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 30 min; 加 5 mL DEPC-水溶解沉淀, 转至 10 mL 离心管; 加 2 mL 苯酚/氯仿, 混匀, 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min; 取上清 2 mL 于 10 mL 离心管, 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2.5 体积预冷的无水乙醇; -80 °C 沉淀 1 h, 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 30 min; 5 mL DEPC-水充分溶解沉淀。加 2 mL 苯酚/氯仿, 混匀, 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min; 重复上一步 1 次; 上清加 LiCl 至终浓度 2 mol/L, -20 °C 沉淀至少 30 min, 4 °C, 15 000 $\times\text{g}$ 离心 20 min; 以 75% 洗涤沉淀 2 次, 浓缩机风干后, 以 400~600 μL DEPC-水溶解; -80 °C 保存。

1.4 紫外扫描

取上述 RNA 样品 2 μL , 加入 98 μL DEPC-水, 混匀后用 BIORAD Smart Spec™ 3000 进行扫描, 波长范围为 200~300 nm, 记录 A_{230} 、 A_{260} 和 A_{280} , 并计算 A_{260}/A_{280} 比值。

1.5 凝胶电泳

按 Sambrook 等^[6]进行非变性琼脂糖凝胶电泳, 凝胶经浓度 1.2% EB 染色后, 紫外凝胶成像系统检测照相。

1.6 mRNA 的分离及差减文库的构建

取岩溪晚芦果皮总 RNA 用 Oligotex mRNA Purification Kit 纯化 mRNA, 再用 PCR-SELECT™ cDNA Subtraction Kit 构建文库。经连接, 电转化, 所得克隆用 TIANprep Mini Plasmid Kit 抽提再做 PCR, 所有实验严格按试剂盒说明书操作。

2 结果与分析

2.1 RNA 的产量和质量

经多品种多组织试验, 均取得良好效果(表 1 和图 1~图 5), 所得总 RNA 质量较高, 经凝胶电泳、EB 染色后在紫外灯下观察, 28SrRNA 和 18SrRNA 条带清晰且完整, 比例接近 2:1。而从 Valeriano Dal Cin^[1]、Nengguo Tao、徐昌杰^[2]和曹庆芹^[3]等报道的 RNA 电泳图可以看出, 所有 28SrRNA 和 18SrRNA 条带均存在不同程度的模糊, 比例近 1:1, 多有拖尾, 污染和降解明显。本实验少数图中似有拖尾, 究其原因则是因为同时操作样品过多, 耗时长, 加之老叶、枝皮、树根、子房、花瓣等容易褐变, 从而产生降解或交叉污染。本方法所得 RNA 浓度较高(表 1), 得率平均为 546.68 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, 个别组织如岩溪晚芦子房的得率高达 1.39 mg/g 鲜重, 即使果肉也高达 185.72 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。而曹庆芹等^[3]报道的嫩叶 RNA 得率最高为 100 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, 徐昌杰等^[2]报道的辣叶为 83.05 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, Nengguo TAO 等^[4]报道的果肉仅 50~70 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。

试验还表明: 本方法在应用于不同品种的同一种组织时, 所得 RNA 质量差异不明显, 而总 RNA 得率则有一定差异, 所得 RNA 浓度也不相同; 在应用于同一品种不同组织时, 除所得 RNA 浓度及 RNA 得率有一定差异外, RNA 质量也有一定差异, 其中以果皮最佳, 果肉和嫩叶次之, 而枝皮、老叶、子房和花瓣则相对差些, 这主要是因为不同组织其褐变难易及速度的不同所致, 与方法本身无关。此外, 同一品种不同组织所得 RNA 的外观色泽也略有不同, 老叶、枝皮和根的略显黄褐色, 果皮和花瓣的呈微黄色, 而嫩叶、果肉和子房的则为白色, 但所得果皮、果肉和嫩叶、老叶的 RNA 经紫外扫描、凝胶电泳以及文库构建后, 结果均显示, RNA 质量几乎未受影响。

本方法所提的 RNA 放于 -80 °C 长达 1 年后再进行差减文库构建, 结果未受影响, 这也表明, 本方法所得总 RNA 因为少有 DNA 等杂质污染, 纯度高, 少降解, 完全可用于下一步研究。

2.2 mRNA 的分离及差减文库的构建效果

本实验把所提取的岩溪晚芦果皮和果肉的总 RNA 经 Oligotex mRNA Purification Kit 纯化, 所得 mRNA 质量良好, 最后所得 20 μL mRNA 浓度高达 1 014.749 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A_{260}/A_{280} 为 1.928 0。取 0.5 μL 稀释 10 倍后进行凝胶电泳, 效果明显(图 6)。再经 PCR-SELECT™ cDNA Subtraction Kit 构建文库。所得 PCR 产物与试剂盒提供的骨骼肌对照的效果接近(图 7), 说明完全达到差减文库构建的要求; 将 PCR 产物连接, 电转化, 筛选到的目标克隆进行质粒抽提, 结果也符合实验要求(图 8)。

表 1 各样品总 RNA 的产量、浓度和 A_{260}/A_{280} 比值

Tab.1 The quantity and concentration of different samples and the parameters of A_{260}/A_{280}

| 样 品 | 取样 量/g | 浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 总 RNA /mL | A_{260}/A_{280} | 样 品 | 取样 量/g | 浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 总 RNA /mL | A_{260}/A_{280} |
|---------------|-----------|--|--------------|-------------------|---------|-----------|--|--------------|-------------------|
| 岩溪晚芦果皮(熟果) | 5 | 3 389.960 0 | 1.5 | 1.878 9 | 纽荷尔脐橙嫩叶 | 1 | 2 776.9343 | 0.4 | 1.798 0 |
| 道县野橘果皮(幼果) | 5 | 3 280.744 4 | 1.5 | 1.944 1 | 岩溪晚芦嫩叶 | 1 | 2 768.0781 | 0.4 | 1.795 5 |
| 台湾椪柑果皮(熟果) | 5 | 2 378.140 4 | 1.5 | 2.032 8 | 尤力克柠檬嫩叶 | 1 | 2 885.9104 | 0.4 | 2.043 8 |
| 五步红心柚果皮(幼果) | 5 | 3 023.002 4 | 1.5 | 2.055 3 | 南丰密橘嫩叶 | 1 | 2 646.1152 | 0.4 | 1.881 6 |
| 锦橙果皮(幼果) | 5 | 2 857.998 3 | 1.5 | 1.912 6 | 朱红橘老叶 | 5 | 1 548.2369 | 0.8 | 1.924 1 |
| 尤力克柠檬果皮(幼果) | 5 | 3 236.089 6 | 1.5 | 1.848 1 | 岩溪晚芦老叶 | 5 | 1 739.0144 | 0.8 | 1.977 4 |
| 马叙葡萄柚果皮(幼果) | 5 | 2 642.525 6 | 1.5 | 2.075 3 | 尤力克柠檬老叶 | 5 | 2 126.3408 | 0.8 | 1.802 9 |
| 桃叶橙果皮(熟果) | 5 | 2 325.180 2 | 1.5 | 1.841 2 | 长寿金柑老叶 | 5 | 1 028.8770 | 0.8 | 1.956 4 |
| 纽荷尔脐橙果肉(熟果) | 5 | 1098.916 0 | 0.5 | 1.898 6 | 马叙葡萄柚老叶 | 5 | 1 457.9839 | 0.8 | 1.977 1 |
| 岩溪晚芦果肉(熟果) | 5 | 1 162.501 7 | 0.5 | 1.981 5 | 锦橙老叶 | 5 | 2 265.5232 | 0.8 | 1.957 6 |
| 台湾椪柑果肉(幼果) | 5 | 1 130.966 2 | 0.5 | 1.972 1 | 旺苍大叶枳老叶 | 5 | 1 151.0312 | 0.8 | 1.932 1 |
| 尤力克柠檬果肉(幼果) | 5 | 1 091.323 9 | 0.5 | 1.995 2 | 莽山野橘老叶 | 5 | 2 019.6523 | 0.8 | 1.802 3 |
| 新生系三号椪柑果肉(熟果) | 5 | 1 209.147 9 | 0.5 | 1.851 2 | 先锋橙老叶 | 5 | 1 689.2341 | 0.8 | 1.893 6 |
| 五步红心柚果肉(幼果) | 5 | 1 763.625 6 | 0.5 | 1.969 1 | 武隆酸橘老叶 | 5 | 1 012.5368 | 0.8 | 1.958 9 |
| 马叙葡萄柚果肉(幼果) | 5 | 1 857.179 8 | 0.5 | 1.910 5 | 马叙葡萄柚枝皮 | 5 | 1 987.2358 | 0.5 | 1.998 6 |
| 锦橙果肉(幼果) | 5 | 1 698.338 0 | 0.5 | 1.965 8 | 锦橙枝皮 | 5 | 9 52.7890 | 0.5 | 1.868 9 |
| 五步红心柚嫩叶 | 1 | 2 664.798 0 | 0.4 | 1.998 6 | 岩溪晚芦枝皮 | 5 | 8 32.6891 | 0.5 | 1.886 7 |
| 马叙葡萄柚嫩叶 | 1 | 2 066.401 2 | 0.4 | 2.083 1 | 岩溪晚芦花瓣 | 1 | 2 568.2369 | 0.4 | 1.998 2 |
| 长寿金柑嫩叶 | 1 | 2 541.846 2 | 0.4 | 1.985 4 | 岩溪晚芦根 | 5 | 1 689.1896 | 0.4 | 1.862 5 |
| 旺苍大叶枳嫩叶 | 1 | 2 462.699 5 | 0.4 | 2.014 8 | 岩溪晚芦子房 | 1 | 3 487.2822 | 0.4 | 2.059 6 |

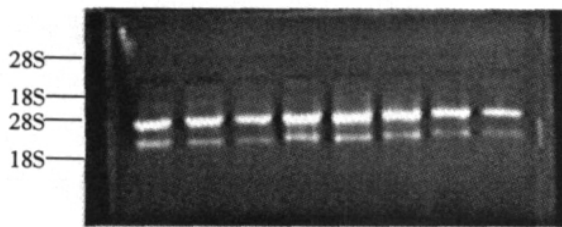


图 1 RNA 凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RNA of epicarp

注: 从左到右: 岩溪晚芦果皮(熟果)、道县野橘果皮(幼果)、台湾椪柑果皮(熟果)、五步红心柚果皮(幼果)、锦橙果皮(幼果)、尤力克柠檬果皮(幼果)、马叙葡萄柚果皮(幼果)、桃叶橙果皮(熟果)。

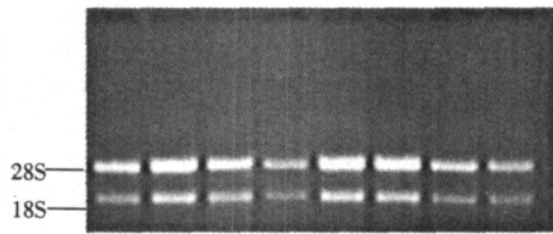


图 2 RNA 凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of RNA of pulp

注: 从左到右: 纽荷尔脐橙果肉(熟果)、岩溪晚芦果肉(熟果)、台湾椪柑果肉(幼果)、尤力克柠檬果肉(幼果)、新生系三号椪柑果肉(熟果)、五步红心柚果肉(幼果)、马叙葡萄柚果肉(幼果)、锦橙果肉(幼果)。

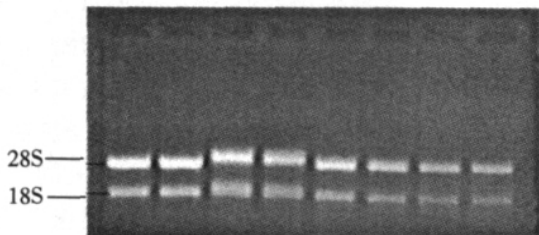


图 3 RNA 凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of RNA of tender leaves

注: 从左到右: 五步红心柚嫩叶、马叙葡萄柚嫩叶、长寿金柑嫩叶、旺苍大叶枳嫩叶、纽荷尔脐橙嫩叶、岩溪晚芦嫩叶、尤力克柠檬嫩叶、南丰密橘嫩叶。

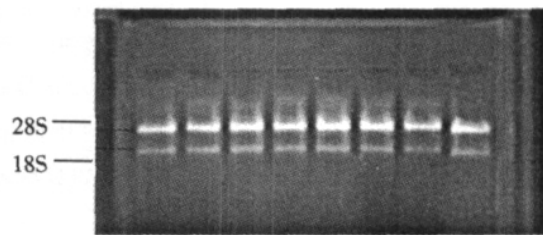


图 4 RNA 凝胶电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of RNA of old leaves

注: 从左到右: 朱红橘老叶、岩溪晚芦老叶、尤力克柠檬老叶、长寿金柑老叶、马叙葡萄柚老叶、锦橙老叶、旺苍大叶枳老叶、莽山野橘老叶。

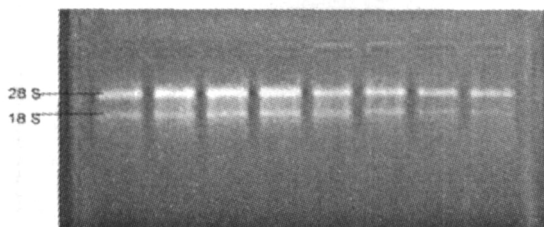


图5 RNA 凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of RNA

注:从左到右:先锋橙老叶、武隆酸橘老叶、岩溪晚芦花瓣、岩溪晚芦子房、马叙葡萄柚枝皮、锦橙枝皮、岩溪晚芦枝皮、岩溪晚芦根。

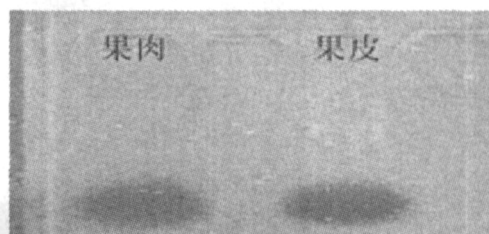


图6 纯化后的 mRNA

Fig.6 The mRNA after purification

注:左边为岩溪晚芦果肉 mRNA,右边为岩溪晚芦果皮 mRNA。

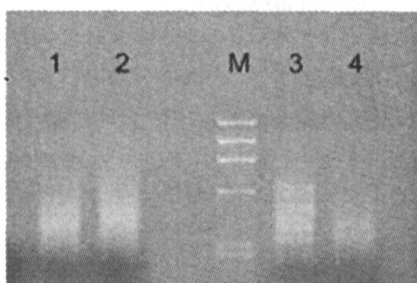


图7 PCR-SELECT™ cDNA Subtraction Kit 后第一次 PCR 结果

Fig.7 First Yanxiwanlu Ponkan PCR products of PCR-SELECT™ cDNA subtraction

注:1 为果肉消减后;2 为果肉消减前;M 为 marker;3 为果皮消减前;4 为果皮消减后。

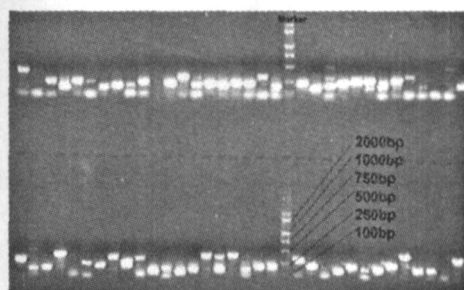


图8 质粒 PCR 结果

Fig.8 The PCR result of plasmid

3 讨论

很多植物组织在提取核酸时,常因多糖、多酚、蛋白质等大分子物质的干扰而变得困难,或杂质多,或所得核酸产量低,或根本得不到核酸,难以进行后续实验。在柑橘类果树组织核酸提取中,徐昌杰^[2]、曹庆芹等^[3]曾对柑橘组织 RNA 的提取进行了多种试验,取得了一定成功,但仍存在不足,如所得总 RNA DNA 污染较多,条带模糊,浓度较低,不利后续研究,且须刻意避免选择果胶或多酚含量高的组织,在应用于大部分柑橘类组织总 RNA 提取时,均难以取得满意效果。

本试验以果胶含量丰富的岩溪晚芦果皮作试材,将两次氯化锂法进行适当改良,参考 Valeriano Dal Cin 等^[1]的实验,加入适量氯化钙,使 RNA 得率平均达 546.68 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,最高达 1.39 mg/g 鲜重。后经多品种多组织试验发现,此法可通用于柑橘类果树组织 RNA 的提取,无须避开高果胶材料。凝胶电泳图中 28S 和 18S 条带清晰且完整,鲜见污染或降解。

我们在提取柑橘类果树组织总 RNA 时遇到多种情况,有些品种组织多糖多酚含量少,普通方法即能容易地提取所要求的 RNA,甚至对实验器皿等的灭菌要求都不很严格,如莽山野橘、道县野橘、武隆酸橘等;有些品种虽要求严些,但多糖污染并不严重,如温州密柑、金橘、汕头酸橘、马鼻蜜橘等的叶片,发现本方法在不加氯化钙的情况下,同样能很好地提出 RNA 来。而岩溪晚芦、台湾椪柑、尤力克柠檬、新生系三号椪柑、五步红心柚、马叙葡萄柚等品种的 RNA 提取就存在严重的多糖污染,必须加入适量的氯化钙才能获得较好的效果。虽然本方法历经多次苯酚氯仿抽提,但所得 RNA 纯度和浓度均较高,在后续研究中,无须采用 DNAase 处理,无须避开某些品种或组织,对柑橘类各品种开展研究非常方便。本方法也可为其他植物,特别是多糖多酚含量丰富的植物的 RNA 提取提供良好的借鉴。

参考文献:

- [1] Valeriano Dal Cin, Marcello Danesin, Fabio Massimo Rizzini, et al. RNA extraction from plant tissues :The use of calcium to precipitate contaminating pectin sugars[J]. Molecular Biotechnology,2005,31:113- 119.
[2] 徐昌杰,陈昆松,张 波,等,柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报,2004,21(2):136- 140.

(下转第 739 页)

操作、无需昂贵的试剂,提取的基因组 DNA 能满足后续分子生物学试验要求。

表 1 供试梨品种基因组 DNA 紫外分光光度计分析
Tab.1 Analysis of the genomic DNA samples from 23 pear cultivars by UV spectrophotometer

| 代号 | 品种 | OD ₂₆₀ | OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|----|--------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 1 | 今村秋 | 0.724 1 | 0.395 4 | 1.831 3 |
| 2 | 菊水 | 0.773 7 | 0.379 2 | 2.040 6 |
| 3 | 丰水 | 0.346 0 | 0.190 4 | 1.817 1 |
| 4 | 晚三吉 | 0.795 5 | 0.544 2 | 1.467 1 |
| 5 | 新兴 | 0.737 2 | 0.417 2 | 1.767 1 |
| 6 | 金水 1 号 | 0.686 2 | 0.393 1 | 1.745 3 |
| 7 | 金水 2 号 | 0.286 3 | 0.162 3 | 1.763 7 |
| 8 | 江岛 | 0.281 8 | 0.155 5 | 1.812 1 |
| 9 | 华梨 1 号 | 0.335 7 | 0.223 8 | 1.499 7 |
| 10 | 湘南 | 0.302 6 | 0.161 4 | 1.874 9 |
| 11 | 翠冠 | 0.309 8 | 0.172 9 | 1.798 2 |
| 12 | 杭青 | 0.764 4 | 0.364 7 | 2.096 0 |
| 13 | 西子绿 | 0.548 3 | 0.320 7 | 1.709 5 |
| 14 | 新杭 | 0.720 0 | 0.361 2 | 1.993 4 |
| 15 | 清香 | 0.775 4 | 0.415 1 | 1.868 0 |
| 16 | 三花 | 0.606 9 | 0.319 7 | 1.894 1 |
| 17 | 黄蜜 | 0.618 7 | 0.330 4 | 1.872 6 |
| 18 | 黄花 | 0.799 5 | 0.451 9 | 1.769 2 |
| 19 | 二宫白 | 0.611 3 | 0.333 1 | 1.835 1 |
| 20 | 华梨 2 号 | 0.317 3 | 0.181 3 | 1.750 3 |
| 21 | 宝珠梨 | 0.283 7 | 0.158 8 | 1.786 7 |
| 22 | 苍溪雪梨 | 0.466 7 | 0.253 1 | 1.843 7 |
| 23 | 灌阳雪梨 | 0.296 7 | 0.167 6 | 1.770 2 |

参考文献:

- [1] Takasaki T, Okada K, Castillo C, et al. Sequence of the S₅-RNase cDNA and PCR- RFLP system for discriminating S₅- to S₃- allele in Japanese pear [J]. Euphytica,2004,135:157- 167.
- [2] 胡春根, 郝玉, 邓秀新, 等. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法[J]. 遗传, 1998, 20(4): 31- 33.
- [3] 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): 1 085.
- [4] 谭晓风, 胡芳名, 张党权, 等. 香榧主要栽培品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 69- 71.
- [5] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 3- 12.
- [6] 严衍禄. 现代仪器分析[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2001: 41- 42.

(上接第 735 页)

- [3] 曹庆芹, 谌谋华, 伊华林, 等. 柑橘及近缘属总 RNA 的有效提取. 果树学报, 2005, 22(4): 426- 427.
- [4] Mehar H Asif A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000(18): 109- 115.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning :A laboratory manual (2nd end)[M]. NY: Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [6] Bugos R C, Chiang V L, Zhang X, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine[J]. Biotechniques, 1995, 19: 734- 737.