

紫丁香与羽叶丁香叶绿体 DNA 提取方法研究

张靖雯¹,姜在民²,蔡 靖^{1*}

(1. 西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100;2. 西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:为了探究适合丁香属植物的叶绿体 DNA (cpDNA)的提取方法,采取高盐-低 pH 法和改良高盐-低 pH 法分别分离提取了紫丁香与羽叶丁香的叶绿体及 cpDNA。结果表明,采取高盐-低 pH 法提取出的 cpDNA,其 OD260/OD280 值均 ≤ 1.7 ,且琼脂糖凝胶电泳检测无条带,表明 cpDNA 质量低,不能满足后续叶绿体基因组测序要求,改良高盐-低 pH 法提取出的 cpDNA,其 OD260/OD280 值在 1.8~1.9,琼脂糖凝胶电泳检测显示条带清晰,无降解现象,表明 cpDNA 质量高,能够满足后续叶绿体基因组测序要求。研究表明,改良高盐-低 pH 法可简便快速的提取紫丁香与羽叶丁香的 cpDNA,为进一步研究丁香属植物的叶绿体基因组奠定了基础。

关键词:紫丁香;羽叶丁香;叶绿体分离;cpDNA 提取;改良高盐-低 pH 法

中图分类号:S685.26 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)04-0095-05

Extraction Method of Chloroplast DNA of *Syringa oblata* and *Syringa pinnatifolia*

ZHANG Jing-wen¹,JIANG Zai-min²,CAI Jing^{1*}

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To explore the suitable extraction method of chloroplast DNA (cpDNA) of *Syringa* L., the chloroplast and cpDNA of *Syringa oblata* and *S. pinnatifolia* were isolated and extracted by high salt-low pH method and modified high salt-low pH method, respectively. The results showed that the value of OD260/OD280 of cpDNA extracted by the high salt-low pH method was less than 1.7, and agarose gel electrophoresis showed no cpDNA stripes, which indicated that the cpDNA was of low quality and could not meet the requirements of subsequent chloroplast genome sequencing. The value of OD260/OD280 of cpDNA extracted by the modified high salt-low pH method was between 1.8 and 1.9, and agarose gel electrophoresis showed that the cpDNA stripes were bright and no degradation, which indicated that the cpDNA was of high quality and could meet the requirements of subsequent chloroplast genome sequencing. This research showed that the cpDNA of *S. oblata* and *S. pinnatifolia* could be simply and quickly obtained by the modified high salt-low pH method, it laid the foundation for the further study of chloroplast genome of *Syringa*.

Key words: *Syringa oblata*; *Syringa pinnatifolia*; chloroplast isolation; cpDNA extraction; modified high-salt low-pH method

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器,具有自主遗传信息,是植物细胞遗传的重要单位。高等植物的叶绿体 DNA(chloroplast DNA, cpDNA),一般

长 120~160 kb,多数为双链共价闭合环状分子,极少数为线状^[1],叶绿体基因组结构由长单拷贝序列(long single copy sequence, LSC),短单拷贝序列

收稿日期:2017-10-30 修回日期:2018-01-06

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项项目(201204308)。

作者简介:张靖雯,女,在读硕士,研究方向:森林植物利用与保护。E-mail:jzhangjingwen@163.com

* 通信作者:蔡 靖,女,教授,博士生导师,研究方向:森林植物利用与保护、植物生理生态。E-mail:cjcaijing@163.com

(short single copy sequence, SSC)和 2 个反向重复序列(inverted repeat sequence A/B, IR_A/IR_B)组成, IR_A 和 IR_B 编码相同, 方向相反, 被 LSC 和 SSC 隔开。被子植物叶绿体基因组序列高度保守, 且属于母系遗传, 具有分子量小、结构简单, 进化速率低、多拷贝^[2]等多方面优点。目前已在遗传结构分析^[3]、分子标记^[4]、起源进化^[5]、核质互作和叶绿体基因工程^[6]等方面展开了广泛研究, 且叶绿体转化技术在遗传改良、生物制剂的生产等方面显示出巨大潜力^[7], 已成为植物转基因技术又一新的研究目标^[8], 而获得高质量的 cpDNA 是展开后续基因分子水平研究的必要条件。

相对于较成熟的基因组 DNA 提取方法而言, cpDNA 的提取存在很大障碍, 主要是由于物种之间差异性较大, 核 DNA 的污染等。目前, 关于叶绿体基因组的提取方法有很多, 但是提取效率依然较低, 不同植物提取叶绿体基因组的难易程度也各不相同。目前国内外对丁香属植物叶绿体基因组的研究较少, 而提取出高质量的 cpDNA 是很多相关研究的关键所在。因此, 本研究以现有的 cpDNA 提取方法为基础, 建立适用于丁香属植物的 cpDNA 的提取方法体系, 这对丁香属植物叶绿体基因组的进一步研究有重大意义。

丁香属(*Syringa*)植物为木犀科(Oleaceae)多年生灌木或小乔木, 是本科著名的观花植物^[9], 由于生境多样、适应性广、观赏性状独特而深受世界人民的喜爱, 现已有近千年的栽培历史^[10]。本试验所选取的植物材料紫丁香(*Syringa oblata*)和羽叶丁香(*Syringa pinnatifolia*)分别为丁香属的广布种和濒危物种。紫丁香作为中国三北地区的广布种, 广泛地应用于园林绿化当中, 具有较高的观赏价值。羽叶丁香是我国三级濒危保护种, 且具有较高的药用及观赏价值, 是丁香属中唯一具有羽状复叶性状的物种, 对于研究丁香属的亲缘关系、系统发育、地理分布等, 都具有重要的科学意义。研究丁香属植物 cpDNA 的提取方法, 并利用现代分子生物学技术, 探究丁香属植物间的遗传多样性、亲缘关系和起源进化, 对今后科学利用丁香种质资源有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料及预处理

试验材料为紫丁香与羽叶丁香的成熟叶片, 紫丁香叶片采自西北农林科技大学南校区丁香园, 羽叶丁香叶片采自西北农林科技大学羽叶丁香种质资源圃。于 2017 年 5 月分别摘取 2 种植物新鲜叶片

30~40 g, 清水洗 3 遍, 擦干, 纱布包裹, 置于 4℃冰箱饥饿处理 12~24 h。

1.2 方法

1.2.1 高盐-低 pH 法 参考 C. Shi^[11]等的方法。

1.2.2 改良的高盐-低 pH 法 参考 K. Diekmann^[12]、刘娟^[13]、陈春梅^[14]等的方法, 并进行改进。

1.2.2.1 叶绿体分离 所有试验步骤均在冰上进行, 玻璃器皿、离心管等提前预冷处理。

1) 匀浆: 将叶片剪成 1 cm 长短, 放入匀浆机(用小型榨汁机代替), 倒入 400 mL 预冷的缓冲液 A(20 mmol/L EDTA-Na₂, 50 mmol/L Tris, 1.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L 抗坏血酸, 1 mmol/L DTT, 0.1% BSA, pH=3.6; 抗坏血酸, BSA, DTT 现用现加), 低速匀浆 10 s, 2 次, 高速匀浆 10 s, 3 次。

2) 过滤: 将匀浆液用 4 层无菌纱布过滤。

3) 去除细胞残骸: 过滤后用 50 mL 离心管分装滤液, 1 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 弃沉淀, 重复 1 次。

4) 粗提: 将上清 4 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 弃上清。

5) 纯化: 沉淀中加入 25 mL 预冷的缓冲液 B(20 mmol/L EDTA-Na₂, 50 mmol/L Tris, 1.25 mol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 0.1% BSA; BSA, DTT 现用现加), 用无菌软毛刷悬浮沉淀, 4 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 弃上清, 重复 1 次。

6) 再纯化: 沉淀加入 5 mL 预冷的缓冲液 C(40 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris, 0.1% BSA; BSA 现用现加), 用无菌软毛刷悬浮沉淀, 4 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 弃上清。所得沉淀为纯化的叶绿体, 用显微镜镜检叶绿体的完整性。

1.2.2.2 叶绿体裂解, cpDNA 的分离纯化

1) 裂解: 纯化叶绿体加入 2 mL 缓冲液 D(50 mmol/L EDTA-Na₂, 100 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT; DTT 现用现加), 0.5 mL 20% SDS, 10 μL 蛋白酶 K, 55℃水浴 3 h, 使叶绿体裂解, 释放出 cpDNA。裂解结束后加入 0.5 mL 5 mol/L KAc, 冰浴 20 min。

2) 抽提: 加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 轻柔颠倒混匀, 12 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 离心后, 小心吸取上清液, 重复 1 次。

3) 再抽提: 加入等体积氯仿, 轻柔颠倒混匀, 12 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 小心吸取上清液。

4) 沉淀 DNA: 上清液加入等体积的异丙醇, -20℃, 沉淀 3 h, 12 000 r/min, 4℃, 离心 15 min, 收集沉淀, 70%乙醇清洗 2 次, 无水乙醇清洗 1 次,

自然挥发乙醇。

5) 除 RNA 除蛋白:沉淀加入 0.5 mL 1×TE 缓冲液,加入 2.5 μL RNase(10 mg/mL),37℃ 水浴 1 h,再加入 2.5 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL),37℃ 水浴 1 h。

6) 沉淀 DNA:加入 1/10 体积 NaAc(3 mol/L) 和两倍体积的无水乙醇沉淀过夜,12 000 r/min, 4℃,离心 15 min,收集沉淀,70%乙醇清洗 2 次,无水乙醇清洗 1 次,自然挥发乙醇。

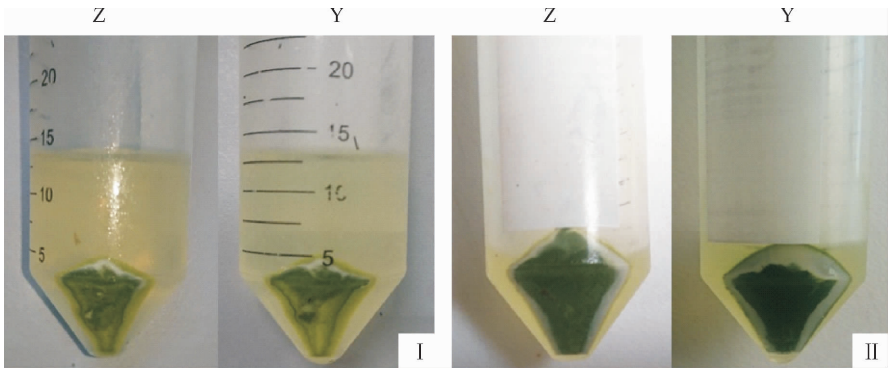
7) 溶解 DNA:加入 50 μL 1×TE 缓冲液溶解 DNA,得到 cpDNA 溶液,-20℃ 保存,长期保存需放入-80℃超低温冰箱。

1.3 叶绿体镜检

取 2 mL 缓冲液 D 悬浮叶绿体沉淀,制作临时装片,在 Leica DM4000B 荧光显微镜下观察叶绿体的完整性。

1.4 cpDNA 检测

1.4.1 cpDNA 质量检测 取 1 μL cpDNA 溶液,在 Nano Drop 2000C 超微量分光光度计上测量核酸含量,用 1×TE 作空白对照,记录 OD260nm/OD280nm 值、OD260nm/OD230nm 值及质量浓度。



注: I、II 分别代表高盐-低 pH 法和改良高盐-低 pH 法,Z、Y 分别代表紫丁香和羽叶丁香。下同。

图 1 高盐-低 pH 法(I)和改良高盐-低 pH 法(II)分离的叶绿体沉淀比较

Fig. 1 Comparison of chloroplast precipitation isolated by the high-salt low-pH method (I) and the modified high-salt low-pH method (II)

2.2 丁香 cpDNA 质量检测

由表 1 的紫外分析结果可知,2 种提取方法所得的 cpDNA 的各项质量指标差异显著,方法 I 所提取的紫丁香与羽叶丁香的 cpDNA 质量浓度仅为 64.1 ng/μL 和 171.6 ng/μL,OD260/OD280 值分别为 1.32 和 1.29,均<1.7,表明样品存在蛋白、酚的污染,OD260/OD230 值分别为 1.34 和 1.00,均<2.0,表明样品存在被糖类、盐类或有机溶剂污染,不能满足后续的测序要求以及叶绿体基因组的深入研究。方法 II 所提取的紫丁香与羽叶丁香的 cpDNA 质量浓度分别为 650.1 ng/μL 和 330.3 ng/μL,OD260/OD280 值分别为 1.86 和 1.88,在纯净的 DNA 比值 1.8~1.9,OD260/OD230 值分别为

质量高的 DNA 的 OD260nm/OD280nm 值在 1.8~1.9,>1.9 表明样品存在 RNA 污染,<1.7 表明样品存在蛋白质、酚类污染;纯 DNA 的 OD260nm/OD230nm 值为 2.5,<2.0 表明样品存在糖类、盐类或有机溶剂污染,需纯化。

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测 取 4 μL cpDNA 溶液,加 0.8 μL DNA loading buffer 混匀,使用 bio-rad Power pac Universal 电泳仪,在 0.5%琼脂糖凝胶中电泳,上样量为 4 μL,电泳缓冲液为 1×TAE,电压为 120 V,电泳 30 min,在紫外凝胶成像系统下检测蛋白是否除干净、RNA 是否除彻底、cpDNA 的完整性。

2 结果与分析

2.1 丁香叶绿体完整性检测

采用高盐-低 pH 法(方法 I)和改良高盐-低 pH 法(方法 II),分别得到了紫丁香(Z)和羽叶丁香(Y)的叶绿体。对比图 1 可发现,方法 II 所得的叶绿体沉淀更多;对比图 2 镜检结果可发现,方法 II 分离的叶绿体浓度高、数量多、杂质少、背景清晰,说明改良高盐-低 pH 法更适合丁香叶绿体的分离。

2.35 和 2.58,大于衡量 DNA 纯净比值 2.0,表明方法 II 所提取的 DNA 质量好,浓度和纯度高,不存在蛋白、酚类、盐以及有机溶剂等的污染。上述结果表明改良的高盐-低 pH 法适合丁香叶绿体 cpDNA 的提取,能够满足后续的测序要求以及叶绿体基因组的深入研究。

2.3 丁香 cpDNA 电泳检测

由图 3 的琼脂糖凝胶电泳结果可知,方法 I 所提取的 cpDNA 无明显条带,而方法 II 所提取的 cpDNA 条带清晰,明亮,整齐一致,无降解现象,无 RNA、蛋白、盐等杂质的污染,所得 cpDNA 纯度较高,质量好。

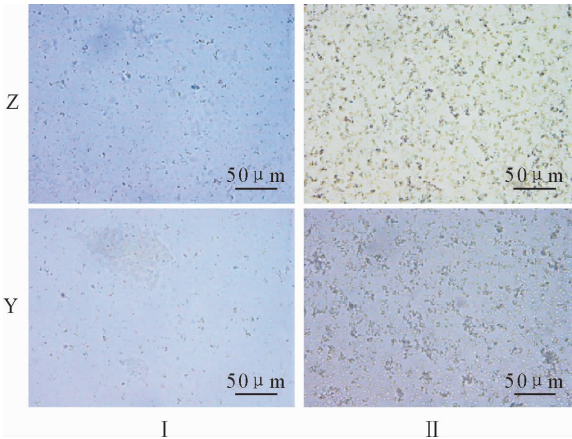


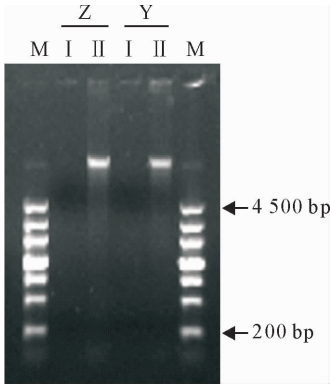
图2 高盐-低 pH 法 (I) 和改良高盐-低 pH 法 (II) 分离的叶绿体镜检比较

Fig.2 Comparison of chloroplast microscopy separated by the high-salt low-pH method (I) and the modified high-salt low-pH method (II)

表 1 2 种方法提取的 cpDNA 紫外分析结果

Table 1 UV scanning results of cpDNA extracted by two methods

种类	提取方法	OD260/ OD280	OD260/ OD230	质量浓度 /(ng·μL ⁻¹)
紫丁香	I	1.32	1.34	64.1
	II	1.86	2.35	650.1
羽叶丁香	I	1.29	1.00	171.6
	II	1.88	2.58	330.3



注:M 代表 5 000 DNA Ladder Marker。

图3 高盐-低 pH 法 (I) 和改良高盐-低 pH 法 (II) 提取 cpDNA 电泳图谱比较

Fig.3 Comparison of cpDNA electrophoresis profiles extracted by the high-salt low-pH method (I) and the modified high-salt low-pH method (II)

3 结论与讨论

获得高质量、高纯度的 cpDNA 样品,是后续基因分子水平研究的前提条件。cpDNA 提取的关键是去除叶绿体膜外的核 DNA 与线粒体 DNA 污染。高盐-低 pH 法分离叶绿体的原理是通过叶片在高速匀浆过程中,产生大量静电,核 DNA 被组蛋白包

裹带正电,紧紧地被吸附在带负电的叶绿体膜上,而在高盐介质环境中由于电子屏蔽作用,这种静电作用被减弱,因此可以通过不同 pH 值的高盐缓冲液反复洗涤,以达到去除吸附的核 DNA 的目的^[15],而由于线粒体与叶绿体差别较大,通过差速离心就可分离。其他关于 cpDNA 的提取方法主要有 DNase I 法^[16]、蔗糖密度梯度离心法^[17]、percoll 密度梯度离心法^[18]、氯化铯密度梯度离心法^[19]等。DNase I 法利用 DNase I 消化膜外的 DNA,以达到消除核 DNA 以及线粒体 DNA 污染的目的,但经过匀浆和多次离心后,叶绿体膜难以保持完整,使得膜内的 cpDNA 也被消化掉,cpDNA 得率低^[15];蔗糖密度梯度离心法无法将完整的叶绿体与破碎的叶绿体分离,密度梯度液不易保持,对离心机等设备要求高,分离效果不理想;氯化铯密度梯度离心法主要用于草本植物 cpDNA 的提取,且其成本高、耗时长、得率低、对设备要求也较高,一般实验室难以采用^[20];percoll 密度梯度离心法虽可较简便地分离提取 cpDNA,但所提取的 cpDNA 得率较低,且 percoll 分离液的价格偏高。因此,这几种方法均无法简便高效地提取植物 cpDNA。

本研究采用了高盐-低 pH 法^[11]和改良的高盐-低 pH 法^[12-14],分别提取了紫丁香与羽叶丁香的 cpDNA。C. Shi^[11]的高盐-低 pH 法已成功提取了葡萄^[21]、无患子^[22]、三叶青^[22]、枣^[23]等植物的 cpDNA,但此方法并不适合丁香 cpDNA 的提取,经紫外分光光度计检测,所提取的紫丁香与羽叶丁香 cpDNA 的 OD260/OD280<1.7,OD260/OD230<2.0,且质量浓度较低,表明提取的 cpDNA 纯度低,含有蛋白、酚类、盐以及有机溶剂等的污染,琼脂糖凝胶电泳也发现并无条带,表明所提取的 cpDNA 含量小,浓度低,结果证明 C. Shi^[11]的高盐-低 pH 法并不适合丁香 cpDNA 的提取,分析可能是 C. Shi^[11]的高盐-低 pH 法在叶绿体分离过程中,离心时间过长,是本研究改进的高盐-低 pH 法分离叶绿体离心时间的两倍,因此导致叶绿体活性大幅降低;叶绿体裂解时间过长,导致基因组 DNA 片段断裂,使得最终提取结果 cpDNA 的质量、浓度都达不到要求。之后采取 K. Diekmann^[12]、刘娟^[13]、陈春梅^[14]等方法进行组合,并根据丁香的特性加以改进,形成改良的高盐-低 pH 法,所提取的紫丁香与羽叶丁香的 cpDNA 的 OD260/OD280 值在 1.8~1.9,OD260/OD230 值接近 2.5,且质量浓度分别高达 650.1 ng/μL 和 330.3 ng/μL,表明提取的 cpDNA 质量好、纯度高,琼脂糖凝胶电泳显示条带清晰、明亮,无降解现象,结果证明改良后的高盐-低

pH 法适合紫丁香与羽叶丁香 cpDNA 的提取。本研究在高盐-低 pH 法的基础上,做了如下改进:提取前,将新鲜叶片放入 4℃ 冰箱,将饥饿处理时间减少到 12~24 h,去除叶片中的淀粉等糖类物质,减少糖类物质对后续提取工作的影响;由于叶绿体离体后活力会迅速下降,所以叶绿体分离过程要快,本试验开始采用研钵进行手工研磨,发现手工研磨会使叶片研磨不彻底,费时费力且导致叶绿体活性下降严重,因此采用匀浆机代替手工研磨匀浆,减少匀浆时间,避免叶绿体离体时间过长导致的活力下降,并采用短时多次的匀浆方法,避免匀浆机发热,破坏叶绿体被膜;用 DTT(二硫苏糖醇)代替 β-巯基乙醇作为还原剂,DTT 具有比 β-巯基乙醇更低的毒性和更小刺激性的气味,且其抗氧化性是 β-巯基乙醇的 7 倍,能更有效组织酚类物质的氧化,并进一步提高叶绿体完整性;增加了氯仿抽提,是因为酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提后,会有酚污染残留,由于酚易溶于氯仿中,因此增加氯仿抽提,以达到进一步排除酚污染的目的;试验最后再次加入少量蛋白酶 K,37℃ 水浴 1 h,以达到进一步去除蛋白残留的目的;在使用 RNase 和蛋白酶 K 处理了 cpDNA 溶液后,再次进行酒精沉淀洗涤 cpDNA,是为了减少所得 cpDNA 溶液中的其他杂质,提高所得 cpDNA 质量。

本研究改良的高盐-低 pH 法可较快速简单地提取丁香 cpDNA,所提取的 cpDNA 可用于叶绿体基因组分子水平的后续研究。此提取方法对实验室仪器设备要求不高,操作简便、成本低,可为木本植物 cpDNA 的提取提供参考。

参考文献:

[1] MAIER R M, SCHMITZ-LINNEWEBER. Plastid genomes. In;DANIELL H,CHASE C D,eds. Molecular biology and biotechnology of the plant organelles: chloroplasts and mitochondria[M]. Netherlands: Kluwer Academic publisher, 2004, 115-150.

[2] WOLFE K H, LI W H, SHARP P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 84(24): 9054-9058.

[3] 陈涛,王小荣,罗华,等. 9 个野生中国樱桃群体叶绿体 DNA *trnQ-rps16* 序列变异及其遗传结构分析[J]. 遗传, 2012, 34(11): 1475-1483.

[4] NISHIKAWA T, VAUGHAN D A, KADOWAKI K. Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(4): 696-705.

[5] XU D, ABE J, GAI J, *et al.* Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of

cultivated soybean[J]. Theoretical & Applied Genetics, 2002, 105(5): 645-653.

[6] LELIVELT C L, MCCABE M S, NEWELL C A, *et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(6): 763-774.

[7] 邢少辰. 叶绿体基因组研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1): 21-28.

[8] 马三梅,王永飞. 高等植物叶绿体基因组的转化[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 85-390.

[9] 陈新露,曲世增. 中国丁香属植物[J]. 西北林学院学报, 1989, 4(1): 72-79.

[10] 崔洪霞,蒋高明,臧淑英. 丁香属植物的地理分布及其起源演化[J]. 植物研究, 2004, 24(2): 141-145.

[11] SHI C, HU N, HUANG H, *et al.* An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31468.

[12] DIEKMANN K, HODKINSON T R, FRICKE E, BARTH S. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection[J]. PLoS ONE, 2008, 3(7): e2813.

[13] 刘娟. 菝葜叶绿体基因组分析及基于单子叶植物 cpDNA 基因组的比较研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[14] 陈春梅,陈亮. 茶树叶绿体 DNA 提取方法研究[J]. 分子植物育种, 2014, 12(3): 562-566.

[15] 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, 9(5): 239-241.

[16] HALLIWELL B. Methods in chloroplast molecular biology [J]. Elsevier Biomedical Press, 1982, 158(1): 190-191.

[17] HIRAI A, ISHIBASHI T, MORIKAMI A, *et al.* Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase and the 32 KD photosystem II reaction center protein[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 70(2): 117-122.

[18] HEINHORST S, GANNON G C, GALUN E, *et al.* Clone bank and physical and genetic map of potato chloroplast DNA [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 75(2): 244-241.

[19] 胡华萃,王进,沈桂芳,等. 氯化铯密度梯度离心法纯化叶绿体 DNA[J]. 杭州大学学报, 1985, 12(3): 370-373.

[20] 盖树鹏,孟祥祚. 简易、快速提取大葱叶绿体、线粒体 DNA 的方法[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 262-262.

[21] 谢海坤,焦健,樊秀彩,等. 中国野生葡萄叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取的研究[J]. 西北植物学报, 2016, 36(7): 1464-1469.

XIE H K, JIAO J, FAN X C, *et al.* An optimized chloroplast isolation and chloroplast DNA extraction protocol for chinese wild grapes [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(7): 1464-1469. (in Chinese)

[22] 李孟竹. 植物叶绿体提取方法比较和两种药用植物叶绿体基因组分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[23] 杨晓婷,黄建,张春梅,等. 枣叶绿体基因组 DNA 提取方法研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(2): 105-110.

YANG X T, HUANG J, ZHANG C M, *et al.* An optimized chloroplast DNA extraction protocol for Chinese *jujube* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(2): 105-110. (in Chinese)