

# 云南柃[木衣]叶片总 RNA 提取方法的比较与改进

慈晓彤<sup>1,2</sup>, 石辰<sup>1,2</sup>, 王大玮<sup>1,2\*</sup>, 沈莲文<sup>1,2</sup>, 何承忠<sup>1,2</sup>, 蔡年辉<sup>1,2</sup>, 段安安<sup>1,2</sup>

(1. 西南林业大学, 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学, 西南山地森林保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**高质量 RNA 的提取是开展云南柃[木衣]分子生物学研究的前提。采用 OMEGA (Plant RNA Kit 50) 试剂盒、TIANGEN (TRNzol-A+Reagent) 试剂盒、CTAB 法、Trizol 法、SDS 法及其改良法 6 种方法提取云南柃[木衣]叶片的 RNA, 并用琼脂糖凝胶电泳、核酸蛋白检测仪及 RT-PCR 技术比较了 6 种不同方法提取的总 RNA 样品的质量。结果表明, 2 种试剂盒法和 trizol 法不适合云南柃[木衣]RNA 提取, 无法得到 28S、18SrRNA 条带, CTAB 法和 SDS 法虽能得到 RNA 的 3 条带, 但拖带现象严重,  $A_{260}/A_{230}$  的比值较低, 对 SDS 法进行改进, 提高  $\beta$ -巯基乙醇的量, 在缓冲液中增加 PVP, 使用 HiBind RNA Mini 柱, 有效地抑制多酚多糖的污染, 得到了较高质量、可用于 RT-PCR 扩增的云南柃[木衣]的 RNA。对其开展分子生物学研究提供技术支撑。

**关键词:**云南柃[木衣]; 叶片; RNA; 比较与改进

中图分类号: S722.39

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2020)03-0095-05

## Comparison and Improvement of Total RNA Extraction Methods from *Docynia delavayi* Leaves

CI Xiao-tong<sup>1,2</sup>, SHI Chen<sup>1,2</sup>, WANG Da-wei<sup>1,2\*</sup>, SHEN Lian-wen<sup>1,2</sup>, HE Cheng-zhong<sup>1,2</sup>,  
CAI Nian-hui<sup>1,2</sup>, DUAN An-an<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory for Forest Resource Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** RNA extraction is a prerequisite for molecular biology research of *Docynia delavayi*, a precious tree species occurring in southwestern China. In this study, OMEGA (Plant RNA Kit 50) kit, TIANGEN (TRNzol-A+Reagent) kit, and the methods of CTAB, Trizol, SDS, and improved SDS were used to extract total RNA from *D. delavayi* leaves. The amounts of total RNA extracted by different methods were compared by gel electrophoresis, nucleic acid protein meter and RT-PCR. The results showed that the two kits and trizol method were not suitable for RNA extraction because 28S and 18S rRNA bands could not be obtained. CTAB and SDS methods could obtain three bands of RNA, but the tailing phenomenon was serious, the ratio of  $A_{260}/A_{230}$  was lower. SDS method could be improved by increasing the addition of  $\beta$ -mercaptoethanol, adding PVP in the buffer, and using HiBind RNA Mini column, which effectively inhibited the contamination of polyphenol polysaccharide, and a higher quality RNA to be used for RT-PCR amplification could be obtained. It laid the foundation for its molecular biology research.

**Key words:** *Docynia delavayi*; leaf; RNA; comparison and improvement

云南柃[木衣] (*Docynia delavayi*) 为蔷薇科 (Rosaceae) 柃[木衣]属 (*Docynia*) 植物, 主要分布于

收稿日期: 2019-08-17 修回日期: 2019-11-27

基金项目: 国家林业和草原局林业科技发展项目 (KJZXSA2019036); 云南森林资源培育与利用协同创新中心开放基金。

作者简介: 慈晓彤。研究方向: 林木遗传育种。E-mail: cxtexf1994@163.com

\* 通信作者: 王大玮, 副教授, 博士。研究方向: 林木遗传育种。E-mail: daweiwon@163.com

我国的云贵川地区<sup>[1]</sup>。云南柃[木衣]果实、树叶、树皮以及树根都有一定的食用或药用功效,浑身是宝。果实可直接食用,较酸涩,也可以加工成果脯、果茶,其香味独特,当地人常用来酿酒,叶和树皮捣碎成汁,可治疗骨折和烫伤<sup>[1]</sup>,叶的内含物是理想的天然抗氧化剂,钙、磷、钾含量是苹果、梨等水果的2倍<sup>[2]</sup>,有着广阔的开发前景。但目前国内外对云南柃[木衣]的研究相对较少,主要集中在有效成分提取、次生代谢物功能分析方面。因此,为了充分挖掘并利用其优良的特性,对其开展分子生物学研究显得尤为重要。

RNA 是转录水平上研究基因表达与调控机制的载体<sup>[3]</sup>,是否能从植物中提取高质量的 RNA 是进行一系列分子生物学研究的关键<sup>[4]</sup>。目前提取 RNA 的方法有很多,常见的有 CTAB 法、Trizol 法、SDS 法、异硫氰酸胍法、高氯酸盐法以及各种试剂盒等等,但由于植物自身组成成分之间有很大的差异,因此,并没有一种方法可以适用于所有植物总 RNA 提取。植物组织中含有大量的蛋白质、多糖多酚等物质,以及广泛且稳定存在的 RNA 酶,决定了植物 RNA 提取的难度<sup>[5]</sup>。

目前,对云南柃[木衣]分子领域的研究鲜少,亟需找到一种稳定的能获得高质量、高纯度云南柃[木衣]RNA 的方法,为其开展分子生物学研究做好铺垫。本研究通过 2 种试剂盒法、CTAB 法<sup>[6]</sup>、Trizol 法<sup>[7]</sup>、SDS 法<sup>[8]</sup>及其改良法共 6 种方法对云南柃[木衣]总 DNA 进行提取,并进行比较与改进,为云南柃[木衣]进一步的分子生物学研究提供了重要的技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

供试材料于 2019 年 3 月采自西南林业大学树木园(103.04°E、23.96°N)云南柃[木衣]资源收集圃。用锡箔纸包裹采集幼叶并放入液氮中速冻,置-80℃冰箱中保存备用。

### 1.2 主要试剂

CTAB、Tris-HCl、EDTA、PVP、 $\beta$ -巯基乙醇、氯化钠、酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、DEPC 水、SDS、LiCl、Trizol、醋酸钾等。

### 1.3 OMEGA(Plant RNA Kit(50))试剂盒、TIANGEN(TRNzol-A<sup>+</sup> Reagent)提取试剂盒 RNA 提取法

分别参照 OMEGA(Plant RNA Kit(50))试剂盒、TIANGEN(TRNzol-A<sup>+</sup> Reagent)提取试剂盒说明书操作。

### 1.4 SDS 法

参考邓浪等<sup>[8]</sup>提取猕猴桃 RNA 的方法。

### 1.5 改良 SDS 法

在邓浪等<sup>[8]</sup>提取猕猴桃 RNA 方法的基础上改进。试验所需试剂和器材均用 DEPC 水处理。1) 试验前将异丙醇放入-20℃冰箱中, RNA 提取缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.15 mol·L<sup>-1</sup> LiCl, 5% SDS, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0, 2% PVP)置于 65℃水浴锅中预热。将采取的嫩叶用锡箔纸包裹,迅速置于液氮中,将新鲜的嫩叶样品转至研钵内,加入液氮充分研磨,并将其装于预冷的 2 mL 离心管内,1/3~1/2 离心管的体积。2) 离心管中加入 300  $\mu$ L 的  $\beta$ -巯基乙醇和 400  $\mu$ L 65℃预热的 RNA 提取缓冲液,混合均匀后,12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心 15 min。取上清于新的 1.5 mL 离心管内,冰浴 10 min。3) 分别加入 250  $\mu$ L 酚和氯仿,充分混匀,同上离心。4) 取上清,加入等体积氯仿,混匀后,冰浴 10 min,同上离心。5) 取上清,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混合均匀,同上离心。6) 取上清,加入 2 倍体积异丙醇(-20℃)和 2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,充分混匀后,置于-20℃冰箱中至少 30 min。7) 将上一步的混合液收集于 HiBind RNA Mini 柱中,放到干净的 2 mL 的收集管内,1 000 r·min<sup>-1</sup>、室温离心 1 min,倒掉废液,把 HiBind RNA Mini 柱放回收集管。8) 在 HiBind RNA Mini 柱加入 400  $\mu$ L RWC Wash Buffer,同上短暂离心,弃收集管。9) 将 HiBind RNA Mini 柱放到新的收集管中,加入 500  $\mu$ L RNA Wash Buffer II,同上离心,弃废液,把 HiBind RNA Mini 柱放回收集管。10) 重复步骤 9,将 HiBind RNA Mini 柱放到新的收集管中,同上离心 2 min,丢掉收集管,将柱放到干净的 1.5 mL 离心管内。11) 加入 20~30  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA (DEPC 水要确保滴在吸附柱中央),室温孵化 2 min,1 000 r·min<sup>-1</sup>、室温离心 1 min。-80℃保存备用。

### 1.6 CTAB 法

参考史宝胜等<sup>[9]</sup>采用 CTAB 法提取植物 RNA 的方法并略作改动, RNA 提取缓冲液(1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 0.02 mol·L<sup>-1</sup> EDTA, 2% CTAB, 2% PVP)。1) 同上取嫩叶加液氮迅速研磨至粉末状,将 1.5 mL 离心管放入液氮中预冷,然后装入研磨好的样品,加入 700  $\mu$ L 提前 65℃预热的提取缓冲液,再加入 3%  $\beta$ -巯基乙醇,立即上下颠倒,使样品粉末均匀分散于溶液中,65℃水浴 30 min,每隔 10 min 弹打 1 次,使其充分裂解。2) 加入 400  $\mu$ L 体积的氯仿:异戊醇

(24:1),混匀;室温,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min;取上清,加入等体积 24:1 重复抽提 1 次,同上离心。3)取上清,加入 1/3 倍体积预冷的 10 mol·L<sup>-1</sup> LiCl,充分混匀,-20℃过夜;同上离心。4)弃上清,加入 200 μL 75%乙醇洗涤沉淀,风干 2~5 min,待沉淀微干后,加入 500 μL 0.1% DEPC 水溶解沉淀。5)加入 400 μL 的酚和氯仿(体积比为 1:1),充分弹打使之混匀,室温静置 5 min,同上离心。6)取上清,加入等体积 24:1 再重复抽提 2~3 次,同上离心。7)取上清,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇和 1/10 倍的 5 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH4.8),-20℃沉淀 1 h,同上离心。8)弃上清,加入 75%乙醇洗涤 1~2 次,待风干后加入 20~30 μL 0.1% 的 DEPC 水溶解 RNA,-80℃保存备用。

### 1.7 Trizol 法

根据 Invitrogen 公司提供的 Trizol 试剂说明书操作,同上将采取的云南柃[木衣]的嫩叶在液氮中研磨成粉末,并将样品用 2 mL 的 RNase-free 离心管中收集。迅速加入 1 mL 的 Trizol 试剂,充分混匀。等体积氯仿抽提 1 次后,加入 0.5 mL 异丙醇混匀,加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制)以清洗杂质,最后加入 20~30 μL DNase/RNase-Free 水溶解 RNA,-80℃保存备用。

### 1.8 核酸蛋白测量仪检测

将所得 RNA 取 1 μL 于微量核酸蛋白测量仪测定其 OD 值和浓度,重复 3 次,取平均值。

### 1.9 普通琼脂糖凝胶电泳

取 5 μL 样品 RNA 与 2 μL loading Buffer 吹打混匀,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,120 V、30 min,于凝胶电泳系统中观察 RNA 条带,并拍照。

### 1.10 RT-PCR

为进一步检测提取的 RNA 的质量,用 FastQuant RT Kit (with gDNase)试剂盒合成第一条 cDNA 链,具体操作按照说明书进行。登录 NCBI 根据拟南芥 WRKY60 基因序列设计云南柃[木衣]的特异性引物,上游引物:5' TCACAA-GAGATAACCCGTCACC3',下游引物:5' CCT-GAAATGGCAGCAGCAAG3',预期得到的目的片段大小为 400 bp。PCR 反应体系(总体积 25 μL)(表 1),PCR 扩增反应程序(表 2)。得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检,并观察记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 6 种方法提取云南柃[木衣]RNA 的比较

利用 6 种方法提取云南柃[木衣]叶片 RNA(图 1),结果表明,利用 TIANGEN 试剂盒法提取的

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

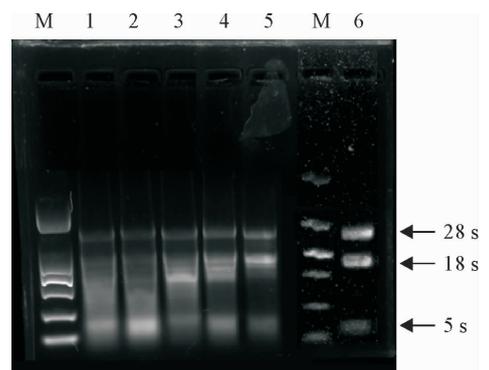
组分	体积/μL
模板 cDNA(Template cDNA)	0.8
2×Taq PCR MasterMix	12.5
Primer1(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1.2
Primer2 (10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1.2
ddH <sub>2</sub> O	9.5

表 2 PCR 扩增反应程序

Table 2 PCR amplification reaction procedure

步骤	循环	温度/℃	时间/min
预变性	1	95	5
变性		95	0.5
退火	32	57.4	0.5
延伸		75	1
延伸	1	72	10
保存		4	—

RNA 效果最差,没有目的条带出现;OMEGA 试剂盒得到的 RNA 有较弱的 28SrRNA 条带出现,但泳道有明显的拖带现象,说明 RNA 被多糖、盐等杂质污染;CTAB 法得到模糊的 28S、18S 和 5S rRNA 条带,但拖尾严重。SDS 法提取效果最好,但 18S 的亮度是 28S 的 2 倍,说明在提取 RNA 的过程中发生了降解;利用 Trizol 法所得 RNA 也有微弱的 28SrRNA 条带,但 18SrRNA 降解严重,说明 RNA 受多糖、盐等杂质的污染;将 SDS 法改进(图 1),有 3 条明亮的 rRNA 条带,泳道清晰无拖带,并进行了重复试验,结果一致,说明改良的 SDS 法较稳定,且提取的 RNA 纯度较高,质量较好没有受到多糖、多酚或其他盐类和有机溶剂等污染。



注:M:标记;1:TIANGEN 试剂盒法;2:OMEGA 试剂盒法;3:Trizol 法;4:CTAB 法;5:SDS 法

图 1 云南柃[木衣]叶片总 RNA 的提取

Fig. 1 Total RNA extracted from *D. delavayi* leaves

### 2.2 不同方法提取 RNA 的浓度及质量

2 种试剂盒法试和 Trizol 法提取 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值分别为 1.48、1.41、1.67,均<1.8(表 3),

说明这 3 种方法提取的 RNA 含有多糖或其他盐类、有机溶剂等污染,利用 CTAB 法和传统 SDS 法提取的 RNA 其  $A_{260}/A_{280}$  比值虽然在 1.8~2.2 之间,但  $A_{260}/A_{230}$  的比值  $<2.0$ ,说明 CTAB 法提取的总 RNA 含有多糖或其他盐类、有机溶剂等污染,其中 CTAB 法提取 RNA 的  $A_{260}/A_{230}$  比值 1.38,远远小于利用传统 SDS 法的 1.76,说明 RNA 含杂质更多、受污染更严重。利用改良 SDS 法提取总 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值和  $A_{260}/A_{230}$  比值分别为 1.93、2.10,在高质量 RNA 的标准范围内。

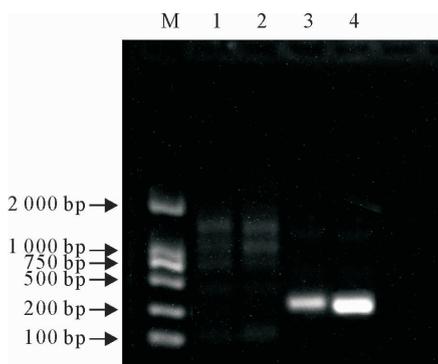
表 3 6 种方法提取云南柃[木衣]总 RNA 的检测

Table 3 Detection of total RNA from *D. delavayi* by 6 methods

提取方法	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	RNA 浓度 ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
TIANGEN 试剂盒法	1.48	0.35	25.13
OMEGA 试剂盒法	1.41	0.73	65.15
CTAB 法	2.01	1.38	105.67
Trizol 法	1.67	0.5	50.18
传统 SDS 法	1.89	1.76	205.3
改良 SDS 法	1.93	2.1	378.2

### 2.3 RT-PCR 扩增检测

用常规 SDS 法和改良 SDS 法提取的 RNA 为样品反转录得到 cDNA,用设计的特异性引物进行扩增(图 2)。利用常规 SDS 法提取的 RNA 做模版,扩增得到的片段模糊、弥散;利用改良之后的 SDS 法提取的 RNA 为样品,经过 PCR 扩增后得到的条带清晰、单一,且片段大小为 400 bp,与目的片段大小一致。试验重复 2 次,确保准确性。排除说明改良 SDS 法适合云南柃[木衣]总 RNA 的提取,可以用于后续 RT-PCR 试验。



注:M:标记;1,2:SDS法;3,4:改良 SDS 法。

图 2 RT-PCR

Fig. 2 RT-PCR results

### 3 结论与讨论

高质量、高纯度的 RNA 是顺利开展 RT-PCR 等后续试验的前提。然而植物中多酚、多糖和 RNase 等物质的存在阻碍了高质量 RNA 的提

取<sup>[5]</sup>。多糖的水解性质与 RNA 极为相似,且易形成不溶于 DEPC 水的沉淀,从而降低提取 RNA 的成功率<sup>[10]</sup>。云南柃[木衣]富含多酚,其叶的多酚含量是苹果<sup>[2]</sup>、梨<sup>[11]</sup>的 1 倍以上,在细胞破裂时释放出大量的多酚,极易被氧化为醌类物<sup>[12]</sup>,这些被氧化的酚类化合物会与 RNA 形成不可逆的混合物<sup>[7]</sup>,影响 RNA 的得率和纯度。目前防止植物组织中酚类物质氧化的方法很多,如丙酮法<sup>[13]</sup>、热硼酸法<sup>[14]</sup>等。植物体内外 RNase 广泛且稳定的存在不仅会引起 RNA 的降解<sup>[15]</sup>,还会影响其质量。诸多因素决定了 RNA 提取的难度。目前已报道的蔷薇科植物提取 RNA 成功的方法有 CTAB 法、Trizol 法、异硫氰酸胍法、SDS 法、高氯酸盐法等等。然而由于不同植物在内含物的组分及含量之间有着巨大的差异,因此,针对不同的植物或同一植物不同品种需要采取不同的 RNA 提取方法<sup>[16]</sup>。在解决多酚、多糖、盐类以及有机溶剂这些可避免因素的污染同时,要尽量在低温、封闭的环境中进行操作,设法抑制 RNase 这一不可避免因素的活性,最大程度的减少 RNA 的降解,从而得到高质量、高纯度的 RNA。

张宇等<sup>[17]</sup>利用 CTAB 法提取紫叶李的 RNA,得到清晰的 28S、18S 条带,紫外光谱分析  $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  的比值均在高质量 RNA 的标准范围内;吴静等<sup>[18]</sup>改良 Trizol 法及改良异硫氰酸胍法都不能从牡丹根系中提取出高质量 RNA,而利用 CTAB 法得到了高质量的 RNA;夏春兰等<sup>[19]</sup>利用 CTAB 法同样也提取了高质量的 RNA。本试验采取 CTAB 法提取的 RNA 虽然有较暗的 3 条带出现,但界限模糊,泳道拖带现象严重。这可能是由于云南柃[木衣]富含多酚、多糖等一些尚未能确定的次生代谢产物导致的。在提取 RNA 的过程中,这些物质与 RNA 形成了不溶于水、不可逆的混合物,导致了琼脂糖凝胶电泳图中的拖带等现象,影响了 RNA 的得率和质量。因此,尽可能除掉多糖、多酚及其次生衍生物,降低其对 RNA 的污染,对高质量 RNA 的提取至关重要。

参考邓浪等<sup>[8]</sup>提取猕猴桃的 SDS 法,提取的 RNA 有了较为清晰 RNA 条带,然而泳道仍然存在明显的拖带,且 18S 的亮度是 28S 的 2 倍,说明 RNA 不仅受到了多酚、多糖等物质的污染,还发生了一定的降解。因此对邓浪等<sup>[8]</sup>的 SDS 法做了几点改进。首先增加了  $\beta$ -巯基乙醇的量,并且在缓冲液中加了 PVP。当加入预热的缓冲液时,细胞破碎释放出的酚类化合物易被氧化形成醌类物质,而  $\beta$ -巯基乙醇有极强的还原性,阻碍酚的氧化<sup>[20]</sup>;PVP 可作为螯合剂与大量的多酚物质形成极易被去除的

螯合物。这两者有效降低了云南柃[木衣]含有大量多酚的困扰。其次是洗涤沉淀的方法做了变动,借助了试剂盒中的 HiBind RNA Mini 柱。在提取 RNA 的过程中,发现了多糖形成的凝胶状物质与 RNA 共同沉淀<sup>[21]</sup>,多糖的理化性质与 RNA 相似,很难将其分离,是污染 RNA、降低 RNA 得率的重要因素。因此,降低多糖的含量是提高云南柃[木衣]总 RNA 的质量和得率以及后续分子生物学研究的关键。本试验利用 HiBind RNA Mini 柱过滤沉淀,将难溶于 DEPC 水的多糖形成的大分子胶状物质过滤与 RNA 分离,从而提高了云南柃[木衣] RNA 质量和得率。

综合上述,CTAB 法和传统 SDS 法虽能得到 RNA 的 3 条带,但拖带现象严重,质量不佳,且 CTAB 法所需时间较长,存在不可避免的降解;2 种试剂盒法和 trizol 法虽所需时间较短,但不适合云南柃[木衣]RNA 提取,无法得到 28S、18S rRNA 条带。本试验通过琼脂糖凝胶电泳、核酸蛋白检测仪和 RT-PCR 方法,证明了改良 SDS 法最适合高质量、高纯度云南柃[木衣]叶片总 RNA 的提取,为云南柃[木衣]进一步的分子生物学研究提供了重要的技术支撑。

## 参考文献:

- [1] 刘刚,吴京,朱明君,等. 云南柃[木衣]叶提取物片段抗氧化活性及成分分析[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2014,39(9):73-81.
- [2] 刘海霞,刘刚,张晓喻,等. 柃[木衣]属植物多酚的含量测定与比较[J]. 食品科学,2014,35(24):295-300.  
LIU H X, LIU G, ZHANG X Y, *et al.* Determination of polyphenol contents in *docynia dene* [J]. Food Science, 2014, 35(24):295-300. (in Chinese)
- [3] 杨晓娜. 植物组织总 RNA 提取方法的比较[J]. 科技视界, 2014(34):157-157.
- [4] 毛积鹏,祝文娟,王博,等. 火炬松总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2016,14(8):2031-2035.  
MAO Z P, ZHU W J, WANG B, *et al.* Comparison of methods for RNA extraction from *Pinus taeda* L [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(8):2031-2035. (in Chinese)
- [5] 张恺恺,李清,惠楠,等. 红豆杉总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2018,17(18):5993-5999.  
ZHANG K K, LI Q, HUI N, *et al.* Comparison of total RNA extraction methods from *Taxus chinensis* [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 17(18):5993-5999. (in Chinese)
- [6] 康亚璇,陈武,庞晓明,等. 枣不同组织提取 RNA 方法的比较及优化[J]. 分子植物育种,2015,13(12):2871-2882.  
KANG Y X, CHEN W, PANG X M, *et al.* The comparison and improvement of RNA extraction methods in different tissues in chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Molecular Plant-Breeding, 2015, 13(12):2871-2882. (in Chinese)
- [7] 黄国文,管天球,赵雨云,等. 油茶叶片总 RNA 提取的改良 Trizol 法及比较[J]. 分子植物育种,2018,16(18):5920-592.  
HUANG G W, GUANG T Q, ZHAO Y Y, *et al.* The improved trizol method and comparison of total rna extraction from *camellia oleifera* leaves [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(18):5920-5926. (in Chinese)
- [8] 邓浪,包昌艳,周军,等. 一种快速提取猕猴桃 RNA 的新方法[J]. 分子植物育种,2018,16(10):3234-3239.  
DENG L, BAO C Y, ZHOU J, *et al.* A new method for rapid extraction of RNA in kiwi [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(10):3234-323. (in Chinese)
- [9] 史宝胜,卓丽环. 紫叶李叶片总 RNA 提取方法的改进与比较[J]. 分子植物育种,2006,4(5):721-725
- [10] 王颖芳,陈艳琳,王文娟. 适用于转录组测序的人参根总 RNA 提取方法的筛选[J]. 广东药学院学报,2017,33(1):19-22.
- [11] 郑迎春,曹玉芬,李静田,等. 梨叶多酚提取的正交试验优化及其成分测定[J]. 食品科学,2015,36(20):32-36.
- [12] 魏琦琦,冯延芝,林青,等. 适于转录组测序的枣不同器官总 RNA 提取方法筛选[J]. 经济林研究,2015,33(2):63-67.  
WEI Q Q, FENG Y Z, LIN Q, *et al.* Screening of total RNA extraction methods for RNA sequences from different organs in *Ziziphus jujuba* [J]. Nonwood Forest Research, 2015, 33(2):63-67. (in Chinese)
- [13] 许明,杨志坚,郑金贵. 藤茶叶片总 RNA 的提取及苯丙氨酸解氨酶基因(pal)片段的克隆[J]. 生物学杂志,2015,32(2):2095-1736.  
XU M, YANG Z J, ZHENG J G. Extraction of total RNA from leaves of *Ampelopsis grossedentata* and cloning of phenylalanine ammonia lyase gene fragment [J]. Journal of Biology, 2015, 32(2):2095-1736. (in Chinese)
- [14] 杨谷良,谭晓风. 热硼酸盐法提取梨雌蕊 RNA 方法改进及提取效果[J]. 西北林学院学报,2006,21(2):54-56.
- [15] 侯双利,刘翠晶,杨利民,等. 影响植物组织总 RNA 质量的因素[J]. 人参研究,2013,25(2):11-16.
- [16] 王杰,王全,田娜,等. 不同植物组织 RNA 提取方法的比较分析[J]. 北京农学院学报,2015,30(1):76-80.
- [17] 张宇,唐志鹏,秦荣耀,等. 金柑果肉组织总 RNA 提取方法比较[J]. 经济林研究,2018,36(4):1003-8981.
- [18] 吴静,李永华,何松林. 牡丹根系 RNA 提取方法的比较研究[J]. 西北林学院学报,2010,25(5):60-63.  
WU J, LI Y H, HE S L. Comparative study of extraction methods for total RNA from the roots of *paeonia suffruticosa* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(5):60-63. (in Chinese)
- [19] 夏春兰,闻志彬,张玉芳. 新疆野苹果果实总 RNA 提取方法的筛选[J]. 干旱区研究,2019,36(2):172-178.  
XIA C L, WEN Z B, ZHANG Y F. Choosing of methods for total RNA extraction from *Malus sieversii* fruits in Xinjiang [J]. Arid Zone Research, 2019, 36(2):172-178. (in Chinese)
- [20] 刘洁,江静怡,徐吉臣. 一种改良的云杉针叶总 RNA 提取方法,分子植物育种,2014,12(3):554-561.
- [21] 李霞,王欣,后猛,等. 紫肉甘薯块根总 RNA 提取方法的评价[J]. 分子植物育种,2015,13(1):165-170.