

技术创新
Updated Technology

一种适于 PCR 扩增的植物基因组快速提取新方法

李筱婷¹ 陈卓君¹ 许文涛^{1,2*} 元延芳² 王一南² 黄昆仑^{1,2}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京, 100083; 2 农业部转基因生物使用安全检验监督测试中心, 北京, 100083

* 通讯作者, xuwentao1111@sina.com

摘 要 在传统的碱裂解法提取基因组的基础上建立了一种新的基因组提取方法, 这种方法对传统碱裂解制备基因组的方法进行优化, 并且调整了中和剂的用量, 引入异丙醇沉淀步骤对基因组进行纯化。实验证明这种方法扩大了碱裂解法制备基因组的适用范围, 可直接从植物种子中快速提取出用于 PCR (polymerase chain reaction) 模板的基因组, 对于 600 bp 以下的目的基因的检测效果显著, 可以发现待测组分含量大于 1% 的样品。整个基因组提取时间控制在 21 min, 大大缩短了基因组提取时间, 并且避免了酚 / 仿等对人体有害药品的使用。

关键词 DNA 提取, 碱裂/ 醇沉法, 中和, PCR

A New Simple and Rapid Plant DNA Extraction Method for PCR Analysis

Li Xiaoting¹ Chen Zhuojun¹ Xu Wentao^{1,2*} Yuan Yanfang² Wang Yinan² Huang Kunlun^{1,2}

1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing, 100083; 2 The Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Organisms Food Safety, Ministry of Agriculture, Beijing, 100083

* Corresponding author, xuwentao1111@sina.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.02.031

Abstract A new DNA extraction method was established based on the traditional alkaline lysis method. In comparison with the former method, the conditions of the extraction reaction were optimized. The volume of neutralization solution was adjusted and the isopropanol precipitation step was added for the purification of DNA. The result showed that the applicability of the new NaOH-based method was extended. DNA quickly extracted by this method could be directly used as templates to amplify fragments of the length of which were less than 600 bp. If the content is more than 1%, samples could be specifically amplified. The whole process could be finished in 21 minutes, which largely shortened the extraction time. And the new method also avoided the use of toxic reagents such as tris-phenol.

Keywords DNA extraction, Alkaline lysis/isopropanol precipitation method, Neutralization, PCR

基于 PCR 反应的分子检测具有速度快、灵敏度高、对模板要求较低等特点, 是目前应用最为广泛的转基因食品检测方法。传统的基因组模板制备方法如 CTAB 法、SDS 法, 多是采用表面活性物质裂解样品细胞, 从而使基因组释放出来, 再经过一系列的抽提、分离, 将样品中的杂质一一除去, 最终得到纯净完整的 DNA 分子。这些方法的优点是得到的基因组

纯度高、完整性好, 在分子生物学研究上具有广泛的应用, 但是其缺点也是显而易见的——即使经过改进, 整个基因组提取过程仍需要约 2 h, 且存在反复离心、沉淀的步骤, 消耗大量的人力和时间(George, 2004; Chen and Ronald, 1999), 无法满足快速检测的需要。并且所用到的试剂中 Tris- 饱和酚、异戊醇等存在一定毒性, 对检测人员不利。

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.02.031

基金项目: 本研究由国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10Z440)、国家自然科学基金(No.30800770)和转基因生物重大专项(2008ZX08012-001)共同资助

收稿日期 2009-04-13 接受日期 2009-05-07

目前国内外开发了多种商品化的 DNA 提取纯化试剂盒,其分离原理有的利用核酸的分子量差异,有的利用特异性膜与 DNA 结合达到分离、回收的目的,如离子交换柱、磁珠等。这些试剂盒针对不同的材料来源设计了不同的提取方法,操作简单、高效, DNA 质量较高,但价格昂贵,提取量少(易庆平等, 2007)。

碱裂解法 (Klimyuk et al., 1993) 和高温水煮法 (Henry, 1997) 作为常见的快速简便的提取基因组的方法,利用碱性、高温等条件对植物组织进行处理,使其细胞膜溶解、蛋白变性,基因组游离出来,得到的基因组不需经过复杂的纯化过程,即可直接用于 PCR 反应。有资料介绍,利用碱裂解法提取基因组,每人每天可以提取超过 5 000 个样品 (Rebecka et al., 2003)。Manuel Porcar 等对裂解法加以改进,将以 Tris-HCl 稀释裂解后的基因组改为以 3 mol/L NaAc (pH=5.2) 对裂解液进行中和,使碱裂解法的灵敏度大大提高(Manuel et al., 2007)。但是,在目前的文献中,这种方法多被应用于幼嫩的根、叶等少数 DNA 含量丰富的植物组织,对于样品要求较为苛刻。

本实验采取碱裂/醇沉的方法,在 Manuel Porcar 方法的基础上加以改进,优化中和液的用量,调整中和后体系的 pH 值,最大程度的保留基因组并去除杂质,同时增加醇沉步骤,将获得的基因组模板用异丙醇沉淀,进一步纯化模板并对基因组进行浓缩,提高检测的灵敏度。整个实验用提取过程时间为 21 min。

1 结果与分析

1.1 碱裂/醇沉法与 CTAB 法基因组提取效果比较

以 BT176 玉米为实验材料比较这两种方法对植物基因组的提取结果,发现以 CTAB 法提取的基因组片段完整,点样孔无蛋白残留,基因组无拖尾现象;而以碱裂/醇沉法提取的基因组呈弥散状态,且点样孔有少量蛋白残留(图 1A)。对上述两种方法进行 PCR 扩增,电泳后发现 PCR 产物无明显差异(图 1B)。可见,碱裂/醇沉法虽然在一定程度上造成基因组的降解,但不影响基因组的 PCR 扩增。

1.2 碱裂/醇沉法对多种植物基因组的提取结果

经过琼脂糖电泳后发现,以碱裂/醇沉法提取上述样品得到的基因组并不令人满意。大部分样品点样空中有蛋白残留,部分样品残留量较多。所有样品的基因组普遍存在严重降解,但不同组织基因组降解情况不同,如玉米基因组条带主要集中在 1 000 bp 以下,部分组织甚至没有得到电泳可见的基因组(图 2A)。

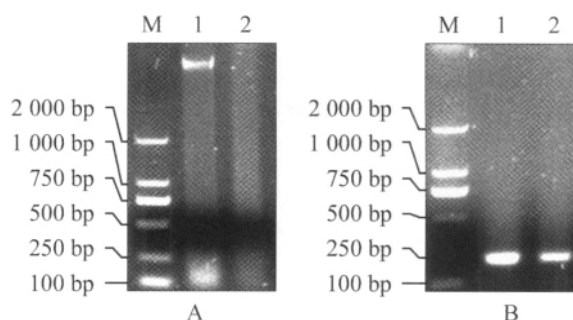


图 1 碱裂/醇沉法与 CTAB 法提取基因组结果的比较
注: A: 两种方法提取得到基因组状态; B: 两种方法提取的基因组以 IVR226 为引物进行 PCR 扩增所得产物的电泳结果; 两个图中: 1: DNA 模版由 CTAB 法制备; 2: DNA 模版由碱裂/醇沉法制备; M: DL2000 marker

Figure 1 Comparison of the DNA templates obtained by CTAB method and alkaline lysis / isopropanol precipitation method
Note: A: DNA templates obtained by the two method; B: The products of PCR amplification with the two DNA templates; In the two figures: 1: DNA templates obtained by CTAB method; 2: DNA templates obtained by alkaline lysis/isopropanol precipitation method; M: DL2000 marker

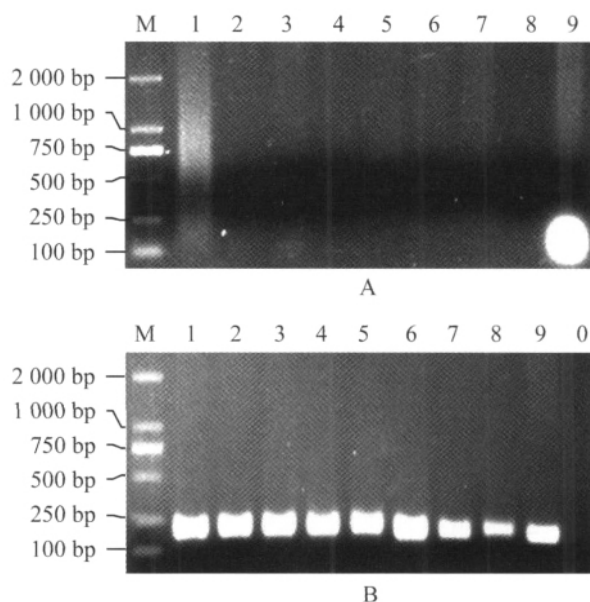


图 2 不同植物样品基因组模板的提取及 PCR 结果
注: A: 不同植物样品基因组的基因组提取结果; B: 以上基因组为模板进行 PCR 扩增的结果; 1: 玉米; 2: 花生; 3: 大豆; 4: 芹菜; 5: 茼蒿; 6: 油菜; 7: 西红柿; 8: 胡萝卜; 9: 西兰花; M: DL2000 marker; 0: 对照

Figure 2 DNA extraction from different plants and rRNA amplification
Note: A: DNA extracted from different plant samples; B: PCR amplification result of the DNA templates above; 1: Maize; 2: Peanut; 3: Soybean; 4: Celery; 5: Crown daisy; 6: Rape; 7: Tomato; 8: Carrot; 9: Broccoli; M: DL2000 marker; 0: Control

尽管如此，对提取的基因组以叶绿体 rRNA-180 为引物进行 PCR 扩增后，所有样品均得到电泳可见的目的基因条带，且扩增片段的亮度差异不大。可见，对于淀粉含量较多的样品(如玉米)，脂肪含量较多的样品(如花生)，蛋白含量较多的样品(如大豆)，以及各种新鲜的植物组织，以碱裂 / 醇沉法提取得到的基因组均可用于 PCR 扩增。

1.3 中和剂体积对 PCR 反应结果的影响

以 IVR226 扩增玉米内标基因为例，发现中和剂用量与 PCR 扩增得到目的基因条带的亮度存在倒“U”形关系：中和剂用量过少，不利于多糖和蛋白质的去除，导致 PCR 反应所得目的基因模糊；而过高时溶液酸性过强，可能导致基因组的过度降解。经比较发现，当中和液：裂解液=2:3 时，所得基因组蛋白含量最少，用于 PCR 反应效果最好(图 3)。测定此时基因组溶液的 pH 值约为 4.6。

1.4 醇沉对基因组提取结果的影响

醇沉是核酸分子的提取和净化中的常规步骤，其原理是根据核酸分子易溶于水而不溶于乙醇、异丙醇、聚乙二醇等有机溶剂的特点，向提取的基因组中加入一定体积的醇，可以将核酸分子沉淀出来，使之与醇溶性杂质分离，分离沉淀后加入少量的水溶解核酸沉淀，对核酸起到浓缩的作用。但是，在碱裂解提取基因组中，这一步却往往被省略。然而，在对玉米基因组提取的实验中发现，保持其他实验步骤不变，仅仅减少异丙醇醇沉的步骤，得到的基因组电泳后看不到明显条带，而醇沉后的样品有明显的弥散条带。对以上两组玉米基因组以 IVR226 为引物进行 PCR 扩增，发现未经醇沉扩增后没有得到目标基因条带，经过醇沉后的样品，PCR 反应后得到明显的条带。结果可见醇沉是此实验中的一个关键步骤(图 4)，不经过醇沉步骤得到的基因组电泳无法分辨，也不能用于 PCR 反应。因此，在碱裂解法中添加醇沉步骤，是提取结果成功并稳定的保证。

1.5 碱裂/醇沉法对不同长度目的基因的扩增效果

从以上实验中可以看到，由碱裂 / 醇沉法所得植物基因组因降解而呈现弥散状态，基因组电泳条带主要集中在 1 000 bp 以下，而以上实验中所扩增的基因均为 200 bp 左右的植物内标基因，因此有较好的扩增效果。为了比较该方法对不同片段大小的基因的扩增效果，实验选择了 Bt176 玉米中的三段基因作为扩增对象，相应的引物分别为 Bt176 (570 bp)，

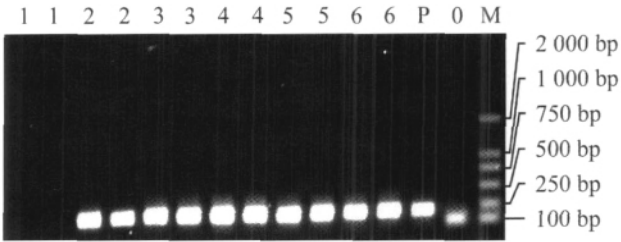


图 3 不同体积中和液对 PCR 反应的影响
注：1~6：样品提取时加入中和液体积依次为 1/6，1/3，1/2，2/3，3/4，1/1；每个体积做两组平行；P：阳性对照；0：空白对照；M：DL2000 marker

Figure 3 Effect of various volumes of neutralization solution on PCR assay
Note: 1~6: The dosages of neutralization solution were 1/6, 1/3, 1/2, 2/3, 3/4, 1/1; Each dosage had a parallel design study; P: Positive control; 0: Blank control; M: DL2000 marker

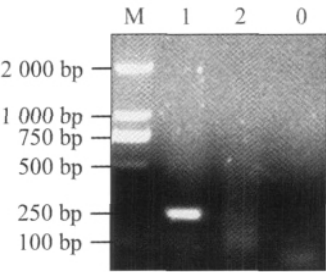


图 4 醇沉对 PCR 反应的影响
注：1：经过醇沉所得基因组的 PCR 产物；2：未经醇沉基因组的 PCR 产物；M：DL2000 marker；0：空白对照

Figure 4 Effect of isopropanol precipitation on PCR assay
Note: 1: PCR products of the DNA template precipitated by isopropanol; 2: PCR products of the DNA template not precipitated by isopropanol; M: DL2000 marker; 0: Blank control

Bt176 (100 bp)和 CAMV35S (195 bp)。从电泳结果来看，碱裂 / 醇沉法提取的基因组尽管已经片段化，且 Bt176 (570 bp)扩增结果中存在非特异性条带，但是主条带亮度明显高于非特异性条带，因此并不影响 600 bp 左右片段大小目的基因片段的扩增效果，且扩增效果比 CTAB 法提取的基因组作为模板的扩增效果要稍好，这可能因为基因组片段化后减少了染色体空间折叠造成的位阻，使得引物与目的片段更容易结合。同样对于 195 bp 的 CAMV35S 基因和 100 bp 的品系特异性片段也获得了良好的扩增效果，也就是说对于碱裂 / 醇沉法提取的基因组对于 600 bp 以下的目的片段扩增效果比较理想，甚至比 CTAB 法提取的基因组的扩增效果更好(图 5)。经过多次重复，碱裂 / 醇沉法提取的基因组提取效果和 PCR 扩增效果也非常稳定 (图略)。由此可以看出，

本实验优化的碱裂 / 醇沉法比其他快速提取法能够提取出更高质量的基因组, 并且基因组中因为成分大大减少也减轻了碱裂法对于 PCR 反应的抑制效果。由于目前转基因成分定性检测的目的扩增片段基本都小于 600 bp, 所以碱裂 / 醇沉法完全可以满足转基因产品快速检测的需要。

1.6 碱裂/醇沉法的灵敏度

将研磨后的玉米样品与大豆样品按质量比 10%、1%、0.1% 混合后, 采用碱裂 / 醇沉法提取基因组, 经过以玉米内标基因 IVR226 为引物的 PCR 扩增后, 以纯玉米样品提取基因组扩增产物为阳性对照, 纯大豆样品扩增产物为阴性对照, 发现当玉米的含量小于等于 1% 时, PCR 扩增后可以得到肉眼可辨的目的基因条带, 继续增加大豆的含量, 则超过该方法的分辨范围, 无法的到目标条带, 碱裂 / 醇沉法可

以分辨含量大于 1% 的样品(图 6)。

2 讨论

经过以上的实验发现, 与 Manuel Porcar 的方法相比, 碱裂 / 醇沉法明显扩大样品的适用范围, 得到令人满意的实验结果。PCR 反应结果显示, 碱裂 / 醇沉提取的基因组虽然存在降解, 但适用于 600 bp 以下目的基因的扩增, 扩增效果甚至好于传统 CTAB 法提取的基因组模版, 而且反应灵敏度高, 可用于在复杂的食物体系中发现含量在 1% 以上的样品。但是碱裂解法提取的基因组不宜长期保存, 实验中发现基因组保存超过 3 d, PCR 扩增效果明显下降; 超过 7 d, 则扩增后无法得到目的基因。因此, 提取基因组后及时进行 PCR 扩增是实验成功的重要保证。

为了证明碱裂 / 醇沉法的普适性, 在实验材料的选择上, 考虑到植物的可食器官主要有根、茎、叶、花、果实、种子, 选择的植物样品不仅来自不同种属, 而且包含了以上六种器官, 并且所选择的样品成分差异明显多糖、蛋白质、脂肪等含量丰富的样品都有所涉及。用碱裂 / 醇沉法制备以上来源和组成差异明显的植物样本, 均得到很好的效果, 因此证明了碱裂 / 醇沉法的普适性。

本实验中中和剂 3 mol/L NaAc (pH=5.2) 的作用是一方面, 裂解液为高 pH 值的 NaOH 溶液, 因此向样品中加入裂解液后, 富含淀粉的植物组织在高 pH 的条件下因淀粉糊化而呈现粘稠状态, 即使长时间高速离心也无法得到上清液, 严重影响植物基因组的提取, 加入中和液后可以破坏淀粉糊化状态, 便于离心分离; 另一方面, 中性盐溶液(如 NaAc、NaCl 等)

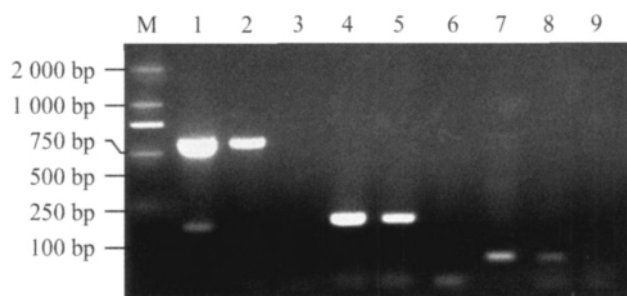


图 5 以碱裂 / 醇沉法扩增不同片段大小的目的基因的结果
注: 1~3: 以引物 Bt176 (570 bp) 扩增的结果; 1: 以碱裂醇沉法提取基因组为模板; 2: 以 CTAB 法提取基因组为模板; 3: 阴性对照; 4~6: 以引物 CAMV35S (195 bp) 扩增的结果; 4: 以碱裂醇沉法提取基因组为模板; 5: 以 CTAB 法提取基因组为模板; 6: 阴性对照; 7~9: 以引物 Bt176 (100 bp) 扩增的结果; 7: 以碱裂醇沉法提取基因组为模板; 8: 以 CTAB 法提取基因组为模板; 9: 阴性对照; M: DL2000 marker

Figure 5 PCR amplification of the DNA template obtained by alkaline lysis / isopropanol precipitation method for the target fragments with different length

Note: 1~3: PCR amplification result with the primers of Bt176 (570 bp); 1: DNA templates obtained by CTAB method; 2: DNA templates obtained by alkaline lysis/isopropanol precipitation method; 3: Negative control; 4~6: PCR amplification result with the primers of CAMV35S (195 bp); 4: DNA templates obtained by CTAB method; 5: DNA templates obtained by alkaline lysis / isopropanol precipitation method; 6: Negative control; 7~9: PCR amplification result with the primers of Bt176 (100 bp); 7: DNA templates obtained by CTAB method; 8: DNA templates obtained by alkaline lysis/isopropanol precipitation method; 9: Negative control; M: DL2000 marker

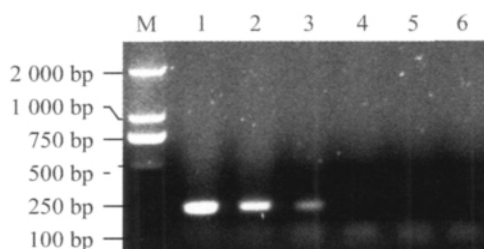


图 6 碱裂醇沉法灵敏度检测

注: 1: 纯玉米样品; 2~4: 玉米含量 10%、1%、0.1% 的玉米大豆混合样品; 5: 纯大豆样品; 6: 空白对照; M: DL2000 marker

Figure 6 Sensitivity of alkaline lysis / isopropanol precipitated method

Note: 1: Maize; 2~4: Mixtures of maize and soybean, the contents of maize were 10%, 1% and 0.1%; 5: Soybean; 6: Blank control; M: DL2000 marker

具有沉淀多糖、蛋白质的作用(Dellaporta et al., 1983; Fang et al., 1992),可以有效去除杂质,净化基因组。

经过中和的基因组由于含有大量盐离子,离子强度较大,且基因组浓度较小,直接用于PCR反应可能导致结果呈现假阴性。引入醇沉步骤,可以对基因组进行洗涤,进一步去除醇溶性杂质,降低离子强度,同时也起到浓缩作用,增加了方法的灵敏度。

碱裂/醇沉法使用的试剂均为分子生物学实验室的常见试剂,试剂成本低、毒性小、安全性好,对条件要求宽松,且方法简便,尤其适用于新鲜样品的快速检测。但是,由于得到的基因组仍存在杂质,醇沉后的基因组不易吹干,对基因组的溶解可能造成一定困难,溶解时用枪头将沉淀捣碎混匀即可。

3 材料与方法

3.1 材料

粮谷类:BT176转基因玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)为实验室储备,花生(*Arachis hypogaea*)购自中国农业大学家属区菜市场,用粉碎机粉碎后过60目筛子备用;茎类:茼蒿(*Chrysanthemum coronarium*)、芹菜(*Apium graveolens*)取茎部分,液氮研磨后备用;叶类:油菜(*Brassica campestris*)取新鲜叶子加液氮研磨后备用;根类:胡萝卜(*Daucus carota*)去皮后取式适量样品,加液氮研磨后备用;花类:西兰花(*Brassica capitata var. italica*)去除茎部,仅保留花,加液氮研磨后备用;果实类:番茄(*Lycopersicon esculentum*)去除果蒂,取果肉加液氮研磨后备用。除粮谷类外,其他样品均购自中国农业大学家属区菜市场。

醋酸钠 3 mol/L pH=5.2;氢氧化钠 0.5 mol/L;乙醇 70%;异丙醇 100%。以上均采用分析纯试剂配制。10×PCR Buffer:100 mmol/L Tris-HCl 500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂,dNTPs混合液,各2.5 mmol/L;TaKaRa Taq™ DNA聚合酶 5 U/L,大连宝生物工程有限公司;琼脂糖,上海 Yito 企业有限公司;DL2000 DNA marker 300 ng/5L,大连宝生物工程有限公司;rTaq DNA聚合酶、dNTP、DNA Marker DL 2000 购于Sigma公司。本实验所用引物均由上海生工合成。

3.2 DNA 提取方法

碱裂/醇沉法:称取0.05 g样品于1.5 mL Eppendorf管中,加入500 μL 0.5 mol/L NaOH溶液,用枪头小心搅拌使其充分混匀,沸水浴加热1 min。取出后加入3 mol/L NaAc (pH=5.2) 333 μL中和,颠倒

混匀,离心(12 000 r/min 10 min)。将上清转移到新的1.5 mL Eppendorf管中,加入与上清等体积的异丙醇,混匀后离心(12 000 r/min 10 min)。弃去上清,沉淀加70%无水乙醇洗涤后吹干,加50 μL水溶解,用于PCR反应(样品及中和液用量可根据不同样品进行调整,如果加入NaAc离心后上清太多,可将上清分两部分醇沉,最后合并沉淀)。

CTAB法:称取0.05 g样品与1.5 mL Eppendorf管中,加入700 μL CTAB缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 20 g/L CTAB)混合均匀后放入65℃水浴中保温1 h,期间每10 min振荡离心管一次。然后转移上清,加入与上清等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,颠倒混匀,12 000 r/min离心10 min。转移上清,加入等体积的氯仿:异戊醇混合液,颠倒混匀,12 000 r/min离心10 min。转移上清,加入2/3倍体积的异丙醇,1/10体积的醋酸钠溶液,轻柔地颠倒混匀。冰浴30 min。12 000 r/min离心10 min,弃去上清,用一定体积70%的乙醇悬浮沉淀,12 000 r/min离心2 min。倒掉乙醇,干燥DNA沉淀。加入50 μL水,充分溶解,最后加入5 μL RNA酶,消化30 min,得到的基因组可用于电泳及PCR扩增(许文涛等,2005)。

3.3 PCR 反应

PCR反应在30 μL体系中进行,体系组成包括10×PCR buffer 3 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.4 μL,上、下游引物各1.5 μL,Taq DNA聚合酶0.4 μL,提取的DNA 1 μL,用水补足30 μL。扩增程序为94℃预变性5 min,94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环,最后72℃延伸10 min。

本实验所用PCR扩增引物见表1。

3.4 琼脂糖凝胶电泳检测

基因组用1%琼脂糖凝胶电泳检测,PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。电泳缓冲液为1×TAE,GOLDVIEW染色,凝胶成像仪拍照。

参考文献

- Chen D.H., and Ronald P.C., 1999, A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications, *Plant Molecular Biology Reports*, 17: 53-57
- Dellaporta S.L., Wood J., and Hicks J.B., 1983, A plant DNA minipreparation; version , *Plant Biology Reporter*, 1(4): 19-21
- Fang G., Hammar S., and Grumei R., 1992, A quick and inex-

表 1 本实验所用引物

Table 1 The primers used in this study

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	长度(bp)	片段(bp)	温度(℃)	参考文献
Gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Segment	Tm (℃)	Reference
IVR	IVR226	F: 5'-CCGCTGTATCACAAAGGGCTGGTCAC-3'	25	226	58	许芳等, 2008
		R: 5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3'	25			
Chloroplast rRNA	Chloroplast rRNA180	F: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	20	180	58	GB/T 19495.4-2004
		R: 5'-TTCCATTGAGCTTCTGCACCT-3'	21			
BT176	BT176-570	F: 5'-AAGCACGGTCAACTTCCGTAC-3'	21	570	58	农业部 869 号公告 -8-2007
		R: 5'-TCGACTTTATAGGAAGGGAGAGG-3'	23			
BT176	BT176-100	F: 5'-GTGTCACCAGCAGCAAACCAG-3'	21	100	58	许文涛等, 2005
		R: 5'-ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT-3'	25			
CAMV35S	CAMV35S-195	F: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	19	195	58	许芳等, 2008
		R: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	21			

pensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA, Biofeedback, 13(1): 52-54

GB/T 19495.4-2004, Detection of genetically modified organisms and derived products—qualitative nucleic acid based on nucleic acid (GB/T 19495.4-2004, 转基因产品检测核酸定性 PCR 检测方法)

George S.M., 2004, A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA, Plant Molecular Biology Reporter, March, 22: 71-81

Henry R.J., 1997, Practical applications of plant molecular biology, Chapman & Hall, London, UK

Klimyuk V.I., Carroll B.J., Thomas C.M., and Jones J.D.G., 1993, Alkali treatment for rapid preparation plant material for reliable PCR analysis, The Plant Journal, 3: 493-494

Manuel P., Silvia R., and Amparo L., 2007, A simple DNA extraction method suitable for PCR detection of genetically modified maize, Journal of the Science of Food and Agriculture, 87: 2728-2730

Rebecka von P., Lars von P., Christophe D., Marie N., Brian P.F., and Stine T., 2003, A high-throughput DNA extraction method for barley seed, Euphytica, 130: 255-260

Xu F., Li X., Luo X., and Liu Z.G., 2008, The PCR for detecting genetically modified components in maize, Wuhan Gongye Xueyuan Xuebao (Journal of Wuhan Polytechnic University), 27(1): 5-7, 27 (许芳, 李鑫, 罗欣, 刘志国, 2008, 玉米中转基因成分的定性 PCR 检测, 武汉工业学院学报, 27(1): 5-7, 27)

Xu W.T., Huang K.L., Deng A.K., and Luo Y.B., 2005, PCR for anti-herbicide genes detection in genetically modified organisms, Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Chinese Journal of Agricultural Biotechnology), 13(5): 575-579 (许文涛, 黄昆仑, 邓爱科, 罗云波, 2005, 转基因产品中抗除草剂基因的 PCR 检测, 农业生物技术学报, 13(5): 575-579)

Yi Q.P., Luo Z.R., and Zhang Q.L., 2007, Advance of genome DNA extraction and purification in plant, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agriculture Science), 35 (25): 7789-7791 (易庆平, 罗正荣, 张青林, 2007, 植物总基因组提取纯化方法综述, 安徽农业科学, 35(25): 7789-7791)

农业部 869 号公告 -8-2007, Detection of genetically modified plants and derived products qualitative PCR method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize Bt176 and its derivatives (抗虫和耐除草剂玉米 Bt176 及其衍生品种定性 PCR 方法)