

# 山葡萄 cDNA - AFLP 体系的建立及引物的筛选

唐美玲<sup>1,2</sup>, 孔 瑾<sup>2</sup>, 徐维华<sup>1</sup>, 韩振海<sup>2</sup>

(1. 烟台市农业科学研究院 果树所, 山东 烟台 265500; 2. 中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100094)

**摘要:**以山葡萄品种左山一的叶片和花芽为材料,对 cDNA - AFLP 体系的几个关键因素进行摸索,建立了适宜山葡萄的 cDNA - AFLP 反应体系。结果表明,提取山葡萄的花芽 RNA 适宜用改良的 CTAB 法,提取叶片 RNA 适宜用 SDS - 酸酚法。在 2 × Y/T Buffer 的作用下,500 ng 的 cDNA 利用 *Mse* I 与 *Eco*R I 双酶切 4 h 即可酶切完全,将 16 连接过夜的产物稀释 5 倍作为预扩增的模板,预扩增产物稀释 20 倍作为选扩模板能获得带型稳定可重复性好的结果。

**关键词:**山葡萄;cDNA - AFLP

**中图分类号:**S663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 7091(2009)02 - 0079 - 05

## Establishment of cDNA - AFLP Analysis System for *Vitis amurensis* Rupr and Screening Primers

TANG Mei - ling<sup>1</sup>, KONG Jin<sup>2</sup>, XU Wei - hua<sup>1</sup>, HAN Zhen - hai<sup>2</sup>

(1. Institute of Fruit, Yantai Agriculture Science Academy, Yantai 265500, China;

2. Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The cDNA - AFLP system for *Vitis amurensis* Rupr was established after optimizing several key factors affecting cDNA - AFLP analysis. The result indicated that CTAB method could be used for extracting ideal RNA from leaf and inflorescence of *Vitis amurensis* Rupr, while SDS - acidic phenol method for extracting RNA from bud; 500 ng cDNA was digested completely by *Eco*R I and *Mse* I for 6 hours. The reducible results was obtained when the ligation products were diluted to 5 times for preamplification template and preamplification products were diluted to 20 times for selective amplification.

**Key words:** *Vitis amurensis* Rupr; cDNA - AFLP

cDNA - AFLP 技术是以 cDNA 为模板进行 AFLP 分析的一项技术<sup>[1]</sup>。由于该技术具有多态性高、检测基因覆盖面广,并且能对转录组进行全面系统研究等优点,现已被公认为是进行转录基因组学研究的重要工具和寻找差异表达基因的最有效手段。目前已经利用该项技术在白菜<sup>[2]</sup>上构建了转录图谱;从苹果<sup>[3]</sup>、葡萄<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>等多种植物中分离和克隆了多个有价值的基因;研究了棉花<sup>[6]</sup>、草菇<sup>[7]</sup>、板栗<sup>[8]</sup>等植物发育或逆境胁迫下基因差异表达。

欧亚种葡萄非常容易遭受病虫害,并且很多地方需要埋土防寒,培育抗病抗寒葡萄品种具有重要的现实意义。山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)是葡萄属中最抗寒的一个种,对多种病害有较强的抵抗力,因此研究山葡萄抗寒、抗病的分子机制对于葡萄育

种具有重要的意义。本研究拟以山葡萄为试材,建立稳定的 cDNA - AFLP 分析体系,为进一步定位、分离及克隆山葡萄抗性基因奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

植物材料来自中国农业科学院左家特产研究所的山葡萄种质资源圃。2007 年 5 月 5 日采左山一的叶片、花芽,材料取后,用锡箔纸包好,液氮速冻后保存于 - 80 °C 冰箱中备用。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及去除 DNA 的污染 采用改进的 CTAB 法<sup>[9]</sup>和 SDS - 酸酚法<sup>[10]</sup>提取总 RNA;参照 TaKaRa 公司的 Dnase 说明书去除 RNA 中的 DNA,反

收稿日期:2009 - 01 - 07

基金项目:国家自然科学基金项目(30671441;30600416);国家“863”项目(2006AA10Z1B6)

作者简介:唐美玲(1976 - ),女,山东威海人,在职博士后,主要从事葡萄分子生物学方面的研究。

通讯作者:韩振海(1963 - ),男,陕西人,教授,博士,主要从事果树生理及分子生物学研究。

应体系 50  $\mu\text{L}$ ; RNA 溶液 40  $\mu\text{L}$ ; DNase Buffer 5  $\mu\text{L}$ ; RNase Inhibitor 1  $\mu\text{L}$ ; Rnase - Free DNaseI 3  $\mu\text{L}$ ; DEPC 水 1  $\mu\text{L}$ 。以上混合溶液在 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 30 min; 用等体积氯仿抽提一次; 将上清转移入干净的离心管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇, -70  $^{\circ}\text{C}$  放置 0.5 h 沉淀 RNA; 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 20 min; 弃去上清, 沉淀经 75 % 乙醇洗涤后吹干, 用 30  $\mu\text{L}$  DEPC 处理水溶解沉淀, 用紫外分光光度计测量样品浓度, 并用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.2.2 cDNA 双链的合成与纯化 cDNA 第一链参照 Promaga 公司的 M - MLV 反转录酶的说明书合成, 总 RNA 的用量为 2  $\mu\text{g}$ ; 第二链的合成和补平参照 TakaRa 公司的 cDNA Synthesis Kit, 总体系为 150  $\mu\text{L}$ : 第一链混合物 25  $\mu\text{L}$ ; 10  $\times$  DNA polymerase I Buffer 15  $\mu\text{L}$ ; DNA polymerase I 20 U, RnaseH 0.8 U, dNTP (10 mmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补平体系。混匀后, 16  $^{\circ}\text{C}$  反应 2.5 h, 70  $^{\circ}\text{C}$  灭活 10 min, 放在冰上。双链 cDNA 末端补平: 在上述反应物中依次加入 dNTP (10 mmol/L) 2.5  $\mu\text{L}$ , T<sub>4</sub> DNA 聚合酶 5 U, 混匀后, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  灭活 10 min。dscDNA 用等体积的氯仿抽提, 取上清液, 加入 0.1 倍体积的乙酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积冷无水乙醇, -20  $^{\circ}\text{C}$  沉淀后, 溶于无菌 ddH<sub>2</sub>O 中, 调整浓度至 100 ng/ $\mu\text{L}$  备用。

1.2.3 酶切与连接 用 *EcoR* I 和 *Mse* I 两种限制性内切酶在 2  $\times$  Y/ Tango Buffer 缓冲体系内同时进行酶切, 酶切总体系为 40  $\mu\text{L}$ : ds - cDNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , *EcoR* I 10 U, *Mse* I 10 U, 10  $\times$  Y/ Tango Buffer 8  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补平体系。混匀后, 37  $^{\circ}\text{C}$  分别酶切 2, 4, 6, 12 h, 酶切结束后 70  $^{\circ}\text{C}$  灭活 10 min 立即置于冰上。取出 5  $\mu\text{L}$  用 1 % 琼脂糖电泳检测酶切结果。

*EcoR* I 接头序列为: 5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'; 3' - CAT CTG ACG CAT GGT TAA - 5'; *Mse* I 接头序列为: 5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'; 3' - TAC TCA GGA CTC AT - 5', 连接体系为 30  $\mu\text{L}$ : 酶切产物 20  $\mu\text{L}$ , *EcoR* I 接头 (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , *Mse* I 接头 (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ATP (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , T<sub>4</sub> 连接酶 5 U, 10  $\times$  T<sub>4</sub> Ligation Buffer 3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补平体系。混匀后, 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 10 h 以上, 70  $^{\circ}\text{C}$  10 min 中止反应。

1.2.4 预扩增与选择性扩增 预扩增的引物序列为: E - 0: 5' - GAC TGC GTA CCA ATT C - 3'; M - C: 5' - GAT GAG TCC TGA GTA AC - 3'。将连接产物原液及其稀释 5, 10 倍作为预扩增的模板, 总体系为 25  $\mu\text{L}$ : 模板 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 0.4  $\mu\text{L}$ , *EcoR* I 预扩增引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , *Mse* I 预扩增引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 2 U, ddH<sub>2</sub>O 补平体系。预扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 进行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。取 5  $\mu\text{L}$  用 1 % 琼脂糖电泳检测。

选择性扩增的引物列表 1 所示。将预扩增引物稀释 20 倍作为选扩的模板, 扩增体系为 20  $\mu\text{L}$ : 模板 3  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 0.4  $\mu\text{L}$ , *EcoR* I 引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , *Mse* I 引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 2 U, ddH<sub>2</sub>O 补平体系。选择性扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s (每个循环降 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 进行 13 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 进行 23 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

表 1 筛选 AFLP 分子标记的引物序列  
Tab. 1 The sequences of AFLP primers screened

<i>EcoR</i> I 引物 <i>EcoR</i> I primer	引物序列 Primer sequences	<i>Mse</i> I 引物 <i>Mse</i> primer	引物序列 Primer sequences
E1	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAG C-3'	M1	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
E2	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C AG G-3'	M2	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'
E3	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'	M3	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
E4	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'	M4	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
E5	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3'	M5	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
E6	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAC G-3'	M6	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT A-3'
E7	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'	M7	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
E8	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3'	M8	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT T-3'

1.2.5 选择性扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 将选择性扩增产物加入 10  $\mu\text{L}$  变性剂 (98 % 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.25 % 二甲苯氰) 混匀, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 立即冰浴。将 6 % 的变性聚丙烯酰胺凝胶恒功率 80 W 预电泳至温度 50  $^{\circ}\text{C}$ , 加 6  $\mu\text{L}$  冰

浴变性混合液上样, 恒功率 50 W 电泳至二甲苯氰距胶下缘 2/5 处停止。银染显色后统计结果。

1.2.6 差异片段的回收 从聚丙烯酰胺凝胶上回收差异片段至 0.5 mL 离心管中, 加入 20  $\mu\text{L}$  灭菌水, 室温浸泡 24 h, 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴中煮沸 10 min, 8 000

r/min离心 10 min,取上清作模板,进行 PCR 扩增,扩增体系 50  $\mu$ L 如下:模板 4  $\mu$ L,10  $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L,dNTP(10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L,*EcoR* I 引物(10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L,*Mse* I 引物(10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L,*Taq* 酶 2 U,ddH<sub>2</sub>O 补平体系。扩增程序同预扩增程序。扩增产物用 1.5 %琼脂糖进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和 cDNA 的质量

由图 1 可以看出,提取山葡萄叶片总 RNA,利用 CTAB 法和 SDS - 酸酚法都可以,泳道干净无拖尾;通过紫外分光光度计测定发现 SDS - 酸酚法的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值在 1.8 ~ 2.0,说明该法能有效抑制山葡萄叶片中多酚和多糖类物质对 RNA 的影响,提取的总 RNA 纯度高、完整性好,可用于后续的反转录反应。提取山葡萄花芽的总 RNA 只能采取 CTAB 法,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值在 1.9 ~ 2.0,SDS - 酸酚法提取的 RNA 有明显的降解。

利用 M - MLV 和 OligdT<sub>18</sub>合成的 cDNA,取 2  $\mu$ L 进行琼脂糖检测,结果如图 2 所示,cDNA 在 0.5 ~ 2.0 kb 范围内呈弥散分布,符合 cDNA - AHLF 的试验要求。

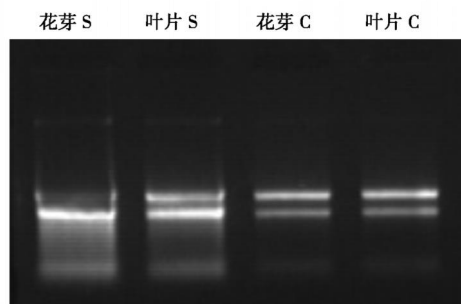


图 1 CTAB 和 SDS - 酸酚法提取 RNA 的电泳结果

Fig. 1 The flower bud RNA result with different extracting method

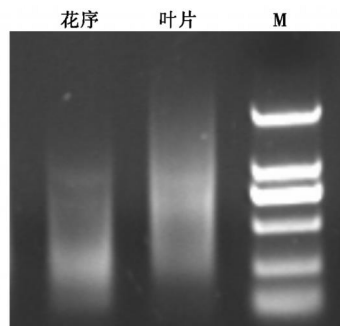


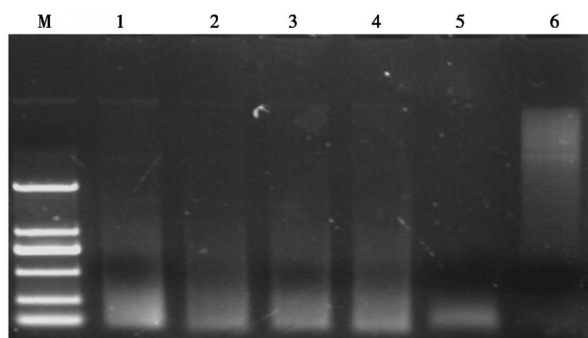
图 2 反转录第一链的电泳结果

Fig. 2 cDNA from grape leaf and inflorescence

### 2.2 dsDNA 的酶切时间

dsDNA 的完全酶切是多态性得以检测的根本保证。本研究采用经典的双酶 *EcoR* 和 *Mse* 组合

进行酶切,由于这两种酶使用的 Buffer 不同,如果分开酶切耽误的时间太多,并且试验步骤繁琐,所以我们采用 2  $\times$ Y/Tanger Buffer 作为两种内切酶的公用 Buffer,在同样的条件下进行酶切,并且设置了不同的酶切时间,从图 3 可以看出,酶切 2 h 不彻底,而酶切 4、6 和 12 h 的效果是一样的,都可以将 dsDNA 切开,酶切片断集中在 100 ~ 600 bp。所以采用 37  $^{\circ}$ C 酶切 4 h。



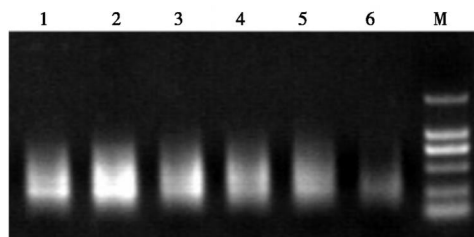
1. 双酶切 2 h;2. 双酶切 4 h;3. 双酶切 6 h;  
4. 双酶切 12 h;5. *EcoR* I 酶切 4 h;6. *Mse* I 酶切 4 h。  
1. Digested for two hours;2. Digested for four hours;  
3. Digested for six hours;4. Digested for 12 hours;  
5. *EcoR* I digested for 4 hours;6. *Mse* I digested for 4 hours;M. DL2000.

图 3 山葡萄 DNA 酶切的电泳结果

Fig. 3 The grape DNA digested by *EcoR* I and *Mse* I

### 2.3 连接产物稀释倍数对预扩增的影响

预扩增是为选择性扩增提供模板,并对模板起选择性纯化作用,本试验采用的是 *EcoR* I + O/*Mse* I + C 的引物组合,并对影响预扩增反应的关键因子连接产物的稀释倍数进行了优化,结果如图 4 所示,连接产物稀释 10 倍扩增信号较弱。直接利用连接原液或稀释 5 倍进行预扩增,其片段集中在 400 ~ 1 000 bp 范围内,信号较强,扩增效果一致,说明预扩增效果较好,因此选择稀释 5 倍的连接产物作为预扩增的模板。



1,2. 利用连接产物的原液作模板预扩增的结果;  
3,4. 稀释 5 倍;5,6. 稀释 10 倍;M. DL2000。

1,2. The pre - amplifying result with the ligation product;  
3,4. The pre - amplifying result with the ligation product diluted 5 times;5,6. The ligation product diluted 10 times.

图 4 连接产物稀释不同的倍数预扩增的电泳结果

Fig. 4 The pre - amplifying result with template diluted differently from ligation product

2.4 选择性引物筛选结果

本研究共选择了 8 个 E - NNN 与 8 个 M - NNN 组合成 64 对引物对山葡萄左山一叶片和花芽进行研究,结果发现只有 44 对引物扩增结果理想,其余 20 对引物中有 12 对引物扩增片段大,并且多集中在胶板上部,不利于统计,另外 8 对几乎没有扩增产物。30 对引物(其中 E - ACT/M - AAC、E - ACT/M - CAT、E - AAG/M - GAA、E - AAG/M - CTT 和 E - AAG/M - NNN 扩增结果如图 5 所示)共扩增出 2 695 条可分辨的 AFLP 条带。其中 9 对引物多态性很高,平均每对引物产生的差异片段为 15 条。表 2 详细说明每对引物组合的扩增情况。

表 2 各引物组合出现的 AFLP 带数及其多态性

Tab.2 AFLP fragment number amplified by different primer combination

引物 Primer	M - CAA	M - CAC	M - CAG	M - CAT	M - CTG	M - CTA	M - CTC	M - CTT
E - AGC	60	×	×	×	56	×	49	50
E - AGG	×	×	×	×	×	×	×	×
E - AAG	68	×	×	67	64	69	×	×
E - ACT	70	68	75	65 *	65	78	67	65
E - ACA	75	73 *	70 *	69	74	73	76	71
E - ACC	65	60 *	×	×	73	67	56	68 *
E - ACG	67	61	73	75	57 *	67	69	65 *
E - AAC	64 *	63	59	65 *	67	70	67	64

注: ×. 代表扩增效果不好的引物组合; \*. 是多态性高的引物组合。

Note :The amplified results was not ideal with ×;The primer is high polymorphic with \*.

2.5 差异片段的回收及 PCR 检测

从聚丙烯酰胺凝胶上回收的 DNA 量少,而且可能含有非目的片段,难以直接用于克隆,所以先通过 PCR 进行扩增,以增大特异片段的含量,将 E - ACA/M - CAC 引物扩增产生的差异片段进行回收,按照与预扩增相同的体系和程序进行扩增,只是将退火温度提高到 60 。结果如图 6 所示,共回收了 8 条差异带,其中 7 条回收成功,只有一条没有扩增产物,证明从聚丙烯酰胺凝胶上回收差异片段及扩增体系是成功的。

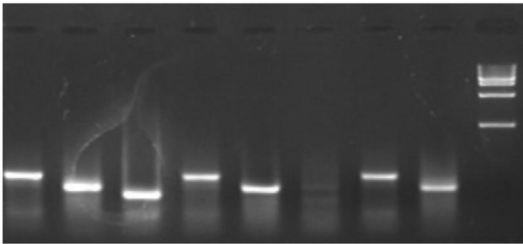


图 6 从聚丙烯酰胺凝胶电泳上回收的差异带 PCR 扩增结果

Fig.6 The PCR result with different gene fragment as the template

3 讨论

cDNA - AFLP 程序多且复杂,任何一步的疏忽都会影响试验结果。其中总 RNA 的纯度及完整性

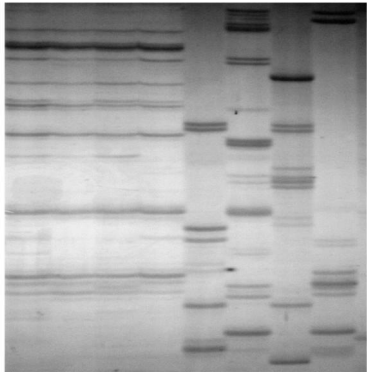


图 5 四对引物在山葡萄叶片和花序中的扩增结果

Fig.5 The selective amplified result with four pairs in leaf and inflorescence

是 cDNA - AFLP 顺利完成的关键步骤。葡萄组织中含有大量的多酚和多糖类物质,并且不同组织含有的内含物不同,因此需要不同的提取方法<sup>[11]</sup>。本研究的结果表明叶片适宜用 SDS - 酸酚法,而花芽只适合用 CTAB 法。与 CTAB 法相比,SDS - 酸酚法最大的优点就是节省提取时间,整个步骤只需要 3 h;与传统的 SDS 法相比,利用醋酸钠饱和酚代替水饱和酚提取 RNA,使蛋白和 DNA 的变性更彻底,减少 RNA 中 DNA 的污染。

其次,dsDNA 的完全酶切是多态性得以检测的根本保证。本研究为了使酶切充分又不浪费时间,因此设置了不同的酶切时间,最终确定 37 酶切 4 h。用于预扩增的连接产物量直接影响预扩增的严谨度和效率,模板浓度过高会引起非特异性扩增;稀释倍数过大,PCR 产物过少,影响统计分析。

随着酿酒葡萄黑皮诺的基因组测序的完成,今后对葡萄研究进入了功能基因组学的研究,功能基因组学的一个重要研究内容就是转录基因组的研究,而 cDNA - AFLP 是公认的研究转录基因组的重要工具。因此可以利用本研究建立的 cDNA - AFLP 分析体系对葡萄不同发育阶段或者是处于不同逆境中基因在转录水平上的表达丰度及差异表达等情况进行研究。获得的差异片段与葡萄基因组序列进行

比对,极有可能直接获得基因全长,这样极大加快了研究葡萄基因功能的步伐。

#### 参考文献:

- [1] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, De Bruijn S M, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AHL P: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant J*, 1996, 9(5): 745 - 753.
- [2] 范淑英, 乐建刚, 成广杰, 等. 用 cDNA - AHL P 技术构建白菜转录图谱[J]. *中国农业科学*, 2008, 46(6): 1735 - 1741.
- [3] Yan Y X, Li M, Liu Z, *et al.* A novel gene, screened by cDNA - AHL P approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45(2): 139 - 145.
- [4] Polesani M, Desario F, Technologies, *et al.* cDNA - AHL P analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 142 - 156.
- [5] Zheng Xianwu, Chen Xuewei, Zhang Xiao - hong, *et al.* Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003: 1 - 11.
- [6] 李 驰, 卢新雄, 陈晓玲, 等. 利用 cDNA - AHL P 技术分析老化棉花种子基因差异表达[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 138 - 143.
- [7] 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 等. 应用 cDNA - AHL P 技术分离草菇冷诱导表达基因[J]. *园艺学报*, 2005, 32(1): 54 - 59.
- [8] 刘 涛, 徐平珍, 胡运乾, 等. 板栗花序与叶的 cDNA - AHL P 的差异表达分析[J]. *中国农学通报*, 23(2): 81 - 84.
- [9] 张玉刚, 成建红, 韩振海, 等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD - PCR 扩增[J]. *生物技术通报*, 2005, 4: 50 - 53.
- [10] 王壮伟, 渠慎春, 章 镇, 等. 苹果属 RNA 高效快速提取新方法[J]. *果树学报*, 2004, 21(4): 385 - 387.
- [11] Karen E, Niclas Olsson, James Schlosser, *et al.* An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real - time RT - PCR during berry development[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 27 - 37.