

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.08.011

基于核酸定量的核质分离质控方案*

赵阿贵 赵玉鑫 霍欣洋 周宇荀 李 凯 肖君华[△]

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的: 拟建立一种方便快捷、经济有效的细胞核质分离鉴定方法。**方法:** 本研究从 DNA 水平进行核质分离鉴定, 选择 GAPDH、ND1 分别作为细胞核和细胞质标志基因, 并根据 GAPDH 及 ND1 序列保守区设计引物, 基于荧光定量 PCR 方法定性检测核质分离的效果。随后将本鉴定方法应用于其他种类细胞(BEAS-2B 细胞、GT1-7 细胞)及组织(小鼠心脏、肝脏、大脑)的核质分离鉴定。**结果:** 在 293T 细胞应用该鉴定方法鉴定核质分离效果, 结果显示: GAPDH、ND1 在核组、质组中的含量存在明显差异, 其中核标志基因 GAPDH 在细胞核中的比例达到了 95% 以上, 质标志基因 ND1 在细胞质中的比例也达到了 90% 左右, 这与从 RNA 水平及蛋白水平鉴定核质分离的结果一致。在其他种类的细胞(BEAS-2B 细胞、GT1-7 细胞)及组织(小鼠心脏、肝脏、大脑)应用该方法结果显示: 细胞核组分中质标志基因 ND1 含量比 293T 细胞的有所增加, 但仍可以实现核质分离鉴定。**结论:** 本研究所建立的核质分离质控方法可以实现从 DNA 水平进行核质分离的鉴定, 该方法更加经济、快捷。

关键词: 核质分离鉴定; 细胞核标志基因; 细胞质标志基因

中图分类号: Q-33; Q591; Q75; Q813 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2020)08-1451-06

Nucleocytoplasmic Separation Quality Control Scheme Based on Nucleic Acid Quantification*

ZHAO A-gui, ZHAO Yu-xin, HUO Xin-yang, ZHOU Yu-xun, LI Kai, XIAO Jun-hua[△]

(School of Chemistry and Bioengineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: It is proposed to establish a convenient, rapid and cost-effective method for identification of nucleocytoplasmic separation. **Method(s):** In this study, identification of nucleocytoplasmic separation were performed at the DNA level. GAPDH and ND1 were selected as nuclear and cytoplasmic marker genes respectively, moreover primers were designed according to the conserved regions of GAPDH and ND1 sequences. The effect of nucleocytoplasmic separation was determined by Real-time quantitative PCR. The identification method was applied to other types of cells (BEAS-2B cells, GT1-7 cells) and tissues (mouse heart, liver, brain). **Results:** The method was used to identify the effect of nucleocytoplasmic separation in 293T cells. The results showed that there were significant differences in the content of GAPDH and ND1 in the nuclear and cytoplasm groups. And the ratio of nuclear marker gene GAPDH in the nucleus was over 95%, the proportion of cytoplasm marker gene ND1 in the cytoplasm also reached about 90%, which was consistent with the results of identification from RNA and protein levels. The results of this method in other kinds of cells (BEAS-2B, GT1-7) and tissues (mouse heart, liver, brain) showed that the content of ND1 in the nuclear component was increased compared with that of 293T cells. However, identification of nucleocytoplasmic separation can still be achieved in those kinds of cells or tissues. **Conclusion (s):** We create a more economical, fast nucleocytoplasmic separation quality control method that can identify the nucleocytoplasmic separation from DNA level.

Key words: The identification of nucleocytoplasmic separation; Nuclear marker gene; Cytoplasmic marker gene

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q591; Q75; Q813 **Document code:** A

Aqicle ID: 1673-6273(2020)08-1451-06

前言

蛋白质分子的亚细胞定位是蛋白功能的重要体现, 其分布具有重要的调控作用和生物学意义^[1]。在研究细胞不同组份的时候, 细胞核和细胞质这两个细胞组份最受关注, 这就要求研究者对细胞的核、质进行有效的分离提取; 核质分离提取之后,

还需要对得到的核、质进行鉴定^[2,3]。常用的核质分离方法是用试剂盒来进行核质分离的, 如 Ambion 公司的 PARISTM 试剂盒^[4]及 Thermo Fisher Scientific 公司的 NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 试剂盒等^[5], 这些试剂盒价格昂贵, 成本较高; 也有实验室利用自建方法进行核质分离^[2,6,7]; 究其原理, 都是先利用一种强度较低的裂解液来进行核质分离,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31772550); 上海市科委基金资助项目(17140903102)

作者简介: 赵阿贵(1994-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 1349745047@qq.com

[△] 通讯作者: 肖君华(1968-), 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 医学分子遗传学, E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn, 电话: 13052427742

(收稿日期: 2019-10-16 接受日期: 2019-11-13)

之后再用另一种强度较高的裂解液或超声法破裂细胞核^[2-7]。至于核质分离之后的核、质成分的鉴定,利用细胞核、细胞质中的标志蛋白检测核质分离得到的细胞核、细胞质一直是核质分离鉴定的金标准,如 Liu, Rose 等人就通过 western 方法进行核质分离的鉴定^[2-7],但该方法需要更长的时间,且对抗体的要求较高,而抗体成本较高;从 RNA 水平进行核质分离质控也是一种常用的方法,如 Wei, Diot 等人就通过细胞核、细胞质中的标志 RNA 检测核质分离得到的细胞核、细胞质从而鉴定出核质分离的效果^[3,8],但由于 RNA 容易降解,对操作要求较高,此外,过程中可能还需要逆转录,操作步骤较多,费时费力并且增加了交叉污染的可能性^[9]。而在 DNA 水平上鉴定核质分离的效果目前还未见报道。

本研究首次从 DNA 水平进行核质分离的鉴定,即通过核、质标志 DNA 对分离得到的细胞核、细胞质进行鉴定。染色体组 DNA 只存在于细胞核的染色体中,而不存在于细胞质中^[10],从中选择 GAPDH 作为细胞核标志 DNA^[11];线粒体组 DNA 只存在于细胞质中的线粒体中,而不存在于细胞核中^[12],从中选择 ND1 作为细胞质标志 DNA^[13]。利用细胞核、质标志 DNA 引物通过 RT-qPCR 对得到的细胞核、质进行检测,根据检测结果便可鉴定出核质分离的效果。

基于 Carlevaro-Fita J 等人建立的核质分离方案^[14],本研究先利用较易培养的 293T 细胞优化核质分离方法;之后,用核、质标志 DNA 先从 DNA 水平上对分离得到的细胞核、细胞质进行鉴定,再将鉴定的结果与从蛋白和 RNA 水平鉴定核质分离的结果相比较,观察该方法是否可行,之后又将该方法在其他种类的细胞与组织中进行试验,观察该方法是否适用于其他种类的细胞与组织。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验细胞与动物 293T 细胞, BEAS-2B 细胞, GT1-7 细胞本实验室保存。3 月龄的雄鼠 C57BL/6J 小鼠由本实验室饲养。

1.1.2 实验试剂及仪器 RT-PCR 试剂盒购自上海近岸科技有限公司;DNA 消化试剂盒及逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;引物合成于苏州泓迅生物科技有限公司;一抗 GAPDH 购自万类生物科技有限公司, Lamin A/C 购自上海博研生物科技有限公司;HRP 连接的二抗购自天根生化科技有限公司。强 RIPA 购自碧云天生物技术有限公司。其他几种裂解液配制方法如下:中等强度裂解液(m RIPA, 1 mL): 50 μ L 1 M Tris (pH8.0), 150 μ L 1 M KCL, 10 μ L 10 % SDS, 100 μ L 10 % Triton-X100, 10 μ L 0.5 M EDTA, 50 μ L 10 % DOC, 0.5 μ L 1 M DTT;弱裂解液 1 (L1 lysate, 1 mL): 50 μ L 1 M Tris(pH8.0), 150 μ L 1 M KCL, 100 μ L 10 % Triton-X100, 10 μ L 0.5 M EDTA, 0.5 μ L 1 M DTT, 剩余体积用灭菌超纯水补齐。弱裂解液 2 (L2 lysate, 1 mL): 100 μ L 10 % Triton-X100, 900 μ L PBS。PK mix 配制方法如下: 15 μ L 5 M NaCl, 1 μ L 5 mg/ml 糖原, 8 μ L 20 mg/ml PK, 181 μ L TE。

组织均质器购自美国 PRO Scientific 公司;RT-qPCR 仪购自 Applied Biosystems 公司;CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品的处理 对于细胞 (293T、BEAS-2B、GT1-7), 取 2×10^7 个细胞, PBS 洗涤并收集细胞沉淀进行核质分离;至于组织(小鼠心脏、肝脏、大脑), 先取 30~50 mg 鲜活组织进行组织匀浆, 收集沉淀并进行核质分离。

1.2.2 核质标志基因的设计

表 1 核质标志基因引物序列

Table 1 Nuclear cytoplasmic marker gene primer sequence	
gene	sequences(5'→3')
Hsp GAPDH -F	CCCACTCTCCACCTTTGAC
Hsp GAPDH -R	CCACCACCCTGTTGCTGTA
Hsp ND1-F	CCCATGGCCAACCTCTAC
Hsp ND1-R	ATAGCCTAGAAATTTTCGTTCCG
Mus GAPDH DNA-F	GGGCCACGCTAATCTCATTTC
Mus GAPDH DNA-R	CACCGACCTTCACCATTGTC
Mus ND2-F	CGTTCTCTACTATCCCCAATCC
Mus ND2-R	AGAATTTGATTGATGTGGTGGTGT
U6-F	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
U6-R	CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT
Mus GAPDH RNA-F	AAGCCCATCACCATCTTCCA
Mus GAPDH RNA-R	CACCAGTAGACTCCACGACA

1.2.3 核质分离及蛋白提取 将细胞或组织沉淀用 150 μ L 核质分离裂解液(提蛋白需要加入 PMSF)重悬, 冰上裂解 5 min、10 min, 每隔 1 min 颠倒混匀。在 4℃, 13.3 K r/min, 离心 10 min, 取 120 μ L 上清为细胞质样品, 沉淀为细胞核。对于核蛋白, 将核用 PBS 洗三次。随后加入 150 μ L 强裂解液重悬至无明显絮状沉淀, 冰上静置 30 min。4℃, 13.3 K r/min, 离心 10 min 取 120 μ L 上清作为细胞核样品。

1.2.4 核质分离后 DNA 抽提 使用 PK mix 法^[15]抽提 DNA 并溶于无菌水中, -20℃ 保存。

1.2.5 核质分离后 RNA 抽提 使用 Trizol 法^[16]抽提 RNA 并溶于 DEPC 水中, -80℃ 保存。

1.2.6 RT-qPCR RNA 用 DNA 消化试剂盒纯化后用 RNA 逆转录试剂盒进行 cDNA 合成。RT-qPCR 反应体系为 20 μ L, 其中 2 $\times$ Superpre Mix 10 μ L, ROX dye II 0.4 μ L, 上下游混合引物(2 μ mol/L)3 μ L, 模板 2 μ L, DEPC 水 4.6 μ L。使用 ABI 7500 Real Time PCR System 定量检测, 反应条件: 95℃ 2 min; 95℃ 15s, 62℃ 32s, 62℃ 采集信号, 进行 40 个循环。

1.2.7 Western blot 取 10 μ L 蛋白点样; 80V, 30 min, 后 120V, 90 min 进行电泳; 280 mA, 1.5h 进行转膜(湿转); 将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 按 1:1000 的比例稀释一抗, 4℃ 过夜孵育; TBST 洗涤 3 次, 15 min/次; 按 1:1000 的比例稀释二抗, 室温孵育 1.5 h; TBST 洗涤 3 次, 15 min/次, ECL 法显色; 用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪拍照。

1.3 统计学分析

所有实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 进行作图, 所有数

据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,并用 t 检验进行统计学分析,用 *** 表示 $P < 0.001$,用 ** 表示 $P < 0.01$,* 表示 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 从 DNA 水平质控核质分离方案的摸索

使用 m RIPA 进行核质分离,m RIPA 处理细胞核质控结果见图 1a。核质分离裂解 5 min,质基因 ND1 在核质之间具有显著差异,但核基因 GAPDH 在细胞核中的含量相比其在细胞质没有显著性差异。

使用 m RIPA 进行核质分离,h RIPA 处理细胞核的核质分离质控结果见图 1b。核基因 GAPDH 在细胞核中的含量明显比其在细胞质中的含量高,质基因在核质之间也有较为明显的差异;说明 h RIPA 更有利于裂解细胞核。

m RIPA 裂解不同时间对核质分离的影响见图 1c。1 min、5 min、10 min、15 min 这四个时间点的 GAPDH 在细胞质中的比例相差不大;此外,该裂解液进行核质分离后,细胞质中核基因 GAPDH 的含量较高(~10%),尝试使用另一种强度较低的

裂解液。

L1 lysate 进行核质分离,h RIPA 裂解细胞核(离心时间为 10 min)质控结果见图 1d。GAPDH、ND1 在核组质组中都有明显差异,说明 L1 裂解液也能实现核质分离。

L1 lysate 和 L2 lysate 的比较结果(离心时间为 10 min)见图 1e。两种裂解液进行核质分离时,GAPDH、ND1 在细胞核及细胞质中的含量并未有显著差异。说明这两种裂解液进行核质分离的效果并没有太大差别。但 L2 裂解液配制方法更为简单,所以,在后续实验中,使用 L2 裂解液进行核质分离。

L2 裂解液裂解不同时间对核质分离的影响见图 1f。离心 5 min 时,随着裂解时间的延长,细胞质中核基因所占的比例越来越高。至于裂解时间,由于核质分离时需要用核质分离裂解液将沉淀的细胞团块吹打均匀,这一步骤本身需要一定的时间,所以如果裂解时间太短;而裂解时间太长又会导致细胞质中核基因的含量增加,最终决定选择核质分离的时间为 5 min。所以,后续实验选择 L2 裂解液裂解 5 min,离心 5 min 进行核质分离。

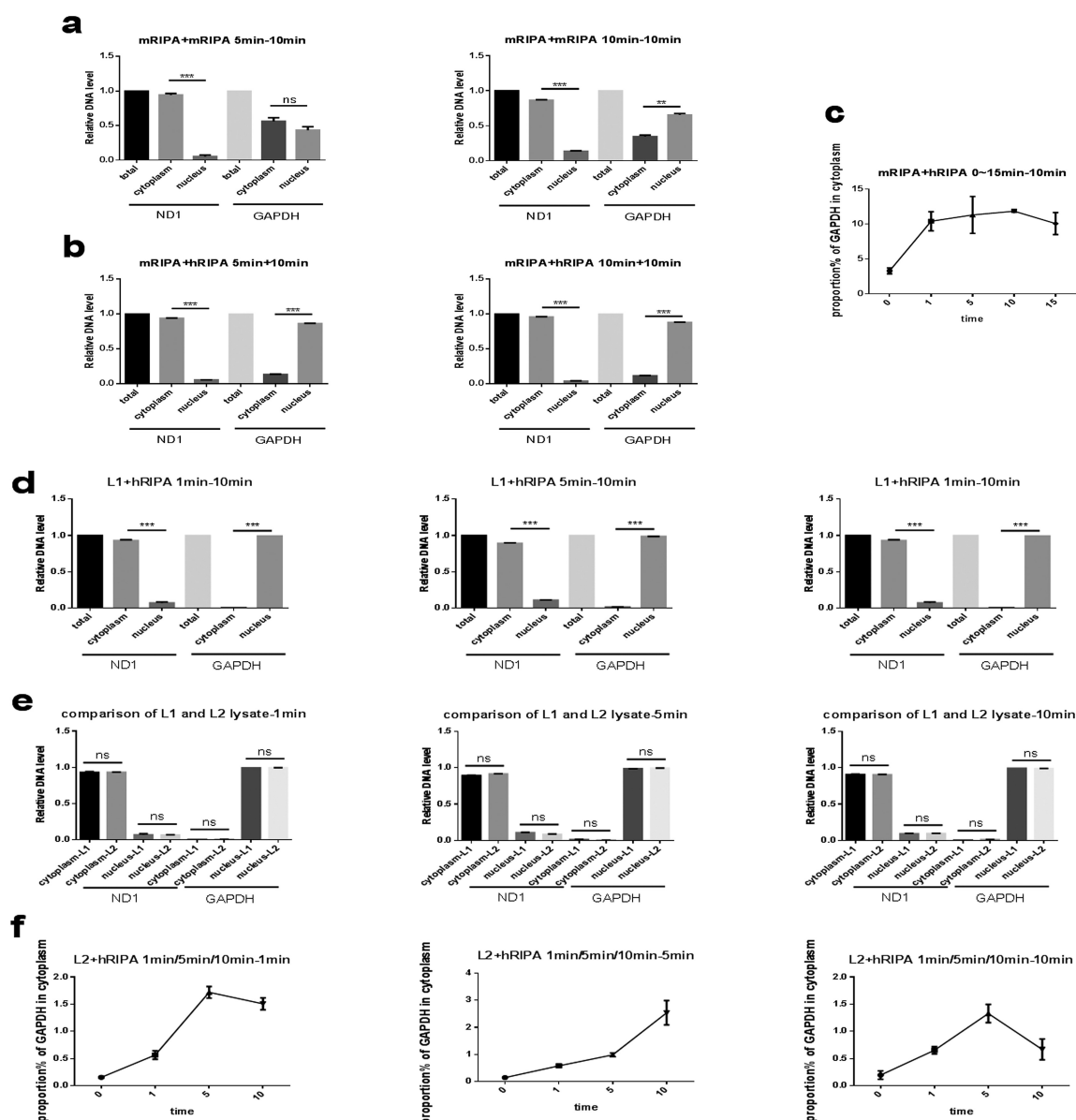


图 1 核质分离优化历程

Fig.1 Optimization of nuclear cytoplasmic separation

2.2 DNA 水平质控核质分离方案的验证

从 RNA 水平质控核质分离结果(图 2a)可以看出:核基因及质基因在核质之间都有明显差异,这与从 DNA 水平鉴定核质分离所得结果一致。Western Blot 分析结果显示核标志蛋白 La min A/C(74 KDa 和 63 KDa)主要分布于细胞核中,而质标志蛋白 GAPDH(37 KDa)主要分布于细胞质中。这与先前从 DNA 水平及 RNA 水平上检测的结果一致。综上可知,该核质分离质控方法与 RNA 水平及蛋白水平鉴定结果相一致,说明所建立的核质分离质控方法可行。

2.3 新建立的核质分离质控方法在其他种类细胞及组织中的应用

由图 3 可见,在 BEAS-2B 及 GT1-7 细胞中,单拷贝基因 GAPDH 在核质间有明显差异,尽管多拷贝基因(ND 及 U6)在核质之间的差异没有其在 293T 细胞中明显,但在 DNA 及 RNA 水平上,核、质标志基因在核质间仍然有明显差异。图 4 结果表明小鼠组织经过核质分离之后,在 DNA 及 RNA 水平上,核、质标志基因在核质间都存在明显差异。综上所述,新建立的核质分离质控方法同样适用于其他种类的细胞及组织。

3 讨论

细胞所处的时期与其分裂状态密切相关^[17],若细胞处于分裂期,核仁核膜消失^[18],此时无法较好地核质进行分离,这也是核质分离时,核质不能彻底分开的一个重要原因^[9,19]。所以,本研究在进行核质分离时,细胞生长到 90 %以上,此时由于细胞间的接触抑制^[20],绝大多数细胞停留在分裂间期,核膜完整

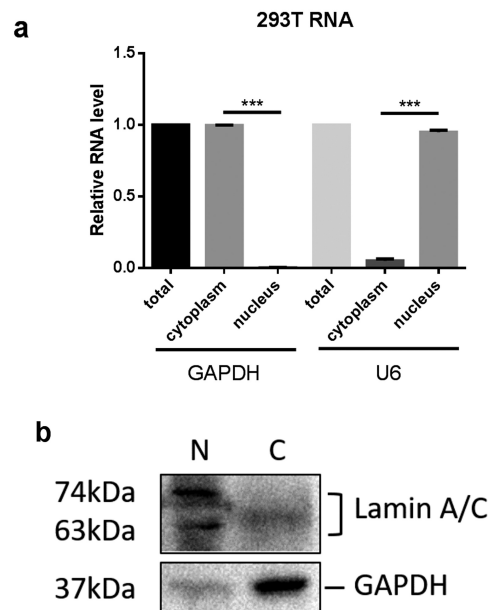


图 2 从 RNA 及蛋白水平进行核质分离的质控

Fig.2 Quality control of nuclear cytoplasmic separation from RNA and protein levels

Note: N in the figure b refers to the nucleus, C in the figure b refers to the cytoplasm.

存在^[21],核质分离时能够取得较好的结果。

在从 DNA 水平鉴定核质分离效果过程中,可以看出:当使用中等强度的裂解液(m RIPA)进行核质分离时,经常会出现核基因在细胞质中含量较高的现象,而当使用弱裂解液(L1 和

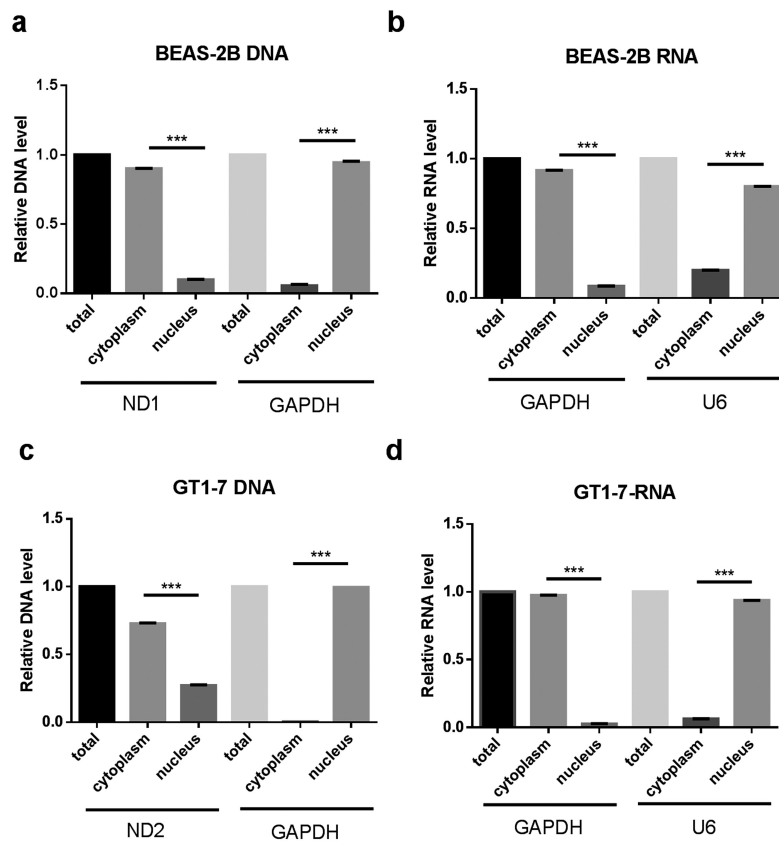


图 3 新建立的核质分离质控方法在两种细胞中的应用

Fig.3 Newly established method for quality control of nuclear cytoplasmic separation in two kinds of cells

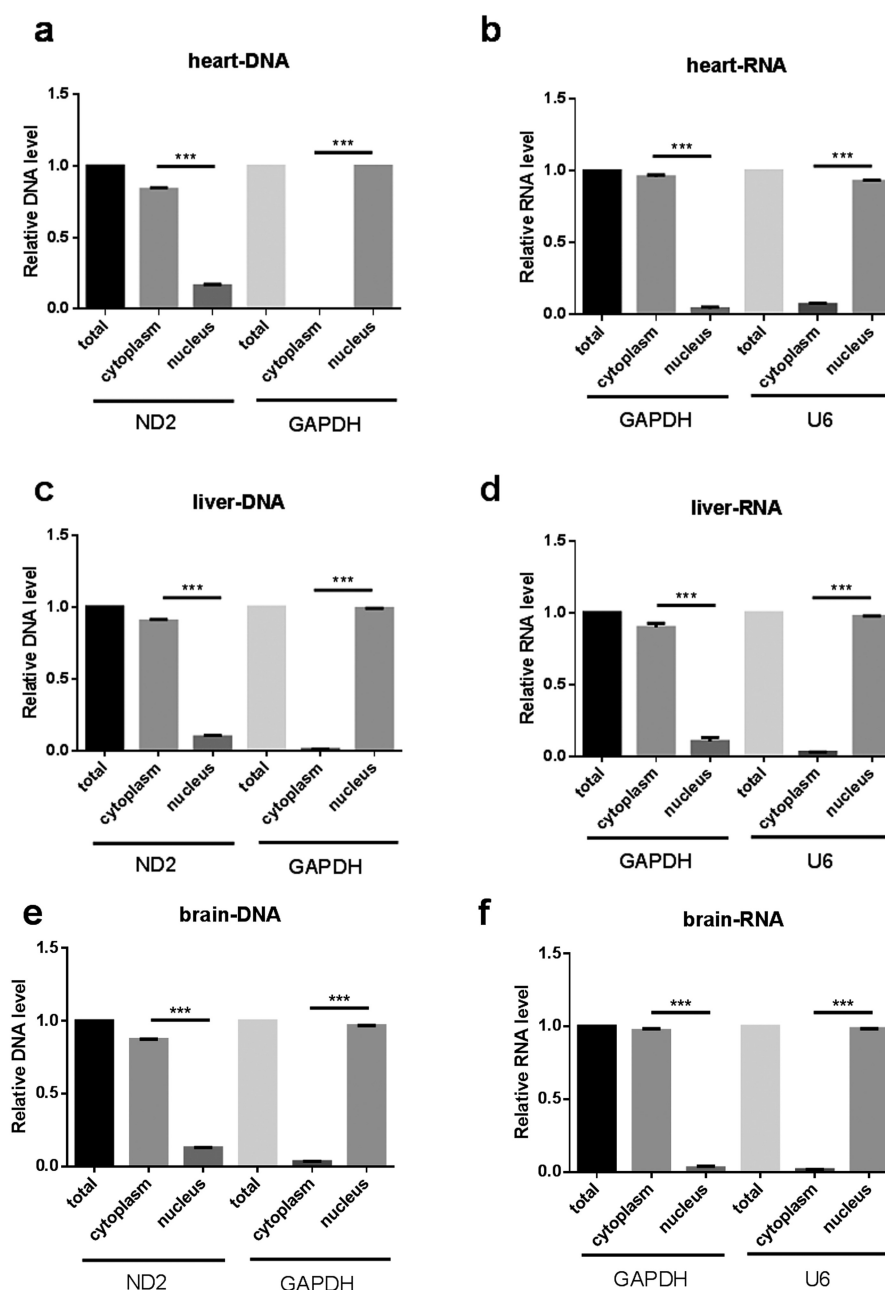


图4 新建立的核质分离质控方法在三种小鼠组织中的应用

Fig.4 Application of newly established nuclear cytoplasmic separation quality control method in three mouse tissues

L2 lysate)进行核质分离时,质基因在细胞核中的含量较高,这也是由两种裂解液自身属性决定的^[23],所以,为了在研究核质分离裂解液裂解不同时间对核质分离的影响实验中争取更长的时间间隔,最终采用弱裂解液进行核质分离。

在研究核质分离裂解液裂解不同时间对核质分离的影响时,本研究选择了单拷贝的 GAPDH 基因^[23]而不是多拷贝的 ND1 基因,这是由于存在于细胞中的 ND1 含量和细胞状态密切相关,即细胞状态的微小差异就可能会对细胞中 ND1 含量造成很大的影响^[24];也正是由于 ND1 基因拷贝数的不稳定,进行 RT-qPCR 时其在两种组分之间的微小偏差会被放大,从而对结果造成非常不利的影响^[25]。本研究结果显示,单拷贝基因(GAPDH)在核质间都能表现出非常显著的差异,而多拷贝基因 U6,ND 往往不如单拷贝基因 GAPDH 效果好,这也是由拷贝数决定的^[3,26]。

SDS 是一种强去污剂,其非极性基团能够破坏蛋白质分子的次级键,使蛋白变性^[27],因而能够使细胞膜及核膜破裂,故而常用于进行细胞的裂解^[28]。Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂,其对疏水性物质有很强的亲和力,能结合并溶解磷脂^[29],常被用来破裂细胞膜,但其破裂生物膜结构的效果较弱^[30],本文中核质分离裂解液进行裂解后,这些小分子物质在离心时,仍会发挥一定的裂解作用,继续破坏细胞核的膜结构,从而影响核质分离结果,所以,离心时间太长可能会导致不同裂解时间组鉴定出的核质分离结果没有明显差别,而离心时间太短,可能会造成细胞核未能完全沉降,从而导致细胞核、细胞质成分无法充分分离^[31]。

本研究所建立的核质分离鉴定方法与常见的从 RNA 及蛋白水平进行鉴定的方法相比较有如下优势:操作简单;核质分离后无需进行逆转录或是用时较长的 western blot 也能完成对

核质分离的鉴定;对超声仪器依赖性较低;此外,该鉴定方法在其他种类的细胞及组织中也具有普遍性。这为之后研究生物大分子的亚细胞定位提供了便利。

参考文献(References)

- [1] Feifei M A, Jiang M, Yang J, et al. Subcellular Localization of APX1 Protein in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2017, 6(2): 31-33
- [2] 徐小燕, 杨雪, 夏蒲, 等. 一种细胞核质蛋白分离方法的建立[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39(10): 803-805
- [3] Wei Y, Li L, Wang D, et al. Importin 8 Regulates the Transport of Mature MicroRNAs into the Cell Nucleus[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(15): 10270-10275
- [4] Liang X H, Sun H, Nichols J G, et al. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(9): 2075-2092
- [5] Liu H S, Shi H L, Fei H, et al. Astragaloside IV inhibits microglia activation via glucocorticoid receptor mediated signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19137
- [6] Samuels AL, Louw A, Zareie R, et al. Control of nuclear-cytoplasmic shuttling of Ankr54 by PKC δ [J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2017, 8(3): 163-174
- [7] Rose B M, Hepler J R, James P. Endogenous RGS14 is a cytoplasmic-nuclear shuttling protein that localizes to juxtanuclear membranes and chromatin-rich regions of the nucleus[J]. *Plos One*, 2017, 12(9): e0184497
- [8] Diot, Cédric, Chin A, Lécuyer, Eric. Optimized FISH methods for visualizing RNA localization properties in *Drosophila*, and human tissues and cultured cells[J]. *Methods*, 2017, 126:156-165
- [9] Berteaux N, Aptel N, Cathala G, et al. A Novel H19 Antisense RNA Overexpressed in Breast Cancer Contributes to Paternal IGF2 Expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(22): 6731-6745
- [10] Aranda-Anzaldo A. The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2016, 393: 51-59
- [11] Hu W, Yang Y, Xi S, et al. Expression of CPEB4 in Human Glioma and Its Correlations With Prognosis[J]. *Medicine*, 2015, 94(27): e979
- [12] Vedelek V, Laurinyecz B, Attila L. Kovács, et al. Testis-Specific Bb8 Is Essential in the Development of Spermatid Mitochondria [J]. *Plos One*, 2016, 11(8): e0161289
- [13] Wallace L, Mehrabi S, Bacanamwo M, et al. Expression of mitochondrial genes MT-ND1, MT-ND6, MT-CYB, MT-COI, MT-ATP6, and 12S/MT-RNR1 in colorectal adenopolyps[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(9): 1-11
- [14] Carlevaro-Fita J, Rahim A, Guigó, Roderic, et al. Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells[J]. *RNA*, 2016, 22(6): 867-82
- [15] Hassani A, Khan G. A simple procedure for the extraction of DNA from long-term formalin-preserved brain tissues for the detection of EBV by PCR [J]. *Experimental & Molecular Pathology*, 2015, 99(3):558-563
- [16] Zhao Y, Hu L, Yang Y J, et al. Improvement on the extraction method of RNA in mites and its quality test[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(2): 851-858
- [17] Kuritz K, D. Stöhr, Pollak N, et al. On the relationship between cell cycle analysis with ergodic principles and age-structured cell population models[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2017, 414: 91-102
- [18] Decarreau J, Wagenbach M, Lynch E, et al. The tetrameric kinesin Kif25 suppresses pre-mitotic centrosome separation to establish proper spindle orientation[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(4): 384-390
- [19] 何大澄, 戎宪辉, 翟中和. 影响去核效果诸因素的分析[J]. *实验生物学报*, 1983, 16(2): 38-48
- [20] Warne D J, Baker R E, Simpson M J. Optimal Quantification of Contact Inhibition in Cell Populations [J]. *Biophysical Journal*, 2017, 113(9): 1920-1924
- [21] Sun H, Furt F, Vidali L. Myosin XI localizes at the mitotic spindle and along the cell plate during plant cell division in *Physcomitrella patens* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2018, 506(2): 409-421
- [22] 庞雅湘, 聂启昊, 刘晓宁, 等. 3 种细胞裂解液提取总蛋白在 Western blot 中的效果分析 [J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(3): 263-267
- [23] 杨晨阳, 于超, 马玉杰, 等. 基于 SSR 标记和单拷贝核基因的蔷薇属植物系统发生分析[J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(12): 89-100
- [24] Tan D Q, Suda T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, 29(2): 149-168
- [25] Lapinski A G, Pavlenko M V, Solovenchuk L L, et al. Some limitations in the use of the mitochondrial DNA cytb gene as a molecular marker for phylogenetic and population-genetic studies by the example of the *Apodemus* genus [J]. *Russian Journal of Genetics Applied Research*, 2016, 6(1): 84-90
- [26] Gonzalezhunt C P, Rooney J P, Ryde I T, et al. PCR-based analysis of mitochondrial DNA copy number, mitochondrial DNA damage, and nuclear DNA damage[J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2016, 67(1): 20.11.1-20.11.25
- [27] Jafari M, Mehrnejad F. Molecular Insight into Human Lysozyme and Its Ability to Form Amyloid Fibrils in High Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate: A View from Molecular Dynamics Simulations[J]. *Plos One*, 2016, 11(10): e0165213
- [28] Mengna J, Tiemin J, Bin L, et al. Analysis of Differences in Milk Fat Globule Membrane Proteins between Breast Milk and Bovine Milk [J]. *Food Science*, 2016, 37(20): 69-74
- [29] Morandat S, El Kirat K. Membrane resistance to Triton X-100 explored by Real-time atomic force microscopy[J]. *Langmuir*, 2006, 22(13): 5786-5791
- [30] Xu H, Zhou S, Jiang D, et al. Cholesterol Oxidase/Triton X-100 Parked Microelectrodes for the Detection of Cholesterol in Plasma Membrane at Single Cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(2): 1054-1058
- [31] 颜晓林. 离心时间长短对血凝实验结果的影响[J]. *现代实用医学*, 2014, 26(2): 202-202