

棉花线粒体基因 cRT-PCR 改良及其在寻找 CMS 相关基因中的应用

王裴林, 周利利, 梁成真, 孟志刚, 郭三堆*, 张锐*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 植物线粒体是含有遗传物质的细胞器,为细胞生命活动提供必需的能量。农业生产中,线粒体基因的变异容易导致细胞质雄性不育,为作物杂交育种提供了高效的杂交母本。然而,植物线粒体基因组结构复杂,不同类型的细胞质雄性不育的发生往往由特异的基因突变所导致,为雄性不育基因的克隆带来了较大的困难。针对棉花线粒体基因的特性,改进了 cRT-PCR 技术,RNA 连接酶将线粒体 mRNA 的 5'和 3'末端连接环化后,应用随机引物进行反转录,在保证与特异引物获得相同的完整线粒体基因转录本的基础上,实现了同时对所有线粒体编码基因的 cRT-PCR,方便对线粒体编码基因的结构进行全局分析,并且通过改良方法对棉花 CMS 基因进行探索,从而快速找到异常因素,为线粒体功能基因组分析提供了新的方法。

关键词: 棉花;线粒体;环式 RT-PCR;细胞质雄性不育

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0134

Improvement of Cotton Mitochondrial Gene cRT-PCR and its Application in Searching for CMS Related Genes

WANG Peilin, ZHOU Lili, LIANG Chengzhen, MENG Zhigang, GUO Sandui*, ZHANG Rui*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Plant mitochondria is a type of organelles containing genetic material, which provides necessary energy for cells. In agricultural production, genovariation of mitochondrial gene may lead to cytoplasmic male sterility, providing a convenient female parent for hybrid breeding. Despite successful utilization of CMS and restoration of fertility (Rf) in breeding programs, the underlying mechanisms of these processes remain elusive because the mitochondrial genome structure is complex, and occurrence of different types of CMS is often caused by specific mutations consequently limiting gene cloning. This study summarized the techniques to improve cRT-PCR technology and present detailed characteristics mitochondrial gene involved in CMS. After RNA ligase cyclizes the 5' and 3' ends of mitochondrial mRNA, random primers were used for reverse transcription to ensure the same integrity as specific primers. Based on the mitochondrial gene transcript, cRT-PCR was performed on all mitochondrial coding genes, which provided insight of structure of mitochondrial coding genes. Therefore, we used this system to explore cotton CMS genes, thus quickly figuring out abnormal factors and providing a new method for mitochondrial functional genomic analysis.

Key words: cotton;mitochondrial;cRT-PCR;CMS

线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所,为细胞的活动提供了能量。细胞生命活动所需的能量 95%来自线粒体,所以其又有“细胞动力工厂”之称^[1]。除了为细胞供

能外,线粒体还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程,并有调控细胞生长和细胞周期的能力。因此,线粒体基因组中基因的异常表达常常会影响细胞的能量代谢,从而引发一系列

收稿日期:2018-12-10; 接受日期:2019-03-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31771850);国家新品种培育转基因重大专项(2016ZX08009003-003-004)资助。

作者简介:王裴林,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail:123695298@qq.com。*通信作者:郭三堆,研究员,研究方向为植物基因工程。E-mail:guosandui@caas.cn;张锐,研究员,博士,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail:zhangrui@caas.cn

的表型变化,如抗病性降低或细胞质雄性不育的发生等。对线粒体基因组编码基因的全长转录本进行分析,有利于深入研究细胞质基因的功能以及某些与细胞质关联性状的分子机理。

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是由细胞质基因控制的并可被核恢复基因抑制的母性遗传性状。近几年,棉花功能基因组学进展良好,但棉花细胞质雄性不育机理的相关报道不是很多,尤其是胞质不育的机理,尚缺乏足够的分子生物学证据^[1,2]。基于目前的研究进展,多数科学家认为 CMS 不育发生的原因大多是由于线粒体基因的重组重排导致,所以对线粒体基因全长转录本的获得显得尤为重要。

在传统方法中,cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 方法往往被用于精确定位 RNA 分子的 5' 或 3' 末端,但由于线粒体基因大部分不存在转录后加工的过程,即不会在转录后进行 5' 加帽子结构和 3' 端加 polyA 序列,也没有内含子,而是采用边转录边翻译的方式,所以不适用于 RACE 技术。为克服这一弊端,Kuhn 和 Binder 于 2002 年提出环式反转录聚合酶链式反应 (cyclic reverse transcription polymerase chain reaction, cRT-PCR),该技术极大简化了操作步骤,成功实现一次性确定目的 RNA 的 5' 和 3' 末端的设想,具有明显的高效与便捷性^[3]。

cRT-PCR 技术现已广泛应该用于确定基因的转录起始位点和启动子、鉴定核糖体 RNA 前体的 5' 和 3' 末端以及评估成熟 mRNA 的 3' 末端的长度和转录后延伸。目前,cRT-PCR 技术应用于水稻和拟南芥等植物的细胞基因研究,但报道中均是利用该方法对特异基因进行研究^[4,5],尚未见从转录组的水平获得全部线粒体基因全长转录本的应用。

目前,根据诸多的文献报道,CMS 基因通常有以下五种特点:①不同的 CMS 之间通常不具备同源性;②CMS 的位点经常出现在 ATP 基因的上下游;③它们往往通过重组产生嵌合的 ORF;④CMS 编码的蛋白通常具有细胞毒性;⑤CMS 编码蛋白通常会形成跨膜结构域。尤其是嵌合 ORF 的形成是不育基因目前的重点研究方向,通过 cRT-PCR 技术可以较为简单的获得靶标基因的 UTR 区,为寻找嵌合的 ORF 提供了一个新的方向^[6~8]。

近几年棉花功能基因组学进展良好,但棉花细胞质雄性不育机理的相关报道不是很多,同其他作物雄性不育机理研究相比有所滞后。因此,我们希望通过该方法的改良及应用能为寻找不育基因带来新的方法。本研究在获得高质量 RNA 的基础上,对 RNA 进行高效环化,并通过随机引物对线粒体全基因组基因进行 cRT-PCR,获得了全部线粒体基因的全长转录本,并以 *ATP6* 基因为例,比较了利用特异引物和随机引物进行 cRT-PCR 后所获得的全长转录本的差异。棉花细胞质雄性不育的研究对于更好地利用棉花杂种优势,以及加深对植物不育机理的认识,具有重要的理论和现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料 本实验所用材料为中国农业科学院抗虫棉课题组实验室培育的不育系 P30A。

1.1.2 试剂 原平皓 RNA 提取试剂盒、RNA 酶抑制剂、DNA 酶、Superstar max 超保真 mix 购自 Genestar 公司;反转录试剂盒购自全式金生物科技有限公司;T4 RNA 连接酶购自 Promega 公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Axygen 生化科技有限公司;T 载体、感受态购自擎科新业生物技术有限公司;高温灭菌冷却至室温的 DEPC 水。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 ①RT-PCR 引物使用本实验室发表的 PrimerServer: PCR Primers Batch Design & Specificity Check 引物设计网站^[9],对参考基因序列设计普通引物,引物位置在参考序列两边留出 100~300 bp 为宜,并由网站检测为特异引物。

②cRT-PCR 引物由 RT-PCR 引物反向互补得到,估计其大小,约为原始序列两边预留的 200 bp 加上可能的 UTR 区域(约 100~600 bp)(表 1)。

1.2.2 RNA 提取 按照原平皓试剂盒 RNA 提取说明书提取 RNA,并在加入去蛋白液前增加 DNA 酶,去除 DNA,为后续实验去除 DNA 污染。提取完成后通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性;并通过 Nano-drop 对 RNA 的浓度和纯度进行测量。

1.2.3 RNA 环化 体系: 10 μ g 总 RNA, 1 μ L RNA 酶抑制剂, 2 μ L T4 RNA 连接酶 Buffer, 1 μ L

表 1 4 类线粒体基因 cRT-PCR 引物信息
Table 1 Four gene families mitochondrial gene cRT-PCR primer information.

扩增基因	F 引物(5'→3')	距边界	R 引物(5'→3')	距边界
<i>ATP1</i>	5'-AACTGAGACCACTCGACCGAT-3'	108	5'-GGATTCTGTGATCGAATGCC-3'	165
<i>ATP4</i>	5'-CCGTCGAGAGTCACTTTGAAAAGTC-3'	185	5'-AGATTTGTCCCGGGGTGTACGTT-3'	108
<i>ATP6</i>	5'-GGAACAAACTGAGAGTTAGCAGC-3'	142	5'-CAGGTCTGGAATTAGGTGTAGC-3'	119
<i>ATP8</i>	5'-CTGCTGTACCCAAGTACTC-3'	116	5'-TTGATCTCGAAGTCCTCCT-3'	99
<i>ATP9</i>	5'-TTCGCGCCACGGAATGGATCA-3'	112	5'-GCCCCAATGATGGCCTTTCTG-3'	126
<i>COX1</i>	5'-ATGTGCCCATCACTCCAGCAAT-3'	97	5'-CACCGGAATGGATGGTACAA-3'	98
<i>COX2</i>	5'-ATCATAGTGTTGCTGCGTC-3'	95	5'-GGTCAGTGCAGTGAGATTTGTG-3'	126
<i>COX3</i>	5'-ATCACACCTCCTACGGTGCTT-3'	101	5'-GAGCATCACGTTGGCTTTGA-3'	102
<i>NAD3</i>	5'-AACCACATTCTAGGCCGAC-3'	136	5'-TTCCTTGGGCAGTACCTCCCAA-3'	125
<i>NAD4</i>	5'-GGATCGAATTGTATCCGAGG-3'	182	5'-GGAGTTGTTTGGATGGGTGT-3'	93
<i>NAD4L</i>	5'-CCGTTGGAACCAATGAAGCA-3'	202	5'-CCGCTATTGGGTTAGCCATTTTCG-3'	86
<i>NAD6</i>	5'-GTAAACCTGAAGTGTGCGCA-3'	121	5'-ACGGAGCGGTGAAAAGACAGGAT-3'	95
<i>NAD7</i>	5'-TTCCACCCTTCTCCGTTCA-3'	114	5'-CTGCCCATTTACAAGGACTCGA-3'	107
<i>NAD9</i>	5'-AGAGGGATGATCAACTCCGCAA-3'	198	5'-CCAGAGAAACGTGTGGTTTCTG-3'	96
<i>RPS3</i>	5'-GGTGGACGTATCGAACGAAA-3'	143	5'-GCGGAAGTATCTACTCGTTACGG-3'	102
<i>RPS4</i>	5'-TCAATCTTCGGAGAATGCGG-3'	97	5'-GGACCTAACATAGGTACATCC-3'	93
<i>RPS7</i>	5'-GAGCCGGGCGATGAAAAGTT-3'	121	5'-GCTGAGATACTGGATGCTTACCG-3'	111
<i>RPS10</i>	5'-GCAATCCAATCTTCCGTGTG-3'	100	5'-GCGCAAGAAGTTCTTTCGGT-3'	112
<i>RPS12</i>	5'-GGTGTCTCTGTTAAAAACGCG-3'	125	5'-GATTTGCCAGGTGTGAAATCCC-3'	108
<i>RPS14</i>	5'-CACTAGGAAGATCGGGATCT-3'	112	5'-GCCCTCGTTCGGTATATGAGTT-3'	101

T4 RNA 连接酶,1 μL ATP, DEPC 水补足至 20 μL。将混合好的样品置于金属浴上,16℃连接过夜。在连接液的每管中加入 10 μL 氯仿并用移液器反复吹打;加入 100 μL 无水乙醇移液器吹打混匀,冰浴 15 min;将混合物 12 000 r/min,10 min 离心,弃上清;最后,加入 14 μL DEPC 水溶解^[11,12]。

1.2.4 反转录 按照全式金生物科技有限公司反转录试剂盒对产物进行反转录,完成后用 Nano 测定浓度,ddH₂O 稀释至终浓度 200 ng/μL,冻存备用。

1.2.5 cRT-PCR 程序 我们在棉花线粒体基因的主要 4 种类型的基因 *ATP*、*COX*、*RPS*、*NAD* 基因中随机选择 7 个作为实验对象,并根据普通 PCR 引物反向互补链设计相应的 cRT-PCR 引物,其特点是仅能以环化 RNA 为模板获得扩增条带。扩增体系:25 μL Superstar max 超保真 mix (Gene-star),1 μL cDNA,正反向引物各 1 μL,ddH₂O 22 μL。扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;54℃(取决于引物)退火 30 s,72℃延伸 40 s,

35~40 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。完成 PCR 之后,将 PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶中上样,120 V,30 min。电泳结束后,按照 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Axygen 生化科技有限公司)回收条带。

1.2.6 *ATP6* 的测序分析 为进一步分析测序结果的准确性,从上述 7 个棉花线粒体基因中随机选取 *ATP6* 为代表进行分析。对 *ATP6* 基因的 cRT-PCR 引物进行扩增,然后将该序列回收后连接 T 载体,挑单克隆进行测序,最终挑选出一个一致性最好的克隆子进行分析,并与 NCBI 上的序列进行比对。然后采用随机引物和特异引物共同对其进行 cRT-PCR(图 1)。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因 cRT-PCR 电泳分析

对棉花线粒体基因的主要 4 种类型的基因中随机选择的 7 个基因的扩增结果显示,7 个线粒

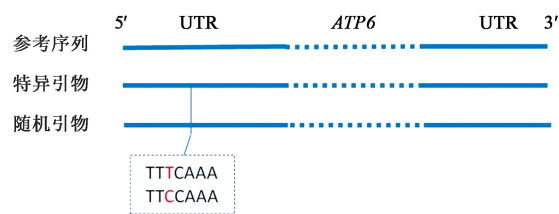


图1 随机引物和特异引物 *ATP6* 全长转录本对比

Fig.1 Comparison of random primer and specific primer of *ATP6* gene full-length transcript.

体基因的电泳条带清晰(图2),表明RNA模板已经环化,为后续的实验分析提供必要的前提。

我们对棉花线粒体的33编码蛋白基因(*ATP1*、*ATP4*、*ATP6*、*ATP8*、*ATP9*; *COX1*、*COX2*、*COX3*; *RPL2*、*RPL5*、*RPL10*、*RPL16*; *NAD3*、*NAD4*、*NAD4L*、*NAD6*、*NAD7*、*NAD9*; *RPS3*、*RPS4*、*RPS7*、*RPS10*、*RPS12*、*RPS14*; *CCMB*、*CCMC*、*CCMFC*、*CCMFN*; *SDH3*、*SDH4*; *MATR*、*COB*、*MTTB*)进行了cRT-PCR,发现大多数的基因UTR都在300~500 bp左右。我们使用特异引物和随机引物同时进行扩增,发现两者所获得结果基本保持一致,通过测序验证,仅有个别基因出现了极少数的SNP。

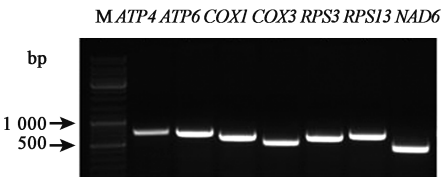


图2 线粒体基因 cRT-PCR 电泳分析

Fig.2 Analysis of mitochondrial gene by cRT-PCR.

2.2 *ATP6* 基因测序结果分析

通过 *ATP6* 基因的 cRT-PCR 引物进行扩增,获得一段全长 567 bp 的序列(图3),测序并与NCBI上的序列进行比对,我们获得了284 bp的5'UTR和22 bp的3'UTR,并且原基因上的一段重复区域也完全匹配,获得了 *ATP6* 的完整全长转录本。测序结果与参考序列保持一致,之后,采用随机引物和特异引物共同对其进行 cRT-PCR,发现两者获得条带一致。测序后,两者序列仅出现了一个SNP。其余基因验证测序结果同样保持一致,所以我认为采用随机引物替代靶基因特异引物的方法在保证正确率的情况下,更为方便快捷。

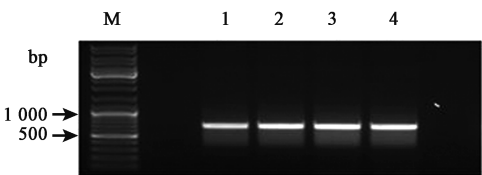


图3 *ATP6* 基因 cRT-PCR 扩增结果

Fig.3 cRT-PCR results of *ATP6* gene.

注:M:Marker;1,2:随机引物;3,4:特异引物。

综上所述,通过随机引物进行反转录 cRT-PCR 同特异引物一样能获得目的基因的全长转录本,但在比对序列时也发现极少部分基因的测序结果存在基因的不完整性和突变性,主要表现为基因两端碱基缺失与单核苷酸多态性。前者的发生取决于RNA的完整度以及环化效率,而单核苷酸多态性的发生则多半是由于特异引物和随机引物的差异造成的。因此,在方便快捷的基础上,首先采用随机引物对大批量的基因进行 cRT-PCR,如若所获基因转录本的序列异常,为保证准确性,可辅助设计特异引物进行反转录。

2.3 cRT-PCR 在寻找不育基因中的应用

通过对本课题组繁育的不育系和保持系同时进行线粒体基因的批量 cRT-PCR,根据条带大小以及测序结果对线粒体编码蛋白基因进行考量,找到一些具有差异的候选基因,认为可能是嵌合ORF的插入导致了结果的差异。

如图4所示,差异表达出现了四种情况,一是不育系和保持系条带完全一致;二是不育系和保持系条带存在明暗亮度差异;三是不育系有而保持系没有条带;四是在不育系和保持系中条带大小不一致的情况。

另外有的基因在电泳条带上表现一致,但通过测序出现了几个氨基酸的缺失,或是出现一些SNP的情况,结果如表2所示:线粒体编码蛋白基因中 *ATP1*、*ATP4*、*ATP6*、*COX1* 在不育系和保持系的扩增中出现了明显差异,尤其是 *ATP1*、*ATP6*、*COX1*,在两段序列中出现了大段的插入或者缺失,我们认为这些差异片段可能是由于线粒体的某种重组或者重排造成,或可能引起作物的不育。除此之外,线粒体的其他基因 *ATP8*、*COX2*、*NAD3* 等出现了在不育系和保持系中序列有SNP的情况,可能是由于PCR或者测序的原

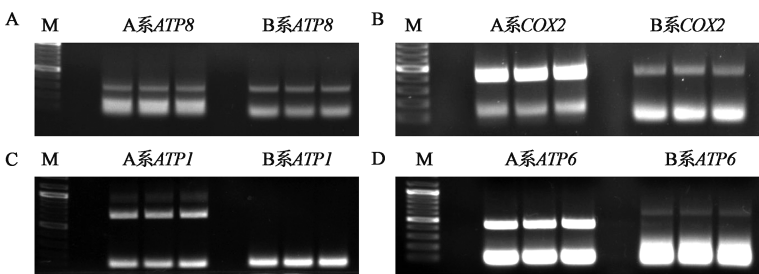


图 4 线粒体基因在不育系与保持系中的扩增条带

Fig.4 Amplification bands of mitochondrial genes in sterile line and maintainer line.

注:A:ATP8;B:COX2;C:ATP1;D:ATP6;M:Marker;A 系:不育系;B 系:保持系。

表 2 线粒体基因在不育系和保持系中的 cRT-PCR 扩增结果

Table 2 Results of cRT-PCR amplification of mitochondrial genes in sterile lines and maintainer lines.

基因名称	差异情况	基因名称	差异情况
ATP1	A 系 260 bp,B 系没有	RPS3	SNP
ATP4	A 系:5'-AACGCGTTTAGGTAAGACTT-3' B 系:5'-AAC--G---A-----CTT-3'	RPS4	-
ATP6	A 系 360 bp,B 系 526 bp,SNP	RPS7	-
ATP8	SNP	RPS10	SNP
ATP9	-	RPS12	-
COX1	A 系 B 系 161 bp 序列差异,SNP	RPS14	SNP
COX2	SNP	CCMB	-
COX3	-	CCMC	SNP
NAD3	SNP	CCMFC	-
NAD4	-	CCMFN	SNP
NAD4L	SNP	SDH3	SNP
NAD6	-	SDH4	未获条带
NAD7	SNP	MATR	SNP
NAD9	SNP	COB	未获条带
		MTTB	SNP

因,也有可能是线粒体的某种突变引起,但这种方式引起不育的可能性过低。

3 讨论

长期以来,cRT-PCR 技术已广泛应用于拟南芥、水稻等植物的细胞研究中,但鲜有涉及棉花细胞线粒体基因的研究。在本研究中,我们对转录本序列分析发现,cRT-PCR 技术适用于获得棉花线粒体目的基因的全长转录本,为后续技术改良奠定了实验基础。在传统 cRT-PCR 技术的基础上,我们优化了 RNA 提取方法和环化连接体系,显著提高了环化效率。反转录阶段,在保证与特

异引物获得相同完整转录本的基础上,创新性地采用随机引物进行大批量的基因检测,操作更方便快捷。

基于本研究中改良的 cRT-PCR 技术存在上述提及的基因的不完整性和突变性现象,本研究提出如下针对性措施:首先保证 RNA 提取方法的科学准确性,鉴于 RNA 的降解起始于 5'和 3'末端,直接决定环化效率并影响扩增中基因序列的完整性,因此反应试剂中应保证一定浓度的 RNA 酶抑制剂,以从源头上确保基因序列的准确性;其次,我们发现环化的效率极大的影响了扩增的结果,无论是特异引物还是随机引物,都会出现区段缺失的情况,但在必要时将随机引物改为传统的

特异性引物,以从反应途径上确保降低单核苷酸多态性的发生,从而提升基因序列的特异性。在本研究中,需要综合考虑影响实验的诸多环节,其中需要格外关注的是 RNA 环化连接的质量。过夜可以为充分环化提供必要的时间保障,但鉴于单链 RNA 的易降解性,保证充分环化时间的前提是确保所加入的 RNA 酶抑制剂达到一定浓度,能够保障 RNA 在环化期间的稳定性。此外,在过夜后环化效率依然不高的特殊情形下,加入适量 ATP 可以明显加速 RNA 环化,提高环化效率。

我们通过改良的 cRT-PCR 技术对不育基因进行探索,通过对不育系和保持系的扩增,发现在 ATP 和 COX 家族中存在 UTR 区有差异的基因(在其他线粒体基因中大多是 SNP 的差异)。在此,我们暂不讨论条带明暗的差异,这可能与扩增效率或是拷贝数相关。差异基因中有无的差异、条带大小的差异,都很可能是由于线粒体内部重排或者 ORF 的插入导致的,而这些差异可能会引起作物的 CMS。根据本实验结果,发现线粒体编码蛋白基因中 ATP1、ATP4、ATP6、COX1 在不育系和保持系的扩增中出现了明显差异,我们认为这些差异片段可能是由于某种重组或者插入造成,或可能引起作物的不育。UTR 区段的差异倾向于 ATP 和 COX 基因,这和目前发表的 CMS 相关文献保持一致,提升了作为 CMS 相关基因的可能性,因此我们认为该方法用来寻找不育基因是可行的。当然,这些差异的出现不一定是 CMS 基因造成的嵌合 ORF,具体结果如何还需要进一步的实验验证。但是,通过 cRT-PCR 技术,为寻找 CMS 基因提供了新的方法和思路。

参 考 文 献

- [1] Liu G, Cao D, Li S, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Gossypium hirsutum* and evolutionary analysis of higher plant mitochondrial genomes[J]. PLoS ONE, 2013, 8(8):e69476.
- [2] Yang P, Han J, Huang J, *et al.* Transcriptome sequencing and de novo analysis of cytoplasmic male sterility and maintenance in JA-CMS cotton [J]. PLoS ONE, 2014, 9(11):e112320.
- [3] Kuhn J, Binder S. RT-PCR analysis of 5'to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria[J]. Nucl. Acids Res., 2002, 30(2):439.
- [4] Zhang Q Y, Lin Y G. Rice mitochondrial genes are transcribed by multiple promoters that are highly diverged[J]. J. Plants, 2006, 48(12):1473-1477.
- [5] Hang R, Deng X, Liu C, *et al.* Circular RT-PCR assay using *Arabidopsis* samples[J]. Bio. Protoc., 2015, doi: 10.21769/BioProtoc.1533.
- [6] Luo D, Xu H, Liu Z, *et al.* A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nat. Genet., 2013, 45(5):573.
- [7] Wang Z, Zou Y, Li X, *et al.* Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing[J]. Plant Cell, 2006, 18(3):676-687.
- [8] Gobron N, Waszczak C, Simon M, *et al.* A cryptic cytoplasmic male sterility unveils a possible gynodioecious past for *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4):e62450.
- [9] Zhu T, Liang C, Meng Z, *et al.* CottonFGD: An integrated functional genomics database for cotton[J]. BMC Plant Biol., 2017, 17(1):101.
- [10] Slomovic S, Schuster G. Circularized RT-PCR (cRT-PCR): Analysis of the 5' ends, 3' ends, and poly(A) tails of RNA[J]. Methods Enzymol., 2013, 530(4):227-251.
- [11] Yu Y, Liu C, Wang B, *et al.* Characterization of 3,17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Comamonas testosteroni*. [J]. Chem. Biol. Inter., 2015, 234:221-228.
- [12] 张 晓. 棉花胞质雄性不育系与保持系线粒体基因组差异研究[D]. 北京:中国农业科学院,博士学位论文, 2011.