

董璐,贾红梅,刘迪,等.菊花叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J].江苏农业科学,2016,44(3):67-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.016

菊花叶片总 RNA 提取方法的比较研究

董璐,贾红梅,刘迪,毛洪玉

(沈阳农业大学林学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:以菊花 C008 的叶片为试材,分别采用 CTAB 法、Trizol 法、改良 Trizol 法和试剂盒法等进行总 RNA 提取试验,并对提取质量进行分析比较。结果表明:CTAB 法提取的总 RNA 存在 DNA 污染。Trizol 法提取的总 RNA 条带复杂,有蛋白等杂质污染。改良 Trizol 法提取的总 RNA 条带清晰,但 RNA 存在降解。试剂盒法提取的总 RNA 条带清晰,纯度更高, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.889,浓度为 144.000 $\mu\text{g/mL}$,是适于菊花叶片总 RNA 提取的简单、高效的方法。

关键词:菊花;总 RNA;提取方法

中图分类号:S682.1⁺10.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0067-02

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是中国十大传统名花和世界四大切花之一,也是园林绿化中的重要观赏植物之一,在现代花卉生产中占有重要地位,具有很高的观赏和经济价值。菊花白色锈病是菊花首要病害之一,在多个国家被列为检疫性病害^[1]。寻找菊花中的抗病基因,对于防治该病具有重要作用。获得纯度高、完整性好的 RNA 是后期进行转录组测序、RT-PCR、基因克隆等分子生物学研究的基础。菊花的组织器官中含有大量的多糖、酚类、蛋白质等次生代谢物质,严重干扰了菊花总 RNA 的提取质量^[2]。目前,针对菊花叶片总 RNA 的提取有一些报道^[2-5],但仍不能提取出质量好的总 RNA。本试验对 4 种常用的总 RNA 提取方法进行系统分析比较,发现试剂盒法对于菊花叶片总 RNA 的提取是一种简单、高效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以沈阳农业大学花卉基地的菊花 C008 的叶片为试材,采后立即用锡箔纸包好,用液氮速冻后,在 -80 ℃ 的超低温冰箱中保存备用。

主要试剂:CTAB 缓冲液、10% β -巯基乙醇、氯仿:异戊醇(CI,V:V=24:1)、Trizol 试剂、异丙醇、无水乙醇、DECP 水、RNA prep Pure Kit 试剂盒等。

试验所需的移液枪枪头、枪头盒均用 0.1% DEPC 水浸泡 24 h,然后 121 ℃ 高压灭菌 30 min,50 ℃ 烘干备用。三角瓶、玻璃棒、量筒、研钵、研棒、钥匙用双蒸馏水清洗后 180 ℃ 烘烤过夜。研钵、研棒、药匙在使用前需放入 -20 ℃ 冰箱预冷。

1.2 试验方法

1.2.1 CTAB 法 ①取 0.2 g 菊花叶片于液氮中迅速冷却充分研磨,将磨好的叶片迅速装入无 RNase 的 2 mL 离心管中,

加入 65 ℃ 预热的 CTAB 缓冲液(含 10% 的 β -巯基乙醇)1 mL,立即在振荡器上剧烈振荡 30 s,65 ℃ 水浴锅中孵育 10 min,每 3~5 min 颠倒混匀 1 次,动作不要太剧烈。②加入等体积的氯仿:异戊醇(CI,V:V=24:1),用力颠倒混匀,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。③取上清液于新的离心管中,加入等体积的 CI,轻轻颠倒混匀,4 ℃ 下,12 000 r/min 离心 10 min。④取上清液于新离心管中,加入二倍体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 ℃ 沉淀 30 min 以上,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 20 min,去上清。⑤用提前预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀 1 次,去上清,在超净工作台中吹干沉淀,加入 40 μL ddH₂O 水溶解沉淀。

1.2.2 Trizol 法 参照吕晋慧等的方法^[2]。

1.2.3 改良 Trizol 法 ①向 1.5 mL 离心管中加入 1 mL Trizol 和 20 μL β -巯基乙醇,混匀。称取 0.2 g 菊花叶片液氮研磨成粉末,转移至离心管中,混匀后,静置 10 min,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min。②取上清,加入等体积的 CI,混匀,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min。③重复步骤②2 次。④取上清,加入等体积异丙醇,混匀,静置 10 min,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。⑤弃上清,用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,超净工作台吹干,加入 40 μL ddH₂O 溶解沉淀。

1.2.4 试剂盒法 参照 RNA prep Pure Kit 试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)说明书。

1.2.5 总 RNA 完整性和纯度检测 取 4 μL 总 RNA 样品在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,电压 150 V 电泳 10~15 min,电泳后用凝胶成像系统拍照记录。取 1 μL 总 RNA 样品,用紫外分光光度计测定波长在 260 nm 和 280 nm 下的吸光度(以试验中溶解总 RNA 的 ddH₂O 作为空白对照进行调零),计算总 RNA 样品浓度及 RNA 产量。

2 结果与分析

2.1 菊花叶片总 RNA 的完整性分析

琼脂糖凝胶电泳是检测 RNA 质量的一种重要方法。用 1% 的琼脂糖凝胶对 4 种不同方法提取的 RNA 进行电泳检测,结果(图 1)表明,采用 CTAB 法提取的 RNA 条带弥散且

收稿日期:2015-12-21

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:2014027004)。

作者简介:董璐(1991—),女,硕士研究生,研究方向为园林植物栽培与应用。E-mail:136062263@qq.com。

通信作者:毛洪玉,博士,副教授,从事园林植物逆境生理及生物技术研究。E-mail:maohongyu74@163.com。

亮度低,伴有 DNA 污染,说明提取的 RNA 质量不好。Trizol 法提取的 RNA 条带复杂并且带有轻微拖尾现象,5S 条带荧光亮度很大,说明 RNA 严重降解;点样孔有亮斑,说明 RNA 样品中含有多糖或蛋白质污染。改良 Trizol 法相较于 Trizol 法,条带少,拖尾现象不明显,点样孔杂质少,但该方法还是未

能完全去除多糖和酚类物质,8S 比 28S 亮度大,说明 28S 有部分降解。试剂盒法提取的 RNA,28S 和 18S 条带清晰,其荧光亮度接近 2 : 1,条带没有拖尾现象,点样孔无亮斑,说明 RNA 提取效果好。该方法最适用于菊花总 RNA 的提取,并用于后续反转录、PCR 等试验。

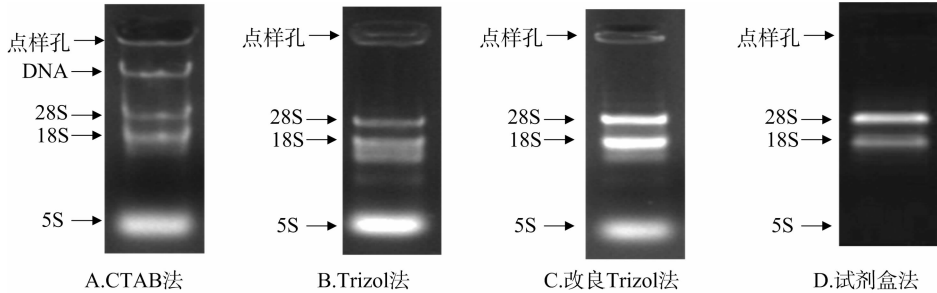


图1 不同方法提取菊花叶片总RNA电泳图

2.2 菊花叶片总 RNA 的纯度分析

利用紫外分光光度计对 4 种方法提取的菊花叶片总 RNA 的纯度进行检测。260 nm 和 280 nm 下的吸光度代表了核酸和蛋白质等有机物含量, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值直接反映出 RNA 中蛋白质等有机物的污染程度。由表 1 可知,Trizol 法的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值为 2.147,产量为 39.224 $\mu\text{g/g}$,改良 Trizol 法的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 2.171,产量为 57.499 $\mu\text{g/g}$,说明 RNA 中有少量蛋白质等有机物污染,质量较好,对于 RNA 质量要求不高的试验,不影响后续使用。虽然 CTAB 法提取的 RNA 浓度高产量大,但不排除是因为其有 DNA 污染的影响。高纯度 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值应介于 1.8 ~ 2.0 之间,试剂盒法中 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.889,浓度和产量分别为 144.000 $\mu\text{g/mL}$ 、28.080 $\mu\text{g/g}$ 。就试验所需时间来看,CTAB 法所需要的时间最长,后期还需要去除 DNA。Trizol 法和改良 Trizol 法所需的时间适中,分别为 60 min 和 70 min。试剂盒法所需时间最短,仅为 45 min。综上,试剂盒法是菊花 C008 叶片总 RNA 提取质量最好、效率最高的方法。

表 1 不同方法提取菊花叶片总 RNA 的纯度比较

提取方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	产量 ($\mu\text{g/g}$)	时间 (min)
CTAB 法	2.147	654.159	130.832	85
Trizol 法	2.113	196.119	39.224	60
改良 Trizol 法	2.171	287.496	57.499	70
试剂盒法	1.889	144.000	28.080	45

3 结论与讨论

获得高质量无污染的 RNA 是进行基因表达分析等后续分子试验的关键环节,但是从植物组织中提取出高质量的 RNA 是有一定难度的。由于植物组织中含有多糖、多酚、蛋白质和其他次生代谢物质,给高纯度 RNA 的提取带来一定难度。并且 RNase 广泛存在且稳定,使 RNA 的提取相较于 DNA 变得更加困难。不同植物采用的提取方法不同,同种植物的不同组织或相同组织在不同生长阶段所用的提取方法也不同^[6-12]。所以,合适的总 RNA 提取方法的选择,是转录组测序、RT-PCR、基因克隆等分子生物学方面研究的根本保证。

菊花为多年生草本植物,其组织或器官中含有大量的多糖和酚类物质,较多的次生代谢物质经常会对总 RNA 的产量和纯度造成影响^[2]。多糖的理化性质和 RNA 相似,容易与 RNA 形成难溶的胶状物^[13-14],然而在去除多糖干扰的过程中,也会去除一些 RNA,使 RNA 产量减少。酚类物质在材料匀浆时释放出来被氧化,使其与 RNA 产生不可逆的褐化反应,导致匀浆呈褐色^[15-16]。CTAB 法、改良 Trizol 法和试剂盒法均使用 β -巯基乙醇作为强还原剂,目的是防止酚类物质被氧化^[17]。CTAB 法是一种传统的总 RNA 提取方法,但其提取的总 RNA 中有 DNA 污染,需要进一步用 DNase I 消除,由于 DNase I 价格较贵,不适用于大量提取 RNA。本试验 Trizol 法和改良 Trizol 法所提取的总 RNA 条带均不只有 5S、18S 和 28S 这 3 条带,在 5S 和 18S 之间还有条带,可能是叶绿体 RNA。改良 Trizol 法相较于 Trizol 法,用氯仿-异戊醇 ($V:V=24:1$) 代替氯仿并进行多次抽提,更加充分地沉淀多糖、酚类物质等,这与王舒黎等的结论^[18]相一致。试剂盒法所提取的总 RNA 虽然由于洗脱柱和过滤柱的作用导致浓度及产量不高^[7],但还是能够满足试验需要,而且试剂盒法所提取的总 RNA 完整性好、操作简单、所用时间短。综上,试剂盒法是一种简单、高效的提取菊花叶片总 RNA 的方法。

对于植物总 RNA 的提取还应该注意以下几个方面:(1) 试验材料尽量采用新鲜样品,长时间冷冻的样品对植物总 RNA 的提取有一定影响。(2) 采集新鲜样品后应立即用液氮速冻,如采集地距离实验室较远,应在采集后立即放入冰盒,防止离体组织的 RNA 降解。(3) 试验前将研钵和研棒于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内预冷。如天气炎热,应在磨样前向研钵中先加入液氮再一次快速预冷。药匙在液氮中快速预冷后可防止药匙上有样品残留,减少样品损失。(4) 在抽提吸取上清液过程中,采用小量程多次吸取的方法,缓慢吸取上清,可减少多糖、酚类物质等大分子与 RNA 作用一起沉淀。

参考文献:

[1] Whipps I M. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas [J]. Ann Appl Boil, 1993, 122: 173 - 187.

班加骏,刘 洋,李 程,等. 药食兼用植物白苞蒿茎段的组培快繁途径[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):69-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.017

药食兼用植物白苞蒿茎段的组培快繁途径

班加骏¹, 刘 洋², 李 程¹, 李保国², 齐国辉², 顾玉红¹, 舒荣志³, 顾仁菲¹

(1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000; 2. 河北农业大学林学院, 河北保定 071000;

3. 河北农业大学现代科技学院, 河北保定 071000)

摘要:为缩短白苞蒿的繁殖周期,提高增殖系数,以白苞蒿带芽茎段为外植体,运用组织培养技术,从培养基的配方、生根方法、移栽等环节进行优化,建立周期短、增殖系数高的2条快速繁殖途径:途径一,在MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+GA 0.5 mg/L上初代培养20 d,在MS+6-BA 1 mg/L上继代培养10 d,在MS+NAA 1 mg/L或MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+GA 0.5 mg/L上生根培养7 d,将生根组培苗移栽到湿沙中在培养箱内培养2 d后,移栽到大田荫棚中7 d的成活率为100%;途径二,继代培养后的茎段用诱导生根的试剂处理,扦插到湿沙中,在培养箱内培养10 d,生根率为90%,移栽到大田中,成活率为100%。2条快繁途径的繁殖周期为1.5~2.0个月,茎段增殖系数为6,成活率为100%。

关键词:白苞蒿;茎段;组织培养;激素;移栽;快速繁殖

中图分类号: S188;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0069-03

白苞蒿(*Artemisia lactiflora* Wall)别称明日叶、白花苞、四季菜等,系菊科(Compositae)蒿属多年生草本植物^[1],主要分布于我国秦岭以南各省区的中、低海拔地区的山坡、路旁、林缘等地^[2],收载于《中国药典》2010年版一部附录中,是刘寄奴的基原药材之一^[3],以全草入药,具有清热、解毒、止咳、消炎、活血、健胃等功效,可用于慢性肝炎、肝硬化、肾炎等肝、肾

疾病的治疗,也有用于血丝虫病的治疗^[4]。明日叶中还含有一种挥发油,对喘息型慢性气管炎有治疗效果^[5]。在当今竞争激烈、生物多样性等环境下植物内生真菌能更好地产生次生代谢物^[6]。钱一鑫等发现,白苞蒿内生真菌次生提取物对人前列腺癌细胞系(PC-3)、人骨髓白血病细胞系(HL-60)和人乳腺癌细胞系(MCF-7)生长可能具有抑制活性作用^[7]。在温度适宜,土壤润湿时,明日叶生长迅速、产量高、叶片肥厚嫩绿、质量好,并且明日叶能耐5~7 d的土壤积水^[8]。植物的无性繁殖方式包括组织培养^[5]、扦插^[9-12]、嫁接^[13]等,能实现植物的快速繁殖,且子代保持母本的优良性状。本研究以白苞蒿带芽茎段为外植体,运用组织培养技术,优化培养基配方和炼苗方法,使茎段不经过愈伤组织而直接增殖,建立利用白苞蒿茎段直接高效快繁的途径,为生产提供技术。

收稿日期:2014-11-23

基金项目:河北省科技计划(编号:14236810D-1)。

作者简介:班加骏(1990—),男,河北邢台人,硕士研究生,主要从事植物发育生物学研究。Tel:(0312)7528244;E-mail:junmal201@sina.com。

通信作者:顾玉红,博士,教授,主要从事植物发育生物学研究。Tel:(0312)7528244;E-mail:gyhshengwu@163.com。

- [2] 吕晋慧,陈 阳,康红梅. 一种有效的菊花总RNA提取方法[J]. 中国农学通报,2011,27(25):113-116.
- [3] 张志想,葛蓓李,潘 嵩,等. 菊花矮化类病毒的分子检测与序列分析[J]. 园艺学报,2011,38(12):2349-2356.
- [4] 黄河,王顺利,曹华雯,等. 甘菊cDNA-AFLP反应体系的优化[J]. 生物技术通报,2009(11):108-113.
- [5] 温立柱. 菊花开花抑制基因CmEMF基因的克隆及其表达分析[D]. 泰安:山东农业大学,2013.
- [6] 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.
- [7] 罗 江,杨丽娟,崔浩然,等. 刺山柑总RNA提取方法的比较研究[J]. 北方园艺,2014(5):91-95.
- [8] 刘 洁,江静怡,徐吉臣. 一种改良的云杉针叶总RNA提取方法[J]. 分子植物育种,2014,12(3):554-561.
- [9] 李红熙,徐美隆,杨 智. 一种适合葡萄多种组织的总RNA提取方法[J]. 中国农学通报,2012,28(7):155-159.
- [10] 王梦娜,武 艳,程国山,等. 茶树叶片总RNA提取方法的比较研究[J]. 植物生理学报,2013,01(1):95-99.

- [11] 崔素萍,康振生,赵 杰,等. 一种快速提取小麦叶片总RNA的方法[J]. 西北植物学报,2006,26(2):314-318.
- [12] 李小婷,戴国礼,李彦龙,等. 沙棘叶片总RNA提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):33-34,137.
- [13] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. BioTechniques, 1992, 13(1):52-54,56.
- [14] 谭丽丽,燕正民,徐亚英,等. 番茄叶片总RNA提取方法的比较[J]. 东北农业大学学报,2010,41(4):29-32.
- [15] Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(1):91-95.
- [16] 曾文丹,罗兴录,袁圣勇,等. 不同方法提取木薯茎总RNA效果的比较研究[J]. 北方园艺,2013(8):103-106.
- [17] 夏海武,吕柳新,陈桂信. 羊蹄甲果荚中总RNA提取的新方法[J]. 分子植物育种,2006,4(1):147-149.
- [18] 王舒黎,吴沙沙,吕英民. 改良Trizol法快速高效提取香石竹总RNA[J]. 分子植物育种,2010,8(5):987-990.