

周 敏,付金娥,韦树根,等. 青蒿不同部位总 RNA 提取方法比较[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):31-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.008

青蒿不同部位总 RNA 提取方法比较

周 敏^{1,2}, 付金娥¹, 韦树根¹, 潘丽梅¹

(1. 中国医学科学院药用植物研究所广西分所,广西南宁 530023; 2. 广西中医药大学,广西南宁 530200)

摘要:为从青蒿中提取高质量的 RNA,以青蒿叶片、茎、根和花为材料,采用 TRIzol 法、改良 TRIzol 法、十六烷基三甲基溴化铵-LiCl(CTAB-LiCl)法、CTAB-异丙醇法 4 种方法,比较不同材料不同方法分离 RNA 的效果。结果表明,4 种方法所提 RNA 纯度均较高,其中改良 TriZol 法所提 RNA 质量最好。

关键词:青蒿;RNA 提取;改良 TRIzol 法;蛋白质

中图分类号: Q522 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0031-02

2015 版《中华人民共和国药典》规定,青蒿为菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)的干燥地上部分^[1]。青蒿苦、辛、寒,具有清虚热、除骨蒸、解暑热、截疟、退黄的功效,多用于治疗温邪伤阴、夜热早凉、阴虚发热、骨蒸劳热、暑邪发热、疟疾寒热、湿热黄疸等疾病。随着青蒿素被发现是治疗疟疾的首选药物,挽救了全球特别是发展中国家数百万人的生命,使得青蒿一直以来是研究的热点。目前青蒿的研究不仅从资源、栽培、育种等传统技术方面进行,还从分子生物学的角度阐明青蒿生长和发育机制及其有效成分青蒿素合成和累积机制等方面进行。因此,提取高质量、高纯度、完整性好的 RNA 是分子生物学研究的重要基础,对于进行逆转录 PCR(RT-PCR),cDNA 合成、RNA 序列分析、Northern 印迹杂交等具有重要意义。由于植物组织中化学成分复杂,并没有一种 RNA 提取方法适用于所有的植物^[2]。青蒿的化学成分主要有挥发油类、香豆素类、萜类、黄酮类、苯丙酸类及其他类成分^[3],复杂的化学成分增加了青蒿 RNA 提取的难度,且前人也未系统地青蒿不同部位 RNA 提取进行研究。本研究通过比较 TRIzol 法、改良 TRIzol 法、十六烷基三甲基溴化铵-LiCl(CTAB-LiCl)法和 CTAB-异丙醇 4 种方法提取青蒿不同部位的 RNA,不仅进一步地为青蒿进行 RT-PCR、cDNA 合成、RNA 序列分析、Northern 印迹杂交等分子生物学试验提供基础,还为近缘种植物 RNA 的提取提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015 年 8 月,采集广西药用植物园栽培基地的青蒿叶片、茎、花、根等作为试验材料,立即用液氮速冻后置于-80℃冰箱保存备用。

收稿日期:2015-09-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560623);广西自然科学基金(编号:2013GXNSFAA019221、2013GXNSFBA019180)。

作者简介:周 敏(1991—),女,江西赣州人,硕士研究生,主要从事药用植物资源育种方面研究。E-mail:zmlw1020@163.com。

通信作者:韦树根,硕士,副研究员,主要从事药用植物资源、繁殖、育种等方面的研究。E-mail:weishugen2@163.com。

1.2 试验试剂

TRIzol 试剂盒、三氯甲烷、异丙醇、三氯甲烷+异戊醇(24:1)、苯酚、75%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)水、CTAB、8 mol/L LiCl、1%琼脂糖凝胶,1×TAE 缓冲液。

1.3 试验仪器

主要仪器:Eppendorf 移液枪,Sigma Sartorius 台式冷冻离心机,涡旋振荡仪器,Bio-Rad 电泳仪,ChemiDoc XRS 凝胶成像系统,MILIPORE 超纯水机,制冰机(北京长流科学仪器有限公司),恒温干燥箱(上海天恒医疗器械有限公司),微量分光光度计,水浴锅。

1.4 操作方法

1.4.1 TRIzol 试剂盒法 取 0.2 g 植物组织,在液氮中研磨成细粉,转移至装有 1 mL TRIzol 的 1.5 mL 离心管中,再加入 0.2 mL 三氯甲烷颠倒混匀 15 s,室温静置 3 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液转移至新的离心管中,加入等体积异丙醇,涡旋混匀,室温静置 10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沿试管壁加入 1 mL 75%乙醇溶液,4℃、8 190 r/min 离心 5 min,弃上清液,室温干燥 5 min,加 50 μL DEPC 水溶解。

1.4.2 改良 TRIzol 法 取 0.2 g 植物组织,在液氮中研磨成细粉,转移至装有 1 mL TRIzol 的 1.5 mL 离心管中,涡旋振荡 1 min,4℃、2 000 r/min 离心 15 min;取上清液转移至新的离心管中,加入等体积苯酚+三氯甲烷+异戊醇(25:24:1)溶液,涡旋振荡 1 min,室温静置 3~5 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液转移至新的离心管中,加入等体积的三氯甲烷+异戊醇,室温静置 3~5 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,加入等体积三氯甲烷,室温静置 3~5 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液 200 μL 转移至新的离心管中,加入 0.5 mL 预冷的异丙醇,颠倒混匀 8~10 次,室温静置 8~10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,试管壁加入 1 mL 75%乙醇溶液,4℃、8 190 r/min 离心 5 min,弃上清液,室温干燥 5 min,加 50 μL DEPC 水溶解。

1.4.3 CTAB-LiCl 法 取 0.2 g 液氮研磨的样品迅速转移至 60℃预热的含有 600 μL CTAB 的离心管中,涡旋振荡 30 s,于 60℃水浴 2 min,其间颠倒混匀 2~3 次,室温冷却 1 min 后加入等体积三氯甲烷+异戊醇溶液,涡旋振荡 1 min

后,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液,加入等体积的三氯甲烷 + 异戊醇溶液,涡旋振荡 1 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;将上清液转移至新的离心管中,加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl,4 ℃ 过夜沉淀,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加 1 mL 75% 乙醇溶液,4 ℃、8 190 r/min 离心 5 min,弃上清液,室温干燥 5 min,加 50 μL DEPC 水溶解。

1.4.4 CTAB - 异丙醇法 步骤同 CTAB - LiCl 法,用等体积的异丙醇沉淀。

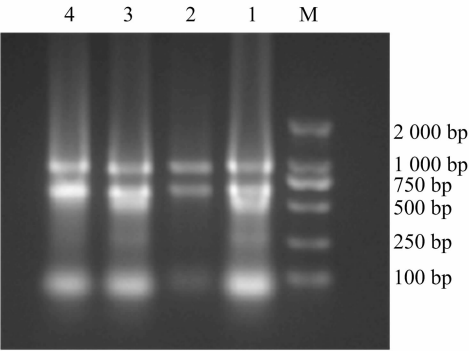
1.5 RNA 的质量检测

用 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 的纯度和完整性,用微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.8 ~ 2.0、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 为 2.0 ~ 2.3,表明 RNA 样品纯度高。

2 结果与分析

2.1 TRIzol 法提取 RNA 效果

由图 1、表 1 可见,电泳结果显示有 3 条条带,且条带清晰;叶片和根的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值 < 1.80,图 1 中 18S 条带有拖尾,说明 RNA 已有部分降解。结果表明,用此方法提取的 RNA 浓度较低。



M—marker; 1—叶片; 2—茎; 3—根; 4—花。下图同
图1 TRIzol 法提取青蒿 RNA 电泳结果

表 1 不同部位 RNA 的浓度和纯度

样品	浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
叶片	65	1.78	2.02
茎	91	1.95	2.12
根	87	1.70	2.05
花	42	1.80	2.01

2.2 改良 TRIzol 法提取 RNA 效果

由图 2、表 2 可见,改良 TRIzol 法电泳可见 3 条清晰条带,带与带之间无明显弥散现象; $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均在 1.8 ~ 2.1 间,说明 RNA 在整个提取过程中结构完整,未发生明显降解; $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值均在 2.0 ~ 2.3 间,说明去 DNA 和蛋白质效果很好。改良后样品浓度较高,可用于进一步的分子试验。

2.3 CTAB - LiCl 法提取 RNA 效果

由图 3、表 3 可见,电泳结果有 18S、28S 条带,5S 条带模糊,不清晰,不适合用于小 RNA 的分析,此方法沉淀 RNA 时,沉淀有颜色,可能是有些物质未去除干净;其中叶片提取的 RNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值 < 1.8, RNA 有所降解,说明此方法不适合叶的提取。

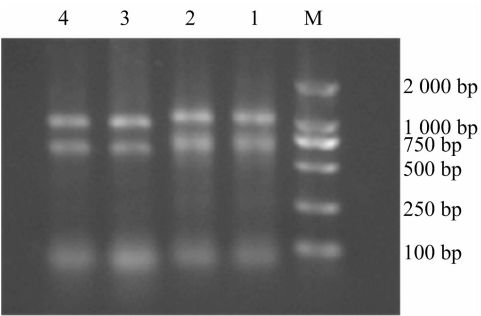


图2 改良 TRIzol 法提取青蒿 RNA 电泳结果

表 2 不同部位 RNA 的浓度和纯度

样品	浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$
叶片	165	1.89	2.08
茎	178	1.96	2.01
根	227	2.05	2.14
花	196	1.82	2.13

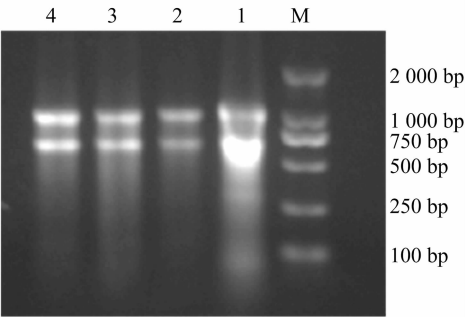


图3 CTAB-LiCl 法提取青蒿 RNA 电泳结果

表 3 不同部位 RNA 的浓度和纯度

样品	浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
叶片	109	1.76	2.04
茎	164	1.81	2.05
根	132	1.93	2.06
花	110	1.94	2.09

2.4 CTAB - 异丙醇法提取 RNA 效果

由图 4、表 4 可见,电泳结果与 CTAB - LiCl 法相同,5S 条带模糊,不清晰;但用此方法提取的 RNA 浓度比 CTAB - LiCl 高,其中花的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值 < 2.0,可能有蛋白质残留或者次生代谢物没有抽提完全。

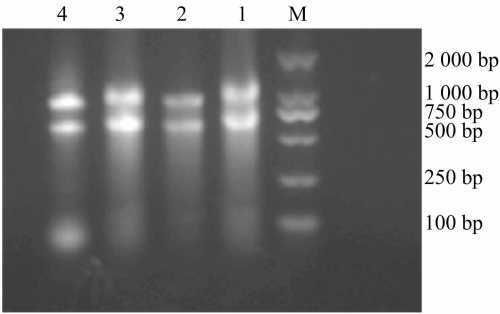


图4 CTAB-异丙醇法提取青蒿 RNA 电泳图

张晓波, 翟晓朦, 许沛东, 等. 野牛草 ISSR-PCR 反应体系的优化与建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 33-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.009

野牛草 ISSR-PCR 反应体系的优化与建立

张晓波^{1,2}, 翟晓朦³, 许沛东³, 赵 艳³

(1. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学, 海南海口 570228;

2. 海南大学旅游学院, 海南海口 570228; 3. 海南大学农学院, 海南海口 570228)

摘要:根据正交试验设计原理探索野牛草 [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] ISSR-PCR 反应体系中各主要成分的最优化用量, 对影响野牛草 ISSR-PCR 反应体系的主要因素 [dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物 (Primers)、 Mg^{2+} 的用量] 进行优化, 获得野牛草的 ISSR-PCR 最适反应体系为 20 μ L 的反应体系, 包括引物 (2.0 μ mol/L) 4.0 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L、 $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.6 μ L、dNTP (2 mmol/L) 2.0 μ L 和模板 DNA (20 ng/ μ L) 3.0 μ L。该优化体系的建立为利用 ISSR 分子标记进行野牛草种质资源遗传多样性研究、种质资源鉴定等奠定了基础。

关键词:野牛草; ISSR-PCR; 反应体系; 正交优化

中图分类号:S688.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)03-0033-03

野牛草 [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] 为禾本科 (Gramineae) 画眉草亚科 (Eragrostoideae) 野牛草属 (*Buchloe*) 多年生草本植物, 由于植株低矮、易繁殖、蔓延快且具有极强的抗旱性, 是国内外公认的典型环保型草坪草, 广泛用于园林、庭院、运动场和固土护坡的优良暖季型草坪^[1]。目前, 关于野牛草的形态特性^[2]、坪用性状^[3]、引种繁殖^[4]、生态功能^[5]、抗逆性^[6-10]等方面研究较多, 而对于野牛草种质资源

遗传多样性评价、鉴定等分子水平方面研究报道较少。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 是在微卫星标记 (simple sequence repeat, SSR) 基础上发展起来的分子标记, 具有揭示的多态性高、精确度高、检测方便的优点^[11]。目前, 广泛应用于植物品种鉴定、保护、遗传多样性、进化及其他分子水平的研究中, 如在紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、高羊茅 (*Festuca ovina*)、冰草 [*Agropyron crstatum* (L.) Gaertn.]、黑麦草 (*Secale cereale* L.) 等牧草及草坪草的研究中 ISSR 分子标记得到了广泛应用^[12]。

尽管 ISSR 具有许多优点, 但由于其本质还是基于 PCR 反应的一种分子标记, 不同类型植物的 PCR 反应体系会具有一定的差异, 所以为了 ISSR 分析结果的可靠性及可重复性, 在进行遗传多样性分析等研究之前预先对 PCR 反应体系进

收稿日期: 2015-10-06

基金项目: 海南大学青年基金 (编号: qnjj1149)。

作者简介: 张晓波 (1978—), 男, 山西岢岚人, 博士研究生, 副教授, 从事草坪管理相关研究, E-mail: angiaao@126.com。

通信作者: 赵 艳。E-mail: yanbo315@126.com。

表 4 不同部位 RNA 的浓度和纯度

样品	浓度 (ng/ μ L)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
叶片	193	1.99	2.00
茎	213	2.08	2.11
根	185	2.16	2.03
花	258	1.89	1.98

3 讨论

组织的破碎程度、RNase 的活性、多糖和蛋白质等大分子物质的存在^[4]都会影响 RNA 提取的质量。TRIzol 试剂盒法比较简单方便, 耗时也较短, 但是可能由于步骤比较简单, 对杂质的去除不够彻底^[5-6]。改良后的 TRIzol, 加了苯酚, 能更好去除蛋白质、多酚、多糖等物质, 通过电泳图、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值可知, 浓度和纯度也较高, 符合转录组、基因克隆等高通量试验的要求。5S 条带缺失或不清晰是 CTAB 法提取 RNA 的不足之处, 此方法提取的 RNA 不能用于小 RNA 的分析。LiCl 本身沉淀大片 RNA 效果好的特点使得到的 RNA 大片损失很少, 更适于进行后续分子生物学试验; 而异丙醇沉淀获得的沉淀

体积大, 导致多糖和酚类物质的共沉淀作用, 因而 CTAB-LiCl 比 CTAB-异丙醇更适合青蒿 RNA 的提取。因此, 青蒿不同部位 RNA 用 TRIzol 法提取的比用 CTAB 法质量更好, 条带清晰、完整, 且 TRIzol 法比 CTAB 法用时更短, 效率更高。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [2] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. Meth Enzymol, 1974, 31(A): 528-545.
- [3] 张秋红, 朱子徽, 李 晋, 等. 中药青蒿化学成分与种植研究现状[J]. 中国医药导报, 2011, 8(19): 10-12.
- [4] Sambrook, J, Fritschi E F, et al. Molecular cloning: a laboratory manuals[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 343-361.
- [5] 赖 茜, 余迪求. 4 种榕树总 RNA 提取方法的比较[J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2008, 30(6): 636-640.
- [6] 印 华, 周兆德, 吴志祥. 2 种荔枝 RNA 提取方法的比较[J]. 热带农业工程, 2009, 33(2): 1-4.