

张志勇, 阳 静, 齐泽民. 铁皮石斛总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 33–35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.009

铁皮石斛总 RNA 提取方法的比较研究

张志勇, 阳 静, 齐泽民

(内江师范学院生命科学学院/四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川内江 641112)

摘要:针对铁皮石斛富含多糖、多酚等次生代谢物质的特点,以铁皮石斛叶片为材料,比较改良 CTAB-LiCl 法、SDS 法以及试剂盒法提取总 RNA 的质量,利用电泳检测、核酸蛋白仪浓度测定、RT-PCR 等进行验证分析。结果表明,3 种方法均能提取铁皮石斛叶片中总 RNA,但提取效果存在差异。改良 CTAB-LiCl 法提取总 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰、 $D_{600\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 与 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 分别为 1.96 和 2.03, RNA 完整性好、纯度高, RNA 浓度在 3 种方法中最高,达到 560.6 mg/L, RT-PCR 扩增出目的基因片段条带最明显,适用于后续分子生物学研究。

关键词:铁皮石斛; 总 RNA; 多糖; CTAB-LiCl 法

中图分类号: Q522; S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0033-02

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为兰科石斛属多年生草本植物,为 2010 年版《中华人民共和国药典》收录的名贵中药材品种。其干燥鳞茎入药,具有滋阴清热、益胃生津、增强免疫力、降血脂、降血糖、抗氧化、抗衰老等多种药理和保健作用,是石斛属中最为珍稀名贵的种,位列“中华九大仙草”之首^[1-3]。对铁皮石斛的研究主要集中在化学成分^[4]、药理和临床作用^[1,5-6]、分类鉴定^[7-8]、诱变育种^[9-10]、组织培养及栽培技术^[11-13]等方面。随着研究的深入,对铁皮石斛药用有效成分关键基因克隆和相关代谢调控网络的分子机理解析越来越受到研究者的重视。高质量 RNA 提取是基因克隆及其功能分析等分子生物学研究的前提,常用的 RNA 少量提取方法有 SDS 酚法^[14]、异硫氰酸胍法^[15]、CTAB 法^[16-18]等。铁皮石斛茎叶中富含多糖、酚类及生物碱等多种次生代谢产物^[19]。尤其多糖多酚不易与 RNA 分离而共沉淀,影响 RNA 的质量,不利于后续分子生物学试验的开展。因此,本研究针对铁皮石斛多糖、多酚等次生代谢物质含量高的特点,通过比较改良 CTAB-LiCl 法、SDS 法以及试剂盒法等 3 种方法提取的总 RNA 质量,建立 1 种简便高效的铁皮石斛总 RNA 提取方法,为铁皮石斛分子生物学研究中 RNA 高效获取提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试铁皮石斛采自四川省高校特色农业资源研究与利用

重点实验室大棚,为组培苗移栽后的 2 年生叶片,分别在相应部位剪取约 1 g 幼嫩叶片,液氮速冻后置于 -80 ℃ 备用。

主要试剂:RNAiso Plus 试剂盒 (Takara 公司), Reverse transcriptase M-MLV 反转录试剂盒 (Takara 公司); RNase 固相清除剂 (华越洋公司); 异硫氰酸胍; DEPC; CTAB; DL2000 Marker (Takara 公司); SDS、饱和 Tris 酚、三氯甲烷、 β -巯基乙醇、无水乙醇、异戊醇、PVP 等均为国产分析纯。

试验中所使用的塑料制品均在 RNase 固相清除剂为 1/1 000 的溶液中浸泡 4 h,高温高压灭菌 30 min,烘干备用;非塑料制品 180 ℃ 烘烤 8 h 后使用。所有配制的提取溶液经 0.1% DEPC 水处理 12 h 以上,高压灭菌后使用。

1.2 方法

1.2.1 SDS 法提取总 RNA 取铁皮石斛组培苗叶片在液氮中快速研磨至粉末状,加入 80 ℃ 预热的 SDS 提取液,具体操作过程参考刘波等文献^[14]提取百蕊草根总 RNA 方法,获得的 RNA 沉淀自然干燥后加入 30 μ L 0.1% DEPC 水溶解, -80 ℃ 保存备用。

1.2.2 改良 CTAB-LiCl 法提取总 RNA 取铁皮石斛组培苗叶片在液氮中快速研磨至粉末状,在 2 mL 离心管中加入 700 μ L 65 ℃ 预热的 CTAB 提取液和 60 μ L β -巯基乙醇,剧烈振荡混匀后置 65 ℃ 水浴 10 min,其间摇动 4~5 次;加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1),振荡混匀,冰浴 10 min;4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一新的 2 mL 离心管,用等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 重复抽提 1 次;取上清液,加入 1/2 体积无水乙醇和 1/3 体积 10 mol/L LiCl,混匀后 -20 ℃ 静置过夜;4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;用 DEPC 处理的 75% 乙醇漂洗沉淀 2 次;4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min,弃上清, RNA 沉淀自然干燥后用 30 μ L 0.1% DEPC 处理水溶解沉淀, -80 ℃ 保存备用。

1.2.3 RNAiso Plus 试剂盒法提取总 RNA 将铁皮石斛叶片在液氮中快速研磨成粉末,使用宝生物 (大连) 有限公司的 RNAiso Plus 试剂盒,相关操作参照使用说明进行,提取的 RNA 沉淀用 30 μ L 0.1% DEPC 水溶解, -80 ℃ 保存备用。

1.2.4 总 RNA 质量检测 3 种方法提取的总 RNA 样品浓

收稿日期:2015-12-17

基金项目:四川省教育厅高校科研创新团队项目 (编号:14TD0025);
四川省教育厅重点项目 (编号:13ZA0007、14ZA0250);内江师范学院自然科学重点项目 (编号:13ZA01)。

作者简介:张志勇 (1982—),男,四川简阳人,博士,副研究员,主要从事植物资源开发与植物分子生物学研究。E-mail: zhangzyong219@126.com。

通信作者:齐泽民,博士,教授,主要从事植物生态学研究与资源开发。E-mail: zmin918@sina.com。

度和纯度均使用核酸蛋白仪检测,分别记录 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值及其浓度,并分别取 2 μL RNA 溶液在 1.0% 琼脂糖凝胶上以 10 V/cm 电泳 15 min,检测 RNA 的完整性。

1.2.5 RT-PCR 检测 分别以上述 3 种方法提取的总 RNA 为模板,使用 Takara 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒,oligo dT primer 和 Random 6 mers 为反转录引物,按说明书配制 10 μL 反应体系,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min 反转录成 cDNA,85 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 s 使反转录酶失活。再以获得的 cDNA 为模板,根据已知的铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因序列 (GenBank:KF711982.1) 设计一对特异引物 (上游引物:5'-TGATGGCTTCGTAGTCCGTAAT-3',下游引物:5'-GGAC-TACTCCCGTGCCAAACCAT-3') 进行 RT-PCR 扩增,目的片段大小 179 bp。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) \times 30 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的总 RNA 质量比较

2.1.1 RNA 的完整性 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测表明,3 种方法提取的总 RNA 均有较整齐、清楚的 28S、18S、5S 条带,点样孔附近无明显亮斑,说明无蛋白质、糖类等杂质残留,但电泳结果存在较大差异 (图 1)。其中 SDS 法提取的总 RNA 虽有 3 条完整条带,但 RNA 浓度较低,改良 CTAB-LiCl 法提取的总 RNA 条带清晰,亮度高、无明显拖带降解现象,其 28S、18S 条带与 RNAiso Plus 试剂盒法提取 RNA 的 28S、18S 条带亮度相当,这表明该方法提取的 RNA 完整性很好。

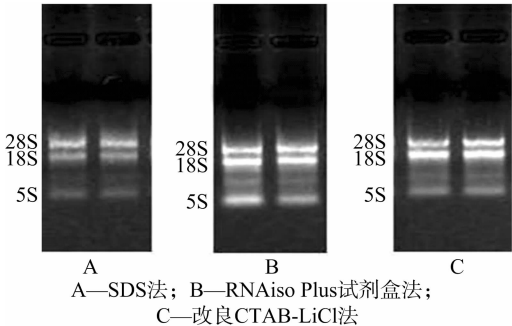


图1 3种方法提取的总 RNA 电泳结果

2.1.2 浓度与纯度 $D_{600\text{ nm}/D_{280\text{ nm}}}$ 和 $D_{600\text{ nm}/D_{230\text{ nm}}}$ 常用于分析提取的 RNA 纯度,高纯度的 RNA 溶液 $D_{600\text{ nm}/D_{280\text{ nm}}}$ 应介于 1.8 ~ 2.0 之间, $D_{600\text{ nm}/D_{230\text{ nm}}}$ 应大于 2.0^[14]。由表 1 可见,SDS 法提取的 RNA $D_{600\text{ nm}/D_{280\text{ nm}}}$ 比值为 1.83,但 $D_{600\text{ nm}/D_{230\text{ nm}}}$ 仅为 1.62,说明可能有盐离子等杂质存在。改良 CTAB-LiCl 法和 RNAiso Plus 试剂盒法提取的 RNA $D_{600\text{ nm}/D_{280\text{ nm}}}$ 比值分别为 1.96 和 2.02, $D_{600\text{ nm}/D_{230\text{ nm}}}$ 分别为 2.03 和 1.92,表明所提 RNA 纯度高,蛋白质、酚类、糖类等杂质去除效果较好。改良 CTAB-LiCl 法和 RNAiso Plus 试剂盒法提取的 RNA 浓度均超过 500 mg/L,远远大于 SDS 法的 97.4 mg/L。

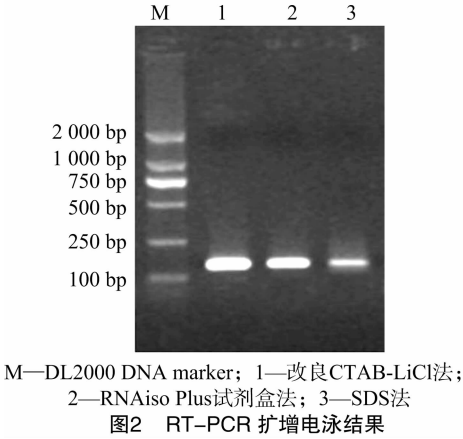
2.2 RT-PCR 扩增结果

由图 2 可知,琼脂糖凝胶电泳结果,3 种方法提取总 RNA 反转录的 cDNA 均通过 RT-PCR 扩增获得大小约为 180 bp

表 1 3 种方法提取的铁皮石斛总 RNA 平均浓度和纯度

方法	$D_{600\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{600\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	RNA 浓度 (mg/L)
SDS 法	1.83	1.62	97.4
改良 CTAB-LiCl 法	1.96	2.03	560.6
试剂盒法	2.02	1.92	548.7

的目的片段,与预期结果相符。其中,改良 CTAB-LiCl 法扩增的条带亮度最高,SDS 法条带亮度最弱,可见改良 CTAB-LiCl 法提取的总 RNA 产物能满足基因克隆、表达等后续分子生物学研究。



3 讨论

获取纯度高、浓度大、完整性好的 RNA 是进行基因克隆、基因表达分析、转录组测序等分子生物学操作的前提^[14,17,20]。近年来,有关植物 RNA 的提取方法有很多报道,但不同植物内含物组分及含量有很大差别,导致相关方法不能通用。铁皮石斛中富含多糖、多酚、生物碱等次生代谢产物,因多糖与 RNA 间的理化性质很相似,不易分开,在去除多糖的同时容易将大量 RNA 同时去除,影响后续试验。而多酚物质易氧化为醌,与 RNA 发生不可逆的结合,进行抽提时同样会带走部分 RNA,因此,从富含多糖、多酚的铁皮石斛中提取高质量 RNA 的关键在于有效去除多糖和多酚等次生代谢物质^[21]。

对于多糖物质的去除方法主要有高盐沉淀法、低浓度乙醇沉淀法、LiCl 沉淀法、KAc 沉淀法等^[16]。本研究中,改良 CTAB-LiCl 法使用 CTAB 作为裂解提取液的效果优于 SDS 法。CTAB 作为强变性剂,能够有效除去蛋白质等杂质,使用较高浓度的 LiCl 进行沉淀过夜,能有效去除多糖,同时提取液中加入的 PVP 也能和多糖结合,去除部分多糖。

RNA 提取时去除酚类化合物主要包括加入强还原剂与加入络合物 2 种途径^[16]。在提取缓冲液中加入的强还原剂有巯基乙醇、二硫苏糖醇或半胱氨酸等,其中巯基乙醇使用最广泛。本试验中改良 CTAB-LiCl 法使用的 β -巯基乙醇的浓度提高至 4%,同时,加入的络合物 PVP 有很强的结合多酚化合物的能力,可以减少酚类物质的影响。

参考文献:

[1] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志,2013,38(4):489-493.

漆子钰,陈俊晖,林志刚,等. 蝴蝶兰小麻雀的组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):35-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.010

蝴蝶兰小麻雀的组培快繁技术

漆子钰¹, 陈俊晖¹, 林志刚², 许丽秋³, 杨毅燕³, 吴沙沙¹, 翟俊文¹, 彭东辉¹

(1. 福建农林大学园林学院, 福建福州 350002; 2. 福建漳浦台湾农民创业园科技服务中心, 福建漳州 363204;

3. 福建漳州钜宝生物科技有限公司, 福建漳州 363204)

摘要:以蝴蝶兰小麻雀花梗为外植体培养成的原球茎为材料,研究不同培养基、生长调节剂和外源添加物对其增殖、分化和壮苗生根的影响。结果表明,原球茎增殖的最佳配方为 1/2 MS + 8.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 蛋白胨 + 25 g/L 蔗糖 + 5.2 g/L 琼脂,增殖系数最高(2.62);原球茎分化的最佳配方为 2.0 g/L 花宝 1 号 + 0.2 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 100 mL/L 椰汁 + 25 g/L 蔗糖 + 5.2 g/L 琼脂,分化率 100%,平均叶片数为 3.54 张/株,平均株高 4.04 cm;最适合蝴蝶兰根诱导的培养基配方为 2.0 g/L 花宝 1 号 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 100 mg/L 香蕉 + 25 g/L 蔗糖 + 5.2 g/L 琼脂,在该培养基上生根率 100%,生根数最多(3.52 条),平均根长最长(35.37 mm)。

关键词:蝴蝶兰;原球茎;组织培养;培养基;正交设计

中图分类号: S682.2⁺90.4⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)04-0035-04

蝴蝶兰属兰科 (Orchidaceae) 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 的附生兰,于 1750 年被发现,原产于热带和亚热带^[1],因花朵的形状酷似蝴蝶而得名,别称蝶兰^[2]。蝴蝶兰花大色艳,可连续观赏 2~3 个月,因此很容易吸引大众的眼球。它与卡特

兰、万代兰、石斛兰并称为四大观赏兰,素有“兰花皇后”之美称^[3],具有极高的观赏价值和经济价值。

小麻雀是福建漳州钜宝生物科技有限公司培育的蝴蝶兰新品种,花径 5.5 cm,花葶高 35 cm,花朵数在 12 朵/枝以上,属黄色系品种。其唇瓣为胭脂红,分枝多,与传统蝴蝶兰品种相比,花期长,达 3~5 个月,更加娇小,并且具香味,观赏性强,非常适合办公桌摆放。本试验以蝴蝶兰小麻雀的原球茎为试验材料,选用 MS 或花宝 1 号基本培养基,加入少量激素和外源添加物,对其增殖、分化、生根培养等方面进行研究,探索出蝴蝶兰小麻雀组培苗繁殖的最佳生长条件,以期提高生

收稿日期:2016-08-23

基金项目:国家星火计划(编号:2014GA720007)。

作者简介:漆子钰(1992—),女,江西宜春人,硕士研究生,从事兰科植物种质资源与应用研究。E-mail:qiziyu2013@126.com。

通信作者:彭东辉,博士,教授,从事园林应用研究。E-mail:fjpdh@126.com。

[2] 俞巧仙,郭英英,斯金平,等. 铁皮石斛多糖和醇溶性浸出物动态累计规律研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4769-4772.

[3] 张 岗,李依民,李 标,等. 铁皮石斛锌铁调控转运蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(1):42-47.

[4] 王 换,张建霞,吴坤林,等. 不同石斛的生物学特性及主要成分比较研究[J]. 广东农业科学,2012(12):44-46.

[5] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPla-1 的理化性质及抗肿瘤活性[J]. 天然产物研究与开发,2008,19(4):578-583.

[6] 鲍素华,查学强,郝 杰,等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(21):123-127.

[7] 谢明璐,侯北伟,韩 丽,等. 珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定[J]. 药学报,2010,45(5):667-672.

[8] 卢家仕,卜朝阳,吕维莉,等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 中草药,2013,44(1):96-100.

[9] 詹忠根,徐 程. 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究[J]. 浙江大学学报(理学版),2011,38(3):321-325.

[10] 张青华,李枝林,唐 敏,等. 秋水仙碱诱导铁皮石斛多倍体研究初报[J]. 云南农业大学学报,2011,26(5):678-682.

[11] 孙志蓉,王美云,金家兴,等. 铁皮石斛试管苗生长发育动态研究[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(2):83-87.

[12] 艾 娟,严 宁,胡 虹,等. 温度对铁皮石斛生长及生理特性

的影响[J]. 云南植物研究,2010,32(5):420-426.

[13] 常美花,金亚征,王 莉. 铁皮石斛快繁技术体系研究[J]. 中草药,2012,43(7):1412-1417.

[14] 刘 波,张晓明,郭巧生,等. 百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):44-46.

[15] 卢河东,薛 涛,李岳忠,等. 皖贝母总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):781-784.

[16] 王晔辉,徐 倩,徐 筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(1):76-80,89.

[17] 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.

[18] Nadiya F, Anjali N, Gangaprasad A, et al. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols[J]. Analytical Biochemistry, 2015, 485:25-27.

[19] He C M, Zhang J X, Liu X C, et al. Identification of genes involved in biosynthesis of mannan polysaccharides in *Dendrobium officinale* by RNA-seq analysis[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 88(3): 219-231.

[20] 张 涛,韩 梅,刘翠晶,等. 人参总 RNA 提取方法及反转录酶的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):34-37.

[21] 容天聚,文国松,钱 雄,等. 两种铁皮石斛总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 云南农业大学学报,2012,27(5):703-707.