

# 刺山柑总 RNA 提取方法的比较研究

罗 江<sup>1</sup>, 杨丽娟<sup>1</sup>, 崔浩然<sup>1</sup>, 马春晖<sup>2,3</sup>

(1. 塔里木大学 动物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

3. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832000)

**摘 要:**以刺山柑为试材, 研究比较了改良 SDS 提取法、RNApure Plant Plus Reagent 法、RNAplant Plus Reagent 法和 RNAPrep Pure Plant Kit 法提取总 RNA 的效果, 以期寻找一种适于野生刺山柑叶片高质量总 RNA 最佳提取方法。结果表明: 4 种方法提取的总 RNA 均可见 28S 和 18S 2 条电泳谱带, RNAPrep Pure Plant Kit 法获得的 RNA 图谱条带清晰、明亮、稳定, 28S rRNA 亮度约是 18S rRNA 的 2 倍,  $OD_{260}/OD_{280}$  为 2.00, 产率为 175.3  $\mu\text{g/g}$ , 除 RNAPrep Pure Plant Kit 法能够从叶片中提取到完整性好、纯度高及产率高的总 RNA 外, 其它 3 种方法提取的总 RNA 均存在降解及 DNA 和蛋白等污染, 经 cDNA-SRAP 分析检测, 此方法获得的 RNA 反转录后能扩增出清晰稳定的多态性条带, 能够满足后续试验的要求。进一步采用 RNAPrep Pure Plant Kit 法从刺山柑幼苗整株、根、茎及叶中能够获得高质量的总 RNA, 因此, RNAPrep Pure Plant Kit 法适合刺山柑总 RNA 的提取。

**关键词:**刺山柑; RNA 提取; 方法比较; 验证

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0091-05

刺山柑(*Capparis spinosa* L.) 属白花菜科(Cap-paraceae)山柑属(*Capparis*) 多年生藤本小半灌木, 又名老鼠瓜、野西瓜, 主要分布在我国新疆、甘肃、西藏等省区, 喜生于荒漠地带的戈壁、沙地、低山和山麓地带, 荒地也有生长<sup>[1]</sup>。它极耐干旱、耐高温、耐风蚀、耐贫瘠, 其根系发达、根深粗壮且维管系统发达, 有的根垂直向下可延伸达 30~40 m, 同时其叶片气孔整天开放能够很快的散热, 可正常生长于几乎常年不下雨、夏季气温高达 45℃ 以上、地面温度高逾 70℃ 的砾石戈壁, 也可生长在地下水位 10 m 左右的风蚀地上<sup>[2-4]</sup>。因此, 刺柑是研究植物耐旱、耐高温不可多得的材料。为深入研究刺山柑耐旱及耐高温机理, 克隆耐旱及耐高温相关基因, 提取纯度、产率高和完整性好的高质量 RNA 至关重要。刺山柑生长在极端干旱、高温的恶劣环境中, 其体内积累了大量的药用成分和次生代谢物质<sup>[5-7]</sup>, 如挥发油、生物碱类、黄酮类等物质, 对 RNA 分离纯化产生严重的干扰, 且易造成 RNA 降解。目前, 栾东东等<sup>[8]</sup>报道有关刺

山柑总 RNA 提取方法的研究, 课题组应用已报道的刺山柑总 RNA 提取方法抽提, 均未取得理想效果。该研究比较了 4 种提取刺山柑叶片总 RNA 的方法, 以期筛选出提取高质量总 RNA 的方法, 为开展刺山柑后续耐旱耐高温基因克隆、cDNA 文库构建及 cDNA-SRAP 筛选差异基因等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 2012 年 9 月底采集新疆和静县巴仑台镇(北纬 42°25'48.7", 东经 86°15'01.7", 海拔 1 315 m)刺山柑的叶片及成熟种子, 幼嫩叶片采集后立即置于液氮中速冻, 带回实验室后于 -80℃ 保存, 种子经清洗自然晾干后, 储藏于干燥通风处备用。

选用 3 种商品化 RNA 提取试剂: 复杂植物总 RNA 提取试剂 RNApure Plant Plus Reagent(CW0537)购自康为世纪生物科技公司; 植物总 RNA 提取试剂 RNAplant Plus Reagent(DP437)和植物总 RNA 提取试剂盒 RNAPrep Pure Plant Kit(DP432)购自天根生化科技公司。所用试剂中, SDS、PVP 和 Tris base 为 Sigma 产品, Agarose 为西班牙分装产品, 其余均为国产分析纯。所有试剂均用高温高压过的 0.01% DEPC 水配制, 塑料制品用 0.1% DEPC 水浸泡过夜后高温高压灭菌、烘干, 玻璃器皿及研钵于 180℃ 烘烤 12 h 以上备用。

**第一作者简介:**罗江(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。E-mail: luojiang17@126.com.

**责任作者:**马春晖(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为饲草生产与加工。E-mail: chunhuima@126.com.

**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAD17B05-2); 国家牧草产业技术体系资助项目(CARS-35)。

**收稿日期:**2013-11-13

## 1.2 试验方法

试验设4种方法,改良 SDS 法:参照栾东东等<sup>[8]</sup>的方法,SDS 提取液(2% SDS,0.125 M 四硼酸钠,硼酸调 pH=8.5);RNApure Plant Plus Reagent 法:根据康为世纪生物科技公司提供的说明书中的方法进行试验;RNAplant Plus Reagent 法:根据天根生化科技公司提供的说明书中的方法进行试验;RNAprep Pure Plant Kit 法:根据天根生化科技公司提供的说明书中的方法进行试验。

1.2.1 RNA 完整性检测 取 5  $\mu$ L 提取的总 RNA,用 1.0% 非变性琼脂糖凝胶进行电泳检测 RNA 完整性,紫外凝胶成像系统观察并拍照记录。

1.2.2 RNA 纯度检测 取 1  $\mu$ L 提取的总 RNA,用 NanoDrop 2000/2000C 微量紫外分光光度计检测 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$ ,  $OD_{260}/OD_{230}$  值及浓度;计算 RNA 产率:RNA 浓度( $\mu$ g/ $\mu$ L) $\times$ 稀释体积( $\mu$ L)/样品质量(g)。

1.2.3 cDNA-SRAP 分析检测 以提取的质量较好的刺山柑叶片的总 RNA 为模板,按照 TIANscript RT Kit cDNA(KR104-02)第一链合成试剂盒操作步骤,将 RNA 反转录合成第一链 cDNA。选用 2001 年 Li 等<sup>[9]</sup>在芸薹属作物研究中报道的 SRAP 通用引物(上游引物 Me1: TGAGTCCAAACCGGAAA, Me2: TGAGTCCAAACCGAGC, Me3: TGAGTCCAA ACCGGAAT; 下游引物 Em1: GACTGCGTACGAATTAAT, Em2: GACTGCGTACGAATTT GC, Em3: GACTG CGTACGAATTGAC)。SRAP 反应体系建立:总体积 25  $\mu$ L,模板 cDNA

40 ng,dNTPs 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、引物 0.2  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  1.25 mmol/L。SRAP 反应程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 30 s,共 5 个循环;84℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;循环结束后,72℃延伸 7 min,4℃停止反应。扩增产物用 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,银染显影,拍照记录。

1.2.4 刺山柑幼苗不同组织总 RNA 的提取效果 为进一步验证优选出的天根 RNAprep Pure Plant Kit 法是否也适于刺山柑幼苗不同组织总 RNA 的提取,利用该方法分别提取刺山柑幼苗整株、根、茎、叶的总 RNA,并进行纯度及完整性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种方法提取总 RNA 完整性比较

4 种方法从刺山柑叶片中提取的总 RNA 完整性检测见图 1。4 种方法提取的总 RNA 均可见 28S 和 18S 2 条电泳谱带,RNAprep Pure Plant Kit 法提取的总 RNA 明显优于其它 3 种方法,其条带清晰明亮、稳定,且 28S 亮度约为 18S 的 2 倍,表明该方法提取的总 RNA 完整性好,质量较高。改良 SDS 法提取的总 RNA 图谱亮度较弱,获得率较低,有明显的蛋白和 DNA 污染;RNApure Plant Plus Reagent 法图谱模糊、明显拖带,有明显的 RNA 降解现象,并且有明显蛋白和 DNA 污染;RNAplant Plus Reagent 法图谱较为清晰,但略微弥散、存在蛋白和多糖等污染。

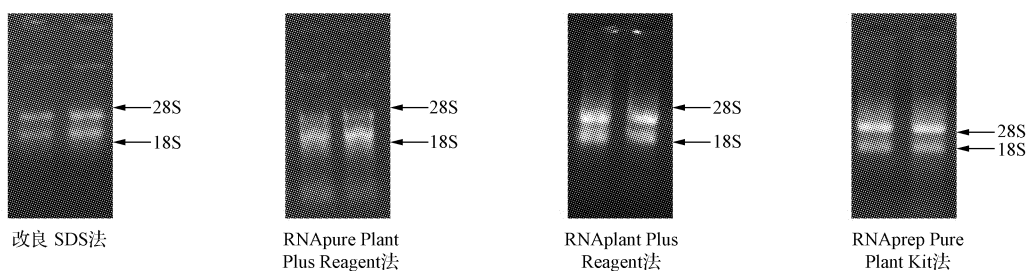


图 1 4 种方法提取总 RNA 完整性检测

Fig. 1 The four methods for extracting total RNA integrity testing

### 2.2 4 种方法提取总 RNA 纯度和产率比较

高纯度 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值应介于 1.8~2.1 之间,比值小于 1.8 时表明有蛋白质等有机杂质污染,大于 2.2 时表明 RNA 已发生降解;而  $OD_{260}/OD_{230}$  值大于 2.0,表明去除多糖及无机盐等杂质效果较好<sup>[10]</sup>。4 种方法提取总 RNA 的纯度、浓度、产率及试验消耗时间见表 1。从纯度角度看,RNAprep Pure Plant Kit 法和 RNAplant Plus Reagent 法提取的总 RNA  $OD_{260}/OD_{280}$  值介于 1.8~2.1 之间,表明所提取的总 RNA 无 DNA、蛋白质等杂质污染;改良 SDS 法和 RNApure Plant Plus

Reagent 法提取的 RNA  $OD_{260}/OD_{280}$  值不在 1.8~2.1 之间,表明残存 DNA、蛋白质等杂质或 RNA 发生降解;4 种方法所提取的 RNA  $OD_{260}/OD_{230}$  值介于 1.7~2.0 之间,表明残存多糖及低浓度无机盐等杂质。从产率角度看,RNAprep Pure Plant Kit 法获得总 RNA 的产率是其它 3 种方法的 2~3 倍,产率为 175.3  $\mu$ g/g。从试验耗时角度看,改良 SDS 法耗时最长,为 5~6 h;RNApure Plant Plus Reagent 法和 RNAplant Plus Reagent 法耗时最短,为 2~3 h;RNAprep Pure Plant Kit 法适中,为 3~4 h。

表 1 4 种方法提取总 RNA 纯度和产率比较

Table 1 Comparison of the four methods for extracting total RNA purity and productivity

RNA 提取方法 The method of RNA solared	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	浓度 Concentration/ng · μL <sup>-1</sup>	产率 Productivity/μg · g <sup>-1</sup>	试验耗时 Consuming of trial/h
改良 SDS 法	1.70	1.93	124.4	62.2	5~6
RNApure Plant Plus Reagent 法	2.30	1.80	119.2	59.6	2~3
RNAplant Plus Reagent 法	1.88	1.74	195.8	97.9	2~3
RNAprep Pure Plant Kit 法	2.00	1.91	175.3	175.3	3~4

## 2.3 cDNA-SRAP 分析检测

为进一步验证 RNAprep Pure Plant Kit 法提取的总 RNA 质量,将刺山柑叶片的总 RNA 反转录为 cDNA 后,经 SRAP-PCR 获得了多样性丰富、清晰及稳定的扩增条带(图 2)。表明 RNAprep Pure Plant Kit 法提取的总 RNA 质量较好,经反转录的 cDNA 样品,可用于基因的克隆、表达等下游分子生物学研究。

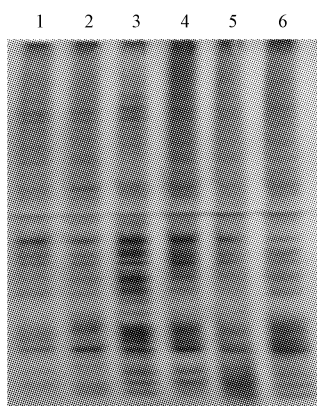


图 2 刺山柑叶片总 RNA cDNA-SRAP 结果

注:1,2;Me1 和 Em1;3,4;Me2 和 Em2;5,6;Me3 和 Em3。

Fig. 3 cDNA-SRAP for total RNA extraction from *Capparis spinosa* L.

Note:1,2;Me1 and Em1;3,4;Me2 and Em2;5,6;Me3 and Em3.

## 2.4 刺山柑不同组织 RNA 提取效果的验证

利用优选出的 RNAprep Pure Plant Kit 法提取刺山柑幼苗整株、根、茎及叶不同组织的总 RNA,检测结果显示,所得的总 RNA 电泳图谱条带清晰明亮、无杂质,且 28S 亮度约为 18S 的 2 倍,且 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值均满足 1.8~2.2,说明该方法提取总 RNA 的完整性好、纯度及质量较高,适于刺山柑幼苗不同组织总 RNA 的提取(图 3,表 2)。刺山柑幼苗不同组织总 RNA 的产率存在差异,大小顺序依次为整株、叶片、茎及根,表明不同组织 RNA 的表达量不同。

## 3 讨论与结论

总 RNA 提取质量的好坏是基因克隆、表达及功能等分子生物学研究的基础,直接影响到后续 cDNA 的合成、SRAP-PCR 及 RNA-Seq 等试验的开展。高质量 RNA 提取的关键在于防止 RNase 内外源性污染和去除

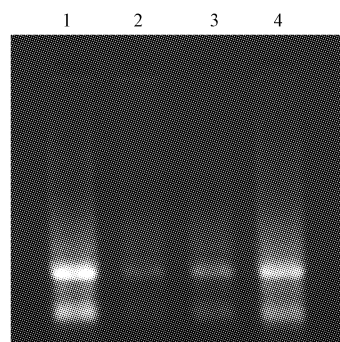


图 3 刺山柑不同组织总 RNA 提取

注:1:整株的 RNA;2:根的 RNA;3:茎的 RNA;4:叶的 RNA。

Fig. 3 *Capparis spinosa* L total RNA extraction from different tissues

Note:1:Whole plant of RNA;2:Root of RNA;3:Stem of RNA;4:Leaves of RNA.

表 2 RNAprep Pure Plant Kit 法提取不同组织总 RNA 纯度和产率比较

Table 2 Comparison of RNAprep Pure Plant Kit different tissues extracted RNA purity and productivity

组织部位 The tissue site	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	浓度 Concentration /μg · μL <sup>-1</sup>	产率 Productivity /μg · g <sup>-1</sup>
整株 Whole plant	2.02	1.96	180.2	180.2
根 Root	2.13	1.19	32.0	32.0
茎 Stem	2.05	1.34	41.5	41.5
叶片 Leaves	2.02	1.98	177.7	177.7

蛋白质、多糖多酚及次生代谢物等杂质干扰<sup>[11]</sup>。刺山柑作为一种生长在极端恶劣环境下的多年生旱生荒漠植物,其体内除含蛋白质、多糖多酚等外,还积累了大量的次生代谢物,如生物碱类、糖苷及黄酮类等物质<sup>[12-14]</sup>。因 RNase 和多酚氧化酶亦属于蛋白质,要获得高质量的 RNA 就必须去除蛋白;多糖易与 RNA 共沉淀形成难溶胶状物,而难以分离提取<sup>[15]</sup>;酚类化合物易被氧化,可与蛋白质、RNA 等不可逆结合,导致 RNA 降解及失活,且在去除中往往会导致 RNA 产量损失<sup>[16]</sup>;次级代谢物易与 RNA 结合,阻碍 RNA 的分离<sup>[17]</sup>,这些都增加了刺山柑 RNA 提取的难度。

目前,去除蛋白主要有 2 种方法:1 种是加入蛋白变性剂,如 SDS、苯酚和异硫氰酸胍等;另 1 种是加入蛋白酶 K 降解蛋白,再用苯酚/氯仿去除残存蛋白。去除多

糖主要有高盐法、乙醇沉淀法和醋酸钠沉淀法。抑制酚类被氧化主要有 2 种方法:1 种是还原剂法,如加入  $\beta$ -巯基乙醇等;另 1 种是螯合剂法,如加入 PVP 等。RNA 常用提取的方法是 CATB 法、SDS 法、TRIZOL 法、商品化 TRIZOL 试剂法和试剂盒法。该研究采用的 4 种方法均可抽提出 RNA,但质量差别很大,这与各方法所用试剂本身的差异有关<sup>[18]</sup>。在改良 SDS 法中,液氮研磨中加入了可溶性 PVP 来防止酚类物质被氧化,70%丙酮抽提来去除酚类物质等杂质<sup>[19]</sup>,并用 2%SDS 和  $\beta$ -巯基乙醇变使蛋白变性及抑制 RNase 活性,经多次 Tris 平衡酚/氯仿抽提除去蛋白、多糖等后,最后用 NaAC 和乙醇沉淀 RNA,但该试验获得的 RNA 质量较差,产率较低,与前人结果不一致<sup>[8]</sup>。在 RNApure Plant Plus Reagent 法和 RNAlant Plus Reagent 法中,抽提试剂 Trizol(主要成分是苯酚)均按 4:1 体积比加入  $\beta$ -巯基乙醇,从而使蛋白变性及抑制 RNase 活性,同时  $\beta$ -巯基乙醇可防止酚类物质的氧化,并用 5M NaCl、氯仿及异丙醇去除蛋白、多糖等杂质,但该试验 2 种方法获得的 RNA 质量相差很大,RNAlant Plus Reagent 法获得的 RNA 质量最差,产率最低,而 RNApure Plant Plus Reagent 法质量较好,产率较高。RNAprep Pure Plant Kit 法采用了高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统,其中裂解液 RL 主要成分是异硫氰酸胍,使用前按 100:1 体积比加入  $\beta$ -巯基乙醇,可有效裂解核蛋白促使蛋白变性及抑制 RNase 活性,并使用 DNase I、去蛋白液 RW I、漂洗液 RW 通过滤柱 CS 和吸附柱 CR3 相结合可有效去除 DNA、蛋白和多糖等杂质,获得了高质量和高产率的总 RNA。

不同植物不同组织或同一植物不同组织,由于组成成分及结构上差异,如多糖多酚含量、次生代谢物种类、木质化程度及细胞壁厚度等,往往需要采用不同的方法来提取植物 RNA<sup>[20]</sup>。为了检验 RNAprep Pure Plant Kit 法对刺山柑不同组织部位 RNA 的提取效果,利用该法分别提取了刺山柑幼苗整株、根、茎及叶的 RNA,经检测,表明提取效果很好,但各组织条带的亮度差异很大,这很可能是不同组织表达量差异照成的,也表明叶片是刺山柑总 RNA 提取的最佳组织部位。

该试验结果表明,RNAprep Pure Plant Kit 法对刺山柑 RNA 提取效果最好,该方法提取刺山柑总 RNA 完整性好、纯度和产率高,去除杂质的效果好,经 cDNA-SRAP 分析结果可获得多态性丰富、清晰及稳定的扩

增条带,为后续的分子生物学研究奠定了基础。RNAprep Pure Plant Kit 法适合刺山柑幼苗不同组织部位 RNA 的提取,尤其是叶片中获得的 RNA 产率较高。

### 参考文献

- [1] 张立运,杨春. 保护风蚀地的刺山柑[J]. 植物杂志,2004,34(1):3-4.
- [2] 张立运,海鹰.《新疆植被及其利用》专著中未曾记载的植物群落类型I. 荒漠植物群落类型[J]. 干旱区地理,2002,25(1):84-89.
- [3] Levizou E, Drillas P, Kyparissis A. Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of *Mediterranean summer*[J]. Photosynthetica,2004,42(2):229-235.
- [4] Rhizopoulou S. Physiological responses of *Capparis spinosa* L. to drought[J]. Plant Physiology,1990,136(3):341-348.
- [5] 周凡. 维药老鼠瓜茎叶生物碱类成分研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2010.
- [6] 喻娟,陈胜瑛,李琴雯,等. 药用植物刺山柑的研究新进展[C]. 中国商品学会中药商品专业委员会,2012.
- [7] 曹锐. 刺山柑总黄酮的提取及药效学研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.
- [8] 梁东东,石庆华,陈虹,等. 刺山柑(*Capparis spinosa*)总 RNA 不同提取方法的比较[J]. 干旱区研究,2009,26(3):401-405.
- [9] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001,103:455-461.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2002.
- [11] 侯双利,刘翠晶,杨利民,等. 影响植物组织总 RNA 质量的因素[J]. 人参研究,2013,25(2):11-16.
- [12] 张瑜,张华,韩博,等. 刺山柑多糖提取及其抗炎镇痛作用研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2011(2):205-209.
- [13] 蒋雯雯,马森,郭艳,等. 刺山柑多酚类物质含量及其抗氧化活性研究[J]. 西北植物学报,2012,32(3):555-558.
- [14] 吴霞,叶蕴华,周亚伟. 维药野西瓜化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):97-100.
- [15] Logemann J, Schell J, Willmitzer L, et al. Improved method for isolation of RNA from plant tissues[J]. Anal Biochem,1987,163:16-20.
- [16] Schneiderhaner A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem,1991,197:91-95.
- [17] 裴东,谷瑞升. 几种提取木本植物中 RNA 方法的比较和改进[J]. 植物生理学通讯,2002,38(4):362-365.
- [18] 唐燕,徐龙,王新建,等. 核桃内果皮 RNA 提取方法研究[J]. 北方园艺,2012(12):117-119.
- [19] 肖洁凝,黄学林,黎茵,等. 富含多糖和次生物质的芒果子叶总 RNA 的提取[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(11):83-86.
- [20] 王玉成,杨传平,姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2):1-4.

## Comparison of Extraction Methods for *Capparis spinosa* L. Total RNA

LUO Jiang<sup>1</sup>, YANG Li-juan<sup>1</sup>, CUI Hao-ran<sup>1</sup>, MA Chun-hui<sup>2,3</sup>

(1. College of Animal Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology of Xinjiang Production and Construction Corps, Alar, Xinjiang 843300; 3. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

# 辣椒经地面模拟诱变后的 RAPD 鉴定

郭亚华<sup>1</sup>, 谢立波<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 陈立新<sup>1</sup>, 刘录祥<sup>2</sup>, 周宇<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081)

**摘要:**以地面模拟处理辣椒干种子为试材, 采用 RAPD 技术对辣椒染色体进行多态性检测, 研究了不同剂量的物理诱变处理对辣椒产生的影响。结果表明: 采用 Li 离子照射可以诱导辣椒发生遗传位点的改变, 但是不同剂量的效应不同; 采用物理进行诱变可以诱导多个性状发生改变, 该方法可以产生复杂的遗传变异。

**关键词:**辣椒; 地面模拟; RAPD

**中图分类号:**S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0095-03

随着科技的发展和社会的进步, 各种资源正被开发利用, 当然也包括空间资源。空间诱变育种以及地面模拟诱变育种已经引起育种学家和科学界的广泛关注, 并在很多方面得到广泛应用<sup>[1-21]</sup>。利用空间诱变进行农作物品种改良不仅涉及到飞行器在空间所处的复杂环境条件, 也涉及搭载作物在空间条件下所引起的细胞学、形态学、分子生物学及生理生化等各方面的变异<sup>[1-3]</sup>。而检测这些遗传变化往往需要快速和有效的手段, 分子标记技术可以快速检测植物发生的变异

位点, 从而根据标记的遗传规律, 推测和跟踪其目标性状的变化<sup>[4-12]</sup>。

在该研究中, 通过 RAPD 分子标记技术, 在采用 Li 离子处理的条件下, 对辣椒的诱变程度进行检测, 同时检测其染色体及基因多态性的变化特点, 从而探讨了采用不同剂量的物理诱变对辣椒进行处理产生变异的机理, 以期对辣椒物理诱变育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料由黑龙江省农业科学院园艺分院通过地面模拟锂(Li)离子处理的辣椒, 同时以未处理的材料为对照, 其中 mn17、mn18、mn19、mn20 分别为不同剂量 Li 处理的第 1 代, mnR17、mnR18、mnR19、mnR20 为不同剂量 Li 处理的第 2 代。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子处理的 Li 离子剂量 辣椒种子 Li 离子处理的 4 种剂量为 Li-1(30 Gy)、Li-2(50 Gy)、Li-3(70 Gy)、Li-4(100 Gy)。

**第一作者简介:**郭亚华(1953-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 现主要从事植物空间诱变育种和生物技术工作。E-mail: guoyahua@sina.com.

**责任作者:**陈立新(1963-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 现主要从事设施园艺规划和设计及蔬菜栽培工作。E-mail: cbc03@126.com.

**基金项目:**国家“863”计划资助项目(2012AA101202); 国家大宗蔬菜产业技术体系哈尔滨综合试验站资助项目(CARS-25-G-11)。

**收稿日期:**2013-11-14

**Abstract:** With *Capparis spinosa* L. as material, the method of modified SDS, RNApure Plant Plus Reagent, RNApure Plant Plus Reagent and RNApure Pure Plant Kit were compared to find out the optimal method for extracting high quality total RNA from blades in wild *Capparis spinosa* L.. The results indicated that four kinds of methods to extract total RNA were seen two electrophoretic bands of 28S and 18S, RNApure Pure Plant Kit method to obtain an RNA bands were clear pattern, bright, stable, brightness of 28S rRNA was two times of 18S rRNA, while the value of OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> was 2.00 and the yield of RNA was 175.3 μg/g, except RNApure Pure Plant Kit method could be extracted from the leaves to integrity is good, high purity and high yield of total RNA, other three kinds of total RNA extraction are pollution, such as biodegradation and DNA and protein. Further using RNApure Pure Plant Kit method from *Capparis spinosa* L seedlings in the whole plant, root, stem and leaf could obtain high quality total RNA, therefore, RNApure Pure Plant Kit method was suitable for the extraction of total RNA.

**Key words:** *Capparis spinosa* L.; RNA extraction; method comparison; verification