

罗布麻总 RNA 提取方法比较研究

李 苗^{1,2}, 李 国旗¹

(1. 宁夏大学 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以 Trizol 法、改进 SDS 法及 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取罗布麻的总 RNA, 并通过紫外分光光度法和凝胶电泳检测对其提取效果进行比较分析, 以筛选出罗布麻总 RNA 最佳提取方法。结果表明: Trizol 法无法有效获得罗布麻总 RNA, 有较为显著的降解现象; 改进 SDS 法提取的罗布麻 RNA 总量较少、浓度低, 且试验重复性差; RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取的 RNA 质量好, 纯度高, 完整性强, 可直接作为后续相关分子生物学试验材料。

关键词:罗布麻; Trizol 法; 改进 SDS 法; RNA plant plus Reagent 试剂盒法; 总 RNA 提取

中图分类号:S 563.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0093-04

罗布麻(*Apocynum venetum* L.) 属夹竹桃科(Apocynaceae)多年生宿根草本植物, 具有极强的生态适应性, 分布于我国长江、淮河、秦岭、昆仑山以北及黄河中上游地区。罗布麻为传统药用植物, 其叶含有大量黄酮、三萜、有机酸、氨基酸等药用成份, 具有增强免疫、消除抑郁、通便利尿等作用, 对高血压、高血脂病症有显著的疗效。此外, 罗布麻纤维品质优良, 有“野生纤维之王”的美称, 颇具经济开发价值^[1]。

目前, 针对罗布麻的研究主要集中在生理生态、种植栽培、有效成分提取、药用功效评价等方面^[2], 利用分子生物学技术开展其基因资源挖掘利用方面的研究尚鲜见报道。挖掘利用罗布麻独特的基因资源, 首先要提取得到高质量的 RNA。提取制备高质量 RNA 样本是基因克隆与转化、功能分析及相关分子进化研究的前提^[3-4], 因而选用适宜的方法获得高质量的参试总 RNA 是开展这些研究的关键因素之一。由于组织细胞及环境中存在大量的 RNA 酶, 极易造成 RNA 在提取过程中被降解; 再者, 有的植物材料中次生代谢物如多糖、酚类等含量较高, 也会严重影响 RNA 的提取效果。现在常用的总 RNA 提取方法主要有 Trizol 法、LiCl 法、CTAB 法、SDS 法等^[5-8], 这些方法在同一试验材料中的提取效果差异较大。罗布麻组织富含类黄酮、糖类、酚类等的次生代谢产物, 造成其 RNA 提取难度进一步加大。为此, 该研究在前人试验的基础上, 分别选取了 Trizol 法、

改进 SDS 法^[9]、RNA plant plus Reagent 试剂盒法 3 种比较常用的方法提取罗布麻总 RNA, 比较它们的提取效果, 从中筛选出罗布麻总 RNA 的最佳提取方法, 为后续反转录、基因克隆等分子生物学的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自宁夏贺兰山农牧场罗布麻品种扩繁实验基地苗圃。选取一年生以上植株, 采集植株茎尖、茎前端幼嫩叶片为参试材料。

Trizol: 异硫氰酸胍与苯酚均一混合物, 购自 Invitrogen 公司。Tris-HCl (RNase-free, pH 9.0): 由 Tris、DEPC 水组成, 用 DEPC 处理的 HCl 调整 pH 值, 购自 Invitrogen 公司。SSTE 溶液: 1.0 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl。

其它试剂: 1×TAE, 1%琼脂糖, 氯仿, 异丙醇, 无水乙醇, 75%乙醇, DEPC 水, 8 mmol/L 氯化锂^[10]。

1.2 试验方法

1.2.1 Trizol 法提取总 RNA 将处理后的幼苗放入研钵, 加入液氮迅速研磨成粉末。加入 1 mL 预冷 Trizol, 冰浴 10 min。加入 300 μ L 预冷的氯仿, 充分混匀。12 000 r/min 4℃离心 10 min。吸取上清液, 加入等体积异丙醇, 混匀-20℃沉淀 1 h。12 000 r/min 4℃离心 10 min。弃上清, 70%乙醇洗涤、沉淀。12 000 r/min 4℃离心 10 min。弃上清, 风干, 加无 RNA 酶水溶解。电泳检测。

1.2.2 改进 SDS 法提取总 RNA 将处理后的幼苗放入研钵, 加入液氮迅速研磨成粉末。加 600 μ L Tris-HCl (pH 9.0) 和 10 μ L β -巯基乙醇于 1.5 mL 离心管中。将材料粉末移入装有提取液的离心管中旋涡混匀, 室温静置 15 min。加入 250 μ L 20% SDS 裂解液, 轻轻混匀, 室温静置 5 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清,

第一作者简介:李苗(1982-), 男, 宁夏银川人, 硕士研究生, 助理研究员, 现主要从事植物生态及特色植物资源利用等研究工作。E-mail: limiao1228@sina.com。

责任作者:李国旗(1965-), 男, 宁夏银川人, 博士, 研究员, 研究方向为植物生态学。

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2011BAC07B03)。

收稿日期:2014-01-20

加入 1/3 体积的 8 mol/L 的 LiCl, 上下颠倒混匀后, 于 4℃ 冰浴至少 2 h。4℃, 15 000 r/min 离心 20 min; 去上清。用 500 μ L SSTE 溶解沉淀, 再加入等体积酚/氯仿旋涡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清至一新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积氯仿旋涡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清, 加入等体异丙醇, -20℃ 放置 30 min。12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗沉淀 2 次, 吹干, 溶于 50 μ L DEPC 溶液中。

1.2.3 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取总 RNA

RNA plant plus Reagent 试剂盒法参照天根生物 RNA plant plus Reagent 试剂盒说明书(目录号 DP437)。

1.2.4 RNA 质量检测 取 1 μ L 样品, 在 (NanoDrop 2000) 检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值; 同时以 1.2% 琼脂糖胶电泳检测 RNA 完整性及降解程度。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取纯度与浓度

使用紫外分光光度计测量不同方法提取的罗布麻总 RNA 浓度。由表 1 可知, Trizol 法由于其裂解程度不够, 未能提取出总 RNA, 且提取产物降解情况严重。改进 SDS 法提取总 RNA 受到材料本身高酚、黄酮类物质含量高的影响, 使得提取液裂解、提取效率较低, 因此所得总 RNA 纯度、浓度均较低。使用 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取所得罗布麻总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.97, 处于 1.7~2.2 之间, 纯度质量较高, 其浓度为 232.50 μ g/mL, 较 SDS 法提取总 RNA 浓度高 76.91%。

表 1 3 种方法提取罗布麻总 RNA 纯度与浓度比较

Table 1 Comparison of total RNA purity and quantity in *Apocynum venetum* by three methods

RNA 提取方法	浓度		
Total RNA Extraction Methods	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Trizol 法	—	—	—
Trizol method	—	—	—
改进 SDS 法	0.57	0.35	1.63
Modified SDS method	0.57	0.35	1.63
RNA plant plus Reagent 试剂盒法	0.81	0.41	1.97
RNA plant plus Reagent Kit method	0.81	0.41	1.97

2.2 RNA 质量检测

分别对不同方法提取的 RNA 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 胶红染色, 凝胶成像系统拍照, 检测 RNA 质量。

2.2.1 Trizol 法提取罗布麻总 RNA 由图 1 可知, 在所有 4 条泳道上均未出现正常 RNA 条带, 因此采用 Trizol 法未能提取出罗布麻总 RNA; 同时在最前端集中出现高亮度条带, 说明提取产物降解程度严重, 不能满足后续试验需要。

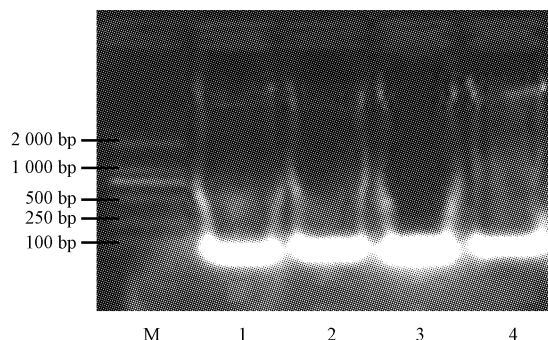


图 1 Trizol 法提取罗布麻总 RNA 电泳图

注: M; marker, 1~4 为 Trizol 法提取产物。

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA extracted by Trizol

Note: M; marker, 1~4 were extracted by Trizol.

2.2.2 改进 SDS 法提取罗布麻总 RNA 由图 2 可以看出, 3 条泳道均出现 28S、18S、5S 条带, 证明采用改进 SDS 法能够提取出罗布麻总 RNA; 凝胶成像常规观察条件下 28S、18S、5S 条带亮度较低, 说明提取产物浓度较低, 结果表现与分光光度计测量结果一致。18S、28S 条带未能呈现出 2:1 关系, RNA 完整性不好; 整体泳道清晰, 无多余亮带、亮点, 说明此方法提取罗布麻总 RNA 能够有效去除罗布麻组织中的总多酚、多糖、黄酮类物质, 无 DNA 污染。

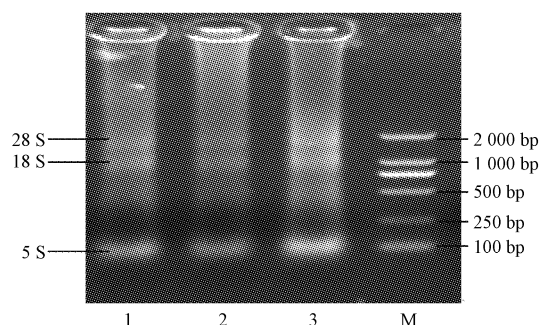


图 2 改进 SDS 法提取罗布麻总 RNA 电泳图

注: M; marker, 1~3 为改进 SDS 法提取产物。

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA extracted by modified SDS

Note: M; marker, 1~3 were extracted by modified SDS.

2.2.3 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取罗布麻总 RNA 由图 3 可以看出, 3 条泳道均出现 28S、18S、5S 条带, 证明采用 RNA plant plus Reagent 试剂盒法能够提取出罗布麻总 RNA; 凝胶成像下观察 28S、18S、5S 条带具备较高亮度, RNA 提取产物浓度较高, 结果表现与分光光度计测量结果一致; 泳道清晰, 无较高亮度 DNA 条带及其它杂带, 说明此方法提取罗布麻总 RNA 能够有效去除罗布麻组织中的总多酚、多糖、黄酮类物质。

2.2.4 综合比较 从图 4 可以看出, 相较于 Trizol 法、改进 SDS 法、RNA plant plus Reagent 试剂盒法更加适宜罗布麻总 RNA 的提取。RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取的 RNA 浓度、得率、完整性均较好, 提取 RNA 质量高。

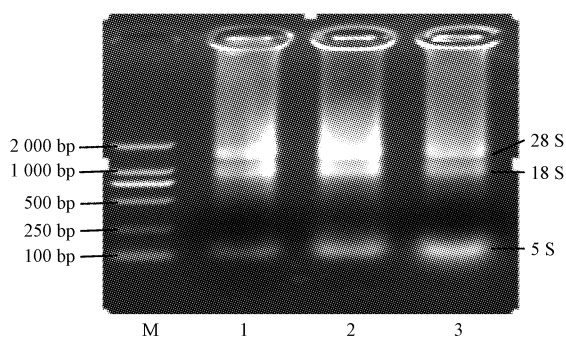


图3 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取罗布麻总 RNA 电泳图

注:M:marker,1~3 为 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取产物。

Fig. 3 Electrophoresis of total RNA extracted by RNA plant plus Reagent Kit

Note:M:marker,1~3 were extracted by RNA plant plus Reagent Kit.

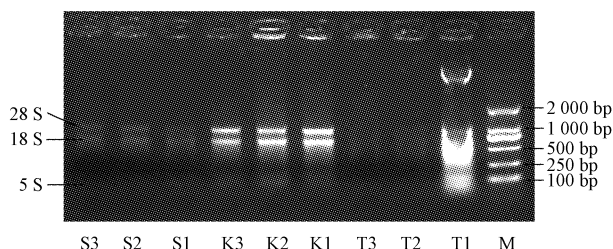


图4 3种方法提取罗布麻总 RNA 比较

注:M:marker,T1~T3 为 Trizol 法提取产物,K1~K3 为 RNA plant plus Reagent 试剂盒法提取产物,S1~S3 为改进 SDS 法提取产物。

Fig. 4 Comparison of 3 methods of extracting total RNA

Note:M:marker,T1~T3 were extracted by Trizol,K1~K3 were extracted by RNA plant plus Reagent Kit,S1~S3 were extracted by modified SDS.

3 讨论与结论

获取高质量的 RNA 样品是分子克隆及其相关后续试验工作的基础^[11-12]。适宜不同植物及组织的 RNA 提取方法不尽相同。对于特定植物组织,其 RNA 提取方法必须经过筛选比较后才能确定^[13-14]。该试验研究针对罗布麻材料本身所含次生代谢较多的特点,选取传统的 Trizol 法、降糖除酚效果显著的改进 SDS 法以及新型 RNA plant plus Reagent 试剂盒法开展罗布麻总 RNA 提取试验。结果表明,试剂盒法能高效提取出罗布麻组织材料的总 RNA。尽管 Trizol 法和 SDS 法在提取大多数植物材料 RNA 中都有良好的效果^[7],但可能由于罗布麻本身次生代谢物成分较复杂,且试剂中胍盐等成分不适合该种材料导致提取失败。对比 3 种方法,试剂盒法在操作时间、提取效果等方面均优于 SDS 法和 Trizol 法,这样有助于降低 RNA 降解风险,提高后续试验操作的可行性。

RNA 容易降解,试验中发现 RNA 的提取效果与样本研磨程度、裂解液成分含量等因素直接相关。在加入裂解液前,样品均需在液氮低温条件下经过充分研磨,直至细粉状。试验过程中发现,样品的研磨充分程度与

裂解效果直接相关,从而最终影响 RNA 提取效果^[15],但为了使材料被充分研磨而延长研磨过程时间则有可能加大样品受 RNase 影响的概率。因此,在试验过程中需通过试验检测来确定适宜的材料研磨程度,控制研磨操作时间。在提取样本次生代谢产物较多时,通常选用 SDS 法。该研究未在提取液中直接加入 SDS,而是在样品放入提取液静置 15 min 后再加 SDS,理论上可减少多糖在提取缓冲液中的溶解度;在酚/氯仿抽提之前加入 LiCl 沉淀 RNA^[10],使大部分多糖留在水相中而不随 RNA 共同沉淀。在原有传统 SDS 法基础上调整优化部分操作程序,可有效提高 RNA 提取效率。而该研究受提取液裂解、提取效果不好及后续步骤误差等因素影响,采用改进 SDS 法虽提取出 RNA,但其完整性^[11]、浓度及得率均不高,效果并不理想。RNA plant plus Reagent 试剂盒法在试验中充分显示出其操作简便、RNA 提取质量好、得率高^[7]等特点,是一种罗布麻总 RNA 提取的适宜方法。在实际操作中应该注意,试剂盒中未直接提供相关试剂,在配制使用时需严格依照 RNA 提取要求及试剂盒说明书操作,否则亦会直接影响试剂盒提取效果。

参考文献

- [1] 李国旗,陈彦云,曹君迈,等.罗布麻生理生态学研究[M].北京:科学出版社,2012:1-4.
- [2] 王东青,李国旗,程志.罗布麻研究利用现状及展望[J].江苏农业科学,2011,39(3):310-313.
- [3] 李劲涛,杨军,阳海宁,等.航天诱变凤仙花总 RNA 的提取及 RT-PCR 初探[J].生物技术通讯,2007,18(5):806-808.
- [4] 林清芳,王存芳,赵欢欢,等.蒙古沙冬青总 RNA 提取与 mRNA 分离方法的研究[J].植物遗传资源学报,2011,12(3):460-463.
- [5] 温雪梅,段小雷,刘虎蛟,等.不同方法提取淡色库蚊总 RNA 的定量比较分析[J].西北农业学报,2012,21(2):99-102.
- [6] Kiefer E, Heller W, Ernst D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from tissue rich in secondary metabolites[J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18: 33-39.
- [7] Wu X P, Xi M L, Liao H Y. Comparison and analysis of extracting methods of the total RNA in lily[J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 6(4): 871-876.
- [8] 陈高,单勤,周丽霞,等.花生总 RNA 提取方法比较研究[J].中国农学通报,2011,27(1):214-218.
- [9] 吴林,薛建平,徐有明,等.半夏叶片总 RNA 四种提取方法及效果的比较[J].中草药,2008,39(6):901-905.
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [11] 张玉刚,成建红,韩振海,等.小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J].生物技术通报,2005(4):51-53.
- [12] 姚世响,谷丽丽,张霞,等.灰绿藜 RNA 提取方法及在 cDNA 文库构建中的应用[J].生物技术,2008,18(6):38-41.
- [13] 王爽,吴梦诗,郭润姿,等.番茄果实总 RNA 提取方法的定量比较研究[J].西北农业学报,2012,21(12):112-115.
- [14] 谭才邓,李静,邓毛程.神秘果果实总 RNA 提取方法比较研究[J].基因组学与应用生物学,2013,32(3):409-412.
- [15] 李宏,王新力,刘仲齐,等.植物组织 RNA 提取难点及对策[J].生物技术通报,1999(1):36-39.

我国双孢菇菌株与国外引进菌株间亲缘关系的 ISSR 分析

王 鸿 磊, 丁 强, 吕 蔚, 曲 威, 崔 从 光, 邹 积 华

(中国农业大学 烟台研究院, 山东 烟台 264670)

摘 要:以国内外的 10 个双孢菇菌株为试材,利用 ISSR 分子标记技术对其进行亲缘关系分析。结果表明:从 117 个 ISSR 引物中筛选出 11 个条带清晰重复性好的引物,对 10 个双孢菇菌株的基因组 DNA 进行扩增,共获得 73 条清晰条带,其中多态性条带 51 条,多态性位点百分率为 69.86%。利用 NTSYSpc 2.10 软件计算菌株间 Nei 遗传距离为 0.5479~0.9589,以平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析,可将 10 个双孢菇菌株分为 4 个类群:类群 I 为国内的 2 个菌株 258 和 2796;类群 II 是引自荷兰的 HRLM;类群 III 包括引自美国的 L901、5113、XXX 和 2200;类群 IV 包括引自荷兰的 H901、F3F 和 HA15。引自美国和荷兰的双孢菇菌株之间亲缘关系较近,相似性达 0.85 以上,而与我国的双孢菇亲缘相似性仅为 0.61。因此,国外优质双孢菇菌株的引进对于增加我国双孢菇遗传多样性具有重要作用。

关键词:双孢菇;ISSR;亲缘关系;聚类分析

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0096-04

双孢菇(*Agaricus bisporus*)又称白蘑菇、洋蘑菇,是世界上栽培最为广泛的食用菌^[1],我国是世界上最大的

第一作者简介:王鸿磊(1977-),男,山东莱州人,硕士,副教授,现主要从事应用微生物等研究工作。E-mail:whl197749@163.com.

责任作者:邹积华(1953-),女,山东烟台人,本科,研究员,现主要从事食用菌菌种选育和推广等研究工作。

基金项目:国家“948”计划资助项目(2012-Z19);山东省农业良种工程重大课题资助项目;山东省现代农业产业技术体系食用菌产业创新团队资助项目(SDAIT-11-011-15)。

收稿日期:2014-01-27

双孢菇生产国,但是,我国双孢菇的生产技术水平与发达国家相差甚远,主要表现在双孢菇菌种种质非常落后,产量相对较低。同时我国不是双孢菇的发源地,野生的双孢菇种质资源十分缺乏^[2]。因此,引进国外抗逆性强、产量高、品质好的优良菌株,以丰富我国的双孢菇菌株种质资源,拓宽遗传基础,对选育适于我国栽培现状的优质双孢菇菌株具有重要的作用。

ISSR(Inter-simple sequence repeats)即简单重复中间序列,是基于 SSR 发展起来的一种新型分子标记技术^[3-4]。该技术利用 SSR 本身设计引物,对 SSR 之间的

Comparative Research of Total RNA Extraction Methods From *Apocynum venetum* L.

LI Miao^{1,2}, LI Guo-qi¹

(1. Key Lab for Restoration and Recovery of Degraded Ecosystem in Northwestern of Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Total RNA was extracted by Trizol, modified SDS and RNA plant plus Reagent Kit methods, the extracted effect were compared by UV Spectrophotometry and Gel Electrophoresis, in order to screen out the best method for extracting *Apocynum venetum* L.. The results showed that the RNA samples extracted by the method of Trizol were degraded gravely. Samples extracted by the method of modified SDS were low concentration and less amount, and the operation results were in poor repeatability. RNA plant plus Reagent Kit method was optimum extraction of *A. venetum* L. total RNA. The RNA samples extracted by the method of RNA plant plus Reagent Kit method were high quality, purity and good reproducibility, and could be used for research of molecule biology directly.

Key words: *Apocynum venetum* L.; Trizol method; modified SDS method; RNA plant plus Reagent Kit method; extraction of total RNA