

不同时期盆栽牡丹叶片 RNA 的提取研究

郭 丽 丽, 李 军, 李 金 航, 候 小 改, 孔 祥 生

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以牡丹品种‘洛阳红’为试材,采用 CTAB-LiCl 改良法,对小风铃期、大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期、初开期和谢花期的牡丹叶片进行总 RNA 提取。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 纯度。结果表明:7 个时期提取的总 RNA 经电泳均检测到 28S、18S 和 5S rRNA 条带,吸光度比值 A_{260}/A_{280} 均介于 1.8~2.0 之间,其中大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期和初开期的 rRNA 条带整齐清晰,并且 28S rRNA 亮度高于 18S rRNA;上述表明 CTAB-LiCl 改良法适合从牡丹叶片中提取总 RNA,且大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期和初开期是最适合提取总 RNA 的 5 个时期。

关键词:牡丹;CTAB-LiCl 改良法;总 RNA 提取

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0099-04

目前 RNA 提取方法有很多,如异硫氰酸胍法^[1]、酚-SDS 法^[2]、Trizol 法和总 RNA 提取试剂盒等。牡丹是中国特有的木本传统名花,因其花大色艳,雍容华贵,享有“花中之王”的美誉^[3-4]。从牡丹组织中提取出高质量的 RNA 是进行 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 文库构建、差异显示、体外转译等分子生物学研究的基础^[5-6]。能否从不同时期牡丹组织中提取纯度更高和完整性更好的 RNA 能够为探索牡丹生长发育过程奠定良好的分子生物学基础,还可以为确定牡丹转录组测序最佳取材时间提供科学参考。木本植物细胞壁坚硬,纤维素、木

质素等多聚糖和多酚类含量高^[7],因此在提取牡丹叶片总 RNA 时,叶片在提取液中必须经过强烈震荡或温浴步骤,该试验选用 CTAB-LiCl 改良法,以春节催花牡丹品种‘洛阳红’为试材,对不同时期牡丹叶片总 RNA 的提取进行了研究,以确定适宜盆栽牡丹总 RNA 提取的最佳时期,为进一步提取干旱及高温逆境条件下牡丹叶片 RNA 进行转录组研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为洛阳国家牡丹园冬季催花品种‘洛阳红’,用剪刀剪下叶片后,立即用锡箔纸包好,投入液氮中速冻,-70℃保存备用。催花牡丹‘洛阳红’的物候期见表 1。

CTAB 提取缓冲液:2% CTAB,2% PVP,2 mol/L NaCl,100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),25 mmol/L EDTA (pH 8.0),2% β -巯基乙醇(使用前加入)。SSTE 缓冲

第一作者简介:郭丽丽(1982-),女,博士,讲师,研究方向为逆境生理与分子生物学。E-mail:guolili0928@126.com

责任作者:孔祥生(1955-),男,硕士,教授,研究方向为植物生理生态。E-mail:kxsh55@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31200468)。

收稿日期:2014-01-21

Abstract: Taking 53 varieties of oyster mushroom as materials, phylogenetic analysis of oyster mushrooms from different places were carried out by ISSR marker in order to provide some molecular biology evidences for research to varieties breeding and genetic relationship of mushroom. The results showed that from 27 ISSR primers, 14 primers whose polymorphisms were obviously screened out. 189 bands as well as 189 polymorphic bands were obtained from all the 53 tested strains, indicating that their polymorphism was 100%. The coefficients of genetic similarity ranged from 0.44 to 0.99. The results of cluster analysis showed that all 53 strains were classified into eight groups at 0.62 levels and that the coefficients of genetic similarity for majority of strains were pretty low, indicating that there were significant genetic variation and rich genetic diversity between the tested strains at the DNA level. The result also showed that there's no significant correlation between the tested materials' clustering and their geographic origins.

Key words: oyster mushroom (*Pleurotus*); ISSR; phylogenetic

表 1 催花牡丹‘洛阳红’的物候期

Table 1 Phenological phase of forcing-flower tree peony ‘Luoyanghong’

物候期	超始期 Start date
Phenological phase	/年-月-日
萌动期 Budding stage	2012-12-20
显蕾期 Bud squaring stage	2012-12-24
跳蕾期 Bud jumping stage	2012-12-31
立蕾期 Bud standing stage	2013-1-3
小风铃期 Small bells stage	2013-1-9
大风铃期 Big bells stage	2013-1-13
圆桃期 Circular peach stage	2013-1-20
平桃期 Flat peach stage	2013-1-25
破绽期 Flaw stage	2013-1-29
初开期 Initial bloom stage	2013-2-3
盛花期 Blooming stage	2013-2-7
谢花期 Fading stage	2013-2-14

表 2

CTAB-LiCl 法和 CTAB-LiCl 改良法的对比

Table 2 Comparison of CTAB-LiCl method and CTAB-LiCl improved method

步骤	CTAB-LiCl 法	CTAB-LiCl 改良法
Procedure	CTAB-LiCl method	CTAB-LiCl improved method
1	取 0.2 g 牡丹叶片置于预冷研钵中,倒入液氮快速研磨至粉末状,迅速转移进含有 800 μ L CTAB 提取缓冲液且 65℃ 预热的 2 mL Eppendorf 管,剧烈震荡 30 s,65℃ 水浴 10 min,期间每 2 min 剧烈震荡 1 次	取 0.2 g 牡丹叶片置于预冷研钵中,倒入液氮快速研磨至粉末状,迅速转移入 2 mL Eppendorf 管,加入 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 800 μ L,剧烈震荡 30 s,65℃ 水浴 10 min,期间每 2 min 剧烈震荡 1 次
2	加入 800 μ L 氯仿/异戊醇,震荡 10 min,18℃,12 000 r/min 离心 10 min;重复抽提 1~2 次	相同
3	小心吸取上清液,加入上清液 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 溶液,终浓度为 2 mol/L,4℃ 放置过夜	小心吸取上清液,加入上清液 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 溶液,终浓度为 2 mol/L,-20℃ 放置 1 h
4	4℃,12 000 r/min 离心 20 min,弃上清	4℃,12 000 r/min 离心 20min,弃上清;加入 800 μ L 70%(V/V)乙醇漂洗沉淀,4℃,12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,将离心管放入超净工作台吹无菌风 15 min,沉淀稍稍晾干即可
5	加入 60℃ 预热的 SSTE 缓冲液 500 μ L 溶解沉淀,加入 500 μ L 氯仿/异戊醇,震荡 10 min,18℃,12 000 r/min 离心 10 min	相同
6	小心吸取上清液转移至 1.5 mL Eppendorf 管中,加上清液 2 倍体积的预冷无水乙醇,-20℃ 至少放置 2 h 或 -70℃ 至少放置 30 min 以沉淀 RNA	相同
7	4℃,12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,将 1.5 mL Eppendorf 管放入超净工作台吹无菌风 15 min,无乙醇味即可。	4℃,12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,加入 500 μ L 70%乙醇洗涤沉淀;4℃,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将 1.5 mL Eppendorf 管放入超净工作台吹无菌风 15 min,无乙醇味即可
8	使用 50 μ L 已高压灭菌的 DEPC-H ₂ O 溶解 RNA 沉淀	相同

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性检测分析

由图 1 可知,不同时期牡丹叶片总 RNA 均有 4 条带,从上至下依次为 DNA,28S rRNA,18S rRNA,5S rRNA;28S rRNA 和 18S rRNA 条带较亮,大部分 5S rRNA 条带较暗,少量非常明亮。在小风铃期(1 月 11 日)和大风铃期(1 月 15 日)提取的总 RNA 电泳图谱中,出现泳道 5S rRNA 明亮,说明泳道中 RNA 出现降解,原因可能是上样过程中存在 RNA 水解酶的污染。在圆桃期(1 月 20 日)、平桃期(1 月 25 日)、破绽期(1 月 30 日)和初开期(2 月 4 日)提取的总 RNA 电泳图谱中,

液:0.5%SDS,1 mol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。氯仿:异戊醇体积比为 24:1。10 mol/L LiCl 溶液。

烧杯、玻璃棒、量筒、容量瓶、移液管、研钵、研棒、药匙用双蒸水冲洗,晾干,用锡箔纸包好放入烘箱,180℃ 烘烤 4 h。研钵、研棒、药匙使用前放入-20℃ 冰箱预冷。移液枪枪头使用未高压灭菌的 0.1%DEPC-H₂O 浸泡 24 h,然后 121℃ 高温高压灭菌 20 min,50℃ 烘干。电泳槽使用前用未高压灭菌的 0.1%DEPC-H₂O 处理 12 h,用双蒸水冲洗,晾干。

1.2 试验方法

该试验对 Chang 等^[8] 的 CTAB-LiCl 法进行了部分改良,2 种方法的对比见表 2;每批样品重复 3 次。

rRNA 条带整齐清晰,并且 28S rRNA 亮度是 18S rRNA 的 2 倍左右,表明 RNA 完整性好。在谢花期(3 月 2 日)提取的总 RNA 电泳图谱显示,泳道中 28S rRNA 亮度比 18S rRNA 低,说明 RNA 降解严重。

2.2 RNA 纯度检测分析

RNA 和蛋白质最大吸收峰分别在 260 nm 和 280 nm,标准 RNA A_{260}/A_{280} 为 2.0,如果蛋白质未去除干净, A_{280} 增大, A_{260}/A_{280} 会偏小。一般认为, $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 较合理,表示 RNA 受蛋白质、多糖类和多酚类污染程度小,纯度高。由表 3 可知,7 批样品的 A_{260}/A_{280} 均介于 1.8~2.0 之间,说明多糖、蛋白质和核酸等杂质含量较少,RNA 纯度较高。

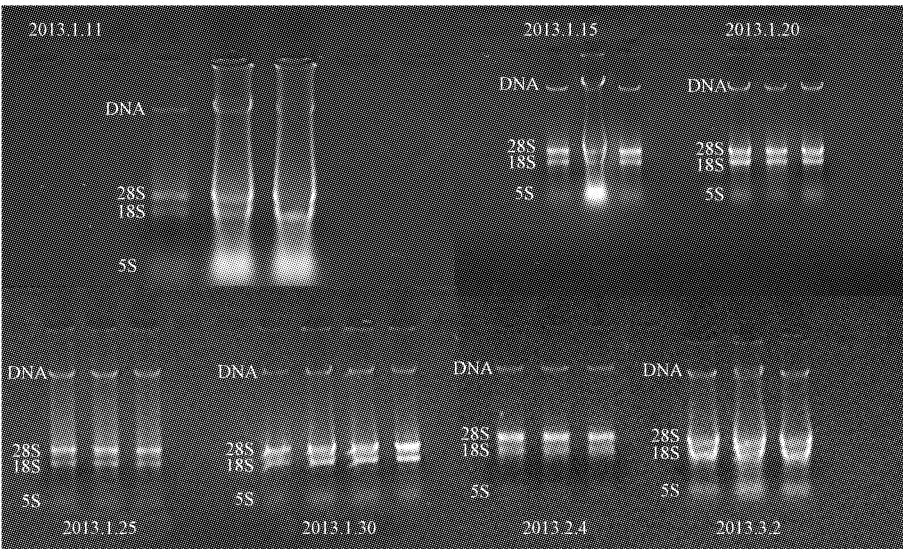


图1 不同时期盆栽牡丹叶片总 RNA 电泳结果

注:1月11日牡丹处于小风铃期,1月15日处于大风铃期,1月20日处于圆桃期,1月25日处于平桃期,1月30日处于破绽期,2月4日处于初开期,3月2日处于谢花期。

Fig.1 Electrophoretogram of total RNA extracted from potted tree peony leaves at different stages

Note:On January 11,tree peony belonged to small bells stage;on January 15,tree peony belonged to big bells stage;on January 20,tree peony belonged to circular peach stage;on January 25,tree peony belonged to flat peach stage;on January 30,tree peony belonged to flaw stage;on February 4,tree peony belonged to initial bloom stage;on March 2,tree peony belonged to fading stage.

表3 RNA 纯度检测

Table 3 RNA purity test					
采样日期 Sampling date	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RNA 浓度 RNA Concentration /μg·μL ⁻¹	稀释倍数 Dilution ratio
1月11日	0.071	0.039	1.821	0.213	75
1月15日	0.227	0.118	1.924	0.681	75
1月20日	0.244	0.125	1.952	0.732	75
1月25日	0.128	0.069	1.855	0.384	75
1月30日	0.248	0.127	1.953	0.744	75
2月4日	0.106	0.055	1.927	0.318	75
3月2日	0.152	0.080	1.900	0.456	75

3 讨论

关于植物总 RNA 提取的文献有很多^[9-13],提取方法也不尽相同,主要原因是植物种类繁多,植物间结构与组分千差万别,并且同一种植物不同部位和不同时期组分也有很大差异^[7]。相对于 Chang 等^[8]的方法,该试验做了以下改进:一是在 Eppendorf 管中先加入粉末状样品,然后加入预热的 CTAB 提取缓冲液,与原方法顺序相反;好处在于粉末状样品不会粘连在小药匙和管壁上,减少残留。二是使用 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次,而原方法未使用 70%乙醇洗涤 RNA;由于 RNA 不溶于乙醇,70%乙醇可以洗涤 RNA,可以去除盐离子和残余的异戊醇,提高 RNA 纯度。三是将终浓度为 2 mol/L 的 LiCl 溶液置于-20℃放置 1 h 来沉淀 RNA,而原方法采用 4℃过夜沉淀 RNA;这样做可以缩短沉淀时间,提高效率。

该研究通过 CTAB-LiCl 改良法,对小风铃期、大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期、初开期和谢花期 7 个时期牡丹叶片样品进行总 RNA 提取试验。琼脂糖凝胶电泳均检测到 28S、18S 和 5S rRNA 条带,并且吸光度比值 A₂₆₀/A₂₈₀ 均介于 1.8~2.0 之间,表明 CTAB-LiCl 改良法适合从牡丹叶片中提取总 RNA。大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期和初开期的牡丹叶片正处于旺盛的生长发育时期,RNA 含量较高,电泳图谱显示 rRNA 条带整齐清晰,并且 28S rRNA 亮度高于 18S rRNA,提取出的总 RNA 质量最好,表明这 5 个时期最适合总 RNA 的提取。

不同时期 RNA 电泳泳道中均出现少量 DNA 条带,其 DNA 污染原因可能是提取总 RNA 时,DNA 未去除彻底,RNA 样品中残留有少量 DNA;使用终浓度为 2 mol/L 的 LiCl 溶液沉淀 RNA,不能使小分子 RNA 沉淀,而且会残留 DNA,造成 DNA 污染,沉淀 2~3 次效果较好^[7]。该试验使用 2 mol/L LiCl 溶液-20℃放置 1 h 来沉淀 RNA,可能是沉淀 1 次的缘故,致使 DNA 有残留。去除 DNA 污染还可以使用 DNA 酶来消化 DNA,此法可以彻底去除 DNA,使 RNA 更纯净。

不同时期 RNA 电泳时少量泳道中出现轻微拖尾现象,可能是多聚糖残留的缘故。牡丹叶片中多聚糖含量较高,而多聚糖与 RNA 在水溶液中理化性质很类似,提取过程中与 RNA 形成沉淀难以去除干净,并且多聚糖还可以抑制多种酶的活性,使分子实验无法继续进

行^[14-16]。该试验中,一方面,CTAB 提取缓冲液中,CTAB 在 2 mol/L NaCl 高离子强度溶液中,CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物沉淀,不沉淀 RNA,通过氯仿/异戊醇抽提,可除去一部分蛋白质和多聚糖^[15];另一方面,使用终浓度为 2 mol/L LiCl 溶液选择性沉淀 RNA,将大部分多聚糖存留在溶液中,离心(4℃、12 000 r/min、20 min),弃去上清液,极大减少了 RNA 沉淀中多聚糖的含量^[16]。

牡丹叶片中多酚类(黄酮类、单宁类、酚酸类和花色苷类等)含量也很高。多酚类在植物细胞破碎时释放出来,pH 为酸性时极易被氧化生成棕褐色多元醌(褐化)。多元醌与 RNA 不可逆结合,使 RNA 丧失活性,苯酚、氯仿等抽提时 RNA 会丢失^[17-19]。CTAB 提取缓冲液中加入强螯合剂 PVP 和强还原剂 β -巯基乙醇,PVP 与多酚类化合物螯合, β -巯基乙醇打断多酚氧化酶的二硫键,使酶失活,从而防止多酚类被氧化^[14,19]。

参考文献

- [1] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159.
- [2] Van Driessche E, Beeckmans S, Dejaegere R, et al. The antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 141(1): 184-188.
- [3] 侯小改,段春燕,刘素云,等.不同土壤水分条件下牡丹的生理特性研究[J]. *华北农学报*, 2007, 22(3): 80-83.
- [4] 李永华,翟敏,李颖旭,等.干旱胁迫下牡丹叶片光合作用与抗氧化酶活性变化[J]. *河南农业科学*, 2007(5): 91-93.
- [5] 杜希华,陆海,高述民,等.文冠果花药总 RNA 提取方法研究[J]. *北*

京林业大学学报, 2003, 25(1): 10-13.

- [6] 张玉进,孟祥春,潘瑞炽,等.非洲菊花瓣总 RNA 提取方法的改进[J]. *植物学通报*, 2001, 18(6): 722-726.
- [7] 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.
- [8] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 113-116.
- [9] 张今今,王跃进,王西平,等.葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. *果树学报*, 2003, 20(3): 178-181.
- [10] 赵双宜,吴耀荣,夏光敏.介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法[J]. *遗传*, 2002, 24(3): 337-338.
- [11] 李大力.一种从富含次生物质的植物中提取 RNA 的方法[J]. *南京理工大学学报*, 2001, 25(5): 547-549.
- [12] 陈国梁,陈宗礼,孙萍,等.枣树幼叶总 RNA 提取方法的比较研究[J]. *北方园艺*, 2012(19): 131-133.
- [13] 高双成,施江,王世华,等.一种牡丹花瓣总 RNA 的提取方法[J]. *河南农业科学*, 2007(10): 93-94.
- [14] 郝福玲,刘雅莉,王跃进,等.百合花瓣总 RNA 提取方法的研究[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(6): 1143-1147.
- [15] 蒋建雄,张天真.利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA[J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167.
- [16] 黄凤兰,李长海,孙婷婷,等.芍药花瓣总 RNA 的提取[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(3): 282-284.
- [17] 王玉成,薄海侠,杨传平.胡杨、柽柳总 RNA 提取方法的建立[J]. *东北林业大学学报*, 2003, 31(5): 99-100.
- [18] 曾凡锁,南楠,詹亚光.富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5): 913-916.
- [19] 夏海武,吕柳新,陈桂信,等.羊蹄甲果荚中 RNA 提取的新方法[J]. *分子生物育种*, 2006, 4(1): 147-149.

Extraction of Total RNA From Potted Tree Peony Leaves at Different Stages

GUO Li-li, LI Jun, LI Jin-hang, HOU Xiao-gai, KONG Xiang-sheng

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Henan, Luoyang 471003)

Abstract: Taking *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Luoyanghong' as test material, total RNA were extracted by CTAB-LiCl improved method from tree peony leaves at small bells stage, big bells stage, circular peach stage, flat peach stage, flaw stage, initial bloom stage and fading stage. RNA integrity was detected by agarose gel electrophoresis, RNA purity was detected by ultraviolet spectrophotometer. The results showed that after electrophoresis, the RNA extracted in seven stages all had three bands-28S, 18S and 5S rRNA, the ratio of A_{260}/A_{280} ranged between 1.8 and 2.0. The rRNA bands at big bells stage, circular peach stage, flat peach stage, flaw stage, and initial bloom stage were tidy and clear, and the lightness of 28S rRNA band was higher than 18S rRNA band. The above showed that CTAB-LiCl improved method was suitable for extraction of total RNA from tree peony leaves, and big bells stage, circular peach stage, flat peach stage, flaw stage and initial bloom stage were the optimal five stages for total RNA extraction.

Key words: *Paeonia suffruticosa* Andr.; CTAB-LiCl improved method; extraction of total RNA