

红花花瓣总 RNA 提取方法的比较研究

张 雪^{1,2}, 官丽莉^{1,2}, 韩怡来², 杨 晶^{1,2}, 杜林娜^{1,2}, 李校堃¹

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:红花花瓣富含多糖、多酚和花色素苷等次生代谢产物,严重影响花瓣总 RNA 的提取。为探索适合红花花瓣总 RNA 的提取方法,以 4 种红花不同时期的花瓣为材料,通过对 4 种 RNA 提取方法,即 RNA 提取试剂盒、RNAiso Plus 试剂法、改良的 CTAB 法和 SDS 法进行比较研究。结果表明:RNAiso Plus 试剂法效果最好,提取的总 RNA 完整性好,纯度高、浓度高。通过 RT-PCR 验证,所提取的 RNA 达到基因克隆和实时定量 PCR 等分子生物学实验要求。

关键词:红花;总 RNA 提取;RNAiso Plus 试剂法

中图分类号:S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0014-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0014

红花(*Carthamus tinctorius* L.)是我国传统的中草药,又叫草红花、金红花,为一、二年生菊科植物红花的管状花,又是新型的油用植物和工业用植物,经济价值高,具有较大的开发潜力,是我国各地都有待开发的经济作物。红花黄色素(safflor yellow,

SY)是红花的主要有效成分之一,是以红花花瓣为原料,利用现代生物技术提取而成的天然色素。研究表明,红花黄色素具有扩张血管、改善心肌供血、抑制血小板聚集、抑制血栓形成、修复血管内皮损伤及抗氧化等多种药理作用^[1-5],被广泛应用在冠心病、高血压、脑梗塞、抗肿瘤、糖尿病并发症和慢性肾病等疾病上^[6]。本课题前期研究发现,红花花瓣在不同开花时期红花黄色素含量不同,然而对于这种变化的分子机制尚不明确,相关工作有待进一步开展。

从不同的组织和器官当中提取出纯度高、完整性好的 RNA 是进行 Northern 分析、实时定量 PCR、cDNA 文库构建和转录组测序等许多分子生物学研究的必要前提^[7]。但是由于植物的种类繁

收稿日期:2014-10-13

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2011AA100606);国家自然科学基金资助项目(31201237, 31101172);吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队资助项目(20111815);教育部博士点基金-青年教师基金资助项目(20122223120002)

第一作者简介:张雪(1988-),女,吉林省长春市人,在读硕士,从事植物生物反应器研究。E-mail:383237154@qq.com。

通讯作者:李校堃(1964-),男,吉林省长春市人,博士,教授,博士生导师,从事生物反应器与药物开发研究。E-mail:xi-aokunli@163.com。

Cloning and Sequences Analysis of Heilongjiang Isolate Potato Virus Y CP Gene

GENG Hong-wei¹, GUO Yi-fan², WAN Shu-ming¹, FAN Guo-quan¹, WEI Qi¹, GAO Yan-ling¹, ZHANG Wei¹

(1. Virus-free Seeding Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: For the research of potato virus Y, pair of primers PVYF, PVYR were designed according to the complete genome of potato virus Y (PVY) in GenBank, the PVY CP gene was amplified from strain isolated from Heilongjiang. After that, the information of amino acid sequences with computer technology was studied. The RT-PCR results showed that the primers could be amplified the CP gene fragment. The analysis of sequence result showed that the CP gene amino acid homology of Heilongjiang isolate and other 40 isolates of PVY in GenBank were 92.1%~97.4%, CP gene was highly conserved that could be used as antibody gene to detect the PVY virus.

Keywords: RT-PCR; potato virus Y; sequences analysis

(该文的作者还有申宇、张抒、邱彩玲、董学志,单位同第一作者,麻琳,单位为黑龙江省现代农业示范区管理委员会)

多,且次生代谢物质复杂,导致很难有一种通用的方法来提取不同植物组织的 RNA。尤其是在许多植物的花瓣组织中,多糖、花色素、酚类化合物及 RNAase 含量较高,导致从红花花瓣中提取高质量 RNA 相对十分困难。目前已经从月季、百合、非洲菊、荷花、茶梅和玫瑰等的花瓣中提取到高质量的 RNA^[8-13],郭庆华等^[14]报道红花叶片总 RNA 的快速提取。然而,以红花花瓣为材料,进行 RNA 快速提取的文章尚未见报道。

红花花瓣富含多糖多酚,尤其是红花黄色素、红花红色素等色素的含量较高。对红花黄色素合成途径的一些关键酶基因及转录因子基因的克隆分离及通过实时定量 PCR 研究其在不同组织中表达的特异性,是了解红花黄色素合成分子机制的主要方法,而提取高质量的 RNA 是后续试验的前提和基础^[15-17]。本试验采收了新鲜的红花花瓣为实验材料,采购市售常用的适用于多糖多酚植物的 RNA 提取试剂盒、RNAiso Plus 试剂法、改良的 CTAB 法和 SDS 法提取红花花瓣组织中的总 RNA。旨在探索找出一种经济、有效、便利且最适用于红花花瓣的总 RNA 的提取方法,为红花分子生物学及基因工程育种研究的开展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以吉红早熟红花品种为材料,取样来源于吉林农业大学红花试验基地。各花期花瓣采收后快速置于液氮中,于 -80°C 低温冰箱中保存备用。主要试剂 RNA 提取试剂盒(购自百泰克生物技术有限公司)、RNAiso Plus 试剂(购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司)、 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS、2%巯基乙醇、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液、 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KAc (pH4.8)、 LiCl 、 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 溶液(pH5.2)、双蒸水经体积分数为 0.1%的 DEPC、 37°C 处理 24 h 后高压灭菌备用、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、0.5%SDS、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl(pH8.0)、 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA。

1.2 红花花瓣总 RNA 的提取

1.2.1 RNA 试剂盒提取方法 参照总 RNA 提取试剂盒方法,分别取 0.5 g 不同时期的红花花瓣于研钵中,研磨成粉末后转移至 1.5 mL 离心管中,每 50~100 mg 组织加入 1 mL 的裂解液 RL 后匀浆。组织样品容积不能超过 RL 容积的

10%。剧烈震荡混匀,静置 5 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心 10 min;吸取上清液于新的离心管中,每 1 mL 中缓慢加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡 15 s,静置 3 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心 10 min;将上层水相层移至新的离心管中加入 1 倍体积的 70%乙醇颠倒混匀,得到的溶液转入吸附柱 RA 中, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 45 s,弃废液;加入 500 μL 去蛋白液 RE, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 45 s,弃废液;加入 700 μL 漂洗液 RW, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 60 s,弃废液;加入 500 μL RW, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 60 s,弃废液;将吸附柱 RA 放回空收集管中, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,尽量去除 RW;将吸附柱 RA 放入新的 RNase free 离心管中,向吸附膜中间加入 50 μL 事先在 $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 RNase free 水,室温静置 2 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min。所得 RNA 溶液置于 -80°C 保存备用。

1.2.2 RNAiso Plus 试剂法 参照 Takara RNAiso Plus 试剂说明书方法进行,所得 RNA 溶液放于 -80°C 保存。

1.2.3 改良的 CTAB 法 称取 0.5 g 不同时期红花花瓣于研钵中,用液氮研磨充分后迅速移到 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL 65°C 预热的 CTAB 溶液(用前加入 3%的 β -巯基乙醇),充分震荡混匀,放入 65°C 水浴 5 min,再次震荡混匀,冷却,加入 600 μL 酚:氯仿:异戊醇的混合液(25:24:1),混匀, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min;取上清加入 1/10 体积的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KAc(pH4.8),1/10 体积的无水乙醇,等体积的上述混合液混匀, 4°C 条件下, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。吸取上清溶液,移至新的离心管中,加入 1/4 体积的预冷 LiCl , 4°C , $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 15 min,弃上清,加 1.2 mL SSTE [$1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、0.5%SDS、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl (pH8.0)、 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA]充分溶解沉淀;加入相同体积的酚:氯仿:异戊醇的混合液(25:24:1),充分混匀, 4°C 条件下, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min,吸取上清至新的离心管,加入 1/10 体积的 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇, 4°C , $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集沉淀,用 75%乙醇洗涤沉淀 2 次,室温干燥;溶解于 30 μL DEPC 水中。所得 RNA 溶液放于 -80°C 保存。

1.2.4 SDS 法 参考 Kam-Lock 等^[18]的方法进行。

1.3 总 RNA 质量检测

分别取不同花期花瓣的总 RNA 1 μL 稀释 10 倍后用核酸测定仪检测 230、260 和 280 nm 处的吸光值,并计算 RNA 浓度及纯度。取 1 μL RNA 溶于 10 g·L⁻¹ 变性琼脂糖,对提取的总 RNA 进行完整性检测分析。

1.4 RT-PCR 分析

Illumina 测序(数据已上传至 NCBI Short Read Archive 数据库,登录号:SRA047279.2)获得的红花转录组序列中高表达的 Unigene27556(594 bp),通过 ClustalX 多重比对确定其保守区,按照引物设计原则,采用引物设计软件 Primer 5.0,设计 1 对特异性引物 MYB Unigene 27556-F: TC-GAGGCATTTAAAGGCCGTG 和 MYB Unigene 27556-R: GCAATCGATCAACCATTTTCGC。通过对不同方法提取的红花初花期花瓣的总 RNA 进行反转录,以得到的 cDNA 为模板。利用基因特异性引物(MYB Unigene27556-F、MYB Unigene27556-R)进行 PCR 扩增,预期扩增出片段的大小为 500 bp 左右。PCR 仪反应程序为:94℃预

变性 6 min;94℃变性 30s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min;72℃延伸 10 min。循环 30 次。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度及浓度测定

使用 NanoDrop2000 测试供试 RNA 的质量浓度值及光密度比值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀,以检验 RNA 纯度。由表 1 可知,RNA 提取试剂盒法、RNAiso Plus 试剂法和改良的 CTAB 法提取的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值(除改良的 CTAB 法花蕾期外)均大于 1.80,比值为 1.9~2.1,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值(除改良的 CTAB 法衰花期和花蕾期外)均大于 2.0,表明 RNA 质量较好,纯度较高;SDS 法提取的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 小于 1.80,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值小于 2.0,说明提取总 RNA 质量稍差,存在降解情况。说明 RNAiso Plus 法和改良的 CTAB 法提取到的总 RNA 浓度较高,而 RNA 提取试剂盒和 SDS 法提取到的 RNA 浓度较低。

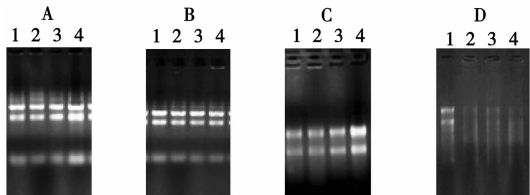
表 1 不同提取方法对不同时期的红花花瓣总 RNA 提取结果的比较

Table 1 Comparison on total RNA purity and concentration in different flowering stage by different isolation methods

提取方法 Extraction method	不同时期 Different flowering stage	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	总 RNA 浓度/(μg·μL ⁻¹) Total RNA concentration
RNA 提取试剂盒法 RNA Extraction kit	花蕾期	2.13	2.15	278.8
	初花期	2.18	2.14	366.4
	盛花期	2.17	2.05	323.7
	衰花期	2.15	2.09	180.7
RNAiso Plus 法 RNAiso Plus reagent	花蕾期	1.93	2.05	1477.3
	初花期	1.90	2.03	1367.4
	盛花期	1.99	2.13	1292.0
	衰花期	2.03	2.11	1296.5
改良的 CTAB 法 Improved CTAB method	花蕾期	2.13	2.17	1373.0
	初花期	2.01	2.09	1367.2
	盛花期	1.97	2.00	1266.3
	衰花期	2.11	1.99	1245.2
SDS 法 SDS method	花蕾期	1.77	1.93	230.0
	初花期	1.71	1.88	253.4
	盛花期	1.73	1.96	399.2
	衰花期	1.69	1.92	121.7

2.2 总 RNA 凝胶电泳分析

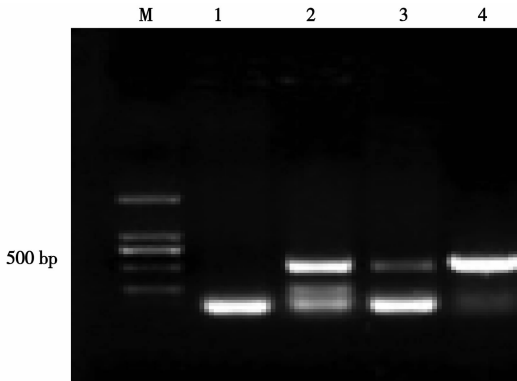
从图 1A、B、C 可以看出 RNA 提取试剂盒、RNAiso Plus 试剂法和改良 CTAB 法提取的红花花瓣总 RNA 有清晰的 28S 和 18S 两条带,拖带现象也不明显, RNA 电泳效果好,表明提取的 RNA 结构完整,无明显降解, RNA 纯度较高,无蛋白及多糖类的污染。 SDS 法提取的 RNA,条带不明显,且有拖带现象,说明提取的 RNA 存在污染和降解现象。



A、B、C、D 分别为 RNA 提取试剂盒、RNAiso plus 试剂法、改良 CTAB 法和 SDS 法 1:花蕾期;2:初花期;3:盛花期;4:衰花期
A,B,C,D,were RNA extraction kit,RNAiso plus reagent,modified CTAB and SDS respectively method 1:bud;2:early flowering;3:flowering;4:bad flowering

图 1 不同方法提取的红花花瓣 RNA

Fig. 1 Total RNA extracted from safflower by different methods



M: DL2000;1: SDS法;2: RNA试剂盒法;
3: 改良的CTAB法;4: RNAiso plus法

M: DL2000;1: SDS method; 2: Improved CTAB method;
3: RNA Extraction kit; 4: RNAiso Plus Reagent

图 2 MYB Unigene27556 基因 RT-PCR 检测

Fig. 2 Detection of MYB Unigene27556 gene by RT-PCR

2.3 不同方法提取的 RNA 的 RT-PCR 分析

将红花初花期花瓣总 RNA 反转录,以获得的 cDNA 为模板。利用红花 Illumina/Solexa 测序产生的转录因子 MYB Unigene27556 基因片段进行 RT-PCR 验证。结果表明, RNAiso Plus 试剂法、RNA 提取试剂盒法和改良的 CTAB 法提取的总 RNA 进行反转录得到的 cDNA 均能扩增出目的条带(500 bp 左右),但 RNAiso Plus 试剂法效果最好,无非特异条带出现。 SDS 法最差, RT-PCR 无目的条带(见图 2)。因此,在后续

对红花花瓣内天然活性物质如红花黄色素的分子生物学研究中,可优先选用 RNAiso Plus 试剂法获取花瓣总 RNA。

3 结论与讨论

高质量的 RNA 提取是基因表达分析的关键步骤^[19],在进行半定量 RT-PCR 和荧光定量 Real-Time PCR 试验中,获得高质量、无 DNA 污染的 RNA 是其关键^[20]。

红花花瓣中富含多糖多酚等物质,酚类化合物被氧化后与 RNA 不可逆的结合,导致 RNA 活性丧失或形成不溶性复合物,且在去除过程中会导致 RNA 产量的大量损失^[21-22];多糖易与 RNA 共沉淀形成难溶胶状物,而难以分离提取^[23]。因此,必须选择有效的去除多糖多酚的方法进行红花花瓣 RNA 的提取。常用的提取方法有 CTAB 法、 SDS 法、 TRIZOL 法、商品化 TRIZOL 试剂法和试剂盒法。本研究采用的 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^[24]。

本试验采用了 RNA 提取试剂盒、 RNAiso Plus 试剂法、改良的 CTAB 法和 SDS 法分别提取了不同时期红花花瓣中的 RNA,结果表明,采用 RNA 试剂盒方法、 RNAiso Plus 试剂法和改良的 CTAB 法提取的 RNA 电泳图较好,适用于红花花瓣中的 RNA 提取。改良的 CTAB 法提取的 RNA 产量高、质量好、纯度高,但是操作耗时长,步骤繁琐,提取过程中 RNA 容易降解,是比较传统的 RNA 提取方法; RNA 提取试剂盒提取的 RNA,质量好,纯度高,浓度较其它两种方法低,但是不影响 RT-PCR 等对于模板要求低的实验,此方法操作简单,快速,高效,是现在较为常用的一种提取方法; RNAiso Plus 试剂法提取的 RNA 产量高、质量好、纯度高、操作简便、效率高,也是实验室常用的提取方法之一,适用于 Real-Time PCR 及 Northern 检测。

植物各个组织的不同时期所含有的化学物质成分差别很大,因此 RNA 的提取方法也不尽相同^[25]。为了检验 RNAiso Plus 试剂法对不同花期红花花瓣 RNA 的提取效果,利用该法提取红花花瓣花蕾期、初花期、盛花期和败花期的 RNA,进行检测,提取效果较好,不同开花时期条带亮度无较大差异。因此,该方法适用于各个花期的红花花瓣 RNA 的提取。此外还应注意研钵应提前用液氮预冷,使用健康新鲜提取材料,提取过程迅

速,在研磨过程中,不断添加液氮,样品应一直处于冷冻状态^[17]。

本研究结果表明,RNAiso Plus 试剂法对红花花瓣 RNA 提取效果最好,该方法提取红花花瓣总 RNA 完整性好、纯度和产率高,去除杂质的效果好,经 RT-PCR 分析表明可获得稳定的、特异的扩增条带,为后续的分子生物学研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 崔剑,李兆陇,洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报,2000,40(6):9-12.
- [2] 金鸣,李金荣,吴伟. 红花黄色素抗氧化作用的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(5):447-449.
- [3] 王幼平,乔峻,钱中希,等. 红花黄素对缺血心肌的保护及抗氧化作用的实验研究[J]. 中华胸心血管外科杂志,1995,11(3):176-178.
- [4] 迪丽努尔,沙比托夫,朱毅忠,等. 红花黄色素对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(27):26-27.
- [5] 汤简明,欧阳臻,冯旭,等. 红花及复方脑得生片中羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(16):2246-9.
- [6] 石宁宁,程春生,查朱青,等. 红花注射液防治游离皮瓣移植术后血管危象的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(10):1322-7.
- [7] 裴嘉博,李晓艳,李亚东. 越橘果实总 RNA 提取方法比较研究[J]. 东北农业大学学报,2012,43(10):30-34.
- [8] 吴田,蓝增全. 茶梅花瓣总 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 中国农学通报 2013,29(28):129-133.
- [9] 谢吉容,程再全,黄兴奇,等. 月季花瓣的 RNA 提取方法[J]. 云南农业大学学报,2007,22(4):480-484.
- [10] 杨峰,李创,刘艺平,等. 荷花花瓣总 RNA 的提取方法[J]. 河南科学,2009,27(10):226-1228.
- [11] 郝福玲,刘雅莉,王跃进. 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.

- [12] 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.
- [13] 冯立国,李婷琳,陈陈,等. 玫瑰花组织总 RNA 提取方法研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2013,34(4):104-107.
- [14] 郭庆华,郭美丽,唐杰. 红花总 RNA 的快速提取方法[J]. 药学服务与研究,2008,8(3):190-192.
- [15] 彭玉帅,王如峰,张陆军. 花青素生物合成的关键酶及其调控因子[J]. 中草药,2014,45(1):131-136.
- [16] 侯佳,孙丰硕,吴秋明,等. 一种高效提取杨树发病树皮总 RNA 的方法及应用[J]. 植物生理学报,2014,50(2):223-228.
- [17] 孙思,陈洁玲,舒灿伟,等. 木麻黄小枝总 RNA 提取方法的比较与优化[J]. 华中农业大学学报,2014,33(1):51-55.
- [18] Kam-Lock C,Chai-Ling H,Parameswarin N,et al. A aimple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides [J/OL]. Nature Protocols,2007-05-28.
- [19] Kim J H,Jin H O,Park J A,et al. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood[J]. Springerplus,2014,8(3):76.
- [20] 陈高,单雷,周丽侠,等. 花生总 RNA 提取方法比较研究[J]. 中国农业学通报,2011,27(1):214-218.
- [21] 陈新,刘洪,贾建云,等. 核桃叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 山东农业科学,2014,46(2):11-12,16.
- [22] Sehneiderhaner A,Sandermann H,Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochen,1991,197:91-95.
- [23] Logemann J,Sehell J,Willmitzer L,et al. Improved method for isolation of RNA from plant tissues[J]. Animal Biochemistry,1987,163:16-20.
- [24] 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.
- [25] 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.

Study on Total RNA Extraction from Safflower Petals

ZHANG Xue^{1,2},GUAN Li-li^{1,2},HAN Yi-lai²,YANG Jing^{1,2},DU Lin-na^{1,2},LI Xiao-kun¹

(1. Ministry of Education Bioreactor and Drug Development Reseach Center,Jilin Agricultural University,Changchun,Jilin 130118;2. College of Life Science,Jilin Agricultural University, Changchun,Jilin,130118)

Abstract: It is difficult to isolate total RNA from safflower petals because of a great deal of polysaccharides, polyphenolics, anthocyanins and other metabolites. To explore suitable RNA extraction method of safflower petals, total RNA was isolated with the method of improved CTAB method, RNA extraction kit, RNAiso Plus Reagent and SDS method. The results showed that RNA extracted by total RNAiso Plus reagent method had best integrity, high purity, high concentrations. The total RNA isolated by this method was proved to be relatively intact and high purity. The isolated RNA could be used in quantitative real-time PCR and other molecular biology experiments by RT-PCR analysis.

Keywords: *Carthamus tinctorius* L.; total RNA extraction; RNAiso Plus reagent method