



王林,王晓敏,李霞,等.茴香叶片总 RNA 提取方法的比较[J].黑龙江农业科学,2021(8):48-50,51.

茴香叶片总 RNA 提取方法的比较

王 林,王晓敏,李 霞,郭荔雯,孔维康,潘兵青

(宁夏大学 农学院/宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室/宁夏设施园艺(宁夏大学)技术创新中心/宁夏现代设施园艺工程技术研究中心,宁夏 银川 750021)

摘要:为促进茴香的分子生物学研究,以宁夏海原的茴香叶片为试验材料,分别采用 CTAB 法、CTAB 改良法、CTAB 水饱和酚法、Tris-硼酸法、异硫氰胍法、异硫氰胍改良法、Trizol 法和 Trizol 改良法共 8 种方法提取茴香叶片 RNA,比较其提取效果。结果表明:CTAB 改良法提取的 RNA 质量最好,浓度为 $1\,481.9\,\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $\text{OD}_{260/280}$ 为 1.82, $\text{OD}_{260/230}$ 为 2.12,且得率较高,琼脂糖凝胶电泳显示条带清晰完整、无拖尾现象;Trizol 法、Trizol 改良法及异硫氰胍法提取的 RNA 质量较高,但完整性较差;CTAB 法、CTAB 水饱和酚法及异硫氰胍改良法提取 RNA 的效果较差;Tris-硼酸法提取的 RNA 质量最差。

关键词:茴香叶片;总 RNA;提取方法

茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.),又名香丝菜、茴香子,被广泛栽植于各地^[1],在我国已有 1 000 多年的栽培历史,且分布于我国各省区。随着其药用价值和食用价值被日益发现和重视^[2],近年来,有关茴香的研究主要集中在对其生理活性成分^[3]、诱导植物种子萌发^[4]、挥发油类成分提取^[5]等方面,而有关茴香抗寒、抗旱等基因的克隆及分子调控机制等研究鲜有报道。从植物组织中提取高质量的 RNA 是进行相关基因克隆及表达与调控、酵母双杂交等试验的前提^[6-7],目前常用的植物 RNA 提取方法有 CTAB 法、SDS 法、快速 SDS 法及改良热硼酸法等,且以上方法在红豆杉^[7]、草坪植物^[8]、茶梅^[9]、百合^[10]等植物上均已被研究并报道,但由于植物本身存在差异,在生长过程中产生的代谢物质,如糖和酚类等物质,可与 RNA 产生共沉淀,进而影响总 RNA 的质量及后续试验^[3]。

因此,本研究以宁夏海原茴香的叶片为材料,分别对 CTAB 法、CTAB 改良法、CTAB-水饱和酚法、Tris-硼酸法、异硫氰胍法、异硫氰胍改良法、Trizol 法以及 Trizol 改良法共 8 种方法提取茴香叶片的总 RNA,从 RNA 浓度、纯度、得率

及完整性等方面进行比较,旨在筛选出最佳提取方法,为开展茴香后续分子生物学研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为宁夏大学农学院园艺实验室收集的海原地区的茴香种子,于 2019 年 5 月种植于宁夏大学农科实训基地玻璃温室中,常规化管理,于茴香生长至 7 片叶时采样。

1.2 方法

1.2.1 CTAB 法 参照史宝胜等^[6]的操作方法。

1.2.2 CTAB 改良法 与上文中 CTAB 法在第(4)步和第(5)步稍有差别:取上清液后加入同等的氯仿:异戊醇(体积比为 24:1),充分混匀后于 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清液于新的离心管后加入上清液 1/2 体积的 5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液,摇晃混匀,再加上清液 1/2 体积的氯仿溶液,于涡旋仪上振荡混匀,于 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。

1.2.3 CTAB-水饱和酚法 具体步骤按水饱和酚(北京索莱宝科技有限公司)的说明书进行。

1.2.4 Tris-硼酸法 参照望飞勇等^[8]的方法略有改动:改变离心管中加入的缓冲液与 β -巯基乙醇的量,第(4)步稍有不同,不同之处在于上清液加入 1/2 体积的苯酚和 1/2 体积的异戊醇,于 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。

1.2.5 异硫氰胍法 与吴田等^[9]的方法稍有不同。不同之处在于第一步加入异硫氰胍抽提

收稿日期:2021-04-06

基金项目:2012 年度宁夏留学回国人员创新创业项目;宁夏回族自治区农业育种专项(NXNYZZ20150303)。

第一作者:王林(1997—),女,在读硕士,从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:784889343@qq.com。

通信作者:王晓敏(1981—),女,博士,副教授,从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:wangxiaomin_1981@163.com。

液[4 mol·L⁻¹异硫氰酸胍、0.025 mol·L⁻¹柠檬酸钠(pH7.0)、0.5%十二烷基肌氨酸钠、0.1 mol·L⁻¹巯基乙醇]后置于冰上依次加入 1/10 提取液体积的 2 mol·L⁻¹KAc 摇晃混匀,等提取液体积的水饱和酚,1/3 提取液体积的氯仿:异戊醇24:1混匀后置冰上 15 min,于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 10 min。

1.2.6 异硫氰酸胍改良法 参照异硫氰酸胍法略有改进:研磨完迅速转移至含 1 mL 异硫氰酸胍抽提液的 2 mL 离心管摇匀后加 600 μL 水饱和酚,50 μL 2 mol·L⁻¹KAc(pH5.2),120 μL 氯仿摇匀。置于冰上 5 min,4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 10 min。吸取上清液于新的离心管,加入与上清液相同体积的氯仿:异戊醇(24:1),于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 10 min。

1.2.7 Trizol 法 根据 Trizol(Invitrogen)试剂说明书的方法操作。

1.2.8 Trizol 改良法 在尹慧等^[10]的方法上略有改进,取上清液于另一离心管,加入等体积的 V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)为 25:24:1 的溶液,充分混匀,于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 15 min。取上清液,再加入等体积的 V(氯仿):V(异戊醇)为 24:1 的溶液,充分混匀。

1.2.9 总 RNA 质量检测 取 2 μL RNA 溶液,用核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度和 OD_{260/280} 及 OD_{260/230}。

RNA 得率(μg·g⁻¹)=浓度(μg·μL⁻¹)×体积(μL)/样品质量(g)。

RNA 完整性的检测:取 RNA 溶液 3 μL 与 1 μL 6×loading buffer 缓冲液混合均匀,100 V 下电泳 20 min 后在凝胶成像仪下观察。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的总 RNA 质量比较

由表 1 可知,CTAB 法、异硫氰酸胍法和异硫氰酸胍改良法提取 RNA 的 OD_{260/280} 分别为 2.24、2.13 和 2.14,均大于 2.0,表明提取的 RNA 纯度较低,不利于后续试验的进行。CTAB 改良法、CTAB 水饱和酚法、Trizol 改良法、Trizol 法测得的 OD_{260/280} 分别为 1.82、2.01、1.95 和 2.07,OD_{260/230} 分别为 2.12、1.96、2.11 和 2.13,说明这几种方法提取的 RNA 纯度较高。而 Tris-硼酸法测得的 OD_{260/280} 为 1.53,OD_{260/230} 为 1.50,说明 RNA 已被其他杂质严重污染,该法不能用于茴香

叶片总 RNA 的提取。此外,不同方法提取的 RNA 得率相差较大,CTAB 法、CTAB 水饱和酚法、Tris-硼酸法的得率分别为 2.256、4.592 和 2.332 μg·g⁻¹,这 3 种方法的得率很低,而用 CTAB 改良法、异硫氰酸胍法、异硫氰酸胍改良法、Trizol 法、Trizol 改良法的提取 RNA 的得率都较高,均在 55~90 μg·g⁻¹,其中以 Trizol 改良法的得率最高(87.728 μg·g⁻¹)。比较 8 种方法提取茴香叶片总 RNA 的浓度可知:CTAB 法和 Tris-硼酸法均在 100 μg·μL⁻¹ 以下,Trizol 改良法的浓度最高,为 2 193.2 μg·μL⁻¹。综合来看,CTAB 改良法提取的茴香叶片 RNA 质量最佳。

表 1 茴香叶片总 RNA 不同提取方法的纯度及得率比较

提取方法	OD _{260/280}	OD _{260/230}	浓度/ (μg·μL ⁻¹)	得率/ (μg·g ⁻¹)
CTAB 法	2.24	2.12	54.6	2.256
CTAB 改良法	1.82	2.12	1481.9	59.276
CTAB 水饱和酚法	2.01	1.96	114.8	4.592
Tris-硼酸法	1.53	1.50	58.3	2.332
异硫氰酸胍法	2.13	2.31	1843.5	73.740
异硫氰酸胍改良法	2.14	2.34	1562.7	62.508
Trizol 法	2.07	2.13	1728.2	69.128
Trizol 改良法	1.95	2.11	2193.2	87.728

2.2 不同方法提取的总 RNA 完整性比较

由图 1 可知,CTAB 改良法、CTAB-水饱和酚法提取的 RNA 的 28S 条带亮度是 18S 的 2 倍,表明这几种方法提取的茴香总 RNA 完整性较好。CTAB-水饱和酚法条带显示有 2:1 的比例,说明提取的 RNA 纯度较高,完整性较好,但其浓度和得率很低,不适合茴香 RNA 的提取;而 CTAB 改良法条带中 18S:28S 为 2:1 的比例,并且无拖带现象,说明 RNA 完整性好,可用于后续的分子试验。异硫氰酸胍法的点样槽内有基因组的荧光亮度,表明这种方法提取的 RNA 中有部分 DNA 的污染;Tris-硼酸法提取的 RNA 泳道里无电泳条带,说明该方法提取的 RNA 完整性最差。Trizol 法、Trizol 改良法、异硫氰酸胍改良法提取的 RNA 的 18S 荧光亮度和 28S 的几乎一致,甚至略高,表明这几种方法提取的 RNA 存在部分降解,完整性较差。整体而言,提取茴香叶片 RNA 的完整性最好的方法是 CTAB 改良法。

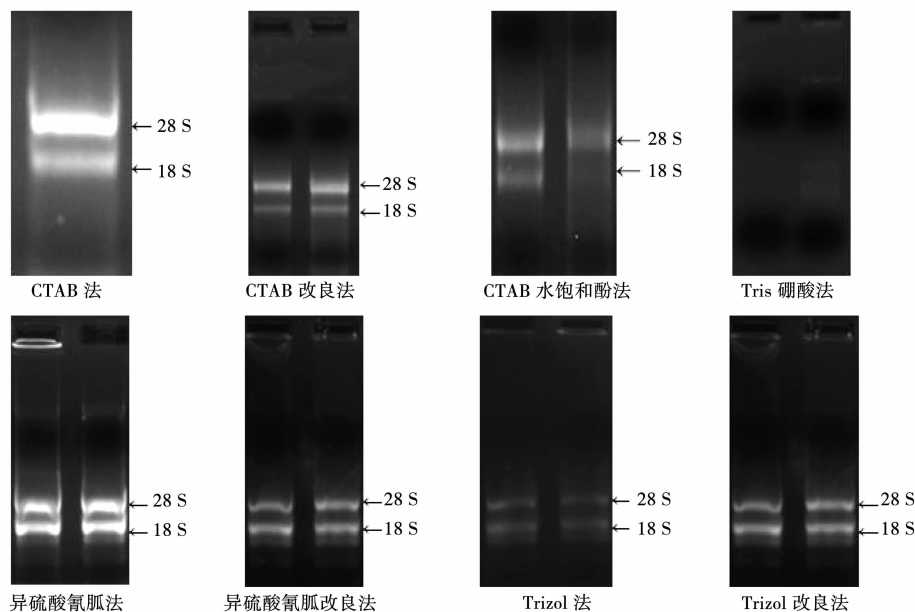


图1 不同方法提取茴香叶片总 RNA 电泳图

3 讨论与结论

RNA 的提取质量对相关分子生物学试验研究至关重要^[11-12]。现有关植物总 RNA 提取方法的研究及报道很多,但植物的组成成分相差甚高^[13-15],为确保获得高质量的 RNA,对某些方法有针对性地进行改良显得尤为重要。

本研究通过对 8 种提取茴香叶片 RNA 的不同方法的效果进行比较,得出最适方法。在试验中,CTAB 改良法提取 RNA 效果最佳,得到的 RNA 浓度为 $1\,481.9\,\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,得率为 $59.276\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $\text{OD}_{260/280}$ 为 1.82, $\text{OD}_{260/230}$ 为 2.12,不论是得率、纯度还是完整性都最佳,有利于后续试验的进行。CTAB 法、CTAB 改良法及 CTAB 水饱和酚法的电泳结果显示其完整性较高,说明 CTAB 抽提液有利于保护茴香叶片的 RNA。异硫氰胍法、异硫氰胍改良法、Trizol 法、Trizol 法改良法提取 RNA 的浓度较高,但电泳条带中 28S 和 18S 的亮度没有明显的 2:1 比例,存在降解和污染等问题。这可能与异硫氰胍裂解液有关,因为提取流程与 CTAB 法相差不大,表明这些方法不适合茴香叶片 RNA 的提取;Trizol 改良法提取 RNA 的纯度、得率及完整性都优于 Trizol 法,但均无明显的 28S 和 18S 条带 2:1 比例,说明提取的 RNA 质量也不高。Trizol 试剂提取榕树和葡萄等其他植物 RNA 的效果较好,但对于茴香 RNA 的提取效果不理想,推测试验操作可能不规范,导致杂质未去除完全,或是在电

泳时由于电泳仪散热导致其降解等原因。而 Tris-硼酸法未提取到 RNA,且该方法在试验中出现些许白色物质,推断是由于在研磨时叶片的组成成分与 RNA 没有充分分离,也可能是茴香叶片 RNase 活性较高,在 RNA 得率少的基础上又逐渐降解,最终导致无法提取到 RNA,所以 Tris-硼酸法不适合茴香叶片的 RNA 提取。综合来看,CTAB 改良法是提取茴香叶片 RNA 的最适宜方法。

参考文献:

- [1] 王晓敏,李军,高艳明,等. 茴香研究进展[J]. 河北农业科学,2013(17):37-40.
- [2] 王晓敏,高艳明,李建设,等. 茴香的种植及应用研究进展[J]. 安徽农学通报,2013(19):17-43.
- [3] 赵秀玲. 小茴香生理活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(4):382-386,389.
- [4] 陈芳洁,王恺,王玥. 小茴香诱导向日葵列当种子萌发的研究[J]. 北方园艺,2018(15):5-12.
- [5] 邹俊波,张小飞,邵佳,等. 水蒸气蒸馏法提取小茴香挥发油类成分的提取动力学研究[J]. 中草药,2018,49(12):2855-2865.
- [6] 史宝胜,卓丽环. 紫叶李叶片总 RNA 提取方法的改进与比较[J]. 分子植物育种,2006(5):721-725.
- [7] 张恺恺,李清,惠楠,等. 红豆杉总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2019,17(18):5993-5999.
- [8] 望飞勇,何勇,许本波,等. 草坪植物 RNA 提取方法的比较研究[J]. 长江大学学报,2007(1):56-59.
- [9] 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(28):129-133.
- [10] 尹慧,陈莉,李晓艳. 百合叶片总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 中国农业大学学报,2008(13):41-45.



王冰洁,王军,李之丽,等.不同冬枣品种在豫东地区引种栽培试验[J].黑龙江农业科学,2021(8):51-54.

不同冬枣品种在豫东地区引种栽培试验

王冰洁,王 军,李之丽,郭玉华,杨秋慧,赵卫华

(太康县林业科学研究所,河南 太康 461400)

摘要:为筛选适宜豫东地区种植的优良冬枣品种,促进当地冬枣产业发展,研究对引进冬枣品种(沾化冬枣、沾化冬枣2号、沧冬1号、大荔冬枣)的物候期、生长结果特性、果实经济性状及品质进行测定,对其在豫东地区的适应性进行评价。结果表明:4个引进的冬枣品种在豫东地区均能正常生长结果,完成正常的生长周期。沾化冬枣及大荔冬枣果实平均单果重较小,丰产、适应性强;沾化冬枣2号、沧冬1号均为短枝型,果实大,肉质脆甜,易管理,丰产性好;综合物候期、结果生长特性、果实经济性状及部分外观、内在品质指标,初步筛选出沾化冬枣2号和沧冬1号为适宜豫东地区立地条件下的冬枣品种。

关键词:冬枣品种;豫东地区;引种栽培

冬枣(*Ziziphus jujuba*)是无刺枣晚熟鲜食栽培品种,皮薄而脆、肉质细嫩,富含各种维生素及钾、钠、铁、铜等多种微量元素,特别是VC的含量,鲜果含VC 333 mg·100 g⁻¹^[1],营养价值极高,

是落叶果树中的高档鲜食水果品种,市场发展前景广阔,具有重要的栽培推广价值。

豫东地区是中原农耕文化的发源地,枣的栽培历史由来已久,气候特点适宜枣树栽培,太康县域内现存有百年以上树龄的散生古枣树18株,古枣树群2处^[2-4]。冬枣是一种喜光性强的树种,对温度、光照等气候因素也有较高的要求。豫东地区年平均气温14.5℃,年日照时数大于2 000 h,

收稿日期:2021-04-03

作者简介:王冰洁(1972—),男,学士,高级工程师,从事经济林研究及林业技术推广工作。E-mail:807325398@qq.com。

[11] 田伟,田义轲,宋伟,等.苹果组织总RNA提取方法的比较研究[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2010(2):122-125.

[12] 张燕梅,周文钊,李俊峰.剑麻不同组织RNA提取方法比较分析[J].分子植物育种,2010(1):201-208.

[13] 张彦苹,王晨,于华平,等.适于葡萄不同组织RNA提取方

法的筛选[J].西北农业学报,2010(11):135-140.

[14] 赖茜,余迪求.4种榕树总RNA提取方法的比较[J].云南大学学报,2008,30(6):636-640.

[15] 申世刚,高燕霞,王峰山,等.一种梨树组织RNA提取方法[J].河北大学学报(自然科学版),2018,38(4):392-395.

Comparison of Total RNA Extraction Methods from Fennel Leaves

WANG Lin, WANG Xiao-min, LI Xia, GUO Li-wen, KONG Wei-kang, PAN Bing-qing

(School of Agriculture, Ningxia University/Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia/Ningxia Facility Horticulture (Ningxia University) Technology Innovation Center/Ningxia Modern Facility Horticulture Engineering Technology Research Center, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to promote the study of molecular biology of fennel, the leaves of fennel in Haiyuan of Ningxia were used as experimental materials, we used CTAB method, CTAB improved method, CTAB water saturated phenol method, Tris-boric acid method, cyanoguanidine isosulfate method, cyanoguanidine isosulfate improved method, Trizol method and Trizol improved method to extract RNA from fennel leaves, and compared their extraction effects. The results showed that the quality of RNA extracted by CTAB improved method was the best, and its concentration was 1 481.9 μg·μL⁻¹, OD_{260/280} and OD_{260/230} were 1.82 and 2.12, respectively. The agarose gel electrophoresis showed that the bands were clear and intact without tailing. The quality of RNA extracted by Trizol method, improved Trizol method and cyanoguanidine isosulfate method was high, but the integrity was poor. CTAB method, CTAB water saturated phenol method and cyanoguanidine isosulfate improved method were poor in RNA extraction. The quality of RNA extracted by Tris-boric acid method was the worst.

Keywords: fennel leaf; total RNA; extraction method