



铁皮石斛总RNA提取方法的比较研究

赵聪慧, 俞振明, 何春梅, 王浩斌, 司灿, 张明泽, 段俊

引用本文:

赵聪慧, 俞振明, 何春梅, 等. 铁皮石斛总RNA提取方法的比较研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(5): 479–486.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4202>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

檀香心材总RNA提取方法的比较研究

Comparison of Several RNA Extracting Methods from Heartwood of *Santalum album*

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 20–25 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3627>

福建泰宁野生铁皮石斛种群的 ISSR 亲缘关系分析

Genetic Relationships among Wild *Dendrobium officinale* Populations in Taining, Fujian by ISSR

热带亚热带植物学报. 2016, 24(3): 259–266 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.003>

太空诱变对金钗石斛光合特性和生长的影响

Effects of Space Mutation on Photosynthetic Characteristics and Growth of *Dendrobium nobile*

热带亚热带植物学报. 2017, 25(5): 480–488 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3720>

授粉方式对铁皮石斛种质座果及种子萌发的影响

Effects of Artificial Pollination on Fruit Setting and Seed Germination of *Dendrobium officinale* Germplasms

热带亚热带植物学报. 2018, 26(1): 65–72 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3794>

瘤菌根菌对铁皮石斛根系形态的影响及其共生关系的研究

Effect of *Epulorhiza* sp. on Root Morphology of *Dendrobium officinale* and Their Symbiotic Relationship

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 124–130 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4093>

铁皮石斛花总 RNA 提取方法的比较研究

赵聪慧^{1,2}, 俞振明¹, 何春梅¹, 王浩斌^{1,2}, 司灿^{1,2}, 张明泽^{1,2}, 段俊^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院核心植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为筛选铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)花总 RNA 提取方法, 对 8 种提取方法进行了比较研究, 包括改良 CTAB-LiCl 法(M1)、改良 CTAB-异丙醇法(M2)、改良 SDS-LiCl 法(M3)、改良 SDS-异丙醇法(M4)、多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒法(M5)、柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒法(M6)、RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M7)和 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M8)。结果表明, 以 M4 和 M5 提取的总 RNA 带型清晰, 完整性好, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 大于 2.0, RNA 产率分别为 (159.45 ± 1.45) 和 $(170.84 \pm 3.53) \mu\text{g/g}$ 。利用 M4、M5 提取霍山石斛、金钗石斛、鼓槌石斛和美花石斛花的总 RNA, 样品的完整性、浓度和纯度均符合质量要求。以 M4、M5 提取的铁皮石斛总 RNA 为模板, 扩增 *Actin* 基因片段, 扩增产物大小与预期一致且条带单一。这说明 M4、M5 方法操作简便, 结果重复性好, 能够较好地提取石斛属植物花的总 RNA。

关键词: 铁皮石斛; RNA; 改良 SDS-异丙醇法; 提取方法

doi: 10.11926/jtsb.4202

Comparison of Several Total RNA Extraction Methods from Flowers of *Dendrobium officinale*

ZHAO Cong-hui^{1,2}, YU Zhen-ming¹, HE Chun-mei¹, WANG Hao-bin^{1,2}, SI Can^{1,2}, ZHANG Ming-ze^{1,2}, DUAN Jun^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Center of Economic Botany, Core Botanical Gardens, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to screen total RNA extraction method from flowers of *Dendrobium officinale*, eight methods were compared, including improved CTAB-LiCl method (M1), improved CTAB-isopropanol method (M2), improved SDS-LiCl method (M3), improved SDS-isopropanol method (M4), Quick RNA Isolation Kit (Huayueyang, China; M5), Column Plant RNAout 2.0 Kit (Tianzhang, China; M6), RNAprep Pure Plant Plus Kit (Tiangen, China; M7) and Plant Total RNA Extraction Kit (Biospin, China; M8). The results showed that the integrity of total RNA extracted using M4 and M5 was good, with distinct electrophoresis bands of 28S and 18S rRNA. The spectrophotometric values of $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ranged from 1.8 to 2.0, and the $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ value was more than 2.0. The yields of total RNA extracted using M4 and M5 were (159.45 ± 1.45) and $(170.84 \pm 3.53) \mu\text{g/g}$, respectively. Additionally, the total RNA of *D. huoshanense*, *D. nobile*, *D. chrysotoxum* and *D. loddigesii* extracted by M4 and M5 was verified to meet the quality requirements on integrity, purity and concentration. The total RNA of *D. officinale* extracted by M4 and M5 was used as template, and the amplified *Actin* gene showed a single band, consisting with the prediction. Therefore, M4 and M5 were effective methods to extract total RNA from flowers of *Dendrobium* plants, especially *D. officinale*.

收稿日期: 2020-02-10 接受日期: 2020-04-15

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000406); 国家自然科学基金项目(31871547)资助

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2018YFD1000406), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31871547).

作者简介: 赵聪慧(1995~), 女, 在读硕士, 主要从事铁皮石斛分子生物学方面的研究。E-mail: zhacongghui@scbg.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

Key words: *Dendrobium officinale*; RNA; Improved SDS-isopropanol method; Extraction method

石斛属(*Dendrobium*)隶属兰科(Orchidaceae)树兰亚科(Epidendroideae), 是兰科最大的属之一, 具有极高的观赏价值, 因其花香奇特、花朵秀丽、花形迷人与色泽鲜艳享誉世界, 被称为世界“四大观赏洋兰”之一^[1-2]。铁皮石斛(*D. officinale*)是珍稀的药食同源传统贵细中药材, 主要以干燥茎入药, 具有滋阴清热、益胃生津、抗氧化、抗衰老、增强免疫力等功效^[3], 是石斛属中最为珍稀名贵的品种。对石斛属植物的化学研究主要集中在茎、叶的多糖、石斛碱、黄酮等成分上^[4-5], 而对于石斛花的研究较少。

铁皮石斛花为可食用部分, 产量丰富, 具有很大的资源开发空间, 在民间被广泛加工成花茶饮用。花香是观赏植物重要的审美和商品性状之一, 作为信号物质, 具有招引昆虫授粉等重要生态功能^[6]。石斛属植物花香的研究报道较少, 铁皮石斛的花香物质以萜类、脂肪族、芳香族化合物为主, 尤其是蒎烯、柠檬烯、桉油素、芳樟醇、 α -松油醇等单萜化合物^[7]。鼓槌石斛的主要花香物质是 α -蒎烯、 β -罗勒烯、苯乙醛和乙酸辛酯^[8]。铁皮石斛花中富含多糖、挥发油、多酚类、花色素和黄酮类物质^[7,9-11], 与茎、叶相比, 花中总黄酮、总酚类物质含量更高, 具有较高的抗氧化活性, 而且还富含精氨酸等人体必需的氨基酸^[10,12]。然而, 关于石斛属植物花中化合物合成的分子机理还不清楚, 参与其合成的相关基因也鲜有报道^[13-14]。因此, 亟需开展花中化合物成分分析、生物合成途径及关键物质合成的分子机制研究, 以便更好地开发利用石斛花资源。

高质量、高纯度 RNA 提取是植物分子生物学研

究的基础, 如 Real-Time PCR 分析、Northern 杂交分析、目的基因克隆、cDNA 文库构建等都需要高质量的 RNA。常用的植物总 RNA 提取方法有 TRIZOL 法^[15]、CTAB 法^[16]、SDS 法^[17]、异硫氰酸胍法^[18]和试剂盒法^[19]等。目前, 以上方法均已应用于铁皮石斛茎的总 RNA 提取^[10-11], 但是不同植物或同种植物不同组织所含的成分存在较大差异, 铁皮石斛花的总 RNA 提取方法必须通过实验才能确定。

因此, 本研究针对铁皮石斛花中黄酮、多糖、多酚等次生代谢物质含量高的特点, 通过比较改良 CTAB-LiCl 法、改良 CTAB-异丙醇法、改良 SDS-LiCl 法、改良 SDS-异丙醇法以及试剂盒法等 8 种方法提取的总 RNA 质量, 筛选并确定铁皮石斛花的总 RNA 提取方法, 为铁皮石斛花香物质合成酶基因的表达、调控及其相关的分子生物学研究提供技术手段。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究使用的 5 种石斛属植物花朵均采自广东省广州市中国科学院华南植物园石斛育种基地(25.14° N, 113.35° E), 包括气味略轻颜色淡黄的铁皮石斛(*Dendrobium officinale*, 图 1)、香气浓郁色彩明黄的鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)、花呈淡黄绿色的霍山石斛(*D. huoshanense*)、气味芬芳颜色明艳的金钗石斛(*D. nobile*)和美花石斛(*D. loddigesii*), 于盛花期(2019 年 4-5 月)的晴天上午 11:00 每个品种随机采摘 10 朵以上, 设 3 次生物学重复, 置于-80℃冰箱保存备用。



图 1 铁皮石斛花

Fig. 1 Flowers of *Dendrobium officinale*

1.2 仪器和试剂

十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, THAM]、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、十六烷基三乙基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)购自天津市科密欧化学试剂有限公司, 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(货号: 0416-50)购自北京华越洋生物科技有限公司, 柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒(货号: 90404-50)购自北京天恩泽基因科技有限公司, RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(货号: DP441)购自天根生化科技有限公司, Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(货号: BSC65S1)购自杭州博日科技有限公司, RNA 提取酚试剂(货号: W0250)购自北京索莱宝科技有限公司, M-MLV 反转录试剂盒(货号: M1701)购自美国 Promega 公司, 铁皮石斛 *Actin* 基因引物由北京擎科生物科技公司合成, 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone 40, PVP-40)、无水乙醇、三氯甲烷、 β -巯基乙醇、异丙醇、氯化钠等化学试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

试验所用试剂瓶、研钵、镊子、药匙等非塑料制品在 180℃ 下烘烤 8 h 后使用, 塑料制品及试剂经 0.1% (W/V) DEPC 水处理 12 h, 121℃ 高压灭菌 30 min 后, 烘干备用。

1.3 花的总 RNA 提取方法

研究共采用了 8 种提取方法: 改良 CTAB-LiCl 法(M1)、改良 CTAB-异丙醇法(M2)、改良 SDS-LiCl 法(M3)、改良 SDS-异丙醇法(M4)、多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒法(M5)、柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒法(M6)、RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M7)、Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M8)。

改良 CTAB-LiCl 法(M1) 参照 Zeng 等^[20]的方法并适当修改。称取 500 mg 新鲜花朵, 在液氮中快速研磨成粉末, 转移至 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 65℃ 预热的 CTAB 裂解液[2% CTAB (W/V), 2 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH=8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 2% β -巯基乙醇(使用前加入)], 65℃ 水浴 15 min, 期间上下颠倒 3~5 次。加入 900 μ L 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, V/V), 剧烈振荡 30 s, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 10 min, 将上清液转移到新

的离心管中, 加入 800 μ L 氯仿/异戊醇(24:1, V/V), 剧烈振荡 30 s, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 10 min, 将上清液转移到新的离心管中。加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl, 于 4℃ 冰箱中静置过夜, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 30 min 沉淀 RNA, 弃上清, 沉淀用 75% 乙醇漂洗 2 次, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 5 min, 弃上清, 风干后, 加入 40 μ L DEPC 水溶解 RNA, 于 -80℃ 冰箱保存。

改良 CTAB-异丙醇法(M2) 参照张力鹏等^[21]的方法并适当修改。称取 500 mg 新鲜的铁皮石斛花朵, 液氮中研磨成粉末后迅速转入含有 500 μ L CTAB 提取液[2% CTAB (W/V), 2% PVP-40 (W/V), 0.045% 亚精胺(W/V), 2.5 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH=8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 2% β -巯基乙醇(使用前加入)]中, 65℃ 水浴 5 min, 加入 250 μ L 氯仿, 剧烈振荡, 于 4℃ 下 13 000×g 离心 5 min, 取上清液加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V), 剧烈振荡, 于 4℃ 下 13 000×g 离心 5 min, 取上清液加入等体积的异丙醇, 温和混匀后, -40℃ 冰箱放置 30 min, 于 4℃ 下 13 000×g 离心 10 min, RNA 沉淀漂洗方法与 M1 相同。

改良 SDS-LiCl 法(M3) 参照 Liu 等^[22]的方法并适当修改。称取 100 mg 新鲜的铁皮石斛花朵, 加液氮充分研磨, 加入 RNA 提取缓冲液[1% SDS (W/V), 4% PVP-40 (W/V), 250 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH=8.0), 50 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)], 迅速混匀后室温放置 5 min, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 5 min。将上清液转移到新的离心管中, 加入 700 μ L 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, V/V), 温和混匀后, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 5 min, 将上清液转移到新的离心管中, 加入 600 μ L 氯仿/异戊醇(24:1, V/V), 剧烈振荡 30 s, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 5 min, 将上清液转移到新的离心管中。加入 500 μ L 10 mol/L LiCl, 冰上放置 60 min, 于 4℃ 下 12 000×g 离心 10 min, RNA 沉淀漂洗方法与 M1 相同。

改良 SDS-异丙醇法(M4) 参照 Cheng 等^[17]的方法并适当修改。称取 100 mg 新鲜的铁皮石斛花朵, 液氮中研磨成粉末后迅速转入含有 1 mL 65℃ 预热的 SDS 提取液[10% SDS (W/V), 1 mol/L NaCl, 2.5 mol/L Tris-HCl (pH=7.4), 100 mmol/L EDTA (pH=8.0), 4% β -巯基乙醇(使用前加入)]中, 充分涡旋混匀, 65℃ 水浴 20 min, 期间上下颠倒 3~5 次, 于 4℃ 下 13 000×g 离心 10 min。将上清液转移

到新的离心管中, 加入 1/2 体积的 RNA 提取酚试剂, 充分颠倒混匀, -20°C 冰箱放置 10 min, 于 4°C 下 $13\,000\times g$ 离心 10 min。将上清液转移到新的离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V), 颠倒混匀, 于 4°C 下 $13\,000\times g$ 离心 10 min。将上清液转移到新的离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, -20°C 放置 30 min, 于 4°C 下 $13\,000\times g$ 离心 30 min, RNA 沉淀漂洗方法与 M1 相同。

多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒法(M5)、柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒法(M6)、RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M7)、Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法(M8)均按照说明书要求进行。

1.4 RNA 质量浓度检测

提取的 RNA 采用 Nano DropTM 2000c 核酸蛋白分析仪(Thermo Scientific 公司)进行测定, 样品检测量为 $1\ \mu\text{L}$, 记录样品的 $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$ 和 $A_{260\ \text{nm}}/A_{230\ \text{nm}}$ 值和浓度, 并计算 RNA 产率($\mu\text{g/g}$)=RNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) \times 稀释倍数 \times RNA 样品体积(μL)/样品质量(mg)。RNA 条带完整性使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, $4.5\ \mu\text{L}$ 样品与 $0.5\ \mu\text{L}$ $10\times$ Loading Buffer (TaKaRa 公司)混匀后点样, 180 V 电压电泳 10 min, 用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.5 RT-PCR 检测

将 M4 和 M5 方法提取的 RNA, 按照反转录酶 M-MLV 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA, 以该 cDNA 为模板, 以铁皮石斛 *Actin* (NCBI 登录号: JX294908)^[23] 为内参基因进行扩增。正向引物: 5'-A-TATGCTAGTGGCCGCACAA-3'; 反向引物: 5'-GC-GGCTTCCATTCCAATCAG-3'。25 μL PCR 反应体系为: Yeasen PCR Master Mix 12.5 μL , 正向引物 1 μL , 反向引物 1 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。扩增程序为: 94°C 预变性 3 min, 98°C 变性 10 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。取 4.5 μL PCR 产物, 加入与 0.5 μL $10\times$ Loading Buffer 混匀后上样, 于 1% 琼脂糖凝胶仪上 150 V 电压电泳 15 min, 用凝胶成像系统观察电泳结果并拍照。

1.6 其他石斛属植物总 RNA 提取

采用 M4 和 M5 方法分别提取霍山石斛、金钗

石斛、鼓槌石斛、美花石斛花朵的总 RNA, 检测完整性、纯度和浓度。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 完整性检测

凝胶电泳是一种简便、适用的鉴定评估 RNA 完整性的方法, 通过凝胶图像可判断 RNA 有无降解以及降解程度。从图 2 可见, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, M8 未见明显条带, 效果不佳; M3、M6 和 M7 提取的 RNA 条带较弱, 浓度低, 可能在提取或者电泳过程中 RNA 发生了部分降解; 其余提取方法均显示出较为明显的条带, 其中 M1 提取的 RNA 条带亮度较高, 但条带较为弥散不清晰且具有拖带现象, 存在蛋白和多糖污染情况, 可能由于样品中多糖多酚含量较高, 提取液中 CTAB 未能将其全部聚合形成复合物沉淀从而未与核酸更好地分离; M2 和 M4 方法条带较为清晰, 尽管 M2 提取的 RNA 中 28S 和 18S 条带明暗差距更为明显, 但是 M4 提取的 RNA 中 28S 条带亮度明显高于 18S; M5 方法条带清楚且无拖带, 重复性也较好。因此, 比较 8 种提取方法, M4、M5 提取的 RNA 完整性较好。

2.2 总 RNA 浓度与纯度的检测

高质量 RNA 的 $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$ 应介于 1.8~2.0 之间, $A_{260\ \text{nm}}/A_{230\ \text{nm}}$ 应大于 2.0。通过 Nano Drop 2000 核酸蛋白检测仪对 8 种方法提取铁皮石斛花的总 RNA 进行浓度和纯度检测(表 1), M4 方法所得的总 RNA 浓度最高, 为 $(199.31\pm 5.68)\ \text{ng}/\mu\text{L}$; M5 的次之 $[(142.30\pm 4.66)\ \text{ng}/\mu\text{L}]$; M2、M3、M6、M7 的为 $(46.42\pm 4.84)\sim(66.37\pm 2.47)\ \text{ng}/\mu\text{L}$, 效果一般; M8 的仅为 $(16.20\pm 1.23)\ \text{ng}/\mu\text{L}$, 无法满足后续试验要求。除 M2、M6、M8 提取的总 RNA 的 $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$ 不符合要求外, 其余方法均在 1.8~2.0 之间, M1、M6 提取的总 RNA 的 $A_{260\ \text{nm}}/A_{230\ \text{nm}}$ 低于 2.0, 其余方法的均高于 2.0, 说明样品中来自蛋白、酚类、糖类等的污染较少, 提取的 RNA 质量较为可靠。因此, M4 和 M5 是最优的 2 种方法。

2.3 内参基因的 RT-PCR 扩增

为进一步验证所提取 RNA 的完整性, 使用 Promega 公司的 M-MLV 反转录试剂盒, 将 M4、M5 方法提取的 RNA 进行反转录, 以 cDNA 第一条链

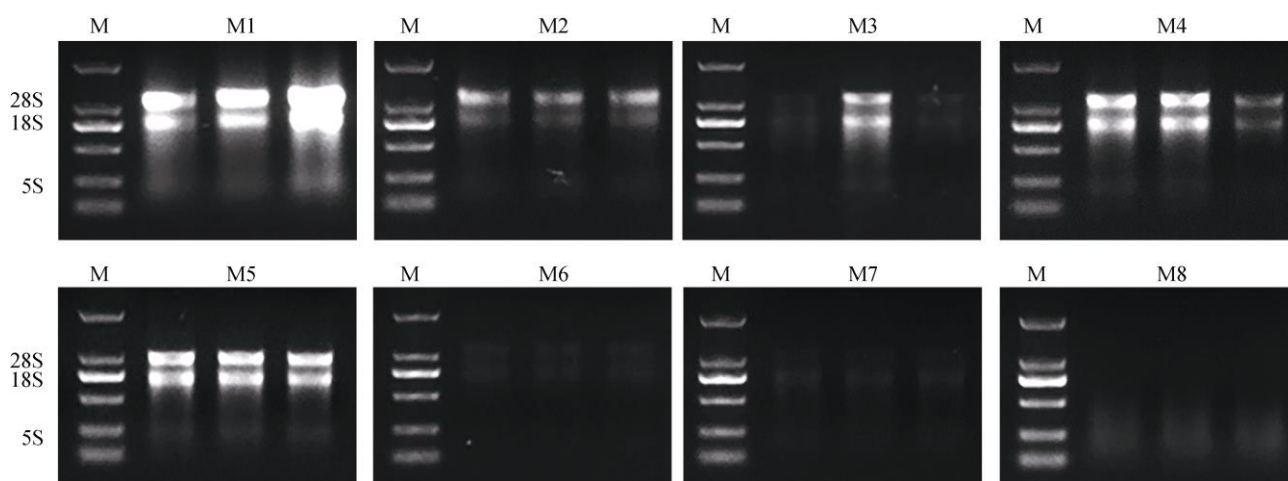


图 2 8 种方法提取铁皮石斛花朵总 RNA 的电泳图。M: DNA marker; M1: 改良 CTAB-LiCl 法; M2: 改良 CTAB-异丙醇法; M3: 改良 SDS-LiCl 法; M4: 改良 SDS-异丙醇法; M5: 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒法; M6: 柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒法; M7: RNeasy Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法; M8: Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒法。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted by eight different protocols from *Dendrobium officinale* flowers. M: DL2000 marker; M1: Improved CTAB-LiCl method; M2: Improved CTAB-isopropanol method; M3: Improved SDS-LiCl method; M4: Improved SDS-isopropanol method; M5: Quick RNA Isolation Kit; M6: Column Plant RNAout 2.0; M7: RNeasy Pure Plant Plus Kit; M8: Plant Total RNA Extraction Kit.

表 1 8 种方法提取的铁皮石斛 RNA 的浓度、纯度和产率

Table 1 Yield, purity and concentration of total RNA extracted by using eight different protocols from *Dendrobium officinale* flowers

| 方法 Method | $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ | $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ | 浓度 Concentration (ng/ μL) | 产率 Yield ($\mu\text{g/g}$) |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| M1 | 1.83 ± 0.01 | 1.76 ± 0.11 | $135.70 \pm 3.73\text{b}$ | $108.56 \pm 2.40\text{c}$ |
| M2 | 2.03 ± 0.18 | 2.14 ± 0.29 | $66.37 \pm 2.47\text{c}$ | $53.09 \pm 5.17\text{d}$ |
| M3 | 1.95 ± 0.13 | 2.01 ± 0.52 | $53.60 \pm 6.93\text{c}$ | $42.88 \pm 7.89\text{d}$ |
| M4 | 1.89 ± 0.09 | 2.15 ± 0.05 | $199.31 \pm 5.68\text{a}$ | $159.45 \pm 1.45\text{b}$ |
| M5 | 1.92 ± 0.23 | 2.16 ± 0.07 | $142.30 \pm 4.66\text{b}$ | $170.84 \pm 3.53\text{a}$ |
| M6 | 2.07 ± 0.03 | 1.85 ± 0.21 | $50.35 \pm 3.32\text{c}$ | $60.62 \pm 3.26\text{d}$ |
| M7 | 1.92 ± 0.15 | 2.16 ± 0.03 | $46.42 \pm 4.84\text{c}$ | $55.70 \pm 5.67\text{d}$ |
| M8 | 2.10 ± 0.02 | 2.08 ± 0.13 | $16.20 \pm 1.23\text{d}$ | $19.44 \pm 0.98\text{e}$ |

同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Data followed different letters within column indicate significant difference at 0.05 level.

为模板设计铁皮石斛内参基因 Actin (NCBI 登录号: JX294908)的特异性引物进行扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 3), 可见, 两种方法提取的 RNA, 经反转录后 PCR 扩增产物片段均为 250~500 bp, 与预期目的片段 390 bp 相符, 且条带清晰、单一, 亮度较高, 说明 SDS-异丙醇法(M4)和华越洋试剂盒法(M5)均能用于 RT-PCR 反应等以 RNA 为基础的分子生物学研究分析。

2.4 石斛属植物 RNA 的提取

采用 M4 和 M5 对 4 种常见的石斛属植物(霍山石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、美花石斛)进行总 RNA

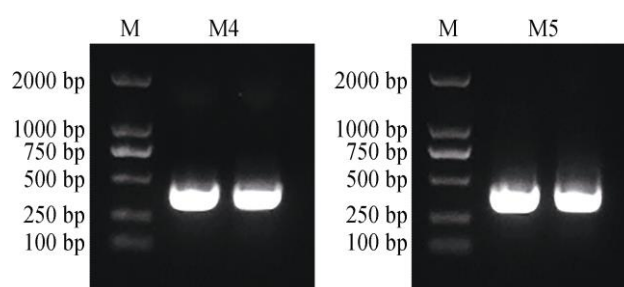


图 3 铁皮石斛 Actin 基因的 RT-PCR 电泳图。M: DNA marker; M4: 改良 SDS-异丙醇法; M5: 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒法。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of Actin gene from *Dendrobium officinale*. M: DL2000 marker; M4: Improved SDS-isopropanol method; M5: Quick RNA Isolation Kit.

提取(图 4)。两种方法提取的 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳均得到清晰无弥散的条带, 说明蛋白质、酚类、糖类杂质去除效果较好, 所得 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 介于 1.8~2.0 之间, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 大于

2.0, 且 RNA 浓度均高于 100 ng/ μL 。因此, M4 和 M5 方法能够提取出高质量、符合要求的霍山石斛、金钗石斛、鼓槌石斛、美花石斛花中的总 RNA, 也可为兰科石斛属其他植物花的 RNA 提取提供参考。

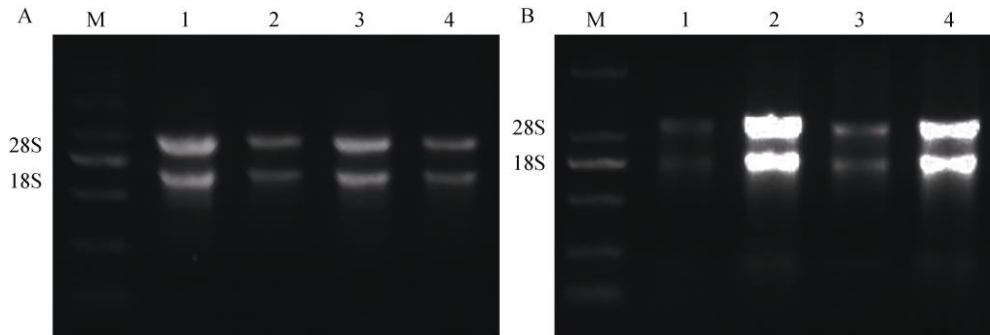


图 4 4 种石斛属植物花的总 RNA 电泳图。A: M4; B: M5; M: DNA marker; 1: 鼓槌石斛; 2: 霍山石斛; 3: 金钗石斛; 4: 美花石斛。

Fig. 4 Gel electrophoresis of flower total RNA from four *Dendrobium* plants. A: M4; B: M5; 1: *D. chrysotoxum*; 2: *D. huoshanense*; 3: *D. nobile*; 4: *D. loddigesii*.

3 结论和讨论

无论是关键基因克隆、Real-Time PCR 分析, 还是高通量测序等分子生物学研究, 获取纯度高、完整性好、浓度高的 RNA 是研究开展的前提。石斛属植物花朵在生长过程中会大量富集挥发油、多酚类、花色素和黄酮类等多种次生代谢产物以及蛋白质和多糖等有机大分子^[7-12,14]。其中, 多酚类物质易氧化成醌, 与 RNA 发生不可逆结合, 在有机溶剂抽提过程中会与部分 RNA 结合而流失^[20,22], 影响 RNA 提取产率。多糖与 RNA 的理化性质相似, 在沉淀 RNA 过程中易形成黏胶状沉淀, 导致所得 RNA 难溶于水, 或溶解后溶液粘稠^[17,20-22], RNA 产率降低, 此外, 多糖可以抑制下游酶的反应活性^[17-18], 被污染的 RNA 难以进行后续分子生物学研究。因此, 在石斛属植物(铁皮石斛)花朵的总 RNA 提取过程中, 有效去除 DNA、蛋白质和多糖、多酚等次生代谢产物干扰, 抑制 RNA 酶活性是提取纯度高、完整性好、浓度大 RNA 的关键所在。

本研究采用改良 SDS-异丙醇法(M4)以 SDS、高浓度 NaCl 和 β -巯基乙醇作为 RNA 抽提液的主要成分, 经过水饱和酚、氯仿/异戊醇抽提, 将绝大多数多糖、酚类物质留在有机相, 再经异丙醇低温孵育, 从而获得完整性好、纯度高的 RNA。其中, SDS 是一种阴离子表面活性剂, 使蛋白质变性, 细胞膜裂解, 让核酸溶解于裂解液中, 与 β -巯基乙醇共同

作用抑制 RNA 酶和 DNA 酶活性^[17,24]。水饱和酚使蛋白质变性, 也抑制了 RNA 酶的降解作用。氯仿抽提加速水相与有机相分层, 去除核酸溶液中的微量酚^[15,22]。相比较 M3, M4 提取铁皮石斛花朵的 RNA 浓度、纯度都较高, 主要原因可能是 LiCl 在与 RNA 反应的同时, 也可能与多糖、多酚类物质结合沉淀, 导致 RNA 部分流失。

前人研究表明, 试剂盒具操作简便、提取时间短的优势, 可用于多糖多酚含量高的植物总 RNA 提取。M5 对菊花根尖^[25]和花瓣^[26]、M6 对铁皮石斛茎和叶^[23]的总 RNA 提取效果较好。本研究比较了 4 种试剂盒(M5、M6、M7、M8)提取铁皮石斛花总 RNA 的效果, 仅 M5 可获得完整性好、纯度高的 RNA。M6、M7、M8 提取的效果较差, 这可能是因为铁皮石斛花富含多糖、黄酮、多酚等物质, 在 RNA 提取过程中通过滤膜难于将杂质与核酸分离, 易使小分子 RNA 丢失, 导致总 RNA 浓度降低。此外, M5 提取铁皮石斛花 RNA 的过程中, 适当延长孵育时间可以增加 RNA 裂解液与植物细胞接触, 促进细胞充分裂解、释放 RNA。

综上所述, 改良 SDS-异丙醇法(M4)、多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(M5)能有效从石斛属植物(铁皮石斛、鼓槌石斛、霍山石斛、金钗石斛、美花石斛)花朵中提取纯度较高、完整性较好的 RNA, 所提取的总 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 大于 2.0, 电泳的 28S、18S 条带清晰。Real-

time PCR 结果表明, M4 和 M5 提取的总 RNA 纯化后可用于铁皮石斛花香合成的关键酶基因克隆等后续分子生物学试验。本研究结果可为富含多糖、黄酮、花色苷、多酚类物质的其他植物材料的 RNA 提取提供参考。

参考文献

- [1] ZHU G F, GUO Z F. Progress on molecular biology of main ornamental Orchidaceae [J]. *Chin Bull Bot*, 2004, 21(4): 471–477. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2004.04.012.
朱根发, 郭振飞. 重要观赏兰科植物的分子生物学研究进展 [J]. *植物学通报*, 2004, 21(4): 471–477. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2004.04.012.
- [2] JING X J, HU F R. Research progress of Orchidaceae [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, 16(15): 5080–5092. doi: 10.13271/j.mpb.016.005080.
景袭俊, 胡凤荣. 兰科植物研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(15): 5080–5092. doi: 10.13271/j.mpb.016.005080.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume II [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 282–283.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282–283.
- [4] ZHANG M Z, HE C M, WANG H B, et al. Advances in active polysaccharides in medicinal plants of Orchidaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2019, 27(5): 611–622. doi: 10.11926/jtsb.4073.
张明泽, 何春梅, 王浩斌, 等. 兰科药用植物活性多糖研究进展 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(5): 611–622. doi: 10.11926/jtsb.4073.
- [5] DONG W, HE C M, YU Z M, et al. Dynamic changes in alcohol soluble components and six kinds of substances from *Dendrobium officinale* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2017, 25(4): 370–378. doi: 10.11926/jtsb.3703.
董伟, 何春梅, 俞振明, 等. 铁皮石斛醇溶性浸出物和六类物质的动态变化研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2017, 25(4): 370–378. doi: 10.11926/jtsb.3703.
- [6] BYERS K J R P, VELA J P, PENG F, et al. Floral volatile alleles can contribute to pollinator-mediated reproductive isolation in monkey-flowers (*Mimulus*) [J]. *Plant J*, 2014, 80(6): 1031–1042. doi: 10.1111/tpj.12702.
- [7] LÜ S H, XU M, ZHANG X F, et al. Studies on volatile constituents of 11 families of *Dendrobium officinale* flowers [J]. *China J Exp Trad Med For*, 2016, 22(6): 52–57. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060052.
吕素华, 徐萌, 张新风, 等. 11 个铁皮石斛杂交家系鲜花的挥发性成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 52–57. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060052.
- [8] HUANG X L, ZHENG B Q, WANG Y. Study of aroma compounds in flowers of *Dendrobium chrysotoxum* in different florescence stages and diurnal variation of full blooming stage [J]. *For Res*, 2018, 31(4): 142–149. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.04.020.
黄昕蕾, 郑宝强, 王雁. 鼓槌石斛不同花期香气成分及盛花期香气日变化规律研究 [J]. *林业科学研究*, 2018, 31(4): 142–149. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.04.020.
- [9] HUANG X H, WANG Z H, LI J, et al. Comparative analysis of quality properties and main nutrients in *Dendrobium* flowers during different flowering phases [J]. *Chin J Trop Crops*, 2017, 38(1): 45–52. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.01.009.
黄秀红, 王再花, 李杰, 等. 不同花期石斛花主要营养成分分析与品质比较 [J]. *热带作物学报*, 2017, 38(1): 45–52. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.01.009.
- [10] LI F, WEI Y, CHEN Y J. Study on the content of flavonoids in stems, leaves and flowers of *Dendrobium officinale* Kimura & Migo and its antioxidant activity *in vitro* [J]. *Act Chin Med*, 2019, 34(5): 1020–1023. doi: 10.16368/j.issn.1674-8999.2019.05.242.
李芳, 魏云, 陈艳杰. 铁皮石斛茎、叶、花中黄酮含量及其体外抗氧化活性研究 [J]. *中医学报*, 2019, 34(5): 1020–1023. doi: 10.16368/j.issn.1674-8999.2019.05.242.
- [11] XIN X X, WANG X X, LI M Y, et al. Active components of flowers in different flowering stages and floral structures of *Dendrobium officinale* [J]. *J Zhejiang Agric For Univ*, 2019, 36(1): 200–205. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.2019.01.025.
辛小雪, 王雪香, 李明宇, 等. 铁皮石斛不同花期及花朵不同部位活性组分分析 [J]. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(1): 200–205. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.2019.01.025.
- [12] QU J X, HE Y X, SUN Z R, et al. Comparison of amino acids and volatile constituents in four kinds of *Dendrobium* flowers [J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(4): 387–394. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20170904003.
曲继旭, 贺雨馨, 孙志蓉, 等. 四种石斛花氨基酸和挥发性成分比较 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(4): 387–394. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20170904003.
- [13] ZHENG S G, HU Y D, ZHAO R X, et al. Genome-wide researches and applications on *Dendrobium* [J]. *Planta*, 2018, 248(4): 769–784. doi: 10.1007/s00425-018-2960-4.
- [14] HUANG X L, WANG Y. Advances in *Dendrobium* molecular biology [J]. *For Res*, 2018, 31(3): 151–157. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.03.020.
黄昕蕾, 王雁. 石斛属分子生物学研究进展 [J]. *林业科学研究*,

- 2018, 31(3): 151–157. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.03.020.
- [15] BILGIN D D, DELUCIA E H, CLOUGH S J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR [J]. *Nat Prot*, 2009, 4(3): 333–340. doi: 10.1038/nprot.2008.249.
- [16] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15(1): 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
- [17] CHENG Y J, GUO W W, YI H L, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21(2): 177–178. doi: 10.1007/BF02774246.
- [18] RONG T J, WEN G S, QIAN X, et al. Comparison on two modified total RNA isolating methods from *Dendrobium officinale* [J]. *J Yunnan Agric Univ*, 2012, 27(5): 703–707. doi: 10.3969/j.issn.1004-390X(n).2012.05.015.
容天聚, 文国松, 钱雄, 等. 两种铁皮石斛总 RNA 提取方法的比较研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2012, 27(5): 703–707. doi: 10.3969/j.issn.1004-390X(n).2012.05.015.
- [19] SHAN T T, CHEN X M, GUO S X. Studies on total RNA extraction methods from the stems of *Dendrobium* species [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(6): 54–58. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0920.
单婷婷, 陈晓梅, 郭顺星, 等. 石斛属植物茎部总 RNA 提取方法的研究 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(6): 54–58. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0920.
- [20] ZENG Y, YANG T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2002, 20(4): 417. doi: 10.1007/BF02772130.
- [21] ZHANG L P, ZHANG Y X, SONG W Q, et al. A highly efficient method of RNA extraction from *Rhodiola* plant [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai*, 2017, 50(6): 48–53.
张力鹏, 张银兴, 宋文芹, 等. 红景天属植物叶片 RNA 高效提取的方法 [J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2017, 50(6): 48–53.
- [22] LIU L L, HAN R C, YU N J, et al. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196592. doi: 10.1371/journal.pone.0196592.
- [23] YU Z M, HE C M, DA SILVA J A T, et al. Molecular cloning and functional analysis of DoUGE related to water-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale* with enhanced abiotic stress tolerance [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2017, 131(3): 579–599. doi: 10.1007/s11240-017-1308-2.
- [24] LIU F, GUAN C Y. Research progress on RNA extracting from plants rich in polyphenols [J]. *Crop Res*, 2015, 29(1): 91–95,100. doi: 10.3969/j.issn.1001-5280.2015.01.22.
刘芳, 官春云. 富含多酚类植物 RNA 提取的研究进展 [J]. *作物研究*, 2015, 29(1): 91–95,100. doi: 10.3969/j.issn.1001-5280.2015.01.22.
- [25] GAO Y H, GAO Y K, WU Z P, et al. Characterization of TEMINAL FLOWER1 homologs *CmTFL1c* gene from *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 99(6): 587–601. doi: 10.1007/s11103-019-00838-6.
- [26] HONG Y, TANG X J, HUANG H, et al. Transcriptomic analyses reveal species-specific light-induced anthocyanin biosynthesis in *Chrysanthemum* [J]. *BMC Genom*, 2015, 16(1): 202. doi: 10.1186/s12864-015-1428-1.