

杜梨不同组织总 RNA 提取方法比较及质量分析

庞宏光¹, 许建锋¹, 张江红¹, 张玉星^{1,2*}, 亓宝秀^{1*}

(¹河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; ²北京林果业生态环境功能提升协同创新中心, 北京 100000)

摘要:【目的】针对杜梨组织中富含多酚、多糖等次生代谢物质特点, 筛选从杜梨不同组织中提取高质量 RNA 的方法。【方法】以杜梨不同组织(根、茎、叶、花和果)为材料, 分别采用 Trizol 法、改良 CTAB 法和 RNAPrep Pure Plant Kit 试剂盒法提取总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 微量分光光度计对 RNA 进行质量检测。【结果】3 种方法均能提出杜梨不同组织中总 RNA, 但 RNAPrep Pure Plant Kit 法提取的总 RNA 电泳条带清晰、完整性较好, 根、茎、叶、花和果提取的 RNA 纯度分别为 2.07、2.02、2.01、2.01 和 2.02; 浓度分别为 186.2 ng/μL、174.5 ng/μL、163.6 ng/μL、167.3 ng/μL 和 121.1 ng/μL。以 RNAPrep Pure Plant Kit 试剂盒法提取的总 RNA 反转录成 cDNA 为模板, 内参基因 *PbUBI* 为目的基因进行 RT-PCR 扩增, 均可获得明亮单一条带。【结论】RNAPrep Pure Plant Kit 试剂盒法更适用于杜梨不同组织总 RNA 提取, 可为下一步进行基因克隆及功能验证等分子生物学研究奠定基础。

关键词: 杜梨; 不同组织; 总 RNA; 纯度; 浓度

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)Suppl.-0001-05

Comparison and quality analysis of total RNA extraction methods from different tissues of *Pyrus betulaefolia* Bunge

PANG Hongguang¹, XU Jianfeng¹, ZHANG Jianghong¹, ZHANG Yuxing^{1,2*}, QI Baoxiu^{1*}

(¹Horticultural Department of Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China; ²Beijing Collaborative Innovation Center for Eco-Environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees, Beijing 100000, China)

Abstract:【Objective】Aiming at the tissues of *Pyrus betulaefolia* Bunge are abundant in amylose, hydroxybenzene and other secondary metabolites, the study screened the method in order to obtain high-quality RNA. 【Methods】The different tissues(root, stem, leaf, flower and fruit) were used as the materials, and the total RNA were extracted by Trizol method, the improved CTAB method and RNAPrep Pure Plant Kit method. The concentration and purity of the extracted RNA were analyzed by Agarose Gel Electrophoresis and NanoDrop 2000. 【Results】The total RNA can be extracted by the 3 methods, and the bands of the total RNA extracted by RNAPrep Pure Plant Kit method were clear. The purities were 2.07, 2.02, 2.01, 2.01 and 2.02 respectively, and the concentrations were 186.2 ng · μL⁻¹, 174.5 ng · μL⁻¹, 163.6 ng · μL⁻¹, 167.3 ng · μL⁻¹ and 121.1 ng · μL⁻¹ respectively. Additionally, the total RNA extracted by RNAPrep Pure Plant Kit method could be used for reverse transcription, and the amplification bands of *PbUBI* gene were specific. 【Conclusion】The RNAPrep Pure Plant Kit method was suitable for different tissues of *Pyrus betulaefolia* Bunge and laid the foundation for the further molecular biology research.

Key words: *Pyrus betulaefolia* Bunge; Different tissues; Total RNA; Purity; Concentration;

杜梨 (*Pyrus betulaefolia* Bunge) 属蔷薇科 (Rosaceae) 梨亚科 (Pomaceae) 梨属 (*Pyrus* L.) 乔木, 在我国分布十分广泛, 其具有根系发达, 抗逆性强, 与

东西方梨嫁接亲和性好等特点, 成为目前梨栽培品种的主要砧木类型, 在梨矮化砧木选育和抗性育种中具有重要的作用^[1-3]。植物组织中富含多种代谢产

收稿日期: 2018-11-04 接受日期: 2018-12-20

基金项目: 科技创新服务能力建设-科研基地-林果业生态环境功能提升协同创新中心 (CEFF-PXM2018_014207_000024)

作者简介: 庞宏光, 男, 博士, 研究方向为果树结实生理与分子生物学。Tel: 0312-7520140, E-mail: pangadmire@vip.qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0312-7520141, E-mail: zhyx@hebau.edu.cn; E-mail: baoyuqi@hotmail.com

物,不同种类的代谢产物在不同种类植物、不同生长部位和不同器官中的分布存在很大差异,导致不同种类植物的RNA提取方法不尽相同^[4],例如苯酚法、CTAB法、LiCl-尿素法、改良 Bugos法以及一系列商品化试剂^[5-9]。因此,为获取高质量的总RNA,需针对特异的植物种类和组织器官进行方法筛选与优化改良。杜梨组织中含有的多糖、多酚等次生代谢产物大大增加了其RNA分离提取的难度^[10],目前尚未见到杜梨不同组织RNA分离提取方法的相关报道。因此,获得高纯度、高质量及完整性好的RNA是杜梨进行分子生物学研究的基础,对下一步进行基因克隆、cDNA文库构建和转录组测序等试验具有重要意义^[11-12]。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 本研究所用材料取自河北农业大学标本园5 a(年)生杜梨,不同组织取样后,用锡箔纸包裹贴附标签后用液氮速冻,带回实验室置于-80 °C冰箱保存备用。

1.1.2 试剂与仪器 RNA Pure Plant Kit(目录号:DP441)试剂盒, FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂(目录号:KR118)购于天根生化科技(北京)有限公司; Invitrogen Trizol试剂购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Taq Plus MasterMIX购于康为世纪生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯; NanoDrop 2000微量分光光度计(Thermo Fisher, USA); 凝胶成像系统(Infinity, France)。

1.2 Trizol法

参照 Invitrogen Trizol说明书,在离心转速、时间及反应条件上略有改良,具体实验操作参考安振宇等^[13]的方法。

1.3 CTAB法

具体实验操作参考关玲等的方法^[14]。

1.4 试剂盒法

RNAprep Pure Plant Kit 严格按说明书步骤进行操作。提取的RNA保存于-80 °C冰箱。

1.5 RNA质量检测

用微量分光光度计 NanoDrop2000检测不同方法提取的各个组织总RNA提取液,分别计算其 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 比值,同时吸取3 μL进行

1%(w)琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 内参基因PbUBI的RT-PCR检测

根据天根生化科技(北京)有限公司的FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂说明书将总RNA反转录成cDNA,稀释至同一浓度,同时根据NCBI上PbUBI(GenBank: AF195224)序列设计RT-PCR引物,引物序列分别为PbUBI-F: AA-CAGGTAAGACTATCACCCCTC; PbUBI-R: ACCAC-GAAGCCTCAGAAC。PCR反应体系为: 25 μL 2×Taq Master Mix, 1 μL PbUBI-F, 1 μL PbUBI-R, 1 μL cDNA模板, 22 μL ddH₂O。PCR反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环, 72 °C 2min。

2 结果与分析

2.1 CTAB法提取的总RNA浓度最高

通过微量分光光度计 NanoDrop 2000对不同方法提取的总RNA进行检测,得到其浓度和纯度(表1)。不同方法提取的不同的组织总RNA浓度相差较大,CTAB法提取的各个组织总RNA浓度均高于其他方法,不同方法从果实中提取的RNA浓度均低于其他组织。3种不同方法提取的总RNA纯度通过比较 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 平均值进行评估(图1),试剂盒法提取总RNA的 OD_{260}/OD_{280} 值最为接近2,CTAB法提取总RNA的 OD_{260}/OD_{280} 值低于2; Trizol法和试剂盒法提取RNA的 OD_{260}/OD_{230} 值均超过2,CTAB法提取RNA的 OD_{260}/OD_{230} 值显著小于

表1 不同方法提取的RNA浓度和OD值

Table 1 The concentrations and OD values of RNA extracted by different methods

| 方法 Method | 组织 Tissue | RNA质量浓度 RNA concentration/(ng·μL ⁻¹) | OD_{260}/OD_{280} | OD_{260}/OD_{230} |
|--------------------------|--------------|---|---------------------|---------------------|
| CTAB法 CTAB method | 根 Root | 256.3 | 1.89 | 1.22 |
| | 茎 Stem | 273.1 | 1.85 | 1.43 |
| | 叶 Leaf | 239.8 | 1.89 | 1.21 |
| | 花 Flower | 216.6 | 1.82 | 1.54 |
| Trizol法 Trizol method | 果 Fruit | 133.4 | 1.86 | 1.36 |
| | 根 Root | 137.2 | 2.07 | 2.24 |
| | 茎 Stem | 142.6 | 2.11 | 2.13 |
| | 叶 Leaf | 176.3 | 2.09 | 2.19 |
| 试剂盒法 Plant kit method | 花 Flower | 102.1 | 2.05 | 1.98 |
| | 果 Fruit | 113.2 | 2.13 | 1.91 |
| | 根 Root | 186.2 | 2.07 | 2.08 |
| | 茎 Stem | 174.5 | 2.02 | 2.05 |
| od | 叶 Leaf | 163.6 | 2.01 | 2.13 |
| | 花 Flower | 167.3 | 2.01 | 2.01 |
| | 果 Fruit | 121.1 | 2.02 | 1.98 |

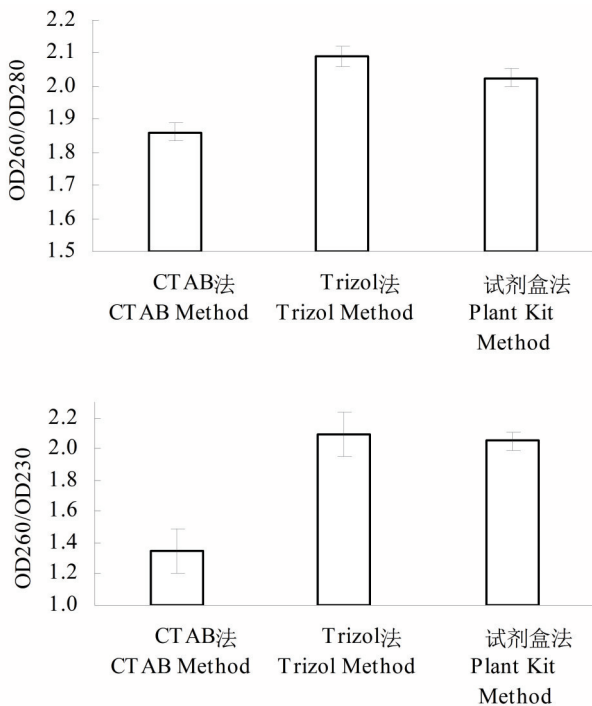


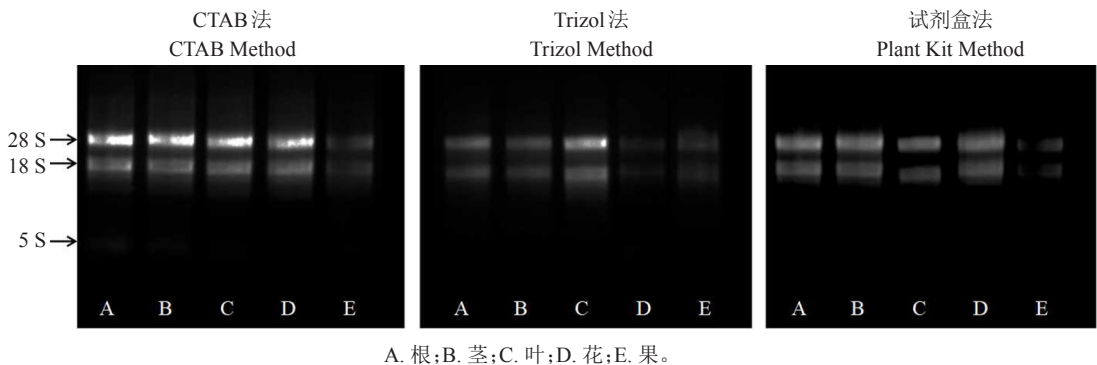
图1 不同方法提取RNA OD比值平均值

Fig. 1 The average values of RNA OD ratio by different methods

2. 综合比较3种总RNA提取方法,CTAB法提取的总RNA浓度最高,Trizol法和试剂盒法提取的总RNA纯度更好。

2.2 试剂盒法提取的总RNA质量最好

通过1%琼脂糖凝胶电泳检测不同方法提取的不同组织总RNA(图2),3种不同方法提取的总RNA均会不同程度遗漏小分子5S rRNA,其中Trizol法和CTAB法最为明显。Trizol法和CTAB法提取的总RNA中均有不同程度的拖尾现象,试剂盒法提取的总RNA条带分离情况比较清晰,无拖尾现象。比较3种方法提取总RNA的OD比值,CTAB法提取RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值均小于2,说明DNA和盐类物质没有完全去除干净;Trizol法提取RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值均大于2,说明受到多糖和蛋白质的污染;试剂盒法提取RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值最为接近2,纯度最高。综合评估3种提取方法,试剂盒法提取的RNA较其他方法质量更高,小分子5S rRNA的遗失可能是由于SDS去除蛋白质的过程中丢失了过多的5S rRNA。



A. 根;B. 茎;C. 叶;D. 花;E. 果。

A. Root; B. Stem; C. Leaf; D. Flower; E. Fruit.

图2 不同方法提取的杜梨不同组织RNA琼脂糖凝胶电泳检测

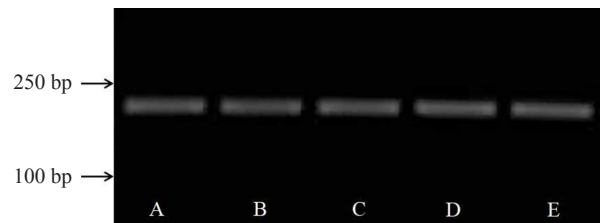
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RNA extracted from different tissues of *Pyrus betulaefolia* Bunge by different methods

2.3 内参基因PbUBI的RT-PCR检测

以试剂盒法提取的各个组织总RNA反转录cDNA为模板,内参基因PbUBI引物为扩增引物,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物(图3),各个组织的cDNA模板均扩增到了大小为202 bp特异性片段,并且条带规整清晰,表明该方法提取的总RNA可用于下一步分子生物学试验的开展。

3 讨论

不同RNA提取方法对不同物种,不同器官及不



A. 根;B. 茎;C. 叶;D. 花;E. 果。

A. Root; B. Stem; C. Leaf; D. Flower; E. Fruit.

图3 杜梨PbUBI基因扩增

Fig. 3 PCR product of *PbUBI* gene from *Pyrus betulaefolia* Bunge

同组织的提取效率不尽相同。目前,科研人员已总结出许多科学高效的RNA提取方法,但在实际操作中,即使相同种属的不同个体,采用同一套固定的提取方法也无法保证取得同样的效果^[15]。研究表明,改良Bugos法对‘新梨7号’花瓣中RNA提取效果最好^[16];CTAB法提取苹果梨和梨极矮化突变体叶片总RNA质量较好,但稳定性方面较差^[17];Plantol试剂盒法和改良CTAB法提取的‘早红考密斯’‘香红蜜’和‘华酥’果实总RNA质量较好^[18];改良酚-SDS方法可以有效地从梨花粉和花粉管提取RNA^[19]。由此可见,不同梨属植物体内存在复杂多样的影响RNA提取的成分,同一方法无法解决RNA提取过程中的所有问题,也无法适用于所有品种和组织的RNA提取。

杜梨属于富含多糖多酚植物,组织细胞破碎后,该类物质易与RNA结合成为复合物,严重影响RNA的提取质量^[20-21]。本研究中,选取较为常用的Trizol法^[22]、CTAB法及试剂盒法为试验方法,分别提取杜梨不同组织的总RNA进行评估比较。结果表明,3种方法均能有效的从杜梨不同组织中提取总RNA,但从中果实提取总RNA量明显低于其他组织,因果实中多糖多酚含量明显高于其他组织^[23-24],提取过程中遗失的RNA量也随之增加,表明多糖多酚是制约杜梨组织RNA提取质量的关键影响因素。试剂盒法相较于其他方法,提取的总RNA效果最好,但遗失小分子RNA的可能性相较于其他方法增加,组分中SDS可能是导致该结果的原因,一定程度降低组分中SDS含量能否改善提取效果有待进一步验证。

综上所述,笔者选取的RNAprep Pure Plant Kit试剂盒法提取杜梨不同组织总RNA效果最好,可以直接用于后续相关试验,为进一步开展杜梨分子水平的研究奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] 张玉星. 果树栽培学总论[M]. 第四版. 北京:中国农业出版社,2011:146-155.
ZHANG Yuxing. The pomology[M]. 4th edi. Beijing:China Agriculture Press,2011:146-155.
- [2] ROBBANI M, BANNO K, KAKEGAWA M. Differential flooding tolerance of some dwarfing pear rootstock clones selected from the progenies of *Pyrus betulaefolia* and *P. calleryana*[J]. Engei Gakkai Zasshi, 2006, 75(4):297-305.
- [3] 宗宇,孙萍,牛庆丰,滕元文. 中国北方野生杜梨分布现状及其形态多样性评价[J]. 果树学报,2013, 30(6):918-923.
ZONG Yu, SUN Ping, NIU Qingfeng, TENG Yuanwen. Distribution situation and assessment of morphological diversity of wild *Pyrus betulaefolia* in Northern China[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(6):918-923.
- [4] J. 萨姆布鲁克, D. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京:科学出版社,2002:516-522.
SAMBROOK J, RUSSELL D. Molecular clone: a laboarty manual[M]. 3rd edi. Beijing:Science Press,2002:516-522.
- [5] 顾红雅. 植物基因与分子操作[M]. 北京:北京大学出版社,1995:101-115.
GU Hongya. Plant genes and molecular manipulations[M]. Beijing:Beijing University Press,1995:101-115.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,1999:61-66.
LU Shengdong. Current protocols for molecular biology[M]. Beijing:Peking Union Medical College Press,1999:61-66.
- [7] 董祯. 梨果实 ACC 氧化酶基因克隆的研究[D]. 保定:河北农业大学,2007.
DONG Zhen. The Study on the the ACC oxidase genes clone of pear fruit[D]. Baoding:Hebei Agricultural University,2007.
- [8] 徐昌杰,陈昆松,张波,王钱洁,叶薇佳. 柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报,2004, 21(2):136-140.
XU Changjie, CHEN Kunsong, ZHANG Bo, WANG Qianjie, YE Weijia. A study on methods for RNA extraction from citrus tissues[J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(2):136-140.
- [9] 孙雯,石海燕,张玉星. 黄金梨果实高质量总 RNA 提取方法的研究[J]. 华北农学报,2013, 28(2):70-72. SUN Wen, SHI Haiyan, ZHANG Yuxing. Extraction of high quality RNA from Whangkeumbae pear[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28(2):70-72.
- [10] 赵小亮,白红进,汪河滨,周忠波,罗锋. 杜梨果实多糖提取方法及含量测定的研究[J]. 西北农业学报,2007, 16(4):279-281.
ZHAO Xiaoliang, BAI Hongjin, WANG Hebin, ZHOU Zhongbo, LUO Feng. Study on the extraction methods and content measurement of polysaccharide from *Pyrus betulaefolia* Bunge fruit[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2007, 16(4):279-281.
- [11] 孙艳琼,段红平. 植物基因克隆方法在作物上的应用[J]. 南方农业学报,2016, 36(3):275-279.
SUN Yanqiong, DUAN Hongping. Application of methods of plant gene cloning in crop[J]. Guangxi Agricultural Science, 2016, 36(3):275-279.
- [12] Weber A P. Discovering new biology through sequencing of RNA[J]. Plant Physiology, 2015, 169(3):1524-1531.
- [13] 安振宇,何新华,董龙,张树伟,胡颖,罗聪,黄桂香. 柠檬总 RNA 提取方法研究[J]. 基因组学与应用生物学,2015, 34(1):203-207.
AN Zhenyu, HE Xinhua, DONG Long, ZHANG Shuwei, HU Ying, LUO Cong, HUANG Guixiang. Studies on extraction

- methods of total RNA from lemon tissues[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(1): 203-207.
- [14] 关玲, 赵密珍, 王庆莲, 吴伟民, 钱亚明, 巫建华. 改良 CTAB 方法提取果树不同组织的 RNA[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(15): 19-22.
- GUAN Ling, ZHAO Mizhen, WANG Qinglian, WU Weimin, QIAN Yaming, WU Jianhua. Improved CTAB method for extracting RNA from different tissues of fruit trees[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(15): 19-22.
- [15] 尚瑞广, 李丽, 孙涛, 王兵益. 玛咖贮藏根总 RNA 提取方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 1936-1940.
- SHANG Ruiguang, LI Li, SUN Tao, WANG Bingyi. Comparison of methods for total RNA extraction from *Lepidium meyenii* (Maca) storage roots[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 1936-1940.
- [16] 孙长悦. 梨组织 RNA 提取方法研究[J]. *北方园艺*, 2009(3): 19-21.
- SUN Changyue. The study for extraction methods of different tissues in pear[J]. *Northern Horticulture*, 2009(3): 19-21.
- [17] 巩艳明, 曹后男, 宗成文, 金灿, 许雪. 三种方法提取不同品种梨叶片总 RNA[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(15): 3204-3206.
- GONG Yanming, CAO Hounan, ZONG Chengwen, JIN Can, XU Xue. Three methods for extracting total RNA from leaves of pear varieties[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(15): 3204-3206.
- [18] 王西成, 乔玉山, 欧春青, 王斐, 马力, 姜淑苓. 三种梨果皮总 RNA 提取方法的比较研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2010, 45(2): 91-94.
- WANG Xicheng, QIAO Yushan, OU Qingqing, WANG Fei, MA Li, JIANG Shuling. Extraction of total RNA from pericarp of pears with three methods[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010, 45(2): 91-94.
- [19] 徐义流, 张绍铃. 梨花柱 RNA 提取方法[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(6): 737-738.
- XU Yiliu, ZHANG Shaoling. A method for RNA isolation from pear style[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(6): 737-738.
- [20] XI L, MU T, SUN H. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172(172): 166-174.
- [21] FANG G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. *Biotechniques*, 1992, 13(1): 52-56.
- [22] 周敏, 付金娥, 韦树根, 潘丽梅. 青蒿不同部位总 RNA 提取方法比较[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(3): 31-33.
- ZHOU Min, FU Jine, WEI Shugen, PAN Limei. Comparison of total RNA extraction methods from different parts of *Artemisia annua*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(3): 31-33.
- [23] 许让伟. 砂梨果实和叶片中糖积累及代谢相关酶活性变化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- XU Rangwei. Studies on changes of sugar accumulation and related enzymes activities in sand pear fruits and leaves[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [24] 李静, 聂继云, 曹玉芬, 李志霞, 闫震, 毋永龙. 砀山酥梨和秋白梨酚类物质 UPLC-PDA-MS/MS-ESI 分析[J]. *园艺学报*, 2016, 43(4): 752-762.
- LI Jing, NIE Jiyun, CAO Yufen, LI Zhixia, YAN Zhen, WU Yonglong. UPLC-PDA-MS/MS-ESI analysis of phenolic compounds in fruits of Dangshan Suli and Qiubaili pears (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(4): 752-762.