

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.06.007

核桃不同时期叶片及不同组织 RNA 提取方法筛选

陈浩^{1*}, 安瑞云², 常青山¹, 王梓¹, 毛星夜¹

(1. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471000; 2. 洛阳市隋唐城遗址植物园, 河南 洛阳 471002)

摘要: [目的] 针对核桃组织中富含多酚、多糖及黄酮类物质含量较高的特点, 筛选经济高效、适合核桃不同发育时期叶片及不同组织总 RNA 的提取方法。[方法] 以核桃幼嫩、成熟和衰老叶片为材料, 分别采用改良硼砂—CTAB 法、改良硼砂—CTAB—异丙醇法、改良 SDS 法、改良 Trizol 法 II 以及试剂盒法进行总 RNA 的提取。以筛选与优化的改良硼砂—CTAB 法、改良硼砂—CTAB—异丙醇法分别提取核桃胚、叶柄、韧皮部、雄花的总 RNA, 并对 RNA 产量、纯度、电泳图谱和 RT-PCR 进行分析。[结果] 5 种方法都可获得核桃总 RNA, 其中, 改良硼砂—CTAB 法能够从幼嫩叶片、成熟叶片、叶柄和雄花中获得质量高、完整性好的总 RNA, 28SrRNA 亮度约为 18SrRNA 的 2 倍, A_{260}/A_{280} 介于 1.9~2.1 之间, A_{260}/A_{230} 大于 2.0, 且总 RNA 质量浓度可达 $1\ 185.2\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 改良硼砂—CTAB—异丙醇法则适合衰老叶片、胚和韧皮部的提取, 总 RNA 质量浓度可达 $1\ 019.0\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。通过 RT-PCR 在不同组织中均能扩增出核桃 18S rRNA 和翻译起始因子 (*JreIF1A*) 片段。[结论] 改良硼砂—CTAB 法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法相比其他 3 种方法更易排除蛋白质、酚类等杂质干扰, 对于不同时期不同组织均有更好的适用性, 提取所获得的总 RNA 纯度和浓度完全符合后续分子生物学试验要求。

关键词: 核桃; 总 RNA; CTAB 法; SDS 法; Trizol 法

中图分类号: S727.3; S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)06-0057-08

核桃 (*Juglans regia* L.) 含有大量易消化的脂肪 (60%~75%)、蛋白质 (约 20%) 和糖类 (约 10%)。此外, 还含有其他有益的营养成分, 如磷、钾、铁、钙、镁、锰等以及多种维生素、多酚、类黄酮、磷脂、花青素等功效成分, 是世界公认的保健食品^[1]。近年来, 转录组测序、Northern 杂交, cDNA 文库构建、逆转录 PCR、基因克隆等分子生物学手段日益普及, 提取总 RNA 是从基因组学入手研究核桃生长和代谢过程的基础环节^[2-3]。诸多研究表明, 多糖易与 RNA 在提取过程中形成共沉淀, 使 RNA 埋入多糖形成的粘稠难溶的胶状物中难于分离, 且发生降解, 严重影响 RNA 的产量和质量^[4-5]; 而酚类化合物的含量较高, 则极易

被氧化为醌类物质, 导致 RNA 失活, 产量降低^[6]。因此, 多糖和多酚等次生代谢物等在核桃体内广泛大量存在, 导致一般提取方法效率低下, 难以获得可靠核桃 RNA。另外, 植物组织特异性也会影响提取效果, 植物不同时期不同组织, 由于上述干扰物质积累不同^[7], 同一方法提取效果差异巨大。因此, 有必要对核桃进行 RNA 提取方法筛选优化, 进而对不同时期不同组织有针对性的改良。

目前, 关于核桃总 RNA 的提取方法已有报道, 其研究主要是针对核桃芽^[8]、胚^[9]、叶片^[10]总 RNA 提取方法的比较, 但对于同一组织的不同发育时期以及同一种植物的不同组织总 RNA 提取方法的筛选和优化还未见报道。本研究采用改良硼

收稿日期: 2020-01-14 修回日期: 2020-08-05

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (182300410092)

* 通讯作者: 陈浩, 男, 1988 年, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: kdlinch@163.com

砂—CTAB法、改良硼砂—CTAB—异丙醇法、改良 SDS 法、改良 Trizol 法 II 以及试剂盒法分别提取核桃幼嫩叶片, 成龄叶片和衰老叶片的总 RNA, 并将筛选出的改良硼砂—CTAB 法、改良硼砂—CTAB—异丙醇法分别提取核桃胚、叶柄、韧皮部、雄花的总 RNA, 以期找到从核桃不同发育时期叶片以及不同组织中提取总 RNA 的最佳方法, 为后续开展核桃的分子生物学等研究工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

供试材料选自河南科技大学林学院实验基地, 核桃品种为“晋中 2 号”, 分别于 2019 年 4 月下旬、7 月中旬、9 月下旬随机从树的不同方位挑取幼嫩叶片, 成龄叶片和衰老叶片; 5 月初采集雄花、叶柄和韧皮部; 果实发育期采集实验用胚; 立即液氮速冻, 带回实验室置于 -80°C 冰箱中保存。

试验所用试剂有 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)、SDS(十二烷基苯磺酸钠)、PVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)、DEPC(焦碳酸二乙酯)、LiCl, 均来自上海沪试实验室器材股份有限公司。提取 RNA 的试剂用经高压灭菌的 0.1% DEPC 水直接配置。Trizol 试剂、RNA plant plus Reagent 植物总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒均购自宝生物工程有限公司。

1.2 试验方法

试验中所用的离心管、枪头、枪头盒等塑料器皿经 0.1% DEPC 水 37°C 浸泡过夜后于 121°C 高温高压灭菌 40 min 后使用, 研钵、药匙、玻璃器皿等用锡箔纸包好后置于 180°C 烘箱中灭菌 8 h。试验均设置 3 次重复, 涉及提取方法如下。

1.2.1 改良硼砂—CTAB 法 参照宋艳波等^[8]方法提取, 并进行了部分优化。将硼砂—CTAB 提取缓冲液 ($0.025\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂 (pH 8.5); $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; 2% CTAB; 0.1% Vc; 1% DTT; $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 糖原) 于 65°C 水浴中温育 30 min, 其余步骤相同。

1.2.2 改良的硼砂—CTAB—异丙醇法 参照王艳等^[3]方法提取, 并进行了部分优化。在 1.5 mL 离心管中加入 1 000 μL 提取缓冲液 ($0.025\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂 (pH 8.5); $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; 2% CTAB; 0.1% Vc; 1% DTT; $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 糖原) 于 65°C 水浴中温育 30 min 后加 50 μL β -巯基乙醇, 其余步骤相同。

1.2.3 改良 SDS 法 参照孟晓庆等^[11]方法提取。

1.2.4 改良 Trizol 法 II 参照王其海等^[12]方法提取。

1.2.5 试剂盒法 按照宝生物工程有限公司的 RNA plant plus Reagent 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书进行 (此试剂盒主要针对多糖多酚类植物设计)。

1.3 总 RNA 质量检测

1.3.1 总 RNA 完整性检测 分别取 3 μL 总 RNA 在 1.0% 普通琼脂糖凝胶电泳上进行电泳检测, 125 V 恒压电泳 20 min, EB 染色后在紫外凝胶成像系统中观察并拍照记录, 根据 28S、18S、5S 条带的清晰度和相对含量评估总 RNA 的完整性。

1.3.2 总 RNA 浓度和纯度的检测 取 1 μL 总 RNA 样品, 用 NanoDrop ND-2000c 型微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度以及 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 值和 RNA 产率。

1.3.3 RT-PCR 检测 按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明进行反转录。根据内参基因 18S 核糖体 RNA (18S rRNA) 基因^[13]和核桃翻译起始因子 (*JreIF1A*) 序列^[14], 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。扩增条件: 95°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72°C 总延伸 10 min。将 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。引物合成和基因测序委托上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.4 筛选出的总 RNA 提取方法对核桃不同组织 RNA 的提取效果

为了进一步验证筛选和优化的提取方法是否也

表 1 RT-PCR 检测引物信息

Table 1 Primers used for RT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product length/bp
18S rRNA	F:5'- AGAGGCCTACAATGGTGGTG - 3' R:5'- CCAATGGATCCTCGTTA - 3'	102
<i>JreIF1A</i>	F:5'- ATGCCGAAGAACAAGGGTAAGG - 3' R:5'- CGATTCTAGTTAGATCTTATCAATATCCTCG - 3'	438

适用于核桃的其他组织。将优选出的改良硼砂—CTAB法、改良硼砂—CTAB—异丙醇法分别提取核桃胚、叶柄、韧皮部、雄花的 RNA 并进行同上检测。

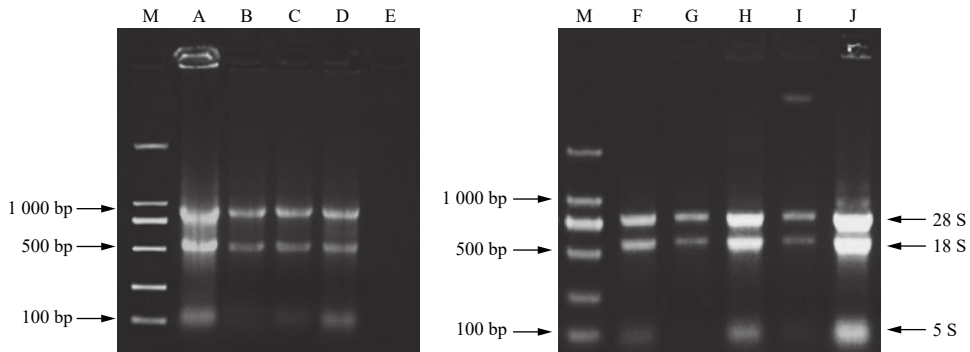
2 结果与分析

2.1 不同发育时期核桃叶片总 RNA 的完整性比较

2.1.1 幼嫩叶片和成龄叶片 核桃幼嫩叶片中除了改良 SDS 法, 其他方法均获得了不同品质的 RNA。改良 SDS 法虽然操作步骤简单, 但实验结果不理想, 未提取出 RNA(图 1E)。改良 Trizol 法 II 呈现 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带明亮, 但条带有拖尾现象, 点样孔附近发亮, 说明有 RNA 降解并存在蛋白质和多糖等杂质污染, DEPC 处理水溶解沉淀时溶液黏稠(图 1A)。试剂盒法提取的 RNA 条带较暗, 且 5S rRNA 条带不明显(图 1B)。改良硼砂—CTAB—异丙醇法和改良

硼砂—CTAB 法均提出了 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带(图 1C、D), 相比较而言, 改良硼砂—CTAB—异丙醇法的 5S rRNA 条带亮度较弱, 改良硼砂—CTAB 法提取的总 RNA 点样孔干净, 且 28S rRNA 亮度大约是 18S rRNA 的 2 倍, 说明提取过程中没有降解的发生, DNA 和蛋白质、多糖污染少, 分析后发现优化的效果很明显。

成龄叶片中 5 种方法都获得了核桃总 RNA, 改良 Trizol 法 II 提取到的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带最亮, 而且两条带宽度相当, 但在点样孔处仍然发亮(图 1J)。试剂盒法和改良 SDS 法 28S rRNA 和 18S rRNA 2 条带较暗(图 1G、I), 5S rRNA 都不明显。改良 SDS 法提取物中有 DNA 残留。改良硼砂—CTAB 法 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带明亮、清晰、无拖尾, 所提取的总 RNA 完整性好且无明显降解(图 1H)。



注: M: D2000 ladder marker; 幼嫩叶片(A~E): A 改良 Trizol 法 II, B 试剂盒法, C 改良硼砂—CTAB—异丙醇法, D 改良硼砂—CTAB 法, E 改良 SDS 法; 成龄叶片(F~J): F 改良硼砂—CTAB—异丙醇法, G 试剂盒法, H 改良硼砂—CTAB 法, I 改良 SDS 法, J 改良 Trizol 法 II

Notes: M: D2000 ladder marker; young leaves (A-E): A. improved Trizol II method, B. Plant kit method, C. improved borax-CTAB-isopropanol method, D. improved borax-CTAB method, E. improved SDS method; mature leaves (F-J): F. improved borax-CTAB-isopropanol method, G. Plant kit method, H. improved borax-CTAB method, I. improved SDS method; J. improved Trizol II method

图 1 不同方法提取核桃幼嫩叶片和成龄叶片总 RNA 的凝胶电泳检测

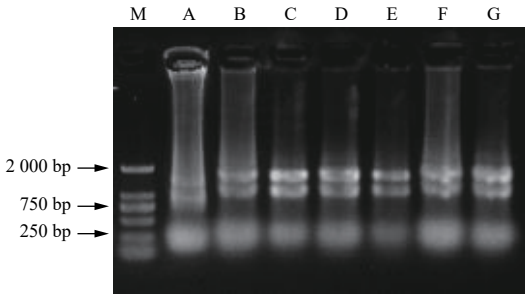
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from young and mature leaves of *Juglans regia* L. by different methods

2.1.2 衰老叶片 进入衰老期的叶片提取时, 通过肉眼观察沉淀发现: 改良 Trizol 法 II、改良 SDS 法、改良硼砂—CTAB 法提取的 RNA 沉淀均为浅褐色, 并且溶解后溶液黏稠易拉丝状; 改良硼砂—CTAB—异丙醇法和试剂盒法沉淀均为白色; 改良 Trizol 法 II 和改良 SDS 法点样时, 都存在不同程度的“漂样”现象。凝胶电泳结果(图 2)显示: 除改良硼砂—CTAB—异丙醇法(图 2C~E)外, 其他 4 种方法(图 2A、B、F、G)均有明显的拖

尾和降解现象, 提取效果差。改良 Trizol 法 II(图 2F)提取与幼叶、成龄叶片相似, 依然存在蛋白质和多糖等杂质污染。

2.2 不同发育时期核桃叶片总 RNA 质量浓度和纯度的比较

改良硼砂—CTAB 法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法提取幼嫩叶片和成龄叶片总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.9~2.1, OD_{260}/OD_{230} 值大于 2.0, 说明其纯度较好; 相较质量浓度而言, 改良硼砂—CTAB



注：M：D2000 ladder marker；A：改良 SDS 法；B：改良硼砂—CTAB 法；C~E：改良硼砂—CTAB—异丙醇法；F：改良 Trizol 法 II；G：试剂盒法

Notes: M: D2000 ladder marker; A: improved SDS method; B: improved borax-CTAB method; C-E: improved borax-CTAB-isopropanol method; F: improved Trizol II method; G: Plant kit method

图 2 不同方法提取核桃衰老叶片总 RNA 的凝胶电泳检测
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from senescing leaves of *Juglans regia* L. by different methods

法比改良硼砂—CTAB—异丙醇法提取浓度更高（表 2）；改良 Trizol 法 II 提取的这 2 个时期叶片

质量浓度最高，但 OD_{260}/OD_{280} 都小于 1.8，说明有蛋白质污染。核桃衰老叶片总 RNA 的纯度和质量浓度，只有改良硼砂—CTAB—异丙醇法的 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 值在标准范围内，说明杂质去除较为彻底。5 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，如图 3 所示：改良 Trizol 法 II、改良 SDS 法和试剂盒法提取总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值均低于 2.0；改良硼砂—CTAB 法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法提取总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值都超过 2.0；改良 SDS 法和试剂盒法提取总 RNA 的 OD_{260}/OD_{230} 值远小于 2.0；其他 3 种方法均超过 2.0。因此，综合比较 5 种方法，改良硼砂—CTAB 法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法对于不同时期叶片提取平均效果最好， OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 值均在 2.0 以上，符合 RNA 提取要求，总 RNA 纯度更好。

表 2 不同方法提取不同发育时期核桃叶片总 RNA 纯度和质量浓度

Table 2 The purity and concentration of the total RNA with different kinds of RNA extraction method in different tissues

方法 Method	不同时期叶片 Leaves in different growth stages	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	质量浓度/($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) RNA concentration
改良 Trizol 法 II Improved Trizol II method	幼嫩叶片 Young leaves	1.78	2.25	1 384.9
	成熟叶片 Mature leaves	1.77	2.24	1 609.5
	衰老叶片 Senescing leaves	1.61	1.59	110.9
试剂盒法 Plant kit method	幼嫩叶片 Young leaves	1.89	1.92	699.8
	成熟叶片 Mature leaves	1.85	1.74	440.8
	衰老叶片 Senescing leaves	1.88	1.80	507.5
改良 SDS 法 Improved SDS method	幼嫩叶片 Young leaves	0.52	0.33	10.9
	成熟叶片 Mature leaves	1.76	1.80	445.1
	衰老叶片 Senescing leaves	1.87	1.74	524.1
改良硼砂—CTAB 法 Improved borax-CTAB method	幼嫩叶片 Young leaves	2.01	2.23	996.3
	成熟叶片 Mature leaves	2.10	2.19	1 185.2
	衰老叶片 Senescing leaves	1.98	1.95	780.8
改良硼砂—CTAB—异丙醇法 Improved borax-CTAB-isopropanol method	幼嫩叶片 Young leaves	1.95	2.03	787.6
	成熟叶片 Mature leaves	2.00	2.01	940.9
	衰老叶片 Senescing leaves	2.08	2.12	1 019.0

2.3 筛选与优化的 2 种方法对核桃其他组织总 RNA 的提取效果

利用优选出的改良硼砂—CTAB 法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法分别提取核桃胚、叶柄、韧

皮部、雄花的总 RNA，经琼脂糖凝胶电泳检测，结果（图 4）显示：改良硼砂—CTAB 法最适合叶柄和雄花的提取，获得的条带清晰、完整、无拖尾。对于胚和韧皮部的提取并不理想，28S 和 18S

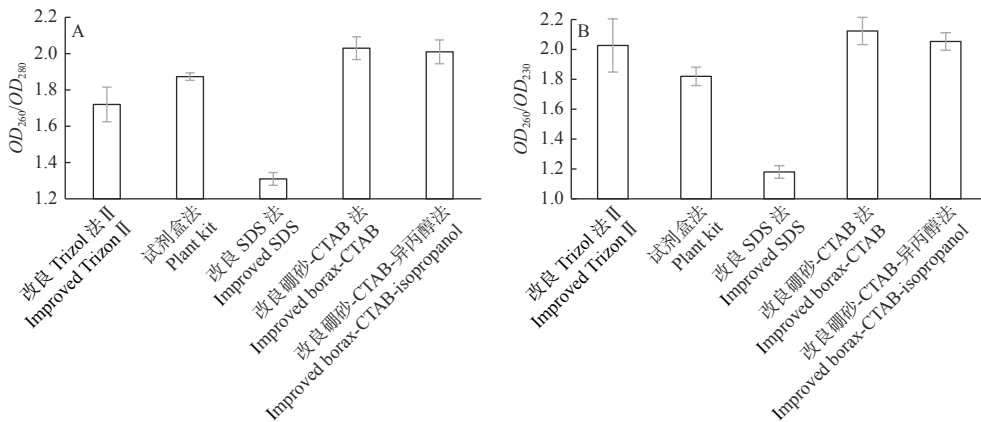
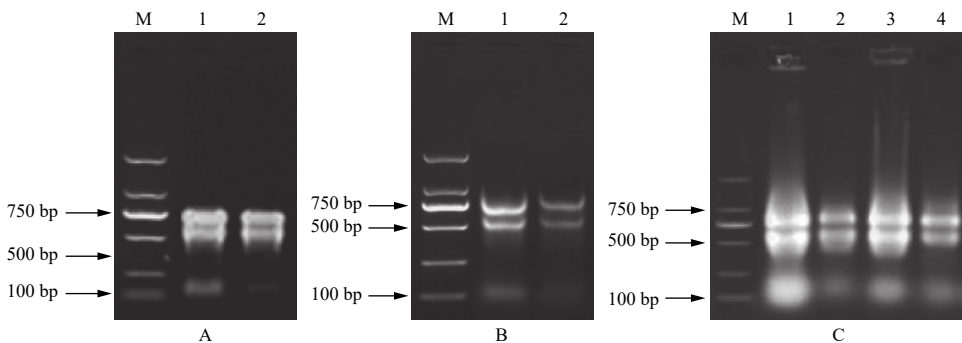


图 3 不同方法提取 RNA OD 比值平均值

Fig. 3 The average values of RNA OD ratio by different methods

存在弥散严重、拖尾和降解, 多糖和蛋白质等污染。改良硼砂—CTAB—异丙醇法则提取胚和韧皮

部的效果较好, 点样孔处无亮斑, 无 DNA 的污染, 条带的亮度与清晰度达到要求。



注: M: D2000 ladder marker; A. 叶柄; B. 雄花; C. 胚 (1~2)、韧皮部 (3~4); 1、3 改良硼砂 - CTAB 法; 2、4 改良硼砂 - CTAB - 异丙醇法

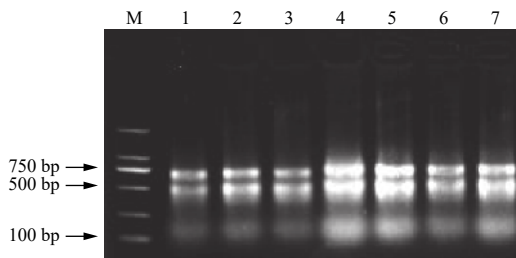
Notes: M: D2000 ladder marker; A. petiole; B. male flowers; C. embryo (1-2), phloem (3-4); 1, 3 improved borax-CTAB method; 2, 4 improved borax-CTAB-isopropanol method

图 4 2 种方法对核桃其他不同组织总 RNA 提取的效果

Fig. 4 The effect of total RNA extracted from different tissues of *Juglans regia* L. by two methods

2.4 核桃总 RNA 的 RT-PCR 检测

将改良硼砂—CTAB 法提取的核桃幼嫩叶片、成龄叶片、叶柄和雄花; 改良硼砂—CTAB—异丙醇法提取的核桃衰老叶片、胚和韧皮部总 RNA 进行电泳检测, 如图 5 所示: 28S、18S、5S 条带明亮。经反转录, 并设计内参基因 18S 核糖体 RNA 基因 (18S rRNA) 和核桃翻译起始因子 (*JreIF1A*) 引物, 以反转录产物为模板进行扩增后电泳检测, 验证所提 RNA 能否满足后续试验要求。PCR 产物电泳结果 (图 6), 在 Mark 500 bp 附近获得明亮的特异目的条带, 与预期的基因片段大小一致。为进一步保证试验结果的准确性, 将 *JreIF1A* 引物所扩增片段测序经比对与 *JreIF1A* (NCBI 基因号: XM018972344.1) 的 ORF 基因序列完全一致, 说明这 2 种方法提取的总 RNA 能用于后期的分子生

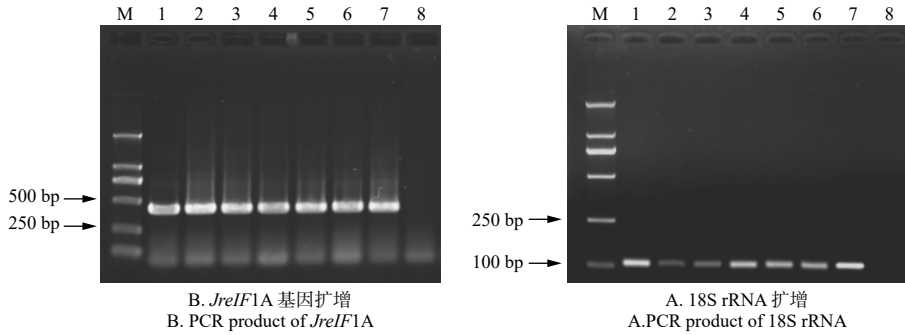


注: M: D2000 ladder marker; 1. 衰老叶片; 2. 胚; 3. 韧皮部; 4. 成龄叶片; 5. 幼龄叶片; 6. 雄花; 7. 叶柄; 1~3. 改良硼砂 - CTAB - 异丙醇法; 4~7. 改良硼砂 - CTAB 法

Notes: M: D2000 ladder marker; 1. senescing leaves; 2. embryo; 3. phloem; 4. mature leaves; 5. young leaves; 6. male flowers; 7. petiole 1-3. improved borax-CTAB-isopropanol method; 4-7. improved borax-CTAB method

图 5 2 种方法提取不同组织总 RNA 电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from different tissues by two methods



注: M: D2000 ladder marker; 1~3: 改良硼砂-CTAB-异丙醇法; 4~7: 改良硼砂-CTAB法 1.衰老叶片; 2.韧皮部; 3.胚; 4.幼嫩叶片; 5.成熟叶片; 6.叶柄; 7.雄花; 8.空白对照

Notes: M: D2000 ladder marker; 1-3: improved borax-CTAB-isopropano method; 4-7: improved borax-CTAB method 1. senescing leaves; 2. phloem; 3. embryo; 4. young leaves; 5. mature leaves; 6. petiole; 7. male flowers; 8. CK

图6 2种方法提取的核桃总RNA的RT-PCR检测结果

Fig. 6 The RT-PCR results of total RNA extracted by two methods

物学试验。

3 讨论

目前,关于如何获得高质量木本植物总RNA的方法已经有大量的探索与研究,但实践证明没有一种方法是通用的。主要因为不同RNA提取方法对不同发育时期,不同器官及不同组织的提取效率不尽相同^[15]。核桃属于多年生木本植物,且不同时期组织结构和组成上存在异质性,特别是多糖、多酚、蛋白质等次生代谢物在不同组织中互有差异,且随着个体不断成熟,同一组织内源、外源RNA酶含量逐渐丰富,各种水解酶大量积累,多酚和多糖的含量也随之增加^[16]。在完整的植物细胞中,这些物质与核酸是分离的,但在提取过程中细胞碎裂,即与RNA相互作用以复合体形式存在,导致各组织RNA提取过程中出现质量差、产量低、容易降解等问题^[17-18]。因此,为确保获得高质量的RNA以应用于后续分子生物学试验,有必要针对核桃不同发育时期及组织筛选出最佳RNA提取方法。

研究发现,改良硼砂-CTAB法对于幼嫩叶片和成熟叶片均有较好的RNA提取效果;而改良SDS法仅适用于成熟叶片,未能提取幼嫩叶片中的RNA。改良SDS法步骤简单,在去除核桃多糖干扰方面效果较好,但对于解决幼嫩叶多酚物质的干扰能力方面较弱,从而无法从组织中提取出完整的RNA^[19]。而改良硼砂-CTAB法,不仅可以高效去除多糖干扰,对幼叶当中的酚类等干扰物也有很好的清除作用。改良硼砂-CTAB提取液中1.5

mol·L⁻¹的高浓度NaCl和CTAB共同作用可以高效除去多糖杂质,避免在溶解时易与RNA一起沉淀,溶解后呈黏稠状的胶质溶液^[20-21];而在研磨过程中加入PVPP,可以主动吸附酚类、蛋白质等,形成螯合物,避免酚类与RNA结合,同时Vc和DTT也可以防止提取过程中酚类物质氧化的发生^[8]。另外,CTAB是一种强烈的去垢剂,可以很好的打破植物细胞,释放核酸,并对蛋白的变性凝聚有很强的效果^[9],进一步提高提取效率。

改良硼砂-CTAB-异丙醇法更适用于对衰老叶片的提取,其他4种方法不同程度地存在降解或多糖、蛋白质污染等现象。多数落叶树种在生长季的后期会积累更多的糖类物质^[22],组织衰老后会比幼嫩组织积累更多的酚类物质,因此,改良硼砂-CTAB-异丙醇法在操作过程中,除改良硼砂-CTAB的干扰物质的去除办法外,另外加入了大量的抗氧化剂β-巯基乙醇,避免氧化,同时增加多次加氯仿抽提,这样使得组织更充分地分散在试剂中使乳化更充分,有效抑制RNA酶RNA降解作用,并且可以更好地去除蛋白质和杂质^[23]。改良硼砂-CTAB-异丙醇提取液在低温存放时易形成白色固体颗粒,加长65℃水浴中温育时间,可以使白色固体颗粒充分溶解,样品更充分地分散在试剂中,很好的发挥其药效。

改良硼砂-CTAB-异丙醇法对于胚、韧皮部也有较高的提取效率。核桃胚因富含多糖、油脂(含量高于其他组织)和蛋白质以及其它次生代谢物质,多酚、色素等物质在提取过程中易被氧化导致褐变,导致RNA失去活性^[24-25],改良硼砂-

CTAB—异丙醇法通过螯合剂、抗氧化、表面活性剂(CTAB)、选择性沉淀RNA(LiCl)^[26-27]、多次抽提等措施可以很好解决。果树韧皮部的组织木质化程度高,细胞壁较厚^[28],导致细胞裂解不完全,可能是提取效率低下的重要原因,因此,改良硼砂—CTAB—异丙醇提取液中加入10% PVPP,β-巯基乙醇与材料共研磨,多次抽提、加长裂解时间,避免氧化同时完全裂解^[29],最终取得较好的提取效果。另外,改良硼砂—CTAB法操作时间相对较短,提取叶柄和雄花的RNA条带清晰,品质佳;而改良硼砂—CTAB—异丙醇法虽然也能提取出完整的RNA,但质量浓度较小,可能主要是由于多次抽提,操作时间相对较长导致RNA产量降低。

改良硼砂—CTAB法与改良硼砂—CTAB—异丙醇法,针对文中不同核桃组织多糖、酚类、蛋白质等干扰物含量高、组织结构差异性等特点,有针对性的进行了改良,有较好的普遍适用性,而且相对经济高效。二者有较高的相似性,改良硼砂—CTAB—异丙醇法耗时更长,操作更复杂,但对于难提取的胚、韧皮部等部位有更好的提取效果,实际操作可以同时多组进行,提高效率。本研究筛选优化的2种方法创新性尤其在于考虑到同一组织不同时期组织的特异性提取需求。试剂盒法虽然基于多糖植物组织开发,操作简单便捷且耗时较短,但因为上述各种核桃组织存在不同的组织结构特异性,不同的发育程度以及不同的内含干扰物种类及含量,决定了试剂盒法不可能适用于所有植物组织的高效提取要求,其成本也较高,大约是改良硼砂—CTAB试剂的3倍。采用试剂盒法提取的样品普遍存在质量浓度较低的现象,试验结果表明提取浓度只有2种CTAB方法的1/2左右,后期降解,不利于后续实验。

4 结论

综上所述,在核桃总RNA提取时以改良硼砂—CTAB法和改良硼砂—CTAB—异丙醇法为宜,但同时要根据不同发育时期叶片及不同组织的生理特性选择适宜的方法,才能更好为后续分子生物学研究奠定基础。

参考文献:

[1] 任成忠. 中国核桃栽培新技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版

社, 2013: 2.

- [2] 侯哲, 陆秀君, 张晓林, 等. 天女木兰不同组织总RNA提取方法的筛选与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2016, 36(7): 109-115.
- [3] 王艳, 高疆生, 金强, 等. 不同RNA提取方法在南疆特色果树上的应用[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(3): 461-466.
- [4] 夏春兰, 闻志彬, 张玉芳. 新疆野苹果果实总RNA提取方法的筛选[J]. 干旱区研究, 2019, 36(2): 437-443.
- [5] 魏环宇, 魏薇, 杨敏, 等. 魔芋(*Amorphophallus* spp.)四种组织器官RNA提取方法的比较[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7064-7070.
- [6] 王颖芳, 陈艳琳, 王文娟. 适用于转录组测序的人参根总RNA提取方法的筛选[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 18-22.
- [7] Li M, Li D, Feng F, et al. Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit development and sugar and acid accumulation in apple[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(17): 5145-5157.
- [8] 宋艳波, 梅霞, 吴国良, 等. 核桃芽总RNA提取及RT-PCR[J]. 农学学报, 2012, 2(7): 25-28, 54.
- [9] 孙翠, 李永涛, 曲文文, 等. 核桃胚营养代谢盛期总RNA提取方法研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(2): 175-180.
- [10] 陈新, 刘洪对, 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.
- [11] 孟晓庆, 侯智霞, 张兰, 等. 榛子总RNA提取方法的比较研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(3): 75-80, 87.
- [12] 王其海, 王裔娜, 刘晓华, 等. 桃不同发育时期叶片总RNA提取方法的比较[J]. 河南农业科学, 2014, 43(3): 116-120.
- [13] 宋晓波, 常英英, 刘昊, 等. 核桃qRT-PCR内参基因的筛选与不定根发生相关基因表达分析[J/OL]. 园艺学报: 1-12[2019-12-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1924.s.20190218.1003.004.html>.
- [14] 任得元, 赵焕元, 刘玉梅, 等. 核桃翻译起始因子JreIF1A的克隆及抗旱功能分析[J]. 西北林学院学报, 2019, 34(6): 103-108.
- [15] 易刚强, 蔡嘉洛, 朱贻霖, 等. 适合金银花不同组织总RNA提取方法的筛选[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 63-65.
- [16] 董宁光, 高英, 裴东. 核桃子叶RNA提取方法的研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(6): 98-101.
- [17] 答国政, 杨敏, 黄静, 等. 大叶蛇葡萄多种来源组织RNA提取效果比较[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2788-2793.
- [18] Yamaguchi H, Hasegawa K, Esumi M. Protein from the fraction remaining after RNA extraction is useful for proteomics but care must be exercised in its application[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2013, 95(1): 46-50.
- [19] 牛美云, 程庆伟, 张月雅, 等. 檀香心材总RNA提取方法的比较研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2017, 25(1): 20-25.
- [20] Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12(1): 20-25.
- [21] Xi Lisha, Mu Taihua, Sun Hongnan. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 166-174.
- [22] 斯蒂芬, 帕拉蒂. 木本植物生理学[M]. 尹伟伦, 郑彩霞, 李凤兰, 等

- 译. 北京: 科学出版社, 2011: 271.
- [23] 陶 倩, 范慧艳, 张水利, 等. 南方红豆杉不同组织总RNA提取方法研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3336-3341.
- [24] Alois S, Heinrich S, Dieter E. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(1): 91-95.
- [25] Gudenschwager O, González-Agüero M, Defilippi B G. A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits[J]. South African Journal of Botany, 2012, 83: 186-192.
- [26] 毛积鹏, 祝文娟, 王 博, 等. 火炬松总RNA提取方法的比较[J]. 分子植物育种, 2016, 14(8): 2031-2035.
- [27] Ahmad J, Baig M A, Ali A A, *et al.* Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf[J]. 3 Biotech, 2017, 7(6): 373.
- [28] 王 宇, 李 玲, 王 慧, 等. 两种桃芽总RNA提取方法的比较研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2011, 42(3): 388-391.
- [29] 庞宏光, 许建锋, 张江红, 等. 杜梨不同组织总RNA提取方法比较及质量分析[J]. 果树学报, 2018, 35(S1): 66-70.

Methods of Total RNA Extraction from Different *Juglans regia* Tissues and Leaves

CHEN Hao¹, AN Rui-yun², CHANG Qing-shan¹, WANG Zi¹, MAO Xing-ye¹

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, He'nan, China; 2. The Sui & Tang Dynasties Relics Botanic Garden of Luoyang, Luoyang 471002, He'nan, China)

Abstract: [Objective] To find the efficient methods of extracting total RNA contents in *Juglans regia* tissues and young and mature leaves. [Method] The young and mature leaves were used as the materials, and the total RNA was extracted by improved borax-CTAB method, improved borax-CTAB-isopropanol method, improved SDS method, improved Trizol II method, and Plant kit method. The concentration, purity, electrophoregram and RT-PCR of the RNA were analyzed, which extracted by the improved borax-CTAB method, improved borax-CTAB isopropyl alcohol method from the total RNA of *J. regia* embryo, petiole, phloem and male flower. [Result] The total RNA were extracted successfully by the 5 methods mentioned above. The high concentration and integrity of the total RNA was extracted by the improved borax-CTAB method. The brightness of 28S rRNA was 2 times that of 18S rRNA. The ratios of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} were approximately 1.9-2.1 and higher than 2.0. The concentration was up to 1 019.0 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. In different tissues, 18S rRNA and translation initiation factor (*JreIF1A*) fragments were amplified by RT-PCR. [Conclusion] Compared with the other three methods, the improved borax-CTAB method and the improved borax-CTAB-isopropanol method have better applicability for RNA extraction from different tissues of *J. regia*. They can avoid interference from impurities. And the purity and concentration of RNA extraction are in line with the experimental requirements.

Keywords: *Juglans regia* L.; total RNA; CTAB method; SDS method; Trizol method

(责任编辑: 张 研)