

# 红花花冠总 RNA 提取方法的筛选研究

康亚兰<sup>1,2</sup>, 裴瑾<sup>1\*</sup>, 刘薇<sup>1</sup>, 罗静<sup>1</sup>, 刘维<sup>1</sup>, 陈翠平<sup>1</sup>, 吴清华<sup>1</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室  
培育基地, 成都 610075; <sup>2</sup>成都医学院药学院, 成都 610083

**摘要:** 筛选一种红花花冠总 RNA 提取方法。采用植物总 RNA 提取试剂盒法、传统 Trizol 法、改良 Trizol 法提取红花花冠总 RNA, 凝胶电泳、RT-PCR、紫外分光光度法检测三种方法提取所得总 RNA, 并将筛选得到的方法应用于红花愈伤组织总 RNA 的提取。改良 Trizol 法提取得到的红花花冠总 RNA 凝胶电泳检测可见清晰的三条带, RT-PCR 结果凝胶电泳检测可见清晰的一条带, 紫外分光光度法检测符合要求, 其余两种方法均不符合要求。改良 Trizol 法应用于红花愈伤组织总 RNA 提取, 检测结果均符合要求。改良 Trizol 法可用于红花花冠总 RNA 提取, 提取所得红花花冠总 RNA 可用于后续分子生物学实验。

**关键词:** 红花花冠; 总 RNA 提取; 植物总 RNA 提取试剂盒; 传统 Trizol 法; 改良 Trizol 法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## The Screening Study of Method of Total RNA Extraction of Safflower Corolla

KANG Ya-lan<sup>1,2</sup>, PEI Jin<sup>1\*</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, LUO Jing<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, CHEN Cui-ping<sup>1</sup>, Wu Qing-hua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of the Research and Development for Traditional Chinese Medicine Resources, Chengdu 610075, China;

<sup>2</sup>Pharmaceutical College, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

**Abstract:** A method used for the extraction of safflower corolla was screened. Plant total RNA extraction kit, traditional Trizol, improved Trizol were used for the extraction of safflower corolla. Gel electrophoresis, RT-PCR and ultraviolet spectroscopy were used for detection. And the method screened was used for the total RNA extraction of safflower callus. The total RNA extraction of safflower Corolla used improved Trizol obtained clearly visible gel electrophoresis three bands, RT-PCR results visible gel electrophoresis with a clear, UV spectrophotometry meet the requirements, the other two methods do not meet the requirements. The improved Trizol can used for the extraction of safflower corolla, the obtained total RNA can be used for the following experiment of Molecular Biology.

**Key words:** safflower corolla; total RNA extraction; plant total RNA extraction kit; traditional Trizol; improved Trizol

中药红花来源于菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 为活血化瘀要药, 《国家基本药品》目录中的血府逐瘀丸、乳癖消片等中成药都用到了红花。红花作为一种多用途的综合资源植物, 红花色素是天然食用色素, 红花种子所含的油可作食用油, 年用量一直保持在 5000 吨以上<sup>[1]</sup>。红花花冠含黄酮、生物碱等成分, 其中红花黄色素 (Safflower yellow, SY) 是红花中研究最多、最主要的有效成分。红花花冠为红花的药用部位, 红花黄色素主要存在于红花花冠中, 其含量远远大于根、茎、叶等其

他部位<sup>[2]</sup>。研究药用植物有效成分积累机制已经成为药用植物研究最有潜力的发展方向, 因此筛选一种高效、经济、能推广使用的红花花冠总 RNA 提取方法是红花有效成分积累机制研究的基础。

植物组织总 RNA 的提取是进行植物分子生物学方面研究的必要前提, 要进行 cDNA 合成、RT-PCR、基因分析、Northern 印迹杂交等均需要高纯度、高完整性的总 RNA, 因此总 RNA 提取质量的高低将直接影响植物分子生物学的后续研究<sup>[3]</sup>。红花花冠次生代谢产物复杂, 其中色素尤为影响红花花冠总 RNA 提取, 一般总 RNA 提取试剂盒的方法和传统 Trizol 法难以洗脱色素, 干扰总 RNA 的提取, 影响总 RNA 质量。因此, 本研究通过植物总 RNA 提取筛选优化, 以期得到一种高效、经济、能推广使用的红

花花冠总 RNA 提取方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

新鲜红花花冠采于成都中医药大学药用植物园,由裴瑾教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L., 清洁后吸干水分直接用于 RNA 提取。

红花愈伤组织为本实验室诱导筛选的浅绿色愈伤组织系,取出置于灭菌滤纸上吸干多余水分,切碎备用。

实验操作中所使用的塑料制品如 Eppendorf 管、吸头等均用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理 12 h, 然后 121℃ 高压灭菌 30 min 后备用。玻璃器皿于 180℃ 干热灭菌 8 h。电泳槽等仪器用去污剂清洗后用 3%  $H_2O_2$  处理 10 min, 再用 0.1% DEPC 水冲洗干净。

### 1.2 主要试剂

植物总 RNA 提取试剂盒购于 OMEGA 生物公司、Trizol 总 RNA 提取试剂购于天根生化科技有限公司,其余生化试剂均为进口及国产分析纯。

### 1.3 实验仪器

冷冻离心机 Allegra X-22R (德国 Beckman Coulter 公司)、三恒多用电泳仪 DYY-III-12B 型 (北京六一仪器厂)、凝胶成像分析系统 (GeldocEQ, Bio-Rad)、JA1003 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司)、pH 计 (METTLER TOLEDO 实验室 pH 计)、离心机 (Allegra X-22R Centrifuge)、DGG-9070A 型烘箱、DZKW-4 型电子恒温水浴锅、冰箱、涡旋震荡器。

### 1.4 红花花冠总 RNA 提取

#### 1.4.1 植物总 RNA 提取试剂盒法

参照 OMEGA 生物公司植物总 RNA 提取试剂盒说明书中方法二 (用于难提取样本) 进行。取 100 mg 新鲜红花花冠, 清洗晾干后在液氮中迅速研磨成粉末并转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 500  $\mu$ L RCL/2-mercaptoethanol (巯基乙醇), RCL/2-mercapthanol = 1 mL:20  $\mu$ L。涡旋使样品分散开, 55℃ 水浴 1~3 min。在室温下以 14,000 rpm 的最大速度离心 5 min。将上清液转移至 gDNA 柱子, 室温下 14000 rpm 离心 2 min, 过柱。在离心管内加入与滤液等体积的 Buffer RCB, 用移液器抽提 5~10 次使其充分混匀。取上步 1/2 的混合液体于 RNA mini 中, 10,000 rpm 室温下离心 1 min。弃去滤液, 把柱子放回

收集管中。把剩下的 1/2 混合液同样操作。在 RNA mini 柱下换新的收集管, 在柱子上加入 400  $\mu$ L RWC, 12000 rpm 瞬时离心, 洗涤蛋白。再换新的收集管, 在柱子上加入 500  $\mu$ L RNA wash buffer II, 12000 rpm 瞬时离心, 重复此步骤 2 次洗去盐分。把柱子放到新的收集管中, 在室温下以 10,000 rpm 空甩 3 min 洗去乙醇。把柱子转移到一个新的 1.5 mL 的离心管中, 用 30  $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O 洗脱。室温下孵化 2 min, 10,000 rpm 离心 1 min。所得红花花冠 RNA 溶液置于 -70℃ 冰箱保存备用。

#### 1.4.2 传统 Trizol 法

取 100 mg 新鲜红花花冠, 清洗晾干后在液氮中迅速研磨成粉末加到 1.0 mL Trizol 试剂 ( $V_{\text{样}} \leq 10\% \times V_{\text{trizol}}$ ) 中, 剧烈混匀, 将匀浆样品静置 5 min, 使得核算蛋白复合物完全分离。以 12000 rpm, 4℃ 环境 (需事先预冷) 离心 10 min。吸上清于一新离心管中, 加 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈震荡 15 秒后再静置 3 min, 以 12000 rpm, 4℃ 离心 15 min。样品会分成三层: 黄的有机相, 中间相以及上层无色的水相, RNA 主要在水相中。吸取 60%~65% 水相 (约 500  $\mu$ L) 转到新离心管, 按等体积比例加入预冷 (-40℃) 的异丙醇, 以沉淀 RNA, 颠倒混匀, -80℃ 冷冻 1 h。以 4℃ 12000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 加入 75% 乙醇洗涤沉淀。5000 rpm, 4℃, 离心 3 min, 沉淀。弃去上清液, 倒扣, 室温下晾干 5 min。加入 30  $\mu$ L 的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 溶解混匀。所得红花花冠 RNA 溶液置于 -70℃ 冰箱保存备用。

#### 1.4.3 改良 Trizol 法

取 100 mg 新鲜红花花冠, 清洗晾干后在液氮中迅速研磨成粉末加到 1.0 mL Trizol 试剂 ( $V_{\text{样}} \leq 10\% \times V_{\text{trizol}}$ ) 中, 剧烈混匀, 静置 15 min。以 12000 rpm, 4℃ 环境 (需事先预冷) 离心 15 min。吸上清于一新离心管中, 加 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈混匀, 静置 3 min 后, 以 12000 rpm, 4℃ 离心 15 min。吸取 60%~65% 水相 (约 300  $\mu$ L) 转到新离心管, 按 1:1 比例加入预冷 (-40℃) 的异丙醇以沉淀 RNA, 颠倒混匀, -80℃ 冷冻 2 h。以 12000 rpm, 4℃ 离心 10 min, 弃上清。加入 300  $\mu$ L 的 75% 乙醇, 7500 rpm, 4℃ 离心 10 min, 弃去上清; 重复加入 300  $\mu$ L 75% 乙醇, 7500 rpm, 4℃, 离心 10 min, 弃去上清液。倒扣, 室温下晾干 5 min。加入 30  $\mu$ L 的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 溶解混匀。所得红花花冠 RNA 溶液置于 -70℃ 冰箱保存备用。

## 1.5 红花花冠总 RNA 质量检测

### 1.5.1 总 RNA 完整性检测

分别取 4  $\mu\text{L}$  不同提取方法得到的 RNA 样品,在 2.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。120 V 恒压 20 min,凝胶成像仪成像,紫外灯下观察 RNA 条带,并照相记录。

### 1.5.2 PCR 检测

#### 1.5.2.1 逆转录反应

按照逆转录反应试剂盒说明书进行如下操作:将 RNA 在冰上解冻;Random Primer、RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ 、 $5 \times \text{RT Buffer}$ 、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、ReverTra Ace 在室温解冻,解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀,简短离心以收集残留在管壁的液体。配制 3  $\mu\text{L}$  RNA、8  $\mu\text{L}$  RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ 、1  $\mu\text{L}$  Random Primer 混合液,65  $^\circ\text{C}$  水浴加热 5 min 后置于冰上,再加入 4  $\mu\text{L}$   $5 \times \text{RT Buffer}$ 、2  $\mu\text{L}$  dNTP Mixture、1  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor、1  $\mu\text{L}$  ReverTra Ace,反应条件为:30  $^\circ\text{C}$ 、10 min;42  $^\circ\text{C}$ 、20 min;99  $^\circ\text{C}$ 、5 min;4  $^\circ\text{C}$ 、5 min。简短离心后保存于 -20  $^\circ\text{C}$ 。

#### 1.5.2.2 PCR 反应

反应体系为 20  $\mu\text{L}$ :5  $\mu\text{L}$  cDNA 模板、1  $\mu\text{L}$  上游特异性引物  $\text{P}_1$ :5-AAGCACAAACGAGCAGAAGGT-3、1  $\mu\text{L}$  下游特异性引物  $\text{P}_2$ :5-GCACATGTTGGGGT-TCTCTT-3、3  $\mu\text{L}$  dd $\text{H}_2\text{O}$ 、10  $\mu\text{L}$  Taq PCR Master Mix。反应条件为:94  $^\circ\text{C}$ 、3 min;94  $^\circ\text{C}$ 、30 sec,58  $^\circ\text{C}$ 、30 sec,72  $^\circ\text{C}$ 、1 min,30 个循环;72  $^\circ\text{C}$ 、5 min,4  $^\circ\text{C}$  保存。将扩增的产物进行琼脂糖电泳检测。

### 1.5.3 总 RNA 的纯度

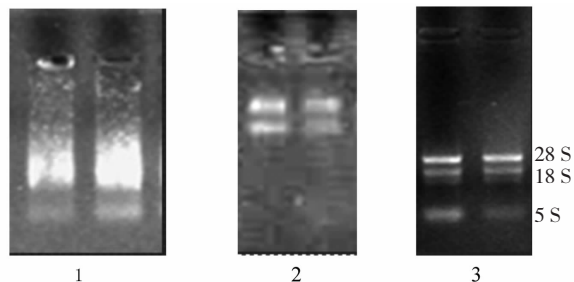
将用 3 种方法提取的 RNA 分别取 1  $\mu\text{L}$  用灭菌的 DEPC 水稀释 50 倍,用紫外检测仪分别测定 260 nm、230 nm 和 280 nm 下的紫外吸光度  $A_{260}$ 、 $A_{230}$  和  $A_{280}$ ,计算  $A_{260}/A_{230}$ 、 $A_{260}/A_{280}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取方法总 RNA 的完整性

凝胶电泳分析是检验 RNA 质量的一种重要的手段,从凝胶上可以判断所得的 RNA 的完整性和降解程度。经过电泳分析,用三种不同提取方法得到的 RNA 在 2% 的琼脂糖凝胶电泳的结果如图 1 所示。

图 1 可见,RNA 试剂盒提取法提取的总 RNA 弥散程度严重无法辨别三条带说明红花花冠总



1、植物总 RNA 试剂盒提取法;2、传统 Trizol 法;3、改良 Trizol 法  
1. Plant total RNA extraction kit;2. traditional Trizol;3. improved Trizol

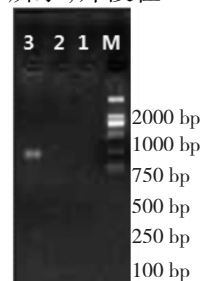
图 1 3 种提取的红花花冠总 RNA 的凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Gel electrophoresis examination of the total RNA

RNA 已经降解,无法用于后续的实验。传统 Trizol 法提取出的红花花冠总 RNA 条带只有两条分别为 18s、28s,且条带亮度差,说明部分 RNA 已经降解,无法用于后续分子生物学实验研究。而改良的 Trizol 法提取的红花花冠总 RNA,三条电泳带 5s、18s 和 28s 亮度明显,且 28s 的亮度是 18s 的 2 倍,无拖带现象,说明所提取的红花花冠总 RNA 样品比较完整,基本没有降解,可以用于后续的红花分子生物学的研究。

### 2.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 是由反转录 PCR 和实时 PCR 共同构成的,是聚合酶链式反应的一种广泛应用的变形。在 RT-PCR 中,一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 的扩增。查阅文献资料得到红花特异性引物  $\text{P}_1$ :5-AAGCACAAACGAGCAGAAGGT-3、 $\text{P}_2$ :5-GCACATGTTGGGGT-TCTCTT-3,分别与逆转录产物进行 PCR 扩增,扩增结果如图 2 所示,片段在 250 bp 左右,带型



M-Marker 2000bp;1-植物总 RNA 提取试剂盒法;2-传统 Trizol 法;3-改良 Trizol 法

M. Marker 2000bp;1. Plant total RNA extraction kit;2. traditional Trizol;3. improved Trizol

图 2 红花花冠总 RNA RT-PCR 电泳检测结果

Fig. 2 RT-PCR of gel electrophoresis examination of the total RNA

清晰。由此结果可表明,获得的 RNA 可应用于 RT-PCR 反应等以 RNA 为基础的研究分析。

### 2.3 不同方法提取红花花冠总 RNA 的纯度

采用紫外分光光度法能够检测出总 RNA 的纯度。RNA 的 A260/A280 为 1.9 ~ 2.1, 可认为 RNA 的纯度较好; A260/A280 值小于 1.8, 表明蛋白质杂质较多; A260/A280 值大于 2.2, 表明 RNA 已经降解。A260/A230 值小于 2.0, 表明裂解液中有异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇的残留。改良 Trizol 法提取得到的红花花冠总 RNA 符合要求, 其他两种均不符合。

### 2.4 改良的 Trizol 法提取红花愈伤组织 RNA

选取实验室培养的浅绿色红花愈伤组织, 将其放在灭菌滤纸上吸干多余的水分, 切碎后立即用改良的 Trizol 法提取总 RNA, 凝胶电泳检测其完整性, RT-PCR 检测其可否用于后续实验, 紫外分光光度法检测其纯度, 均符合要求。见图 3。

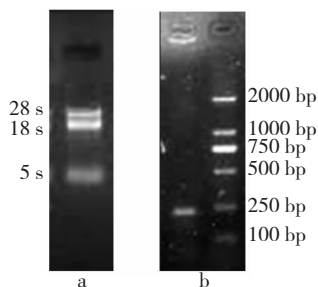


图 3 a 红花愈伤组织 RNA 凝胶电泳检测图; b 红花愈伤组织 RNA RT-PCR 凝胶电泳检测图

Fig. 3 a. Gel electrophoresis examination of the total RNA of Callus b. RT-PCR of gel electrophoresis examination of the total RNA

## 3 讨论

关于植物总 RNA 提取方法已多有报道, 但是植物材料细胞壁厚, 细胞内富含蛋白质、多糖及鞣质、萜烯、色素、酚类等物质, 很不利于总 RNA 的提取及其逆转录、酶切等实验操作。不同植物或同一植物的不同组织中内含物组分及量也可能有较大差异, 因此, 没有一种适合于所有植物总 RNA 的提取方法, 必须针对不同植物材料的特点, 对总 RNA 的提取方法进行优化选择, 才能达到高效提取高质量总 RNA 的目的<sup>[4]</sup>。

许多植物组织富含酚类化合物, 在植物材料匀浆时, 酚类物质会释放出来, 氧化后使匀浆液变为褐色, 并随氧化程度的增加而加深, 这一现象被称为褐

化效应(browning effect)。被氧化的酚类化合物(如醌类)能与 RNA 稳定地结合, 从而影响 RNA 的分离纯化。但 RNA 提取的难易程度与材料中酚类物质的总量之间并无相关性, 因此认为不是所有的酚类化合物都影响 RNA 的提取。但一般认为所谓的“缩合鞣质”即聚合多羟基黄酮醇类物质(如原花色素类物质)是影响 RNA 提取的一类化合物。红花花冠富含红花黄色素等黄酮类物质, 干扰 RNA 提取, 加大了 RNA 提取的难度。实验采用植物总 RNA 提取试剂盒的方法提取红花花冠 RNA, 电泳检测发现 RNA 降解严重, 无法用于后续实验。采用传统 Trizol 法提取红花花冠 RNA, 实验过程中发现, 红花花冠色素过多, 无法除去。

综合以上两种方法改良传统 Trizol 法。红花花冠粉末置于 Trizol 溶液中提取时, 放置时间增加至 15 min, 使尽可能多的 RNA 溶解于 Trizol 提取液中; 由于红花花冠质轻, 易漂浮于 Trizol 提取液中, 影响后续实验。因此, 第一次离心增加至 15 min, 尽可能沉淀完全; 分层后, 在吸取上清液时, 吸取 50% 水相, 尽可能避免吸收到中间层的蛋白, 以保证 RNA 的纯度; 异丙醇沉淀 RNA 过程中, 增加至 2 小时, 尽可能多的使 RNA 沉淀; RNA 清洗过程中, 三次用 300  $\mu$ L 75% 乙醇清洗, 保证色素被清洗干净。

将改良 Trizol 法应用于红花花冠总 RNA 提取, 凝胶电泳检测可见其完整性良好, 紫外检测可见其纯度符合要求, RT-PCR 检测说明此法提取得到的红花花冠总 RNA 可用于后续实验, 因此改良 Trizol 法是一种有效的红花花冠总 RNA 提取方法。作者将该方法应用于红花愈伤组织总 RNA 提取当中, 发现该方法同样适用, 唯一不同的是在第一步研磨破坏细胞时, 由于红花愈伤组织含大量水分, 加入液氮后迅速凝结成冰, 不利于研磨, 研磨前需将愈伤组织放在灭菌滤纸上除去多余的水分并切碎再进行液氮研磨。凝胶电泳、RT-PCR 凝胶电泳、紫外检测改良 Trizol 法提取得到的红花愈伤组织总 RNA 均符合要求。说明改良 Trizol 法可以应用于红花愈伤组织总 RNA 提取。因此, 改良 Trizol 法是一种有效并值得推广的植物 RNA 提取方法。

### 参考文献

- 1 Flora of China Editorial Board(《中国植物志》编辑委员会编). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 2010. (下转第 331 页)