

• 药材与资源 •

铁皮石斛 RNA 提取及 RT-PCR 检测

李 标^{1,2}, 王伯初^{1,2}, 唐 坤^{1,2}, 刘 毅¹, 戴传云², 段传人²(1. 重庆邮电学院生物信息学院, 重庆 400065; 2. 重庆大学生物工程学院
生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要:目的 有效地提取铁皮石斛高质量的 RNA, 为研究环境胁迫对铁皮石斛生长与代谢影响的分子表达机制奠定基础。方法 建立声波处理的刺激组与对照组, 改良苯酚-氯仿法制备的 RNA, 分光光度法检测其量, 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性; 所得的总 RNA 经过 RT-PCR 扩增, 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测显示其差异 cDNA 片段。结果 提取的总 RNA A_{260}/A_{230} 为 3.16, A_{260}/A_{280} 为 1.96, 产量达 0.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 电泳条带清晰, 完整性良好, 可筛选出明显的差异 cDNA 片段, 分子质量在 240~600 bp。结论 用该方法能高质量地提取富含多糖的药用植物总 RNA。

关键词: 铁皮石斛; RNA 提取; 声波; RT-PCR

中图分类号: R282.1

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0585-04

RNA Extraction and RT-PCR detection of *Dendrobium candidum*LI Biao^{1,2}, WANG Bo-chu^{1,2}, TANG Kun^{1,2}, LIU Yi¹, DAI Chuan-yun², DUAN Chuan-ren²

(1. College of Bioinformation, Chongqing University of Posts & Telecommunications, Chongqing 400065, China;

2. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education,
College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** The high quality RNA from the plantlet of *Dendrobium candidum* was isolated efficiently. It laid a foundation to study the mechanism of molecular expression on its growth and metabolism under environmental stress. **Methods** The groups stimulated by sound wave and the control groups were established. Total RNA was prepared by a modified phenol-chloroform method. The content was determined by a spectrophotometer. The integrity of RNA was detected by electrophoresis with 1.0% denatured agarose gel. The total RNA obtained was amplified by RT-PCR. The differential cDNA bands were displayed on 6% denatured polyacrylamide gel by electrophoresis and silver staining. **Results** The ratios of total RNA A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} were 3.16 and 1.96, respectively. The yield was 0.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fresh weight. The bands were clear on agarose gel and the integrity of RNA was good. The differential cDNA bands were screened with molecular weight of 240—600 bp. **Conclusion** The method of modified phenol-chloroform can be used to isolate RNA from *D. candidum* with high quality and high yield.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl; RNA extraction; sound wave; RT-PCR

植物生长发育是一系列基因表达和内外环境因子影响共同作用的结果。分离和提纯植物体内的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行差异基因筛选克隆、Northern 杂交和蛋白质体外翻译实验等, 都需要高质量的 RNA。

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 是一种富含多糖的药用植物^[1], 尚未见到铁皮石斛总 RNA 提取的报道。利用适当的声波胁迫

铁皮石斛的特异基因表达, 可以提高其多糖的量 3.42%。为了研究适当的声波胁迫对铁皮石斛次生代谢产物表达的影响及其特异表达基因的筛选, 必须得到高质量的 RNA。有关植物组成 RNA 的提取方法已有不少报道^[2,3]。由于植物组织中往往富含多糖; 而多糖的许多理化性质与 RNA 很相似, 因此很难将它们分开^[4], 致使污染多糖的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。

收稿日期: 2005-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(30470431); 重庆市科委自然科学基金(CSPC2005BB1094); 重庆大学优秀博士论文风险基金资助(200301)

作者简介: 李 标(1970—), 男, 湖北黄梅人, 重庆邮电学院生物信息学院讲师, 2003 年 3 月考入重庆大学生物工程学院在职博士研究生, 研究方向为生物力学与植物分子生物学。Tel: (023) 60712795 Fax: (023) 62460025

E-mail: cqptlibiao@yahoo.com.cn; libiao@126.com

本实验首先采用了 RNeasy Plant Mini 试剂盒 (Qiagen) 提取铁皮石斛的总 RNA, 但收率不高, 不能满足后续研究。但采用改良酚-氯仿法提取适当声波处理的铁皮石斛刺激组和对照组的总 RNA, 并通过逆转录差异显示 PCR 扩增检测, 发现此方法能够得到良好的总 RNA 并能满足实验的要求。

1 材料和方法

1.1 实验材料: 铁皮石斛接种 2 个月的无菌试管苗。

1.2 实验方法

1.2.1 声波刺激处理: 对生长 2 个月的铁皮石斛组培苗, 在频率 1 000 Hz、声强 100 dB 的声波刺激下, 每天 8:30~9:30 刺激 1 h, 连续刺激 6 d, 建立对照组(C)和刺激组(S), 刺激方法参见文献[5]。

1.2.2 总 RNA 提取: 取 500 mg 嫩叶片, 加液氮研磨, 加入研磨缓冲液 (1% SDS 以 HCl 调节 pH 至 8.2, 0.18 mol/L Tris, 0.09 mol/L LiCl, 4.5 mmol/L EDTA) 15 mL, 再研磨。

将含样品的缓冲液移入试管中, 加入等体积的苯酚-氯仿混合液。剧烈震荡试管 10 min, 室温下, 3 000 r/min, 离心 15 min 分离 (可再用酚-氯抽提一次)。取出上清液, 加入 0.1 倍体积的 (-20 °C 保存的) 异丙醇, 放入 -20 °C 保存 1 h。

接着离心 (10 000 r/min, 30 min, 4 °C), 沉淀溶解在 0.75 mL SDW 中 (可再离心除去不溶物)。产生的黏液包含 RNA、DNA 和碳水化合物, 将其转移至灭菌的离心管中, 通过添加相同体积的 8 mol/L LiCl, 并且 -20 °C 保温至少 1 h。再次按以上方法沉淀。

将沉淀溶解在 500 μ L SDW 中, 并再次离心。将上清液移入新离心管中, 加 LiCl, 并离心。沉淀溶解在 200 μ L 250 mmol/L 乙酸钾中, RNA 用 2.5 倍体积的冰乙醇沉淀, 并在 -20 °C 保温 30 min, 接着再次沉淀。

用 200 μ L 80% 乙醇洗沉淀, 真空下干燥并且最终溶解在 100~500 μ L SDW 中。对不溶解的物质再次离心除去, 最终的上清液转入一新的离心管中。将 RNA 样品在 -70 °C 下保存, 备用。

1.2.3 RNA 量的鉴定: RNA 量用紫外分光光度计 (UV-756B) 测定其质量浓度及 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值, 用 1.2% 的变性琼脂糖电泳来检测总 RNA 完整性。

1.2.4 DDRT-PCR 和 PAGE 检测: 所用的锚定引物为: HT₁₁M: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA/G/C-3' (上海生工合成), 以制备的总 RNA 为模板进行逆转录反应。每管 20 μ L 反应体系, 操作如下: 2

μ g 的总 RNA, 4.96 μ L 20 μ mol/L 的锚定引物, 加 DEPC 处理水到 11 μ L; 充分混匀, 70 °C 水浴 5 min, 冰上骤冷; 依次加入 4 μ L 5 $\times$ M-MuLV RT 逆转录酶 Buffer, 2 μ L 10 mmol/L 4 $\times$ dNTP, 0.5 μ L 20 U RNase 抑制剂, 加 DEPC 处理水定容至 19 μ L; 37 °C 水浴 5 min, 加 1 μ L M-MuLV 逆转录酶 (20 U/ μ L) 42 °C 维持 60 min; 后在 70 °C 维持 10 min, 冰上骤冷。逆转录产物可以立即 PCR 扩增, 也可以放置 -20 °C 保存。

选用了 8 个随机引物 H-AP (HAP1, AGCTTGATTGCC; HAP2, AAGCTTCGACTGT; HAP3, AAGCTTTGGTCTGA; HAP4, AAGCTTCTCAACG; HAP5, AAGCTTAGTAGGC; HAP6, AAGCTTCGACCAT; HAP7, AAGCTTAACGAGG; HAP8, AAGCTTTTACC-GC) (上海生工合成), 以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增。反应体系包括: 9 μ L 无菌双蒸水, 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液 (pH 8.4), 1.2 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 1.6 μ L 25 μ mol/L 4 $\times$ dNTP 混合物, 2 μ L 2 μ mol/L H-AP, 2 μ L 2 μ mol/L HT₁₁M (与逆转录同), 2 μ L 逆转录产物, 0.2 μ L 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶, 总反应体系 20 μ L。

PCR 反应条件: 95 °C, 2 min; 94 °C, 30 s, 42 °C, 2 min, 72 °C, 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。配制 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 250 V 恒压电泳 9 h, 银染干胶后扫描。

2 结果

2.1 RNA 产率和纯度: 分别提取了铁皮石斛刺激组和对照组新鲜材料各 500 mg 左右, 每组各提了 3 管, 结果见表 1。不论是对照组还是刺激组, 从 500 mg 铁皮石斛新鲜材料中均可得到 120~140 μ g 的总 RNA, 平均得率 0.27 μ g/mg。其 A_{260}/A_{280} 平均为 1.96, A_{260}/A_{230} 平均为 3.16, 显示 RNA 很纯, 没有被蛋白质或酚等污染; 同时, 也显示经声波处理的刺激组均比其对照组所含的总 RNA 要高, 刺激组平均产率为 0.274 μ g/mg, 对照组平均产率为 0.266 μ g/mg。

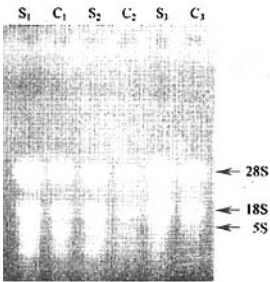
2.2 RNA 完整性: 对铁皮石斛每一刺激组和对照组的总 RNA 进行了 1.0% 琼脂糖电泳检测, 如图 1 所示。28S 和 18S 的两条带都比较清晰, 且 28S 的带亮大约是 18S 的两倍, 说明提取的总 RNA 完整性很好。声波刺激组均比对照组的带亮。

2.3 RT-PCR 检测: 将铁皮石斛响应声波刺激的处理组和对照组总 RNA 进行逆转录, 再以此为模

表 1 刺激组与对照组总 RNA 质量比较

Table 1 Comparison of total RNA quantity between stimulated groups and control groups

样 品	鲜重/ mg	总体 积/ μ L	A_{260}	$A_{260}/$ A_{280}	$A_{260}/$ A_{230}	RNA 质 量/ μ g	产率/(μ g· mg^{-1})
刺激组(S_1)	500.2	100	0.169	1.97	3.07	135.4	0.270
对照组(C_1)	499.9	100	0.167	1.96	2.96	133.2	0.264
刺激组(S_2)	499.8	100	0.159	1.90	2.94	126.8	0.255
对照组(C_2)	499.3	100	0.156	1.92	3.00	124.7	0.249
刺激组(S_3)	499.5	100	0.186	2.02	3.49	148.7	0.298
对照组(C_3)	499.6	100	0.178	1.98	3.50	142.5	0.285
平均	499.7	100	0.169	1.96	3.16	135.3	0.270



泳道 S_1 - C_1 , S_2 - C_2 , S_3 - C_3 分别为相对应的声波刺激组
和对照组的总 RNA 电泳图
Lanes S_1 , C_1 , S_2 - C_2 , and S_3 - C_3 simultaneous isolation RNA
electrophoresis of relative sound stimulation and control
groups respectively

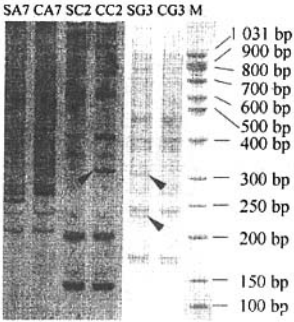
图 1 铁皮石斛总 RNA(1 μ g) 1.0% 琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel (1.0%) electrophoresis of total
RNA (1 μ g) isolated from callus of *D. candidum*

板进行差异显示 PCR 扩增,经 6% 变性聚丙烯酰胺
凝胶电泳,银染干胶后扫描,结果如图 2 所示。

不同的锚定引物和随机引物的 PCR 产物,经过
6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染,声波刺激组和对照
组比较,具有较为清晰的差异条带,相对分子质量在
240~600 bp。而且,多次重复逆转录和 RT-PCR 产
物,具有稳定的重现率。说明所提的总 RNA 活性很
好,质量稳定,能够进行后续研究。

3 讨论

利用 RT-PCR 进行分离克隆特定条件下差异显
示的基因,最重要的一点就是必须首先获得完整性良
好的纯化总 RNA^[6]。在常规的方法中,通过 SDS-盐
酸胍处理可以部分去除一些多糖;在高浓度 Na^+ 或
 K^+ 离子存在条件下,通过苯酚、氯仿抽提可以除去
一些多糖;通过 LiCl 沉淀 RNA 也可以将部分多糖留
在上清液中,但即使通过这些步骤仍会发现有多糖
的多糖与 RNA 混杂在一起^[7]。所以针对不同的植
物,都需要有一套有效的方法来解决其 RNA 分离纯
化时多糖的污染,而多糖的污染是提取植物 RNA 时



SA7 和 CA7、SC2 和 CC2、SG3 和 CG3 分别为刺激组与对照组
不同的锚定引物和随机引物对。差异显示的条带用箭头标示, M
为已知的分子量标记
SA7 and CA7, SC2 and CC2, SG3 and CG3 different primer
couples of an anchored primer and an arbitrary primer of
stimulated and control groups, respectively. Band indicated by
an arrow is a differentially displayed band. M is known
molecular size marker

图 2 铁皮石斛总 RNA 的 RT-PCR 产物 6% PAGE
电泳银染图

Fig. 2 Silver-stained electrophoresis 6% PAGE
analysis of RT-PCR product from total RNA
extracted from callus of *D. candidum*

常遇到的一个棘手问题。在完整的细胞内这些物质在
空间上与核酸是分离的,但当组织被研磨,细胞破碎
后,这些物质就会与 RNA 相互作用,会形成难溶的
胶状物与 RNA 共沉淀下来^[8];而且多糖可以抑制许
多酶的活性^[4],因此如何除去多糖便成为富含多糖植
物进行分子生物学操作中常见的难题。

本实验中,首先采用 SDS-盐酸胍处理可以部分
去除一些多糖;但是由于铁皮石斛中多糖的量太大,
仅通过此法完全去掉 RNA 中的多糖是不可能的。
因此,采用在 K^+ 离子存在的情况下,用预冷的($-$
20 $^{\circ}\text{C}$)无水乙醇沉淀 RNA,可以进一步地除去
RNA 中的多糖。在实验中首先采用 LiCl 除去多糖,
因此避免了在高浓度 K^+ 离子存在时会因多糖沉淀
而使 RNA 和多糖共同沉淀,而达不到去掉多糖的
目的^[9]。本方法可从大量材料中分离提取高质量的
植物总 RNA(图 1),如用酚/氯仿重复抽提一次,其
RNA 的纯度会更好。本方法也适用于微量材料(100
mg 左右)。用此方法能够提取到高质量的铁皮石斛
总 RNA,并能顺利地进行逆转录和 PCR 扩增,已筛
选出多条响应声波胁迫的特异表达的 cDNA 片段。
对其后续的 Northern 杂交、克隆测序和全 cDNA
的合成等工作正在进行中。

References:

[1] Yang H, Wang S C, Wang Z T, et al. Structural analysis of

- polysaccharides from *Dendrobium candidum* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39 (4): 254-256.
- [2] Arun D S, Prabhjot K G, Prabhjeet S. RNA Isolation from plant tissues rich in polysaccharides [J]. *Anal Biochem*, 2003, 314 (2): 319-321.
- [3] Wang D H, Wang B C, Li B, et al. Extraction of RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates [J]. *Colloids Surfaces B*, 2004, 36: 111-114.
- [4] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. *Biofeedback*, 1992, 13 (1): 52-54.
- [5] Liu Y Y, Wang B C, Long X F, et al. Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus [J]. *Colloids Surfaces B*, 2002, 24: 321-326.
- [6] Minafra A, Hadidi A, Martelli G P. Detection of grapevine closterovirus a in infected tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *Vitis*, 1992, 31: 221-227.
- [7] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, 12: 198-203.
- [8] Geuna F, Harting H, Scienza A. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 61-67.
- [9] Bahloul M, Burkard G. An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 210-213.

利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系

王慧中, 卢江杰, 施农农, 应奇才

(杭州师范学院 生物化学与分子生物学杭州市重点实验室, 浙江 杭州 310036)

摘要:目的 通过对 13 种石斛属植物进行遗传多样性和亲缘关系分析, 为更好地开发利用石斛资源奠定基础。方法 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析遗传多样性, UPGMA 类平均法进行聚类分析。结果 利用筛选出的 10 个随机引物对供试材料 DNA 进行随机扩增, 共得到 188 条带, 其中多态性带有 180 条, 多态性百分率为 95.74%。采用 UPGMA 类平均法对扩增出的谱带进行遗传聚类分析, 得出反映各种间亲缘关系的树状图。在遗传距离 (D) = 0.63 处, 可将供试材料分为 3 类, RAPD 对基因组的分析结果与传统分类学的结果差异不大。结论 该标记技术对石斛属植物的遗传多样性和分类研究是可行的。

关键词: 石斛属; RAPD; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: R282.7

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0588-05

Analysis of genetic diversity and affinity relationships among 13 species of *Dendrobium* Sw. by RAPD

WANG Hui-zhong, LU Jiang-jie, SHI Nong-nong, YING Qi-cai

(Key Laboratory of Hangzhou City for Biochemistry and Molecular Biology, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

Abstract: **Objective** Genetic diversity and affinity relationships among 13 species of *Dendrobium* Sw. were analyzed, the result laid a solid foundation for the better use of this resources. **Methods** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analyze genetic diversity, and the dendrogram was constructed by UPGMA. **Results** Ten RAPD primers were applied to do random amplification. A total of 188 DNA bands was detected, 180 among which were polymorphic, the average rate of polymorphic bands was 95.74%. The result of cluster analysis by using UPGMA method showed that 13 genotypes could be classified into three types in genetic distance 0.63. This outcome was corresponding to the result by using traditional classification. **Conclusion** It is concluded that RAPD markers can be used on the studies of genetic relationships and classification of species of *Dendrobium* Sw. sensitively.

Key words: *Dendrobium* Sw.; RAPD; genetic diversity; genetic relationships

兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 植物除了观赏之外, 不少还是珍贵的药用植物。国内外学者已对石斛属 37 种植物进行了化学成分分析,

从中分离鉴定出生物碱类、多糖类、倍半萜类、菲醌类、联苄类、苊酮类、香豆素类以及挥发油等多种化学成分, 并对其药理活性进行了研究^[1]。目前有关石

收稿日期: 2005-07-10

基金项目: 浙江省自然科学基金 (301406); 浙江省“151”和杭州市“131”人才基金资助项目

作者简介: 王慧中 (1962—), 男, 教授, 博士, 主要从事植物分子生物学研究。Tel: (0571) 28865198 E-mail: whz62@163.com