

基于 LiCl 法优化酿酒葡萄叶片的 RNA 提取

成丹丹, 范丽娜, 王美娇, 于放, 王燕燕

(大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116033)

摘要: 为获得纯度高、质量好的酿酒葡萄植株叶片 RNA 以用于荧光实时定量分析, 为后续以酿酒葡萄叶片 RNA 为材料研究相关转录水平的调控提供技术保障, 以经典酿酒葡萄赤霞珠叶片为试验材料, 比较分析了重蒸酚法、Trizol 法、改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和 LiCl 法(基于改良的 SDS 法)4 种方法对酿酒葡萄叶片 RNA 提取的影响。结果表明, 重蒸酚法提取 RNA 浓度较低, 完整性较差, 存在部分降解; Trizol 法提取的 RNA 则有部分 DNA 污染; 改良 CTAB 法提取浓度较高, 但蛋白和 DNA 污染严重; LiCl 法提取结果显示, 28S 的条带亮度是 18S 的 2 倍, 条带无拖尾, 完整性较好, 存在 DNA 污染和少量的蛋白污染。进一步在 LiCl 法基础上利用醋酸钠、DNAase 消化、苯酚抽提法进一步优化, 并采用荧光实时定量验证, 结果表明, 醋酸钠的加入 RNA 质量无明显改善; 然而, 经氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 2 次, 氯仿抽提 1 次, 氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 1 次, 并经 DNAase 进行消化, 最终提取出质量浓度为 173.611 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $A_{260/280}$ 为 1.803 纯度高、完整性较好且无蛋白和 DNA 污染的葡萄叶片总 RNA; 经实时荧光定量 PCR 进一步验证, 该方法提取的 RNA 经反转录后获得较好的扩增曲线以及融解曲线, 并能够对相关基因进行定量分析。

关键词: 酿酒葡萄; 赤霞珠; RNA 提取; LiCl 法优化; qRT-PCR

中图分类号: S663.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2481(2024)02-0050-08

Optimization of RNA Extraction from Wine Grape Leaves Based on LiCl Method

CHENG Dandan, FAN Lina, WANG Meijiao, YU Fang, WANG Yanyan

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116033, China)

Abstract: In order to obtain RNA from wine grape leaves with high purity and good quality for fluorescence real-time quantitative analysis, and to provide technical support for subsequent studies on the regulation of transcription levels using wine grape leaf RNA as materials and have certain application value, in this study, classic wine grape *Cabernet Sauvignon* leaves were used as the experimental materials. Effects of four methods, including resteam phenol, Trizol, improved cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB), and LiCl(based on improved SDS), on RNA extraction from wine grape leaves were compared and analyzed. The results showed that the concentration of RNA extracted by resteam phenol was low, the integrity was poor, and there was partial degradation. In addition, the RNA extracted by Trizol method had some DNA contamination. In the modified CTAB method, the extraction concentration was high, but the protein and DNA contamination was serious. In the RNA swim lane extracted by LiCl method, the brightness of the 28S band was twice of that of the 18S band. The band has no dragging phenomenon, and the extracted RNA integrity was good, but there was still DNA contamination and a small amount of protein contamination. Further, on the basis of LiCl method, sodium acetate, digestion by DNAase, and phenol extraction method were used for optimization. The results showed that the addition of sodium acetate did not improve the quality of RNA. However, total RNA from grape leaves with high purity, good integrity, and no protein and DNA contamination ($173.611 \mu\text{g}/\text{mL}$, $A_{260/280} = 1.803$) was extracted by extracting chloroform and water-saturated phenol(1:1) twice, chloroform once, chloroform and water-saturated phenol(1:1) once, and digestion by DNAase. The results of real-time fluorescence quantitative PCR further verified that the RNA extracted by this method obtained good amplification curve and melting curve after reverse transcription, and could be used to quantitatively analyze related genes.

Key words: wine grape; Cabernet Sauvignon; RNA extraction; LiCl method optimization; Real-time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR)

葡萄隶属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*), 是一种原产于西亚、欧洲和北非落叶藤本植物, 它

收稿日期: 2023-06-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31970324); 辽宁省教育厅基础研究项目(J2020042)

作者简介: 成丹丹(1997-), 女, 贵州遵义人, 在读硕士, 研究方向: 植物分子生物学与代谢调控。

通信作者: 王燕燕(1984-), 女, 辽宁阜新人, 讲师, 博士, 主要从事植物分子生物学与代谢调控研究工作。

是世界第三大果树^[1],国际葡萄和葡萄酒组织(OIV)发布的2021年全球葡萄酒行业最新数据报告显示,2020年中国葡萄种植面积位列全球第3,仅次于西班牙和法国^[2]。葡萄的使用用途分为2种,一种是鲜食葡萄,也可制作成葡萄干;另一种为酿酒葡萄^[3]。调研结果发现,葡萄酒行业具有很大的市场潜力,酿酒葡萄作为葡萄酒的原料,是葡萄酒品质的决定性指标,赤霞珠作为经典酿酒葡萄备受关注。

随着葡萄基因组全序列的测序完成,葡萄分子生物学研究领域已经扩展到基因组学、蛋白质组学、植物生理及病理等各个方向,更精确到基因分析、cDNA文库构建、蛋白质的互作研究等^[4]。而无蛋白和DNA污染且浓度高的RNA则是上述研究工作的基础。研究发现,植物各组织总RNA提取比动物或者微生物组织总RNA提取难度要大得多,根本原因在于植物组织具有坚硬的细胞壁,细胞内含有多种丰富的次级代谢产物,破碎细胞后,此类物质将在不同时间以不同形式干扰RNA的提取。另外,组织细胞内、操作过程中产生的核糖核酸抑制剂均会对分离样品中的RNA进行降解,其高稳定性是造成RNA分离困难的主要原因。葡萄的不同组织在不同发育阶段其结构和成分有着或多或少的差异^[5],特别是葡萄中含有大量干扰RNA提取的物质:如多酚和多糖类,其中,多酚在提取RNA的过程中非常容易被氧化为醌类物质,RNA可以与其发生不可逆结合,影响RNA提取的纯度^[6-7];多糖则由于其许多理化性质与RNA相似,在提取的过程中会与RNA结合形成难以分开的共沉淀^[8]。基于以上原因,最终导致葡萄组织RNA的提取效率不高,且往往耗费大量的时间及试验成本,成为急需解决的问题。

目前,植物RNA的提取方法有很多种,常用方法有异硫氢酸胍法^[9-10]、苯酚法、改良Gomez法、LiCl-尿素法、CTAB法和改良CATB法^[11-12]、SDS法和改良SDS法、Trizol法、成品试剂盒法^[13]等。针对试验材料的不同,不同的方法各有其优劣性。王暑辉等^[14]对SDS酚法进行改进,从侧柏中提取RNA;涂国英等^[15]采用改良CTAB法从香蕉叶片中提取了高质量的RNA。针对葡萄组织中多酚、多糖类物质含量较高,张今今等^[16]比较了改良SDS-酚法、成品试剂盒和异硫氰酸胍法这3种完全不同的方法,以期获得质量高、完整性好的总RNA;

YANG等^[17]采用SiO₂自旋柱的提取方法,成功从葡萄果实中提取出可用于病毒RT-PCR的高质量RNA;房经贵等^[18]采用CTAB法从葡萄冬芽中提取RNA,李红熙等^[19]采用CTAB结合SDS法从蛇龙珠葡萄中提取的RNA可以满足RT-PCR的要求;付阳等^[20]采用改良CTAB法从山葡萄提取了适用于RT-PCR、构建cDNA文库等研究的总RNA;RNA试剂盒法是获取植物高质量RNA样品的常用技术^[13],具有操作简便、耗时短和试验重复性好的优点^[21];杨晓燕等^[13]将3种常用的试剂盒进行改进,从葡萄叶片中提取出适合转录组测序的RNA;BEUVE等^[22]采用试剂盒法成功从黑比诺葡萄的绿叶中提取出可用于检测葡萄卷叶病毒的总RNA。尽管已经有很多研究者经过大量试验对这4种RNA提取法进行调整、优化,进而用来提取不同植物叶片的总RNA,但对酿酒葡萄赤霞珠叶片总RNA的提取尚未见系统的研究与分析。

基于试验方法的广泛性及试验条件的要求,本研究采用重蒸酚法、Trizol法、改良CTAB结合SDS法以及LiCl法(基于改良SDS法)4种方法,从经典酿酒葡萄赤霞珠叶片中提取总RNA,通过比较4种方法提取得到的总RNA的纯度和浓度确定较适合的提取方法,并在此基础上进行优化,最终获得适用于实时荧光定量PCR分析的最优方法,旨在为后续以酿酒葡萄赤霞珠叶片为材料进行研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用植物材料为实验室种植的3年生赤霞珠(Cabernet Sauvignon),于2022年3月种植于营养土:蛭石:椰糠体积比为7:2:1的土壤中,在光暗交替(光照16h)、温度为25℃的温室中常规化管理,于赤霞珠植株生长至10片叶时采样。

1.2 RNA提取方法

1.2.1 Trizol法(Trizol method) RNase free 2 mL EP管中加入0.2 g新鲜叶片,放入无菌氧化锆,加入600 μL Trizol,50 Hz破碎180 s,具体操作参考文献^[23]进行。

1.2.2 重蒸酚法(Resteam phenol method) 将0.2 g新鲜叶片经液氮研磨成粉末,加入1.2 mL预热后的重蒸酚和10 μL(3 mol/L) NaAC,后续参照苗琪^[24]的研究方法进行。

1.2.3 CTAB结合SDS法(Improved CTAB method)

称取 0.4 g 新鲜叶片于研钵中,加入 0.05 g PVP,加入适量液氮迅速研磨成粉末,参照 HENRIQUE 等^[25]以及王杰等^[26]的研究方法进行。

1.2.4 LiCl法(LiCl method) 称取 0.1 g 的新鲜叶片,用液氮在研钵中研磨成粉末,参照张彦革等^[27]

以及彭婧等^[28]的方法提取,采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和纯度。

1.3 LiCl法的优化处理

在 LiCl法基础上利用醋酸钠、DNAase 消化、苯酚抽提法进一步优化(表 1)。

表 1 LiCl法提取 RNA 的优化流程
Tab.1 Optimization of RNA extraction process by LiCl method

处理	Treatment	操作步骤	Operating steps	优化目的	Optimizing strategy
S1	50 μ L β -巯基乙醇			醋酸钠保持提取液酸性环境	
S2	20 μ L 醋酸钠			醋酸钠保持提取液酸性环境	
S3	20 μ L 醋酸钠和 25 μ L β -巯基乙醇			醋酸钠保持提取液酸性环境	
S4	20 μ L 醋酸钠和 50 μ L β -巯基乙醇			醋酸钠保持提取液酸性环境	
		RNase-Free DNase I 消化	根据文献[18]步骤操作		去除 DNA 污染
I	氯仿与水饱和酚(体积比 1:1)抽提 2 次				去除蛋白污染
II	氯仿抽提 1 次,水饱和酚抽提 2 次,氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 1 次				去除蛋白污染
III	氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 5 次				去除蛋白污染
IV	氯仿和水饱和酚抽提 2 次,氯仿抽提 1 次,氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 1 次				去除蛋白污染

1.4 RNA 检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像仪上观察 RNA 条带,以筛选出浓度高、无污染的赤霞珠植株叶片总 RNA。同时采用超微量分光光度计(Micro Drop)测定 1 μ L 样品中 RNA 浓度,并分别检测 260 nm 和 280 nm 下吸光光度值,并计算 $A_{260/280}$ 值^[29]。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

参照文献[30]将获得的酿酒葡萄植株叶片 RNA 样品反转录为 cDNA,向 8 联管内依次添加 Primer F、Primer R、dTOP Mix(实时荧光定量检测预混酶试剂)、ddH₂O。Real Time PCR 仪器为 LightCycle[®]480II。

2 结果与分析

2.1 4 种不同方法提取赤霞珠葡萄叶片 RNA 比较

在样品基本一致的前提下,不同提取方法处理样品方式不同,Trizol 法是需要借助仪器对植物组织进行破碎,其他方法则需液氮研磨后放 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。利用 Trizol 法提取的 RNA 时间短,约 6.5 h,而利用重蒸酚法提取时间 7 h,CTAB 结合 SDS 法用时约为 9 h,LiCl 法总体用时最长,需要过夜;但是相比前 3 种方法,LiCl 法实际操作时间比较短,且 LiCl 法不需要组织研磨仪和水浴锅等,操作比较简单。

经 4 种方法提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示(图 1),重蒸酚法和 Trizol 法提取 RNA 的 18S 和 28S 的条带亮度相近且均很弱,表明提取 RNA 浓度较低,完整性较差,其中,Trizol 法提取的 RNA 存在基因组 DNA 污染。改良 CTAB 法、LiCl 法提取的 RNA 条带则表现出较强的亮度,表明这 2 种方法提取的赤霞珠总 RNA 浓度高,其中改良 CTAB 法提取结果显示有大量弥散条带以及胶孔位置的阻滞条带,表明存在 DNA 污染以及蛋白污染;LiCl 法提取的 RNA,28S 的条带亮度是 18S 的 2 倍,并且条带无拖带现象,表明这种方法提取的 RNA 完整性较好,浓度较高,但是依然有 DNA 污染和少量的蛋白污染。总之,上述结果表明,重蒸酚法和 Trizol 法提取率低,改良 CTAB 法和 LiCl 法尽管能够保证浓度,但 CTAB 法 DNA 以及蛋白污染程度更高,仅采用上述 4 种方法均不能直接用于酿酒葡萄赤霞珠叶片 RNA 的提取,因此,选择完整性高、污染程度较弱的 LiCl 法继续优化,以期最终提取出完整性好、浓度高、无 DNA 及蛋白污染的赤霞珠叶片 RNA。从重蒸酚提取葡萄叶片中可以发现,尽管提取的 RNA 完整性较差,但是没有 DNA 污染。对照组没有优化的 LiCl 法(只加 50 μ L 的 β -巯基乙醇)提取的 RNA,浓度和完整性均较好,但是 DNA 污染比较严重,并且仍存在少量蛋白污染。

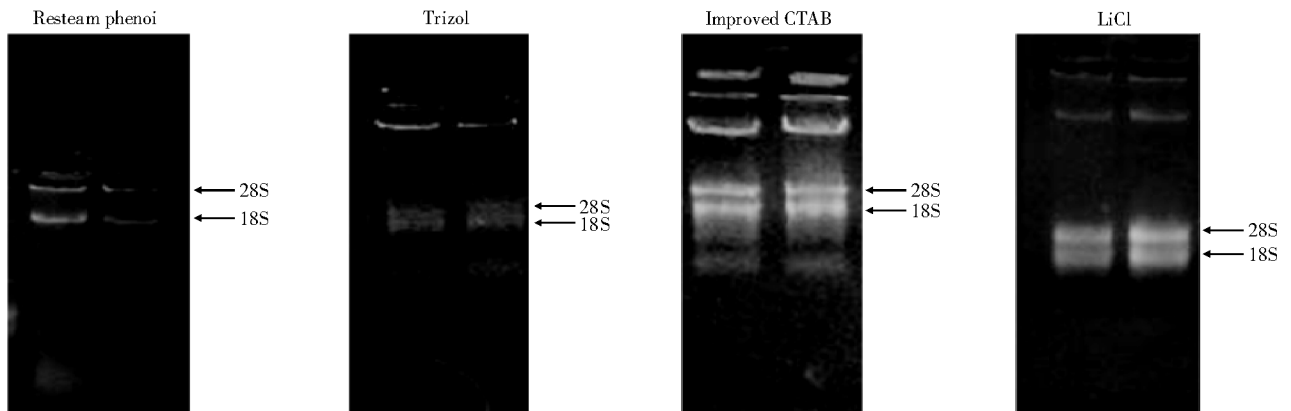


图1 赤霞珠叶片总RNA琼脂糖凝胶电泳检测
Fig.1 Detection of total RNA from *Cabernet Sauvignon* leaves by agarose gel electrophoresis

2.2 不同处理优化LiCl法

醋酸钠在植物提取总RNA过程中起到去除多糖、基因组DNA、维持提取液的酸性环境、不破坏RNA结构的作用^[31],因此,首先利用醋酸钠优化LiCl法。由图2-A可知,仅醋酸钠时无电泳条带

(Lane2);当组合25 μ L和50 μ L β -巯基乙醇时(分别对应Lane3和Lane4),出现蛋白质和DNA污染条带,但所得RNA条带仍不清晰。而仅有50 μ L β -巯基乙醇时,尽管存在蛋白质和DNA污染严重,但RNA条带清晰(Lane1)。

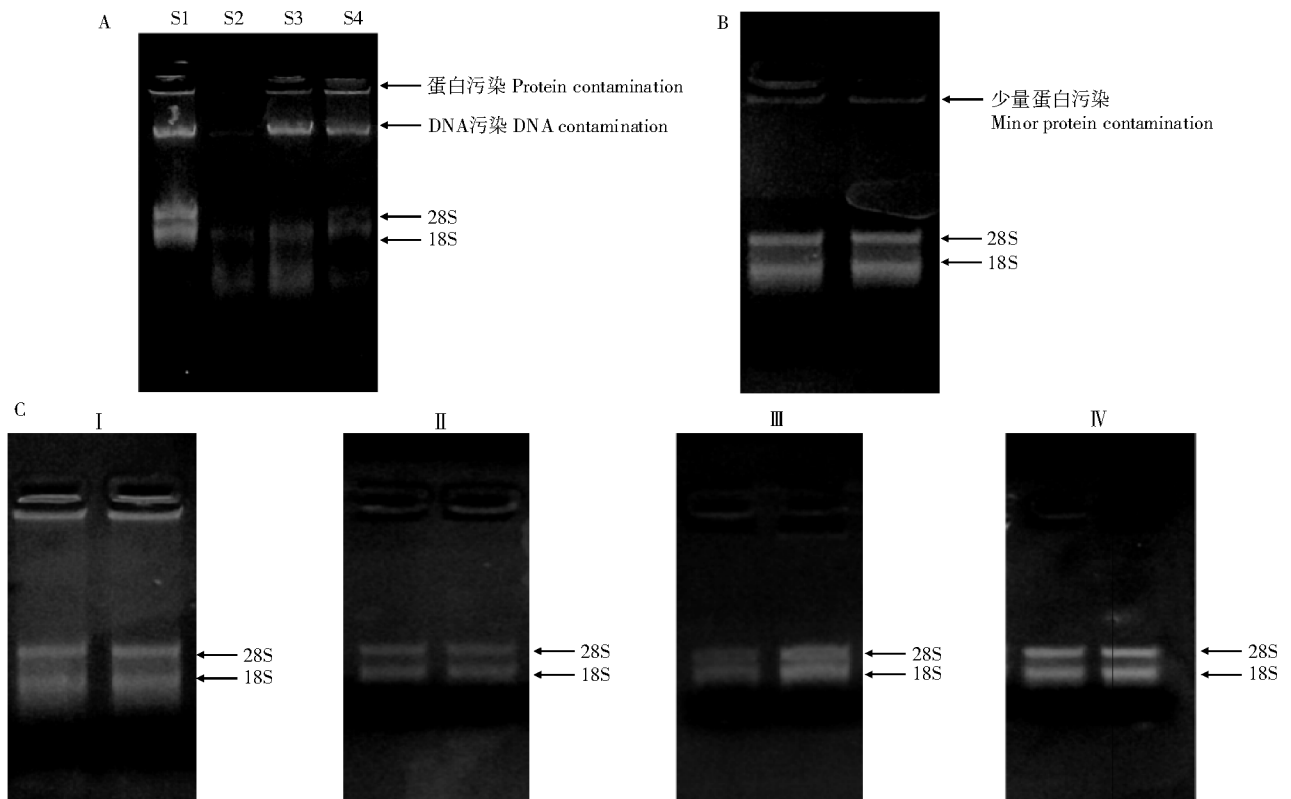


图2 醋酸钠优化(A)、RNase-Free DNase I(B)以及水饱和酚氯仿方法优化(C)RNA琼脂糖凝胶电泳检测
Fig.2 Detection of RNA optimized by Sodium acetate (A), RNase-Free DNase I digestion (B), and water-saturated phenol chloroform (C) by agarose gel electrophoresis

为了除去RNA提取中的DNA污染,进一步选用RNase-Free DNase I处理,结果如图2-B所示,用RNase-Free DNase I消化后的2条泳道中28S和18S的条带亮度都比较清晰,无拖尾现象,RNA完整性较好,并且没有出现基因组DNA的条带,表

明用这个方法可以有效去除提取总RNA中的DNA污染。对于结果显示的少量的蛋白污染将进一步优化。

在提取RNA的过程中,氯仿作为有机溶剂可以使蛋白变性,同时对溶剂抽提样品中的一些脂溶

性杂质起到一定除杂作用;水饱和酚也具有去除蛋白和DNA污染的作用^[32]。本研究中,采用2种试剂进行多次抽提,并在最后均使用无RNA酶的DNA酶处理消化DNA,结果如图2-C所示,经氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提2次的RNA存在严重蛋白污染(图2-C-I),RNA质量浓度为160.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$,且 $A_{260/280}$ 为1.211(表2),也证实蛋白污染严重;经氯仿抽提1次、水饱和酚抽提2次、氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提1次之后的RNA条带比较清晰,完整性比较好(图2-C-II),但仍存在少许的蛋白污染且质量浓度RNA较低(70.204 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(表2),可能是由于提取过程中损失较多;经氯仿和水饱

和酚(体积比1:1)抽提5次的RNA无明显的蛋白污染(图2-C-III),但浓度较低(93.652 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(表2);氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提2次、氯仿抽提1次、氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提1次的RNA,28S和18S的条带亮度都很好,并且条带无拖尾(图2-C-IV),质量浓度为173.611 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $A_{260/280}$ 为1.803(表2),表明这种方法提取的RNA完整性好且浓度高。上述结果表明,水饱和酚氯仿优化LiCl中采用方案IV,即氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提2次、氯仿抽提1次、氯仿和水饱和酚(体积比1:1)抽提1次能够最终获得完整性最好、浓度最高、无明显蛋白污染的赤霞珠葡萄叶片总RNA。

表2 水饱和酚氯仿不同方式提取的赤霞珠叶片RNA浓度检测
Tab.2 Detection of RNA concentration in *Cabernet Sauvignon* leaves extracted by different methods of water-saturated phenol chloroform

编号 Number	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ Concentration	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	编号 Number	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ Concentration	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$
I	160.950	4.024	3.321	1.211	III	93.652	2.838	1.634	1.737
II	70.204	1.755	1.333	1.316	IV	173.611	5.261	2.917	1.803

2.3 实时荧光定量PCR分析

qRT-PCR扩增结果与融解曲线如图3所示。

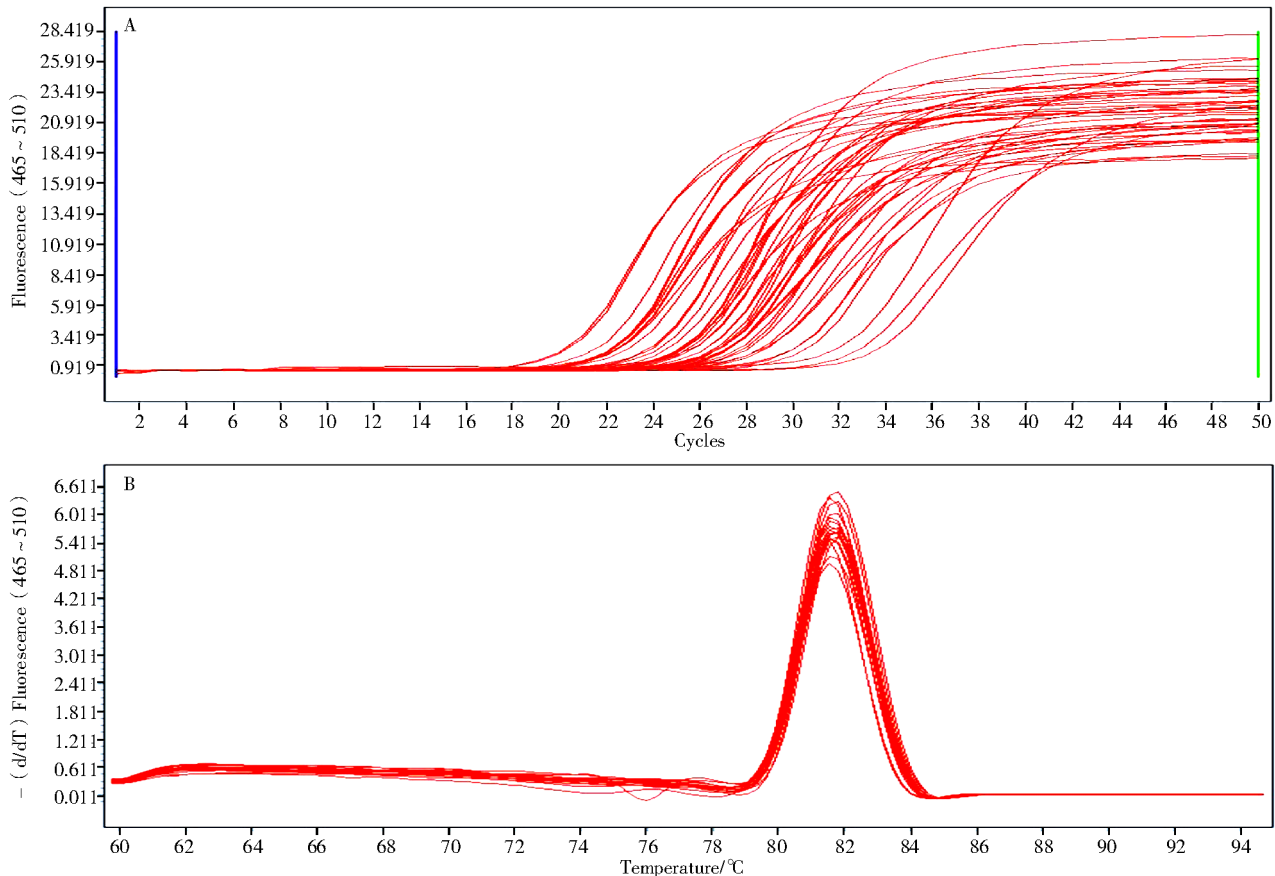


图3 qRT-PCR扩增与融解曲线
Fig.3 Amplification and melting curve of qRT-PCR

将获得的酿酒葡萄植株叶片RNA样品反转录为cDNA在PCR仪中反应后,用RNase-Free ddH₂O稀释,接着加入Primer F、Primer R、dTOP Mix(实时荧光定量检测预混酶试剂)、ddH₂O等物质进行反应。qRT-PCR是在标准PCR体系中加入了荧光物质通过荧光信号的积累能够实时监测每次循环后PCR产物的变化,并生成荧光扩增曲线,该技术能够实现对于初始模板的定量分析^[33]。qRT-PCR试验要求提取的RNA有2个要素,一是浓度高、完

整性较好,二是无蛋白和DNA污染,二者缺一不可。图3结果显示,对内参基因进行qRT-PCR扩增后出现对应的扩增曲线,且融解曲线为单峰,为80~90℃,表明扩增产物特异性好,提取RNA可用于实时荧光定量PCR分析;同时内参基因的Ct值在19左右,大部分目的基因的Ct值为20~30,少数2个基因在30左右(表3)。按照图4的RNA提取流程,结果表明,优化后LiCl法得到的RNA质量好,能够用于qRT-PCR分析。

表3 赤霞珠叶片cDNA内参基因和检测基因的Ct值
Tab.3 Ct values of reference genes and detection genes in cDNA of Cabernet Sauvignon leaves

基因 Gene	内参基因	棉子糖合成酶	半乳糖醇合成酶基因		抗寒基因			淀粉关键酶基因	
	Reference gene	Raffinose synthase	Galactinol synthase		Cold resistance genes			β-amylase	
	<i>VvACTIN</i>	<i>VvRafS2</i>	<i>VvGolS1</i>	<i>VvGolS3</i>	<i>VvMDH</i>	<i>VvCE1a</i>	<i>VvCE1b</i>	<i>VvBAMY1</i>	<i>VvBAMY4</i>
Ct	19.4±0.01	37.41±0.05	30.55±0.1	21.85±0.1	26.18±0.1	22.82±0.2	25.82±0.15	21.98±0.15	25.83±0.2

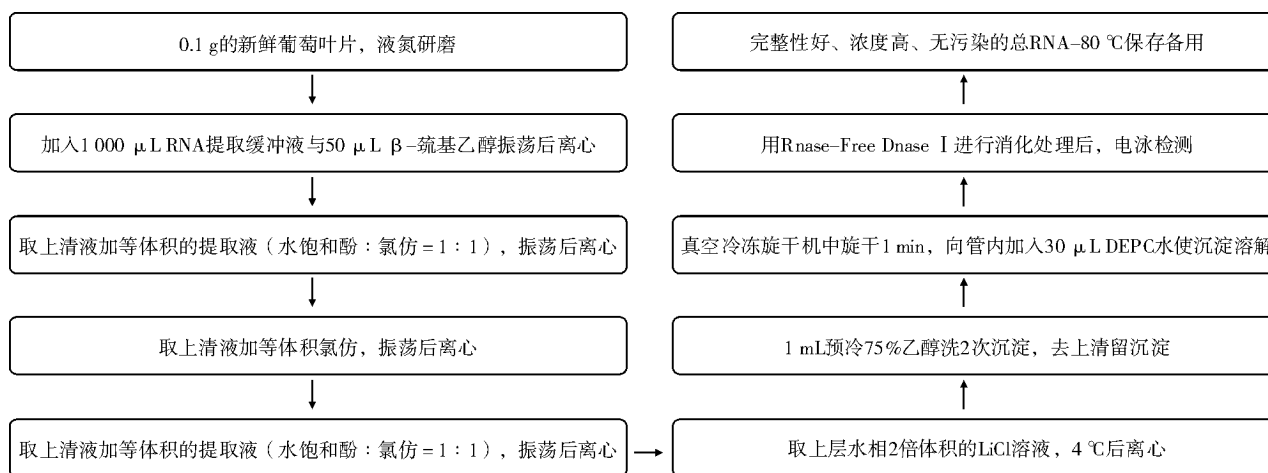


图4 酿酒葡萄赤霞珠叶片总RNA提取流程
Fig.4 Extraction process of total RNA from wine grape Cabernet Sauvignon leaves

3 结论与讨论

本研究在分析比较4种常用RNA提取方法的基础上,确定从LiCl法出发,从基因组DNA污染和蛋白污染2个方面进行优化,最终获得用于提取酿酒葡萄赤霞珠叶片总RNA的方法。该方法提取的RNA完整性好、纯度高、无污染,可用于后续反转录以及实时定量PCR分析,为后续其作为材料的相关代谢调控研究奠定基础。

研究结果显示,LiCl法(基于改良SDS法)提取RNA效果最好,RNA条带清晰不拖尾,亮度高,虽然有轻微DNA和蛋白污染,但是无论是浓度还是完整性均是最佳,有利于后续试验的进行。改良CTAB法提取的RNA完整性较好、浓度较高,但是提取葡萄叶片需要的样品量较多、样品较少时,不

利于实验进行,且有蛋白和DNA污染。使用Trizol法和重蒸酚法很难从赤霞珠叶片中提取出高质量的总RNA,尽管重蒸酚法中基本上无DNA和蛋白污染,Trizol法存在严重降解和污染等问题。有研究表明,重蒸酚法提取喜树RNA的效果较好^[34],而在本研究中对葡萄叶片的提取效果不理想,这可能是因为葡萄赤霞珠叶片中含有较多的有机酸、多酚和其他一些次生代谢物质,这些物质可与RNA相互作用,形成不溶于水相的复杂混合物,在抽提过程中RNA可与这些物质共聚合而损耗,从而影响RNA的提取量和质量。有报道指出,Trizol对葡萄RNA的提取质量好,条带锐利,可清晰看出28S与18S亮度比为2:1^[35]。但在本试验中,提取效果不理想,推测可能是由于提取组织的不同,导致杂质未去除完全。上述结果表明,这2种方法均不适合

赤霞珠叶片总 RNA 的提取,最终选在 LiCl 法的基础上进行改良。

根据上述结果,从基因组 DNA 污染和蛋白污染 2 个方面进行优化。针对 DNA 污染,研究发现,在用重蒸酚提取 RNA 的方法中无基因组污染,选择加入醋酸钠进行优化,结果并没有提高 RNA 的提取质量,甚至使 RNA 降解;RNase-FreeDNase I 消化是比较常用的去除 RNA 溶液中 DNA 的方法,结果显示,无明显基因组 DNA 条带。进一步利用氯仿和水饱和酚这 2 种试剂去除蛋白污染,发现氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 5 次和氯仿水饱和酚(体积比 1:1)抽提 3 次中间加 1 遍氯仿效果是比较理想的,消除了蛋白污染, RNA 浓度也较高。

本研究进一步利用其反转录获得 cDNA,并以其为模板进行荧光实时定量分析,内参基因以及其他基因的 Ct 值约为 20 左右,符合实验要求。同时利用实时定量成功检测到一些抗寒基因不同程度的表达,这与文献报道相一致^[36],表明制备的 RNA 可以用于后续荧光实时定量分析,这为酿酒葡萄叶片以及其他组织 RNA 提取提供一定参考。

本研究通过对 4 种常规 RNA 提取方法比较发现, LiCl 方法相对较优,进一步针对 RNA 降解以及蛋白和 DNA 污染问题进行优化发现, β -巯基乙醇、氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 2 次,然后加入氯仿抽提 1 次,最后用氯仿和水饱和酚(体积比 1:1)抽提 1 次是提取赤霞珠葡萄叶片 RNA 的最适宜方法,进一步经 RNase-FreeDNase I 进行消化,就可以得到纯度高、完整性好、用于实时定量 PCR 的酿酒葡萄叶片 RNA。尽管本研究获得最佳的试验方法,解决了完整性、高纯度无污染的问题,但用时较长,后续将进一步对实验操作精简进行研究。

参考文献:

- [1] 綦伟,李瑞臣,徐月华,等. 葡萄抗旱性研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2005(3):33-36.
 QI W, LI R C, XU Y H, et al. Research progress on drought resistance of grapes[J]. Sino-overseas Grapevine & Wine, 2005(3):33-36.
- [2] 徐菲远. 中国葡萄酒生产、消费、进口全球排什么位置?[N]. 华夏酒报, 2022-05-17(A07).
- [3] 娄玉穗,张晓锋,李政,等. 不同挂果量对阳光玫瑰葡萄延迟采收期间果实品质的影响[J]. 河南农业科学, 2022, 51(6):111-118.
 LOU Y S, ZHANG X F, LI Z, et al. Effect of different yield load on quality development during delayed harvest of shine muscat grape[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(6):111-118.
- [4] 崔小月,尚泓泉,吕中伟,等. 欧洲葡萄 *VvCAX* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 河南农业科学, 2023, 52(11):113-123.
 CUI X Y, SHANG H Q, LÜ Z W, et al. Identification, characterization, and expression analysis of *VvCAX* gene family in grapevine[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(11):113-123.
- [5] 梁长梅,刘正乾,李艳文,等. 基于 MobileNetV3-large 模型的葡萄品种识别[J]. 山西农业科学, 2023, 51(7):824-831.
 LIANG C M, LIU Z Q, LI Y W, et al. Variety identification of grape based on mobileNetV3-large model[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(7):824-831.
- [6] SALZMAN R A, FUJITA T, ZHU-SALZMAN K, et al. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(1):11-17.
- [7] SILVA D V, BRANCO S M J, HOLANDA I S A, et al. Comparative evaluation of total RNA extraction methods in *Theobroma cacao* using shoot apical meristems[J]. Genetics and Molecular Research:GMR, 2016, 15(1):15017364.
- [8] VENNAPUSA A R, SOMAYANDA I M, DOHERTY C J, et al. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber[J]. Scientific Reports, 2020, 10:16887.
- [9] 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.
- [10] PEI Y X, MAMTIMIN T, JI J, et al. The guanidine thiocyanate-high EDTA method for total microbial RNA extraction from severely heavy metal-contaminated soils[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(2):465-478.
- [11] KHAIRUL-ANUAR M A, MAZUMDAR P, LAU S E, et al. High-quality RNA isolation from pigment-rich *Dendrobium* flowers[J]. 3 Biotech, 2019, 9(10):371.
- [12] 张树伟,丁峰,黄羽,等. 适用于转录组测序的毛葡萄叶片总 RNA 提取方法筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(11):3593-3597.
 ZHANG S W, DING F, HUANG Y, et al. Screening of total RNA extraction method of *Vitis quinquangularis* leaves suitable for transcriptome sequencing[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(11):3593-3597.
- [13] 杨晓燕,张波,黄方爱,等. 适合转录组测序的葡萄叶片总 RNA 试剂盒提取法的改进[J]. 生物技术通报, 2013(6):215-220.
 YANG X Y, ZHANG B, HUANG F A, et al. The improvement on the protocols of total RNA extraction kits for RNA-seq from grape leaves[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(6):215-220.
- [14] 王暑辉,徐倩,徐筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1):76-80, 89.
 WANG S H, XU Q, XU X, et al. Extraction of total RNA from the leaves of *Platycladus orientalis* rich in polysaccharides and polyphenol[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(1):76-80, 89.
- [15] 涂国英,漆艳香,蒲金基,等. 改良 CTAB 法提取高质量香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009, 36(7):192-195.

- GAN G Y, QI Y X, PU J J, et al. Improved CTAB method for extracting high quality total RNA from banana leaves[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2009, 36(7): 192-195.
- [16] 张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总RNA提取方法的研究[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178-181.
- ZHANG J J, WANG Y J, WANG X P, et al. An improved method for rapidly extracting total RNA from *Vitis*[J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(3): 178-181.
- [17] YANG F, WANG G P, XU W X, et al. A rapid silica spin column-based method of RNA extraction from fruit trees for RT-PCR detection of viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 247: 61-67.
- [18] 房经贵, 高志红, 陶建敏. 一种提取葡萄芽中总RNA的方法[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 24-25.
- FANG J G, GAO Z H, TAO J M. Method for extracting total RNA from grape buds[J]. Biotechnology, 2003, 13(2): 24-25.
- [19] 李红熙, 徐美隆, 杨智. 一种适合葡萄多种组织的总RNA提取方法[J]. 中国农学通报, 2012, 28(7): 155-159.
- LI H X, XU M L, YANG Z. A method suited to extract total RNA from various tissues of grapevine[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(7): 155-159.
- [20] 付阳, 刘海峰, 李娟, 等. 山葡萄总RNA提取方法的比较[J]. 延边大学农学报, 2013, 35(4): 298-301.
- FU Y, LIU H F, LI J, et al. Comparison of the methods for total RNA extraction of *Vitis amurensis*[J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2013, 35(4): 298-301.
- [21] HABIB S H, SAUD H M, KAUSAR H. Efficient oil palm total RNA extraction with a total RNA extraction kit[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(2): 2359-2367.
- [22] BEUVE M, HILY J M, ALLIAUME A, et al. A complex virome unveiled by deep sequencing analysis of RNAs from a French Pinot Noir grapevine exhibiting strong leafroll symptoms[J]. Archives of Virology, 2018, 163(11): 2937-2946.
- [23] WANG Y Y, YANG B R, ZHANG M X, et al. Application of transport engineering to promote catharanthine production in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2019, 139(3): 523-530.
- [24] 苗琪. CaERF1与CaERF2介导脱落酸调控喜树碱的生物合成[D]. 大连: 大连工业大学, 2021.
- MIAO Q. CaERF1 and CaERF2 mediate abscisic acid regulation of camptothecin biosynthesis[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2021.
- [25] NORONHA H, SILVA A, SILVA T, et al. *VviRafS5* is a raffinose synthase involved in cold acclimation in grapevine woody tissues[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 754537.
- [26] 王杰, 王全, 田娜, 等. 不同植物组织RNA提取方法的比较分析[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(1): 76-80.
- WANG J, WANG Q, TIAN N, et al. Comparison and analysis of RNA extracting method from different plant tissues[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2015, 30(1): 76-80.
- [27] 张彦苹, 王晨, 于华平, 等. 适于葡萄不同组织RNA提取方法的筛选[J]. 西北农业学报, 2010, 19(11): 135-140.
- ZHANG Y P, WANG C, YU H P, et al. Screening of RNA extraction methods for various grapevine organs and tissues[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(11): 135-140.
- [28] 彭婧, 王军, 段长青, 等. 葡萄RNA提取方法的研究进展[J]. 分子植物育种, 2022, 20(11): 3644-3650.
- PENG J, WANG J, DUAN C Q, et al. Advances in the extraction of RNA from grape by different methods[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(11): 3644-3650.
- [29] 廖弘毅. 超微量分光光度计检测方法研究[J]. 计量与测试技术, 2016, 43(8): 31-34.
- LIAO H Y. Study on detection method of ultra micro spectrophotometer[J]. Metrology & Measurement Technique, 2016, 43(8): 31-34.
- [30] RAJU L S, KAMATH S, SHETTY M C, et al. Genome mining-based identification of identical multirepeat sequences in *Plasmodium falciparum* genome for highly sensitive real-time quantitative PCR assay and its application in malaria diagnosis[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2019, 21(5): 824-838.
- [31] 江昌俊, 王朝霞, 李叶云. 茶树中提纯总RNA的研究[J]. 茶叶科学, 2000, 20(1): 27-29.
- JIANG C J, WANG Z X, LI Y Y. Studies on isolation of general RNA from tea plant *Camellia sinensis* (L.) O kuntze[J]. Journal of Tea Science, 2000, 20(1): 27-29.
- [32] LAL L, SAHOO R, GUPTA R K, et al. RNA isolation from high-phenolic tea leaves and apical buds[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19(2): 181.
- [33] 初雪鹏, 佟少明, 侯和胜. 两种适用于葡萄不同组织RNA提取方法的比较[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 558-562.
- CHU X P, TONG S M, HOU H S. Comparison of two methods for RNA extraction from different tissues of grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(4): 558-562.
- [34] 董淋淋, 杨秉润, 王燕燕, 等. 喜树幼叶发育与喜树碱类化合物生物合成的相关性[J]. 大连工业大学学报, 2022, 41(4): 242-245.
- DONG L L, YANG B R, WANG Y Y, et al. Correlation between the development of young leaves of *Camptotheca acuminata* and the biosynthesis of camptothecin compounds[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2022, 41(4): 242-245.
- [35] 宋洋波, 刘延琳, 耿万刚. 三种提取酿酒葡萄不同组织总RNA的方法比较[J]. 北方园艺, 2012(15): 119-122.
- SONG Y B, LIU Y L, GENG W G. Comparison of three optimized method for isolating total RNA from grapevine tissues [J]. Northern Horticulture, 2012(15): 119-122.
- [36] CHAI F M, LIU W W, XIANG Y, et al. Comparative metabolic profiling of *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* during cold acclimation[J]. Horticulture Research, 2019, 6: 8.