

芍药花瓣miRNA提取方法的比较研究

魏梦苒, 夏星, 陶俊, 赵大球*

扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州225009

摘要: 小分子RNA (miRNA)对于调控植物花瓣色泽的形成具有重要作用, 而获得高质量的miRNA是开展相关机理研究的重要前提。本研究采用一步法、多步法及改良多步法对芍药(*Paeonia lactiflora*)花瓣中miRNA进行提取, 发现一步法和改良多步法均可用于芍药花瓣miRNA的提取, 但相比一步法的价格便宜、提取步骤简单、时间短、提取的RNA浓度较高等优点, 改良多步法提取成功率高, 提取的芍药花瓣RNA纯度高、完整性好, 并且后续的miRNA前体序列扩增效果好、表达模式检测稳定, 是一种高效的芍药花瓣miRNA提取方法。

关键词: 芍药; 多糖; miRNA; 提取

芍药(*Paeonia lactiflora*)是中国传统名花, 与牡丹齐名, 自古以来就有“花中宰相”的美誉, 具有极高的观赏价值。芍药花色丰富, 对其形成机理的研究已取得一定进展, 如已明确了类黄酮是决定芍药花色的色素(Jia等2008; Zhao等2012), 初步鉴定了类黄酮生物合成的相关结构基因在花瓣色泽形成中的作用等(Zhao等2012, 2014)。这些研究主要着眼于生理生化和转录水平层面来阐明芍药花色的形成机理, 而转录后水平的调节对于组织色泽同样至关重要(Xu等2010)。

小分子RNA (microRNA, miRNA)是一类长度为19~26个核苷酸大小的内源性小分子非编码单链RNA。植物miRNA能与靶mRNA高度互补配对, 在转录后水平上调节着色泽的形成(Vaucheret 2006; Hsieh等2009; 贾小云等2013)。如Gou等(2011)发现miR156通过靶向SPLs转录因子对拟南芥花色苷的生物合成起着负调控的作用, 增强的miR156活性可以提高花色苷的积累, 降低的miR156活性可导致高水平的黄酮类物质的积累。而要想开展miRNA介导芍药花瓣色泽形成的研究, 获取纯度高、完整性好的miRNA是必要的前提和关键。目前, 植物上常采用公司生产的试剂盒来提取miRNA, 但不同植物在状态及组成上存在很大差异, 这些试剂盒方法是否适合于芍药花瓣还有待商榷。本研究比较分析了基于TaKaRa公司的RNAiso for Small RNA试剂盒的一步法、MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒的多步法以及改良多步法提取芍药花瓣miRNA的效果, 以期获得一种适于芍药花瓣miRNA研究的提取方法体系, 为芍药花色研究打好基础。

材料与方法

1 材料

供试材料为芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)托桂型品种‘金辉’(外瓣红色, 内瓣黄色), 栽植于扬州大学园艺与植物保护学院牡丹-芍药种质资源圃内。将盛花期的内、外花瓣采集后用液氮速冻, 保存于-80°C冰箱中备用。

2 方法

2.1 一步法提取miRNA

采用TaKaRa公司的RNAiso for Small RNA试剂盒, 按照说明书操作并加以改进。称取0.5 g用液氮研磨好的花瓣样品于去酶研钵中, 加入1 mL RNAiso for Small RNA充分研磨样品至裂解液呈透明状, 室温静置5 min后12 000×g、4°C离心5 min, 吸取上清液于新的离心管中, 加入200 μL氯仿(三氯甲烷)后剧烈震荡, 使溶液充分乳化, 12 000×g、4°C离心15 min。小心吸取三层匀浆液中上层无色上清液于新的离心管中, 重复此步骤3次后加入等体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 在室温下静置10 min。12 000×g、4°C离心10 min后小心弃去上清, 缓慢地沿离心管壁加入1 mL 75%的乙醇[0.1%焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水溶液配制], 轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁, 12 000×g、4°C离心5 min后小心除净乙醇, 重复此步骤3次。室温干燥沉淀5 min后加入100 μL RNase free水溶解沉淀, 待沉淀完全溶解后于-80°C冰箱保存。

收稿 2016-12-01 修定 2017-03-25

资助 国家自然科学基金(31400592)。

* 通讯作者(E-mail: dqzhao@yzu.edu.cn)

2.2 多步法提取miRNA

采用TaKaRa公司的MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒,严格按照说明书操作。(1)样品的裂解:称取0.35 g低温冻存的花瓣样品于1.5 mL去酶离心管中,加入800 μL Buffer PE,充分震荡直至裂解液中无明显沉淀。将裂解液12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min。将上清液小心吸取到新的1.5 mL离心管中,加入80 μL Buffer NB充分混匀,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min。小心吸取上清液到新的离心管中,加入450 μL 含有二硫苏糖醇(dithiothreitol)溶液的Buffer RL,震荡混匀。(2) miRNA的提取与纯化:加入混合液0.5倍体积的无水乙醇,混匀后以每次600 μL 将混合液全部转入到RNA Spin Column(含2 mL收集管)中。12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min,弃滤液。将RNA Spin Column放回到2 mL收集管中,分别向Spin Column中加入500 μL Buffer RWA和600 μL 含有乙醇的Buffer RWB, Buffer RWB沿管壁缓慢加入,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min,弃滤液。在RNA Spin Column膜上方加入50 μL DNase I反应液,室温静置15 min后加入350 μL Buffer RWB多次离心洗脱除去糖类、酚类和盐离子。(3) miRNA的洗脱与保存:将RNA Spin Column重新安置于2 mL收集管上,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心2 min。将RNA Spin Column安置于1.5 mL的RNase Free Collection tube上,在RNA Spin Column膜的中央处分两次加入8 μL 的RNase Free水,室温静置5 min后12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心2 min洗脱RNA,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 改良多步法提取miRNA

选取TaKaRa公司的MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒,按照说明书操作并加以改进。样品的裂解步骤与多步法提miRNA相同,在miRNA的提取与纯化过程中,向裂解液中加入1.5倍体积的无水乙醇,混匀后以每次600 μL 将混合液全部转入到RNA Spin Column(含2 mL收集管)中,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min,弃滤液。将RNA Spin

Column放回到2 mL收集管中,将600 μL 80%的乙醇(0.1% DEPC水溶液配制)沿管壁加入至RNA Spin Column中,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min,弃滤液。同样进行DNA酶消化后加入350 μL 80%的乙醇多次离心洗脱除去糖类、酚类和盐离子。最后,miRNA的洗脱与保存的方法与多步法相同。

2.4 miRNA浓度和纯度检测

首先,使用核酸蛋白测定仪(BioPhotometer Plus 6132, Eppendorf)检测RNA的浓度和纯度。在1 μL RNA样品中加入49 μL 0.1%的DEPC水进行充分稀释,而后使用核酸蛋白测定仪检测RNA浓度和260和280 nm波长处的吸光值。其次,配制1%琼脂糖凝胶,加入提取的RNA、RNase Free水和RNA Loading Buffer (+EB) (TaKaRa)各2 μL , 220 V电泳10 min,利用成像仪(Universal Hood II, BIO-RAD)及拍照系统(Molecular Imager Gel DocTM XR+With Image LabTM Software, BIO-RAD)观察检测miRNA完整性。

2.5 miRNA茎环法反转录

参照上海生工生物工程股份有限公司的miRNA第一链cDNA合成(茎环法)试剂盒说明书进行。20 μL 的miRNA反转录反应体系如下: 10 μL 2 \times miRNA L-RT Solution mix、1.5 μL miRNA L-RT Enzyme mix、2 μL miRNA、1 μL Stem-loop primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和5.5 μL RNase free water。反转录参数设置为: 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, + ∞ 。产物离心后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。miRNA茎环法反转录所用特异性反转录引物如表1所示。

2.6 实时荧光定量PCR

参照北京全式金生物有限公司的TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂盒说明书进行并加以改进。20 μL 的实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)反应体系如下: 2 μL 反转录样品, 1 μL 特异性正向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 通用反向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、12.5 μL 2 \times TransStart

表1 miRNA成熟体及其反转录特异性引物

Table 1 miRNA mature sequences and their special reverse transcription primers

基因名称	miRNA成熟体序列(5'→3')	引物序列(5'→3')
miR156e-3p	GCTCTCTTCGTCGTGCATC	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGATGAC
miR156d	TTGACAGAAGAGAGGGAGCAC	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTC

Tip Green qPCR SuperMix、8.5 μL 超纯水。qRT-PCR反应参数设置为: 95°C, 30 s; 95°C, 5 s; 55.2°C, 30 s; 72°C, 30 s; 溶解曲线65~95°C, 每5 s升高0.5°C, 共45个循环。以*actin*作为内参基因, 所有特异性引物序列列于表2, 最终qRT-PCR产物用3%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表2 qRT-PCR特异性引物

Table 2 qRT-PCR special primers

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>Actin</i>	GCAGTGTCCCCAGTATT	TCTTTTCCATGTCATCCC
miR156e-3p	CGCGCTCTCTCTCGTCT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR156d	GCGCTTGACAGAAGAGAGG	GTGCAGGGTCCGAGGT

2.7 前体序列的扩增

将提取后的RNA使用TaKaRa公司的PrimerScript RT reagent Kit with gDNA Graser试剂盒反转成cDNA备用, 反转录过程参照说明书进行。选择miR156e-3p和miR156d的共同前体序列(5'-ACGAAGAAGAGAAAGAAATGTTGACAGAAGAGAGGGAGCACAACCCGGGATCAGCTAAAGG-GT-3')进行亚克隆扩增, 使用的特异性引物为: 正向引物5'-ACGAAGAAGAGAAAGAAATGTTGAC-3', 反向引物5'-ACCCTTTAGCTGATCCCGGTTGTG-3'。25 μL 的扩增反应体系为: 2.5 μL 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus)、2 μL dNTP Mixture (2.5 mmol·L⁻¹)、2 μL cDNA、2.5 μL 特异性引物、0.25 μL TaKaRa Taq和15.75 μL 灭菌蒸馏水, 扩增程序为: 94°C, 3 min; 94°C, 30 s; 52.2°C, 30 s; 72°C,

30 s, 共35个循环; 72°C, 10 min; 4°C, + ∞ 。PCR产物使用3%琼脂糖凝胶检测, 180 V电泳30 min, 利用成像仪(Universal Hood II, BIO-RAD)及拍照系统(Molecular Imager Gel Doc™ XR+With Image Lab™ Software, BIO-RAD)观察前体序列扩增产物。

实验结果

1 miRNA的浓度和纯度

表3为3种方法所提取的芍药花瓣RNA浓度和纯度。采用一步法所提取的芍药花瓣RNA浓度最高, 在2 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上, 多步法次之, 浓度约为1 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而改良多步法提取的芍药花瓣RNA浓度介于600~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。而就RNA纯度而言, 多步法和改良多步法所提取RNA的OD_{260/280}均约为2.0, 纯度显著高于一步法所提取的RNA。

表3 三种方法提取的芍药花瓣RNA浓度和纯度

Table 3 RNA concentration and purity extracted from herbaceous peony petals using three methods

方法	部位	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD _{260/280}	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀
一步法	外瓣	2 591.25±69.05	2.19±0.02	0.36±0.01	0.16±0.01
	内瓣	2 587.55±48.95	1.86±0.01	0.34±0.02	0.19±0.01
多步法	外瓣	1 541.15±107.55	2.02±0.07	0.33±0.01	0.16±0.01
	内瓣	1 512.25±51.75	2.00±0.02	0.34±0.03	0.17±0.02
改良多步法	外瓣	669.80±42.10	2.00±0.05	0.34±0.02	0.17±0.01
	内瓣	756.55±76.95	2.07±0.03	0.38±0.04	0.18±0.02

1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 芍药花瓣中的RNA包含了5S、18S和28S, 但3种方法所提取的效果并不相同(图1)。采用一步法提取的芍药花瓣miRNA条带模糊, 大分子RNA条带弥散; 采用多步法提取的RNA中并未检测到miRNA; 而采用改良多步法提取的RNA中5S、18S和28S条带都十分清

晰、明亮, 从中可以看出多步法不适于提取芍药花瓣的miRNA, 因此, 下面将只针对一步法和改良多步法进行研究。

2 qRT-PCR检测

首先, 我们比较了一步法和改良多步法提取miRNA的qRT-PCR重复性。从miR156e-3p的qRT-

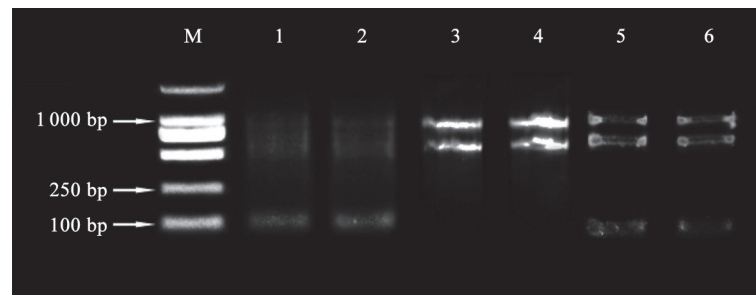


图1 miRNA琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis detection of miRNA

M: DL 2 000 bp DNA Marker; 1: 一步法提取的芍药外瓣miRNA; 2: 一步法提取的芍药内瓣miRNA; 3: 多步法提取的芍药外瓣miRNA; 4: 多步法提取的芍药内瓣miRNA; 5: 改良多步法提取的芍药外瓣miRNA; 6: 改良多步法提取的芍药内瓣miRNA。

PCR扩增曲线与溶解曲线可以看出, 两种方法的溶解曲线均为单峰, 解链温度均为83.1°C, 但与一步法相比, 改良多步法的重复性更好, 重复之间差异较小(图2)。而就表达水平而言, 无论是miR156e-

3p还是miR156d, 使用改良多步法提取的miRNA表达水平与华大公司的miRNA测序结果更为接近(图3), 由此可见, 改良多步法提取的miRNA更适用于表达模式研究。

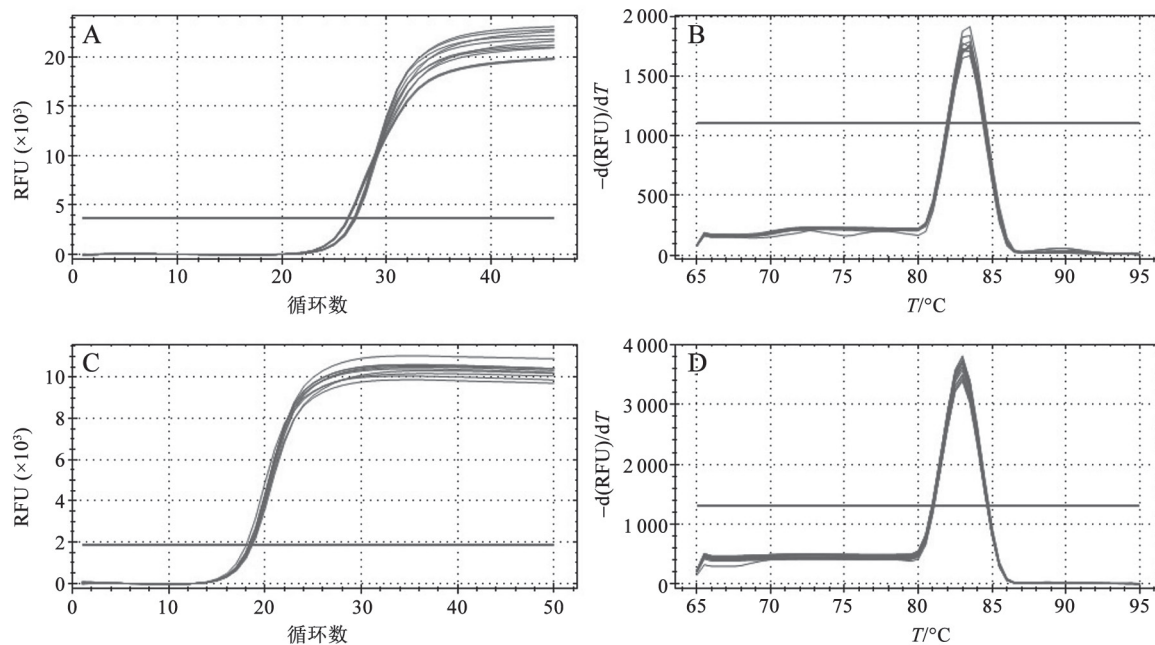


图2 miR156e-3p qRT-PCR检测

Fig.2 qRT-PCR detection of miR156e-3p

A: 一步法miR156e-3p qRT-PCR扩增曲线; B: 一步法miR156e-3p qRT-PCR溶解曲线; C: 改良多步法miR156e-3p qRT-PCR扩增曲线; D: 改良多步法miR156e-3p qRT-PCR溶解曲线。RFU: 相对荧光单位; T: 温度。

3 前体序列的扩增

所提取的miRNA同样被用来进行前体序列的扩增, 结果见图4。当以一步法提取的miRNA为模板进行扩增miR156e-3p和miR156d前体序列时, 所获得的条带模糊、亮度较弱; 而使用改良多步法

提取的miRNA为模板进行扩增时, 两者所获得的条带单一、明亮, 能够满足后续的胶回收、连接、转化及测序等实验。由此可见, 采用改良多步法获得的miRNA中由于其中包含了完整的18S和28S, 因此还适用于前体序列的扩增。

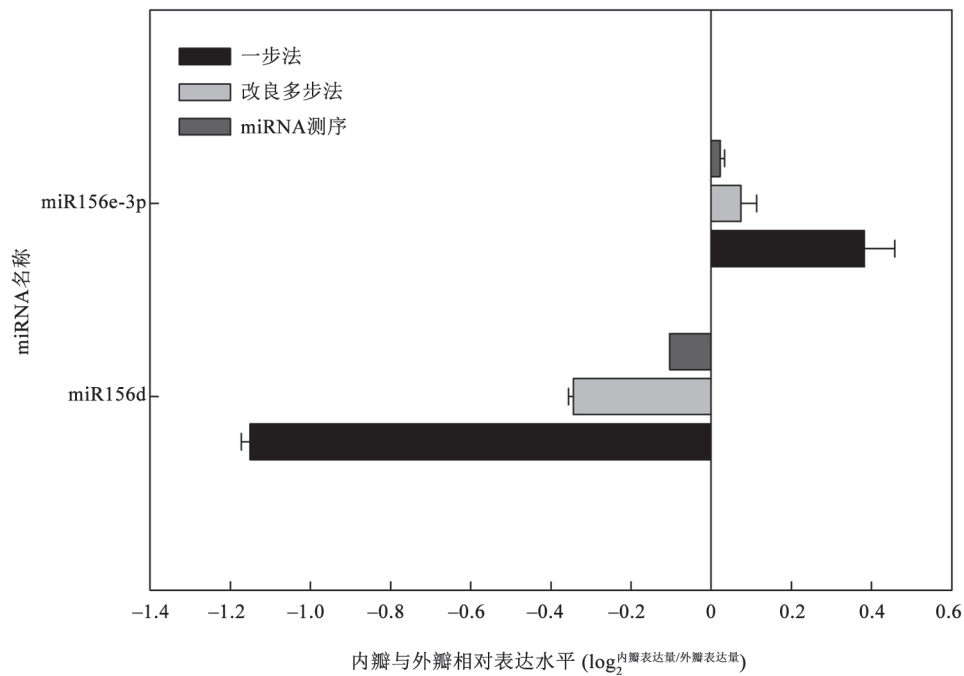


图3 qRT-PCR与miRNA测序结果的内外瓣相对表达水平比较

Fig.3 Comparison of relative expression levels in outer and inner petals between qRT-PCR detection and miRNA sequencing results

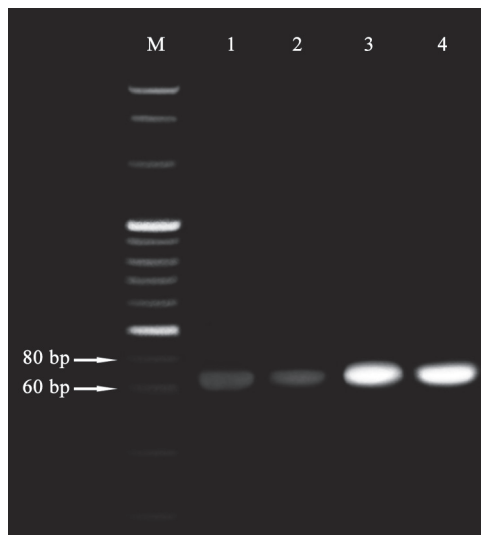


图4 miR156e-3p和miR156d前体序列扩增检测

Fig.4 Precursor sequence amplification detection of miR156e-3p and miR156d

M: 20 bp DNA Ladder Marker (Dye Plus); 1: 一步法miR156e-3p前体扩增检测; 2: 一步法miR156d前体扩增检测; 3: 多步法miR156e-3p前体扩增检测; 4: 多步法miR156d前体扩增检测。

讨 论

植物花瓣富含酚类、花色苷、多糖等次生代

谢产物, 它们给RNA的提取带来了一定的难度。为了获得高质量的花瓣RNA, 前人已在三色堇(*Viola tricolor*)、茶梅(*Camellia sasanqua*)、红花(*Chelonopsis pseudobracteata* var. *rubra*)等多种植物上开展了RNA提取方法的比较研究(李琴等2015; 张雪等2015; 吴田和蓝增全2013)。在芍药上, 黄凤兰等(2005)通过比较分析认为, 改良热硼酸盐法更适于芍药花瓣RNA的提取。但上述研究都是集中于提取花瓣中总RNA, 而关于高质量miRNA提取方法的报道相对较少。

目前, 传统的miRNA提取方法有TRIzol法、蛋白酶消化法、沉淀裂解法和酚-氯仿法等, 但 these 方法主要应用于人体血清(陈昌国等2015; 徐翔和贺丽卉2012)。而市场上各大公司生产的miRNA分离试剂盒给植物miRNA研究带来了希望。罗茂等(2013)采用Ambion公司的mirVana™ miRNA Isolation Kit试剂盒结合反复冻融法成功从富含多糖的玉米(*Zea mays*)胚乳组织中提取到了miRNA。吕帝瑾等(2014)发现天根公司的miRcute miRNA提取分离试剂盒、天根植物总RNA提取试剂盒结合Balancer NGS Library Preparation Kit for small mi-

croRNA试剂盒均可用于富含多糖及次生代谢产物的蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*) miRNA提取。而这些试剂盒并非广泛适用于其他植物,尤其是花瓣组织。因此,本研究主

要应用TaKaRa公司的RNAiso for Small RNA和MiniBEST Plant RNA Extraction Kit两种试剂盒,采用一步法和改良多步法对miRNA进行提取比较,两种方法的特点如表4所示。

表4 一步法与改良多步法综合比较

Table 4 Comprehensive comparison of one-step and improved multi-step methods

类别	一步法	改良多步法
提取价格/元·样品 ⁻¹	45	70
提取时间/h	2	3.5
提取成功率/%	60	90
实验条件及操作要求	极为严格	严格
优点	步骤简单,省时快捷,提取结果完整性高,价格相对便宜	成功率高,第一步提取产物可应用于多类实验
缺点	实验条件及操作要求严格,单个样品消耗量较大	步骤较多,耗费时间较长

通过比较可以发现,一步法虽然价格便宜、提取时间短、提取的RNA浓度较高,但成功率低,在提取的过程中还是存在一些杂质污染,其纯度要远低于改良多步法。与此同时,一步法在提取过程中需使用氯仿、异丙醇等多种有机溶剂,对实验环境及操作要求较高。在获得miRNA之后进行的表达模式检测中发现,改良多步法的重复性要远高于一步法,并且表达更接近于miRNA测序结果。此外,由于改良多步法提取的miRNA中保留了较为完整的大分子RNA片段,能够满足miRNA前体序列扩增等研究,这给后续的研究带来了便利。在此基础之上,本研究认为改良多步法更适宜于提取芍药花瓣miRNA,但目前市场上提供的试剂盒种类较多,是否有更为适合的提取方法还有待进一步的研究。

参考文献

- Chen CG, Chen QY, Guo JW, Ma ZJ, Liu M, Zhao QY, Zhang YF (2015). Comparing the serum miRNA extraction effect of three method. *Lab Med Clin*, 12 (20): 2976–2978 (in Chinese with English abstract) [陈昌国, 陈秋圆, 郭建巍, 马志家, 刘敏, 赵强元, 张雅(2015). 三种方法提取血清miRNA效果的比较. *检验医学与临床*, 12 (20): 2976–2978]
- Gou JY, Felippes FF, Liu CJ, Weigel D, Wang JW (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell*, 23 (4): 1512–1522
- Hsieh LC, Lin SI, Shih ACC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, Li WH, Chiou TJ (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol*, 151 (4): 2120–2132
- Huang FL, Li CH, Sun TT, Gao XQ, Hu BZ (2005). Extraction of total RNA in petals of *Paeonia lactiflora* Pall. *Lett Biotechnol*, 16 (3): 282–283 (in Chinese with English abstract) [黄凤兰, 李长海, 孙婷婷, 高秀琴, 胡宝忠(2005). 芍药花瓣总RNA的提取. *生物技术通讯*, 16 (3): 282–283]
- Jia N, Shu QY, Wang LS, Du H, Xu YJ, Liu ZA (2008). Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars. *Sci Hortic*, 117 (2): 167–173
- Jia XY, Yu ZQ, Liang JP, Tang LG, Jin LH, Zhang L, He LH, Li RZ (2013). Cloning of *Arabidopsis At-pri-miR828* gene and its genetic transformation into tomato. *Acta Hortic Sin*, 40 (12): 2419–2428 (in Chinese with English abstract) [贾小云, 于治芹, 梁建萍, 唐贵良, 金雷皓, 张莉, 贺立恒, 李润植(2013). 拟南芥 *At-pri-miR828*基因的克隆及其对番茄的遗传转化. *园艺学报*, 40 (12): 2419–2428]
- Li Q, Wang J, Zhao ZX, Shang X (2013). Comparison of three kinds of total RNA extraction method of pansy petals. *Jiangsu Agr Sci*, 41 (5): 24–26 (in Chinese) [李琴, 王健, 赵钟鑫, 尚啸(2013). 三色堇花瓣总RNA 3种提取方法的比较. *江苏农业科学*, 41 (5): 24–26]
- Lü DJ, Chen J, Zhong Y, Nan P (2014). Compare with two protocols for microRNA extraction from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1255–1258 (in Chinese with English abstract) [吕帝瑾, 陈婧, 钟扬, 南蓬(2014). 两种提取蒙古黄芪miRNA方法的比较. *植物生理学报*, 50 (8): 1255–1258]
- Luo M, Li R, Zhang C, Luo B (2013). Improvement of extraction method of miRNA from plant tissue with abundant polysaccharides. *J Luzhou Med Coll*, 36 (1): 6–9 (in Chinese with English abstract) [罗茂, 李蓉, 张春, 罗波(2013). 富含多糖的植物组织miRNA提取方法的改进. *泸州医学院学报*, 36 (1): 6–9]
- Vaucheret H (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Gene Dev*, 20 (7): 759–771
- Wu T, Lan ZQ (2013). Comparison and analysis of methods of extracting total RNA from petals of *Camellia sasanqua*. *Chin Agr Sci Bull*, 29 (28): 129–133 (in Chinese with English abstract) [吴

- 田, 蓝增全(2013). 茶梅花瓣总RNA提取方法的比较和分析. 中国农学通报, 29 (28): 129–133]
- Xu Q, Liu YL, Zhu AD, Wu XM, Ye JL, Yu KQ, Guo WW, Deng XX (2010). Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. BMC Genomics, 11: 246
- Xu X, He LH (2012). Comparison of current laboratory used of miRNA extraction. J North Pharm, 9 (7): 31–32 (in Chinese with English abstract) [徐翔, 贺丽卉(2012). 血清中miRNA常用提取方法的综合比较. 北方药学, 9 (7): 31–32]
- Zhang X, Guan LL, Han LL, Yang J, Du LN, Li XK (2015). Study on total RNA extraction from safflower petals. Heilongjiang Agr Sci, 2: 14–18 (in Chinese with English abstract) [张雪, 官丽莉, 韩怡来, 杨晶, 杜林娜, 李校堃(2015). 红花花瓣总RNA提取方法的比较研究. 黑龙江农业科学, 2: 14–18]
- Zhao DQ, Jiang Y, Ning CL, Meng JS, Lin SS, Ding W, Tao J (2014). Transcriptome sequencing of a chimaera reveals coordinated expression of anthocyanin biosynthetic genes mediating yellow formation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). BMC Genomics, 15: 689
- Zhao DQ, Tao J, Han CX, Ge JT (2012). Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Mol Biol Rep, 39 (12): 11263–11275

Comparative study on the methods of extracting miRNA from herbaceous peony petals

WEI Meng-Ran, XIA Xing, TAO Jun, ZHAO Da-Qiu*

College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: MicroRNA (miRNA) plays an important role in regulating formation of petal color, so obtaining high-quality miRNA is an important prerequisite for the study of its related mechanism. In this study, one-step, multi-step and improved multi-step methods were used to extract miRNA from herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) petals, and the results show that both one-step and improved multi-step methods could be used to extract miRNA from herbaceous peony petals. Moreover, the advantages of one-step method were low cost, simple extracted step, short extracted time and high RNA concentration. But compared to one-step method, improved multi-step method had higher successive rates of RNA extraction and purity, the better amplification effect of miRNA precursor sequence and more stable expression pattern. In conclusion, the improved multi-step method is an efficient extraction method for extracting miRNA from herbaceous peony petals.

Key words: *Paeonia lactiflora*; polysaccharide; miRNA; extraction

Received 2016-12-01 Accepted 2017-03-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31400592).

*Corresponding author (E-mail: dqzhao@yzu.edu.cn).