

野葛块根总 RNA 的不同提取方法比较研究

肖旭峰, 姜文轩, 吴才君, 范淑英*

(江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045)

摘要: 以块根膨大与块根不膨大突变型的野葛块根为材料, 比较 Trizol、CTAB、SDS 及改良 SDS 法提取野葛块根总 RNA 的效果。通过 RNA 产量、纯度及电泳图谱分析等, 初步确立了一种有效提取野葛块根总 RNA 的改良 SDS 法。该方法提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 值介于 1.7~1.9, 电泳图谱清晰完整, 产量高, 成本低, 完全适用于 RT-PCR、cDNA-AFLP 及 Northern 杂交等分子生物学后续试验。

关键词: 葛块根; 总 RNA 提取; Trizol 法; CTAB 法; SDS 法; 改良 SDS 法

中图分类号: S632.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0147-04

Comparison of Different Methods for Total RNA Extraction from Pueraria Earthnut

XIAO Xu-feng, JIANG Wen-xuan, WU Cai-jun, FAN Shu-ying*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this paper, the wild type and the mutant type of pueraria earthnut were used as the experimental material to compare the effects of Trizol, CTAB, SDS and modified SDS on total RNA extraction. Through analyzing the yield, purity, quality and electrophoretograms, an improved effective SDS method was preliminary developed to extract the total RNA from pueraria earthnut. The OD_{260}/OD_{280} value of RNA extracted with this method varied in a range of 1.7~1.9 and the electrophoretograms were integrated. This RNA extraction method is characterized by the high yield, low cost, etc., and could be used in some experiments, such as RT-PCR, cDNA-AFLP and northern hybridization.

Key words: pueraria earthnut; total RNA extraction; Trizol; CTAB; SDS; modified SDS

野葛(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 是豆科植物葛属的一个种, 块根是其主要的经济器官^[1]。块根的大小直接影响葛的综合利用, 故葛块根膨大机理研究一直广泛受植物学家和发育学家关注。开展葛根膨大分子机理研究, 从分子水平上探讨葛块根膨大的机理, 将对其遗传控制、分子育种研究高产栽培具有极大的促进作用, 而葛块根总 RNA 提取则是此研究中的基础环节。葛块根中富含大量多糖、酚类等特殊物质, 严重干扰总 RNA 提取及后续分子生物学研究^[2]。目前, 常用的 RNA 提取方法对处理野葛块根类的特殊材料, 还存在分离产量低、污染较严重等问题。本试验通过比较 Trizol、CTAB、SDS 及改良 SDS 法对野葛块根中总 RNA 的提取效果, 筛选出提取葛根总 RNA 的最佳方法, 旨在为葛根膨大分子生物学机理研究奠定技术基础。

收稿日期: 2010-09-20 修回日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760142)

作者简介: 肖旭峰(1977—), 女, 讲师, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: xiaoxufeng01@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 范淑英, 教授, E-mail: wucj1@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为野生葛块根,包括膨大型与不膨大突变型两类,均采自江西农业大学科技园试验田。葛根采用无菌水洗净,体积分数为75%的酒精擦洗晾干后,用无菌锡箔纸包好,并放入液氮中冷冻处理,带回实验室后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中保存备用。

1.2 野葛块根总 RNA 提取

分别采用 Trizol、CTAB、SDS 法及改良 SDS 法提取两种不同类型野生葛块根总 RNA。所有试剂均用无 RNase 水配制,塑料制品用 1 g/L DEPC 水浸泡处理后高温灭菌,玻璃器皿及研钵在 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘烤 8 h 以上备用。

Trizol 法采用 Invitrogen 公司 Trizol 试剂法规范操作;CTAB 法具体步骤则参照 Chang 等^[1];SDS 法参照 Vandriessche 等方法^[2];而改良 SDS 法的具体操作步骤为:(1)取约 $100\text{ }\mu\text{g}$ 用液氮研磨的葛根粉,加入配制的葛根总 RNA 提取液(包括 20 g/L SDS, 10 g/L 巯基乙醇, 50 mmol/L EDTA, 150 mmol/L Tris 碱,并用 1 mol/L 硼酸调 pH 至 7.5) 0.5 mL 提取液在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴约 0.5 h ,然后再裂解液中加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ β -巯基乙醇,室温下静置约 5 min ;(2)向匀浆中加入 0.25 倍体积的无水乙醇和 0.11 倍体积的 5 mol/L 醋酸钾,迅速剧烈振荡或涡旋约 1 min 混匀;(3)加入等体积 $w_{\text{氯仿}}:w_{\text{异戊醇}}$ ($49:1$),摇匀 15 s , $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ;(4)回收水相,加入等体积的 $w_{\text{酚}}(\text{pH}4.3):w_{\text{氯仿}}$ ($1:1$)抽提, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min 后,再加入 $w_{\text{氯仿}}:w_{\text{异戊醇}}$ ($49:1$)等体积摇匀后 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ;(5)液相小心移出,加入一定体积 10 mol/L LiCl,使其终浓度至 3 mol/L , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀 RNA;(6) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 2 min 收集 RNA 沉淀后,加入 1 mL 3 mol/L LiCl 冲洗 2 次;(7)用 DEPC 处理的灭菌水溶解 RNA,加入一定量的 5 mol/L 醋酸钾(pH 4.8)使其终浓度为 0.3 mol/L ,同时加入 2 倍体积的无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀 RNA;(8) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min 后,用 1 mL 冷体积分数为 75% 乙醇冲洗 2 次后,DEPC 水溶解 RNA 贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 野葛块根总 RNA 的完整性及纯度检测

RNA 完整性采用 1.2% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测(上样量为 $3\text{ }\mu\text{L}$)紫外凝胶成像系统观察并拍照;得率、纯度则采用 Eppendorf 蛋白核酸分析仪检测;样品采用无菌水稀释 20 倍或用 10 mmol/L Tris 溶液(pH 值=7.5)稀释 20 倍。

2 结果与分析

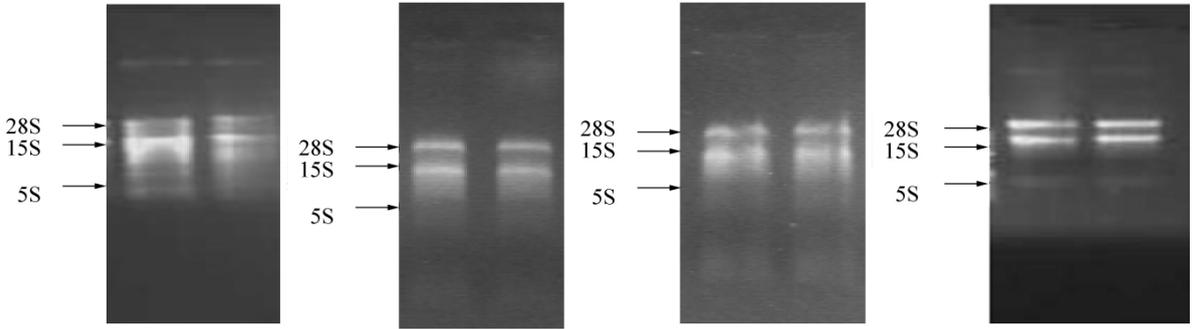
2.1 不同方法提取野葛块根总 RNA 完整性比较

采用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测不同方法提取葛块根总 RNA 完整性。通常未降解的总 RNA 经凝胶电泳后,其 28S 与 18S 的比例应接近 $2:1$;如果发生部分降解, 28S rRNA 会降解为 18S rRNA,导致两谱带比例发生改变^[3]。

从图 1A 可见,Trizol 法虽然获得了块根的总 RNA,但 28S 降解明显,条带亮度较 18S 弱,无 5S 条带,泳道呈弥散拖尾状,说明该法提取野葛块根的总 RNA 降解现象较严重,不能作为有效提取方法;利用 CTAB 法提取的野葛块根总 RNA,从图 1 可看到明显的 28S 和 18S 谱带,但两者荧光强度差不多,未呈现出明显的 2 倍差异关系,此外 5S RNA 含量较少,表明 RNA 也发生了部分降解,再加上 CTAB 法步骤繁琐,沉淀 RNA 时需过夜,由此该法也不是野葛块根总 RNA 提取的最佳方案(图 1B);传统 SDS 法提取的 RNA,条带比较模糊,泳道出现少量拖带,说明 RNA 完整性较差(图 1C),而改良后的 SDS 法提取总 RNA, 28S 和 18S 谱带整齐清晰,带型无拖尾和弥散,亮度接近明显的 $2:1$ 关系,表明 RNA 结构完整,质量优良,加之点样孔中无亮带,杂质少,由此初步地确立改良 SDS 法为提取野葛块根总 RNA 首选方案(图 1D)。

2.2 不同方法提取野葛块根总 RNA 纯度和产量比较

采用 Eppendorf 蛋白核酸仪检测 4 种方法提取的样品 OD_{260}/OD_{230} 、 OD_{260}/OD_{280} 值及产量见表 1。Trizol 法和 SDS 法提取的总 RNA OD_{260}/OD_{280} 值均小于 1.8 , OD_{260}/OD_{230} 低于 2.0 ,表明提取物中含有多



A: Trizol 法; B: CTAB 法; C: SDS 法; D: 改良 SDS 法; 1 2 分别代表块根膨大型与块根不膨大突变型。

A: Trizol method; B: CTAB method; C: SDS method; D: modified SDS method; 1 2: the wild type and the mutant type of pueraria earthnut.

图 1 不同方法提取野葛块根总 RNA 的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis validation of total RNA extracted from pueraria earthnut

糖、酚类物质等过高,导致 RNA 污染严重,得率较低;而 CTAB 法和改良 SDS 法提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.7 ~ 2.0,且 OD_{260}/OD_{230} 也大于 2.0,表明提取的 RNA 符合去除蛋白质的要求,无多糖和酚类等物质污染,纯度较理想;而从 RNA 得率上看,改良 SDS 法得到的 RNA 产量最多,明显高于其它 3 种提取方法。

表 1 不同方法提取野葛块根总 RNA 的产量与纯度比较

Tab. 1 Comparison of yield and purity of total RNA from pueraria earthnut

RNA 提取方法 RNA Extraction method	葛根类型 Earthnut Type	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	总 RNA 浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Total RNA concentration
Trizol 法	膨大型 Wild type	1.28	1.45	10.3
Trizol extraction method	突变型 Mutant type	1.45	0.74	7.6
CTAB 法	膨大型 Wild type	1.72	2.01	8.9
CTAB extraction method	突变型 Mutant type	1.81	2.14	9.4
SDS 法	膨大型 Wild type	1.46	1.59	9.2
SDS extraction method	突变型 Mutant type	1.39	1.77	8.5
改良 SDS 法	膨大型 Wild type	1.88	1.97	15.6
Modified SDS extraction method	突变型 Mutant type	1.78	2.08	16.9

3 讨论

不同植物种类及同种植物不同组织内物质组分及物质含量有很大差异,往往需要不同的 RNA 提取方法^[6]。野葛的块根是由粗壮的纤维根积累养分后膨大而成的,块根中富含大量的淀粉、多糖、酚类化合物及其它次级代谢物等,严重干扰葛根总 RNA 的提取。当植物组织被研磨细胞破裂后,上述物质与 RNA 发生相互作用,如酚类化合物被氧化后与 RNA 不可逆结合,使 RNA 活性丧失和在酚-氯仿抽提时使之丢失;多糖在水中的理化性质和 RNA 相似,与之共沉淀后形成粘稠难溶的胶状物,除大大降低沉淀 RNA 的溶解性,并导致 RNA 的大量流失外,还严重干扰 RNA 的分光光度法定量测定,抑制许多酶活性^[7];次级代谢产物很容易与 RNA 结合并与 RNA 共同被抽提出来而阻碍具有生物活性的 RNA 分离^[8]。因此能否有效去除多糖、酚类化合物及干扰 RNA 提取的其它代谢产物等是提取高质量葛块根 RNA 成败的关键。

Trizol 法具有操作简单、耗时短,所需试剂种类少等优点^[9]。但本试验采用 Trizol 试剂提取葛根 RNA 的效果不理想,可能是由于该法步骤相对较简单,对葛根细胞壁组织裂解不充分而导致了 RNA 得率低。而且仅用氯仿抽提仅可去除葛根中少量的多糖,仍有大量多糖不能有效去除,故该法不适宜内含

物较多的葛根总 RNA 提取。SDS 法及 CTAB 法的提取缓冲液中都加入了 β -巯基乙醇。 β -巯基乙醇具有强还原性,能有效防止多酚氧化,还可打断多酚氧化酶的二硫键使之失活^[10],对降低酚类化合物干扰 RNA 提取有极大的帮助。高浓度的 CTAB 能有效溶解细胞膜上的蛋白质,使细胞破裂彻底释放 RNA^[11]。然而与 SDS 法相比,CTAB 法存在步骤繁琐、抽提次数过多等不足,从而延长了提取时间,使得该法提取的葛根 RNA 效果不稳定, RNA 部分降解、得率低等。SDS 法中的主要试剂 SDS(十二烷基磺酸钠)是一种效果很强的阴离子去污剂,在震荡过程中可有效去除蛋白质和核酸对 RNA 提取的干扰^[12];高浓度 K^+ 、低浓度乙醇,再加上酸性酚和氯仿抽提,能有效去除多糖类物质,提高 RNA 的纯度^[13];改良 SDS 法与传统方法比较,提取缓冲液增加了 SDS 的浓度,并含有 Tris-硼酸。SDS 能显著提高 RNA 的产量,而硼酸可与酚类物质结合成复合物,抑制酚类物质的氧化及与 RNA 的结合,也提高了 RNA 的产率。此外,葛根中淀粉、酚类物质含量均高,细胞中 RNA 含量较其它部位少。选择 LiCl 专一沉淀 RNA,防止多糖等生物大分子杂质沉淀,且提取杂质较多,特别适合从大量样品中提取少量 RNA 的组织^[14-15]。

总之,与其它野葛块根 RNA 提取方法相比,改良的 SDS 法具有 RNA 结构完整、产量高、提取时间较短等特点,而且使用的药品在价格方面更为低廉一些,因此改良 SDS 法被确立为一种有效提取葛块根高质量 RNA 的首选方法。这一关键性问题的突破,为今后探讨葛块根膨大分子机理方面的后续试验提供了技术基础。

参考文献:

- [1]周文灵,王瑛华,陈刚,等.野葛葡糖基转移酶基因 *P1UGT3* 的克隆与生物信息学分析[J].植物生理学通讯,2009,45(7):651-656.
- [2]范淑英,吴才君,杨寅桂.野葛主要营养和药用价值分析[J].江西农业大学学报,1998,20(4):460-463.
- [3]Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113-116.
- [4]Vandriessche E S, Becckmans S, Dejaegere R, et al. The antioxidant of choic for the purification of protein from phenol-rich tissues[J]. Anal Biochem, 1984, 141(1): 181-188.
- [5]余发新,孙小艳,徐立安,等.木本植物根系总 RNA 提取方法的比较和分析[J].林业科技开发,2010,24(4):90-95.
- [6]田伟,田义轲,王彩虹,等.苹果组织总 RNA 提取方法的比较研究[J].青岛农业大学学报,2010,27(2):122-125.
- [7]夏海武,吕柳新,陈桂信.羊蹄甲果荚中总 RNA 提取的新方法[J].分子植物育种,2006,4(1):147-149.
- [8]李宏,王新力.植物组织 RNA 提取的难点及对策[J].生物技术通讯,1999,1:36-39.
- [9]肖旭峰,雷建军,曹必好,等.菜心 *BrcuFCA* 基因的克隆与表达分析[J].基因组与应用生物学,2010,29(1):31-36.
- [10]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.
- [11]Schneiderbauer A, Sandermann H J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91-95.
- [12]栾东东,石庆华,陈虹,等.刺山柑总 RNA 不同提取方法的比较[J].干旱区研究,2009,26(3):225-227.
- [13]史公军,侯喜林,王彦华.植物组织 RNA 的几种提取方法[J].西南农业学报,2005,18(2):225-227.
- [14]袁明珠,温柔,刘吉升,等.几种植物材料中总 RNA 的提取[J].分子植物育种,2005,3(2):285-292.
- [15]谷守芹,解灵君,范永山.植物组织总 RNA 提取的常用方法及优化策略[J].保定师范专科学校学报,2005,18(2):40-43.