

技术与方法 Techniques and Methods

茶树叶片总RNA提取方法的比较研究

王梦娜, 武艳, 程国山, 张今今*

陕西师范大学生命科学学院, 西安710062

摘要: 针对茶树叶片中富含多酚类物质的特点, 以陕西地方茶树代表种质紫阳楮叶种的叶片为材料, 比较了Trizol法、异硫氰酸胍法和改良SDS-酸酚法三种不同的总RNA提取方法。结果表明改良SDS-酸酚法能够从新鲜叶片、冷冻叶片和干燥叶片中提取到质量高、完整性好的总RNA, 经检测28S rRNA亮度为18S rRNA的2倍, A_{260}/A_{280} 值介于1.83~2.01之间。以鲜叶、冻叶和干燥叶片的总RNA为材料, 进一步用于DDRT-PCR分析, 均可获得清晰稳定的多态性结果。说明改良的SDS-酸酚法能抑制茶树叶片中多酚类物质对总RNA提取的影响, 是一种适于茶树叶片总RNA提取的有效方法。

关键词: 茶树; 改良SDS-酸酚法; 总RNA; 多酚

Comparison of Methods for Total RNA Extraction from *Camellia sinensis*

WANG Meng-Na, WU Yan, CHENG Guo-Shan, ZHANG Jin-Jin*

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: To develop an improved protocol to isolate total RNA in good yield and integrity from *Camellia sinensis* leaves containing high levels of tea polyphenols, three different total RNA extraction techniques, the Trizol method, the isothiocyanate guanidine method and improved SDS-phenol method were compared. Modified SDS-phenol method can be used to extract the high quality and integral total RNA from fresh leaves, frozen leaves and dry leaves. The testing result showed that the brightness of 28S rRNA was two times of 18S rRNA, and the value of A_{260}/A_{280} was between 1.83 and 2.01, and further DDRT-PCR experiment also acquired clear and distinguished polymorphism results. So the modified SDS-phenol method is an effective way to extract total RNA for tea plants, meanwhile can inhibit the polyphenol influence on total RNA extraction.

Key words: *Camellia sinensis*; modified SDS-phenol method; total RNA; polyphenol

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]为山茶科山茶属的亚热带多年生木本常绿植物, 原产于我国西南地区、缅甸北部和印度阿萨姆一带, 也是我国的重要经济林木之一。陕西茶区地处秦巴山区, 地理位置独特, 生态条件优异, 既是江北茶区的主产区之一, 也是我国北方茶区茶树种质资源的重要宝库。陕西地方茶树品种资源丰富, 目前仍为原始组成状况。据其分布地域特点、栽培历史以及组成类型可分为紫阳群体、西乡大河坝群体等7大群体28个品种(王镇恒和王广智2000)。目前已从陕西茶树种质资源的多样性(李剑2008)、适制性(李剑2008)、特殊资源筛选(潘庆等2007)及茶树抗寒性(武艳等2012)等方面开展了一些基础性研究, 并取得了一定的成果。但陕西茶树资源特有的抗寒(武艳等2012)、无花(潘庆等2007)和富含茶多酚(李剑2008)等优良性状的分子

机制尚不明确。茶树的组织器官中富含茶多酚、茶多糖和大量次生代谢物质(李剑2008), 且RNase活性较高, 这都使得茶树总RNA提取难度增大, 从一定程度上限制了茶树分子生物学研究的进行。

开展茶树功能基因的克隆和重要经济性状的分子机制研究, 从茶树中提取纯度高、完整性好的总RNA是必不可少的基本实验技术。因此, 本研究拟进行茶树总RNA提取的方法研究, 基于对核酸提取原理的了解, 比较Trizol法、异硫氰酸胍法和改良后的SDS-酸酚法, 以期获得质量高、纯度好的茶树叶片总RNA, 筛选并确定适合茶树这种多酚多糖含量类植物叶片总RNA提取的最佳方

收稿 2012-11-16 修定 2012-12-07

资助 中央高校基本科研业务费项目(GK201002026)。

* 通讯作者(E-mail: zhangjinjin@snnu.edu.cn; Tel: 029-85310266)。

法。为今后合理开发和利用陕西地方茶树种质资源,开展茶树重要基因的克隆和功能研究,进一步探索miRNA、siRNA等小RNA与茶树生长发育、抗病耐逆基因的表达调控分子机制,合理利用和改良茶树资源,提高茶叶产量和品质奠定实验基础。

材料与方法

1 供试材料

供试材料为茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]紫阳群体种中的代表种质紫阳楮叶种二年生扦插苗,取自陕西省安康市紫阳县茶叶试验站,并移栽于陕西师范大学植物资源圃栽培保存。分别以当年生新枝上的幼叶、冻叶(-20 °C保存)和干叶(硅胶干燥2~3 d)为材料提取总RNA。

2 主要试剂

聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)、氯化锂(LiCl)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)、硼酸、尿素(Urea)、柠檬酸三钠、十二烷基磺酸钠(SDS)、L-半胱氨酸为Amresco产品;交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)为Sigma产品;水饱和酚为Wolsen产品;其他均为常规试剂。锚定引物、随机引物均为上海生工公司产品;Recombinant DNase I (RNase-free)、Reverse Transcriptase M-MLV反转录酶、Taq DNA聚合酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、 Mg^{2+} (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、dNTPs (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、DL2000 Marker、DL500 Marker、Recombinant DNase I (RNase-free)以及Ribonuclease Inhibitor等购自TaKaRa公司;用于RNA提取的所有试剂及一次性塑料耗材均用0.1% DEPC水(*V/V*)处理并高压灭菌,玻璃制品及研钵等180 °C烘烤8 h备用。

3 方法

3.1 总RNA提取

茶树叶片总RNA的提取采用以下三种方法:

3.1.1 Trizol法 Trizol法操作步骤参考孙德权等(2009)方法,Trizol购自宝生物工程(大连)有限公司。

3.1.2 异硫氰酸胍法 参考董宁光等(2011)方法。

3.1.3 改良SDS-酚法 参考王暑辉等(2012)方法,并加以改进:于2 mL离心管中加入850 μL 提取缓冲液(100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl, 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, 1% SDS, 用前加入PVP和 β -巯基乙醇,终浓度分别为16%和1%),置于80 °C预热;分别

称取0.3 g鲜叶、冻叶、干叶置于液氮预处理过的研钵中,迅速加液氮及适量PVPP研磨成细粉末状,分装于两个预热的离心管中,冰浴15 min; 15 300 $\times g$, 4 °C离心15 min;将上清转移到1.5 mL离心管中,加入1/3体积5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ KAc (pH 4.8),充分混匀后冰浴15 min; 15 300 $\times g$, 4 °C离心15 min;将上清转移到新的1.5 mL离心管中,每管加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀后冰浴10 min; 15 300 $\times g$, 4 °C离心15 min;将上清转移到新的1.5 mL离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后置于-20 °C沉淀2 h; 15 300 $\times g$, 4 °C离心15 min;弃上清,加入600 μL 重悬缓冲液(2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl, 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA)重悬沉淀; 15 300 $\times g$, 4 °C离心15 min;加入600 μL 75%乙醇洗涤2次,每次冰浴5 min后15 300 $\times g$, 4 °C离心5 min;室温放置10 min使酒精完全挥发;加入30 μL 0.1% DEPC ddH₂O溶解RNA, -80 °C的超低温冰箱中保存。

3.2 总RNA样品中DNA的去除及检测

总RNA样品中DNA的去除参考张今今(2003)方法。取溶解于DEPC ddH₂O的总RNA溶液约2 μL 进行1.0%琼脂糖凝胶电泳,紫外成像系统记录电泳结果。分别取每种方法提取的总RNA 2 μL ,在核酸蛋白测定仪(ND2000超微量)上分别测定样品在280、260 nm处的吸光值,并计算 A_{260}/A_{280} 的比值。

3.3 DDRT-PCR

反转录反应体系参照Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)使用说明,反转录引物为5'-AAGC-TTTTTTTTTTGTG-3' (B0327)和5'-AAGCTTTTTTTT-TTTA-3' (B0328)。DDRT-PCR (differential display reverse transcription PCR)步骤参考张今今(2003)方法,锚定引物为5'-AAGCTTTTTTTTTTTTGTG-3' (B0327)和5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3' (B0328)。随机引物为5'-TACAACGAGG-3' (B0301)。扩增产物用55 W恒定功率进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染步骤参考Ji等(2007)。

实验结果

1 三种方法对茶树叶片总RNA的提取

电泳结果显示(图1),三种方法中仅异硫氰酸胍法和改进的SDS-酚法能从新鲜叶片中提取出不同产率的总RNA。Trizol法对应的泳道中,无

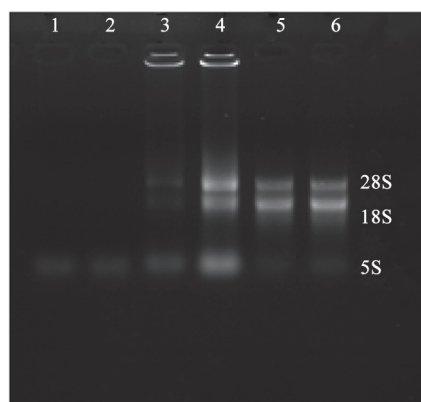


图1 3种不同方法提取茶树鲜叶总RNA的电泳结果
Fig.1 Electrophoresis results for total RNA extraction from *Camellia sinensis* with three methods
1, 2: Trizol法; 3, 4: 异硫氰酸胍法; 5, 6: 改进SDS-酚法。

28S rRNA和18S rRNA, 只可见少量5S rRNA, 说明该方法提取的总RNA完全降解, 不适用于茶树总RNA的提取。异硫氰酸胍法提取的总RNA可见28S rRNA、18S rRNA和5S rRNA, 但是条带锐度不好, 有一定程度的弥散或降解, 且点样孔有明显的残留; 改良的SDS-酚法2次平行重复的结果表现一致, 28S和18S rRNA清晰可辨, 锐度好, 无弥散或降解, 点样孔干净无残留。 A_{260}/A_{280} 分别为1.94和2.0, 均处于1.9~2.0范围内, 说明此方法提取的总RNA完整性最好, 纯度最高, 是三种方法中最适合茶树叶片总RNA提取的方法。

2 改良SDS-酚法提取茶树鲜叶、冻叶、干叶的总RNA

进一步采用改良SDS-酚法对茶树鲜叶、冻叶、干叶分别提取总RNA, 电泳结果显示(图2), 该

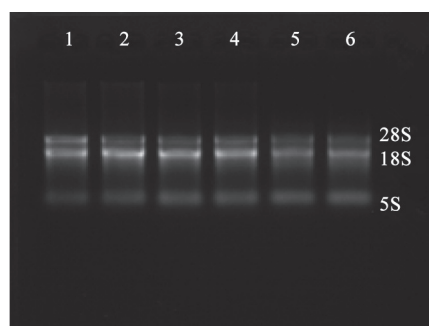


图2 3种不同茶树叶片的总RNA提取电泳结果
Fig.2 Electrophoresis result for total RNA extraction from three leaves
1, 2: 茶树鲜叶; 3, 4: 茶树冻叶; 5, 6: 茶树干叶。

方法从三种叶片材料中均能提取出总RNA, 其中鲜叶的总RNA电泳条带清晰, 锐度好, 28S rRNA亮度是18S rRNA亮度的2倍, 无明显的弥散或降解, 质量最好; 冻叶的总RNA电泳条带清晰, 无明显弥散或降解, 28S rRNA亮度较鲜叶总RNA 28S rRNA略差; 干叶的总RNA电泳条带清晰度较鲜叶、冻叶低, 28S rRNA和18S rRNA亮度较差, 有一定的弥散或降解, 但仍可见清晰的三条带, 说明茶树鲜叶、冻叶和干叶中都能提取到一定纯度的总RNA。

分别检测三种茶树叶片总RNA在280 nm、260 nm处的吸光值(表1)。结果表明鲜叶的总RNA A_{260}/A_{280} 值为1.99±0.01, 说明鲜叶的总RNA纯度好, 无蛋白质、酚类物质、 β -巯基乙醇等污染, 且产率最高, 平均浓度为480 ng· μ L⁻¹; 冻叶的总RNA A_{260}/A_{280} 值为1.97±0.04, 说明冻叶的总RNA纯度较好, 无 β -巯基乙醇等污染; 干叶的总RNA A_{260}/A_{280} 值为1.865±0.035, 说明干叶的总RNA有一定程度 β -巯基乙醇污染, 产率较低。

表1 改良SDS-酚法提取不同处理的茶树叶片总RNA的产量与浓度

Table 1 Comparison of yield and purity of total RNA from different materials with modified SDS-phenol

材料	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	总RNA浓度/ng· μ L ⁻¹
鲜叶	11.774	5.901	2.00	471.0
	12.368	6.246	1.98	491.8
冻叶	7.993	3.937	1.93	413.5
	6.876	3.420	2.01	375.1
干叶	6.686	3.653	1.83	280.9
	6.733	3.546	1.90	269.3

3 DDRT-PCR

为进一步证明改良的SDS-酚法提取的总RNA完全可以用于DDRT-PCR等分子生物学方面的研究, 将茶树苗置于4℃人工气候箱中进行冷胁迫诱导, 取形态学顶部向下数第2片完全展开的功能叶片, 分别提取鲜叶、冻叶和干叶的总RNA, 经反转录反应后用于DDRT-PCR反应。从表1可见冻叶和干叶在总RNA的质量和产率上与鲜叶相比略差(图2、表1), 但三种叶片材料的总RNA在反转录后, 都可以获得扩增条型丰富的DDRT-PCR结果(图3)。从扩增结果可见, 每一种引物对在单一电泳泳道可稳定显示数十个条带, 主带清晰, 扩增片

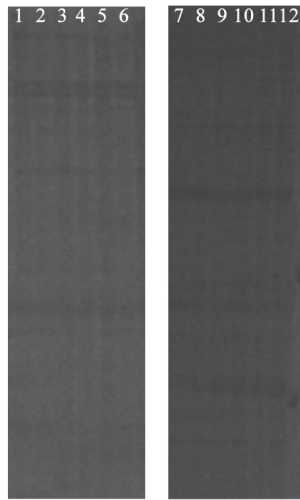


图3 茶树叶片总RNA DDRT-PCR结果

Fig.3 DDRT-PCR for total RNA extraction from *Camellia sinensis*

1, 2: 鲜叶; 3, 4: 冻叶; 5, 6: 干叶(1~6锚定引物B0327和随机引物B0301); 7, 8: 鲜叶; 9, 10: 冻叶; 11, 12: 干叶(7~12锚定引物B0328和随机引物B0301)。

段介于100~2 000 bp之间, 条带丰富, 条带强度较好, 稳定性、重复性好。表明改进的SDS-酸酚法提取的总RNA并反转录成的cDNA样品, 可用于基因的克隆、表达等分子生物学研究。

讨 论

总RNA的提取和纯化是基因表达、克隆及功能等分子生物学研究的基础, 其质量直接影响后续cDNA合成、DDRT-PCR及小RNA的提取和二代测序等实验的进行。茶树叶片中含有丰富的茶多糖、茶多酚及萜类化合物, 茶多酚会被氧化成能与RNA共结合的醌类物质, 茶多糖因具有与RNA相似的理化性质而与RNA形成很难分开的共沉淀, 在对茶叶进行研磨时还会产生茶黄素、茶红素等氧化产物(王暑辉等2012), 这些都增加了茶树RNA提取的难度。

茶多酚是茶树叶片中多酚类物质的总称, 包括黄烷醇类、花色苷类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类物质(黄丽凤等2010), 是形成茶叶色香味的主要成分, 同时也是茶叶中具有保健功能的有效成分。因此有效地防止和抑制茶多酚的氧化, 是茶树总RNA提取的重要环节。在改进的SDS-酸酚法中, 加入了络合物和强还原剂以有效抑制茶多

酚被氧化。液氮研磨时加入不溶性PVPP, 防止材料在研磨过程中被氧化, 同时在提取液中加入水溶性PVP。聚乙烯吡咯烷酮是多酚类化合物的螯合剂, 可与多酚络合形成复合物, 以阻止醌类物质的形成, 有效防止总RNA被裹挟损失(Medina等2001)。提取缓冲液中还加入了强还原剂 β -巯基乙醇, 既可提供强还原条件防止多酚被氧化, 同时可打断多酚氧化酶的二硫键使之失活, 从而有效地提高了RNA的完整性。与常规的核酸提取方法不同, 改进的SDS-酸酚法中, 未向组织匀浆液中加入水饱和酚进行抽提, 而是在DNase酶解除去DNA后加入酚, 是因为PVP结合多酚类物质的同时, 也与水饱和酚发生不可逆的结合, 产生白色絮状物, 裹挟大量的RNA, 降低产率, 因此待除去DNA后再用水饱和酚抽提就可完全除去残余蛋白质。

茶多糖是茶叶复合多糖的简称, 由糖类、果胶、蛋白质等组成, 其中多糖部分包括阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖聚等水溶性多糖, 也是茶叶中的主要有效成分(周小玲等2007)。但茶多糖的许多理化性质与RNA相似, 在提取过程中往往产生难溶于水的凝胶状沉淀, 或溶解后产生黏稠状的溶液而无法获得总RNA沉淀(Logemann等1987)。以往去除多糖的方法通常有低浓度乙醇沉淀法(Tesniere和Vayda 1991)、醋酸钾沉淀法(Ainsworth 1994), 此外适当提高缓冲液中NaCl浓度也有助于去除多糖(Fang等1992)。本实验中, 在第一次离心去除大量细胞破碎物后, 即向上清液中加入1/3体积5 mol·L⁻¹ KAc (pH 4.8), 离心后得到大量凝胶状茶多糖沉淀物, 有效地去除了茶多糖的干扰。

本研究针对茶树叶片富含茶多酚和茶多糖的特点, 对SDS-酸酚法加以改进, 在提取缓冲液中加入了16% PVP和1% β -巯基乙醇, 在匀浆上清液中加入5 mol·L⁻¹醋酸钾, 有效防止多酚与多糖的干扰, 获得了完整性好、纯度高的总RNA, 完全能满足后续茶树分子遗传学方面的研究。改进的SDS-酸酚法还适合茶树冻叶和干叶的提取, 从干叶和冻叶中获得的总RNA与鲜叶的DDRT-PCR结果无明显差别, 这也为野生茶树种质资源的野外采样和研究提供了便利。

参考文献

- 董宁光, 高英, 裴东(2011). 核桃子叶RNA提取方法的研究. 北京林业大学学报, 33 (6): 98~101
- 黄丽凤, 刘友平, 黎代余(2010). 茶多酚提取物的质量评价. 食品科技, 35 (4): 262~268
- 李剑(2008). 陕西茶树种质资源鉴定与评价[学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学
- 潘庆, 余有本, 李剑(2007). 茶树种质紫阳1号不育性初探. 西北农业学报, 16 (4): 257~259
- 孙德权, 郭启高, 胡玉林, 谢江辉(2009). 改良Trizol法提取香蕉叶片总RNA. 广东农业科学, (5): 162~164
- 王暑辉, 徐倩, 徐筱, 徐吉成(2012). 富含多糖多酚的侧柏叶片总RNA提取方法. 吉林农业大学学报, 34 (1): 76~80, 89
- 武艳, 肖斌, 游有才, 陈亦雯, 吴琴丰, 张今今(2012). 陕西茶树种质资源抗寒性综合评价. 热带作物学报, 33 (5): 792~798
- 王镇恒, 王广智(2000). 中国名茶志. 北京: 中国农业出版社
- 张今今(2003). 葡萄总RNA提取方法的研究. 果树学报, 20 (3): 178~181
- 周小玲, 汪东风, 李素臻, 周恂, 侯仰锋, 王远红(2007). 不同酶法提取工艺对茶多糖组成的影响. 茶叶科学, 27 (1): 27~32
- Ainsworth C (1994). Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). *Plant Mol Biol Rep*, 12 (3): 198~203
- Fang G, Hammar S, Grumet R (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13 (1): 52~56
- Ji YT, Qu CQ, Cao BY (2007). An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 28 (8): 1173~1175
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 163 (1): 16~20
- Medina J, Catala R, Salinas J (2001). Developmental and stress regulation of *RCI2A* and *RCI2B*, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol*, 125 (4): 1655~1666
- Tesniere C, Vayda ME (1991). Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mol Biol Rep*, 9 (3): 242~251