

盐生肉质化植物海马齿(*Sesuvium portulacastrum* L.)中总 RNA 提取方法的优化

杨成龙, 段瑞军, 郭建春*

中国热带农业科学院生物技术研究所, 海口 571101

Optimization Methods for Extracting Total RNA from Salt-living and Succulent Plant *Sesuvium portulacastrum* L.

YANG Cheng-Long, DUAN Rui-Jun, GUO Jian-Chun*

Institute of Biotechnology and Bioscience, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

摘要: 以海马齿为材料, 分别用 CTAB 法、SDS 法、Trizol 方法以及改进的 CTAB 法提取其总 RNA, 并比较了各 RNA 的产率、纯度和完整性等。结果表明, 改进的 CTAB 法对海马齿总 RNA 的提取有较好的效果, 所得总 RNA 的 28S、18S 和 5S 条带清晰, A_{260}/A_{280} 比值为 2.0, A_{260}/A_{230} 比值为 2.08, RNA 产量可达 $56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。经 RT-PCR 获得了特异条带, 说明利用改良的 CTAB 法从海马齿中提取到的 RNA 质量好、产率高、完整性强, 完全适合于进一步的分子生物学研究。

关键词: 海马齿; 多糖; 多酚; 总 RNA; 改良 CTAB

植物中的 RNA 是分子生物学研究的重要材料, 如: 用于 Northern 杂交分析、RT-PCR、cDNA 文库构建、差示 PCR 分析及体外转译、基因分离和基因转录表达调控等分子研究(李宏和王新力 1999)。海马齿又名滨水菜, 属于番杏科(Aizoaceae) 海马齿属(*Sesuvium*), 生长在海边沙地或盐碱地的多年生匍匐性肉质草本植物。海马齿的组织中存在大量的多糖、多酚和其他次生类代谢物质, 这些物质很容易与 RNA 共沉淀, 干扰 RNA 的提取和纯化, 影响 RNA 的产量和质量。因此, 要获得完整的、高纯度的 RNA 是一项较为困难的工作。另外, 一些常用的 RNA 酶强烈变性剂和较高温度处理都会使多糖类物质糊化, 溶液变得粘稠而不易处理, 因此, 去除多糖等物质是分离这类植物组织中 RNA 的关键。目前应用较多的有 CTAB 法(曾会才 2003)、SDS 法(刘海等 2006; 杜中军等 2005)、异硫氰酸胍法(张志刚等 2006)、热硼酸盐法(李宏和王新力 1999)以及商业试剂盒 Trizol 等。由于各种不同植物有其各自的生理结构特点和含有不同的生理代谢产物, 因此, RNA 的提取方法也不尽相同(望飞勇等 2007)。本研究综合了多种 RNA 的提取方法, 在 CTAB 法基础上进行了改良, 成功地从盐生肉质化海马齿中提取了较为完整的 RNA。

材料与方法

1 植物材料

海马齿(*Sesuvium portulacastrum* L.) 采自海南省海口市郊区白沙门海滨, 用同一株海马齿进行大量扦插, 使其成活后, 取培养 30 d 后的健康幼苗植株作为实验材料。

2 方法

2.1 CTAB 法 参照曾会才(2003)、方孝东等(1998)的 CTAB 法进行。

2.2 改良 CTAB 法 通过综合多种植物 RNA 提取的 CTAB 方法而获得(方孝东等 1998; 李宏和王新力 1999; Bekesiova 等 1999; 曾会才 2003; 史宝胜和卓丽环 2006; 葛晓萍和石琰璟 2007)。取 3 g 材料磨成粉末, 加入到 15 mL 提取缓冲液[2% CTAB、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、1.4 mol·L⁻¹ NaCl、20 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、2% PVP, 用前加入 β -巯基乙醇至终浓度为 2%], 用力混匀, 于 65 °C 中放置 30 min, 每隔 5~10 min 混匀 1 次。然后冷至室温,

收稿 2008-06-30 修定 2008-09-12

资助 中国热带农业科学院(RKy0725)、国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(92007CB108903)、中央级公益性科研院所基本科研项目(CATASITBYYB072)。

* 通讯作者(E-mail: jianchunguo@163.com; Tel: 0898-66890635)。

加入0.25倍体积的无水乙醇和0.11倍体积的5 mol·L⁻¹ KAc溶液(pH 4.8), 旋涡混匀。用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提, 4℃下以17 000×g离心15 min。上清液加8 mol·L⁻¹ LiCl至终浓度为3 mol·L⁻¹ (0.6体积), 加入80 μL β-巯基乙醇至终浓度达到2%。-20℃放置过夜或8 h以上, 4℃下以17 000×g离心30 min。RNA沉淀用4 mL SST缓冲液[0.5% SDS、1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、1 mol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)]溶解, 加入80 μL β-巯基乙醇至终浓度达到2%。混匀后加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 涡旋混匀, 冰浴10 min。4℃下以17 000×g离心15 min。上清液中加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 涡旋混匀, 冰浴10 min。上清液按照以上方法重复沉淀2次。然后上清液加入0.11倍体积的5 mol·L⁻¹ KAc (pH 4.8)和0.25倍体积的无水乙醇, 冰上放置30 min, 4℃下以17 000×g离心20 min, 沉淀多糖。上清液加等体积的异丙醇, -20℃沉淀30 min以上, 然后4℃下以17 000×g离心20 min沉淀RNA。沉淀物用75%乙醇洗涤2次, 真空干燥, 用适量体积的DEPC水溶解RNA, 取少量用于琼脂糖凝胶电泳, 其余置于-70℃冰箱中保存备用。

2.3 Trizol 试剂法 具体步骤按照 Trizol 试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)说明进行, 但在研磨时加入0.2 g PVP。

2.4 SDS 法 参照刘海等(2006)、杜中军等(2005)的 SDS 法进行, 略有改动。

3 RNA 纯度及完整性检测

分别取5 μL提取的样品RNA溶液, 在0.8%非变性琼脂糖凝胶中电泳, GoldViewTM Nucleic Acid Stain 染色, 而后在凝胶成像系统下观察并拍照。取2 μL RNA溶液稀释至200 μL, 用紫外-可见分光光度计测量A₂₃₀、A₂₆₀、A₂₈₀值, 并计算A₂₆₀/A₂₃₀、A₂₆₀/A₂₈₀的比值, 确定其纯度, 再计算得率。

4 RT-PCR 分析

cDNA第一链的合成按反转录酶说明指导书进行。实验所用的目的基因为 *Actin* 基因(GenBank: EU697920), 以P1 (5' CAGTGGTCGTACAACCTGGTAT 3')和P2 (5' ATCCTCCAATCCAGACTGT 3')为引物进行PCR反应。PCR反应条件为: 94℃ 5 min 预变性; 然后94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 45 s, 30个循环; 最后72℃ 10 min。PCR产物在1%非变性琼

脂糖凝胶电泳检测。

实验结果

1 RNA 完整性比较

将提取得到的总RNA经0.8%非变性琼脂糖凝胶检测, 改良CTAB法提取的总RNA有28S、18S、5S三条清晰的带型, 且28S rRNA与18S rRNA之比为2:1, 带与带之间无弥散现象, 说明RNA在提取过程中结构基本完整, 降解很少(图1-2)。而用上述描述的CTAB法和SDS法提取的总RNA带型弥散, 说明多糖、多酚等次生代谢物质还有残留, 不能完全去除。Trizol试剂盒法提取的总RNA的28S条带的亮度低于18S, 说明此方法总RNA的完整性较差(图1)。

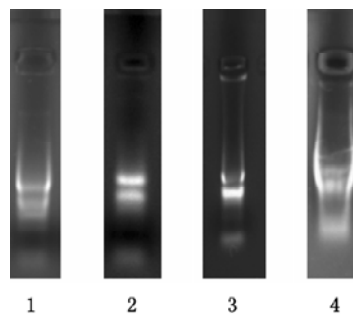


图1 RNA电泳图

1: CTAB法; 2: 改良CTAB法; 3: Trizol法; 4: SDS法。

2 纯度和浓度比较

从4种方法提取的总RNA溶液中分别取2 μL稀释成200 μL, 于Beckman DU-70 Spectrophotometer中分别测量A₂₃₀、A₂₆₀和A₂₈₀值, 结果见表1。从表1可以看到, Trizol法和改良CTAB法所提取的RNA纯度高于SDS法和CTAB法所提取的RNA, A₂₆₀/A₂₈₀都可以达到1.9以上, 而改良CTAB法纯度最高, 说明此方法可以满足分子实验的要求。由于吸光比值A₂₆₀/A₂₈₀的大小直接反映多糖、多酚和蛋白质污染程度(Logemann等1987; Manning 1991)。因此我们认为, 改良CTAB法和Trizol法都可以很好地去除这些杂质。从A₂₆₀/A₂₃₀的比值小于2.0, 表明其中有大量的小分子或盐存在, 表明其他3种方法所得的RNA有待进一步纯化(望飞勇等2007), 从而可以看出改良CTAB法所提的RNA小分子或盐去除较干净。从RNA产量而言, 改良CTAB法较

表1 使用不同方法提取的RNA的纯度与产量

方法	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	产量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)
CTAB 法	0.055	0.079	0.047	1.43	1.67	50.0
改良 CTAB 法	0.210	0.457	0.219	2.08	2.00	56.7
Trizol 法	0.760	0.777	0.398	1.02	1.95	50.0
SDS 法	1.305	0.626	0.359	0.48	1.74	41.7

CTAB 法、Trizol 法和 SDS 法产量都高。所以综合纯度、完整性和产量等方面, 我们认为该改良 CTAB 法提取肉质化盐生植物的 RNA 是比较理想的。

3 RT-PCR 结果

分别取相同 OD (A_{260}) 值的反转录产物为模板进行 PCR 扩增, 这几种方法提取的总 RNA 都可以扩增出一条 600 bp 的条带(图 2), 这与我们预期推测的片段和最后测序所得到的结果相吻合。但是, 从条带的亮度可以说明改良的 CTAB 法提取的总 RNA 反转录活性高, 而其他 3 种方法由于多糖、多酚或者完整性不好等原因影响了 RT-PCR 的结果。同时也说明改良的 CTAB 法提取的总 RNA 的完整性和纯度都达到了我们预期的要求。

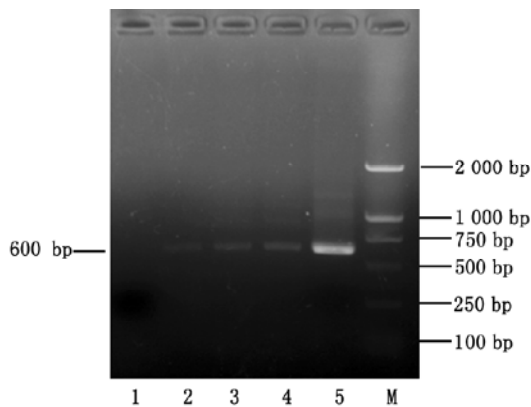


图2 RT-PCR 电泳图

M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 以 SDS 法提取的总 RNA 为模板; 3: 以 Trizol 法提取的总 RNA 为模板; 4: 以 CTAB 法提取的总 RNA 为模板; 5: 以改良 CTAB 法提取的总 RNA 为模板。

讨 论

相对于其他植物来说, 肉质化的盐生植物海马齿植物组织中多糖、多酚等次生产物的含量较多, 为提取完整性好、纯度高的 RNA 带来困难。本实验运用的 SDS 法和 CTAB 法都不能把多糖、多

酚等物质去除干净, 而 Trizol 法完整性较差, 小分子物质较多, DNA 未除干净, 对以后的分子操作将有可能产生影响。所以, 以上这 3 种方法都没有获得达到要求的 RNA。

本实验把原来 CTAB 法提取液中加入 2% 的 PVP, 并在提取液中增加 1% β -巯基乙醇, 保证了酚类物质保持还原态, 然后再将其与 RNA 分开。通过 Li^+ 或 Ca^{2+} 沉淀 RNA 的方法可以将未被氧化的酚类化合物去除。与 PVP、不溶性 PVPP 或 BSA 结合的多酚, 可以直接通过离心去除掉或在苯酚、氯仿抽提时除去(Wang 和 Vodkin 1994)。同时, 在开始进行氯仿抽提时先加入 0.25 倍无水乙醇和 0.11 倍体积的 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KAc 替代原来 CTAB 法中直接用氯仿抽提植物材料匀浆液, 这样, 植物材料匀浆液中的多糖和多酚在无水乙醇和 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KAc 作用下能部分去除。其次, 用 SST 缓冲液溶解 RNA 沉淀替代原 CTAB 法中用异硫氰酸胍溶解 RNA 沉淀, 再进行第二次苯酚、氯仿抽提。然后用 1/10 体积 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积无水乙醇换成等倍体积的异丙醇沉淀 RNA, 取得了较好的结果。

比较几种 RNA 提取方法, 改良 CTAB 法成本较低, 试剂配制简单, 操作简便, RNA 质量高, 是多酚、多糖和次生物质含量高的植物总 RNA 提取比较有效的方法。

参考文献

- 杜中军, 徐兵强, 黄俊生, 王家保, 徐立(2005). 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法. 植物生理学通讯, 41 (2): 202~204
- 方孝东, 吴多桂, 林栖凤, 李冠一(1998). 一种适用于盐生植物的 RNA 提取方法. 海南大学学报自然科学版, 16 (4): 311~313
- 葛晓萍, 石琰璟(2007). 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法. 青岛科技大学学报(自然科学版), 28 (1): 6~8
- 李宏, 王新力(1999). 植物组织 RNA 提取的难点及对策. 生物技术通报, 15 (1): 36~39
- 刘海, 林德球, 徐杰, 蒋跃明(2006). 一种适合于富含多糖和酚类

- 物质的香蕉果实RNA提取方法. 果树学报, 23 (1): 136~137
- 史宝胜, 卓丽环(2006). 紫叶李叶片总RNA提取方法的改进与比较. 分子植物育种, 4 (5): 721~725
- 望飞勇, 何勇, 许本波, 徐锋, 田志宏(2007). 草坪植物RNA提取方法的比较研究. 长江大学学报(自科版)农学卷, 4 (1): 56~60
- 曾会才(2003). 红树林植物海马齿耐盐相关基因克隆[学位论文]. 海口: 华南热带农业大学
- 张志刚, 李枸, 官春云, 白德朗, 武小金(2006). 改良提取水稻胚乳和拟南芥花柱中DNA和RNA的SDS法. 植物生理学通讯, 42 (3): 493~495
- Bekesiova I, Nap JP, Mlynarava L (1999). Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. Plant Mol Biol Rep, 17: 269~277
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem, 163: 16~20
- Manning K (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. Anal Biochem, 195: 45~50
- Wang CS, Vodkin LO (1994). Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. Plant Mol Biol Rep, 12: 132~145