

富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取

曾凡锁¹, 南楠¹, 詹亚光^{2,*}

东北林业大学¹生命科学学院,²林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

Extraction of Total RNA from Mature Leaves Rich in Polysaccharides and Secondary Metabolites of *Betula platyphylla* Suk.

ZENG Fan-Suo¹, NAN Nan¹, ZHAN Ya-Guang^{2,*}

¹College of Life Science, ²Key Laboratory of Forest Tree Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

摘要: 分别采用CTAB法、SDS法、异硫氰酸胍法和缓冲液冰浴-CTAB法从转基因白桦成熟叶中提取总RNA, 并对琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱分析进行比较。结果表明, 缓冲液冰浴-CTAB法提取的总RNA纯度高、完整性好且得率高。应用此法提取的总RNA能够满足RT-PCR和Northern杂交分析要求。

关键词: 白桦; 成熟叶片; RNA提取

从植物组织中提取出纯度高、完整性好的RNA是顺利进行分子生物学研究的关键所在(李宏和王新力1999)。然而许多木本植物如白桦成熟叶中含有大量的多糖、酚类化合物、蛋白质和某些尚无法确定的次级代谢产物, 这些物质的含量远远高于幼嫩叶片, 从而影响了总RNA的提取(杨传平等2002)。其中酚类物质是植物所特有的次生代谢物, 它很容易被氧化成褐色的醌类物质, 醌类物质与RNA的不可逆结合, 不仅会使RNA的活性丧失, 而且在苯酚和氯仿抽提时还会使RNA丢失, 因此富含次生代谢产物的植物RNA提取一直是RNA分析研究中的障碍。而相关报道的植物总RNA提取方法(Wang等2005; Cheng等1993; Verwoerd等1989; Shirzadegan等1991; Ainsworth 1994), 都无法满足富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总RNA的提取。而一部分研究(如对不同发育时期的转基因植物中外源基因转录水平表达的研究)又必须以成熟组织为研究材料。因此, 应用适当的方法在富含多糖和次生代谢产物的成熟组织中提取高质量的总RNA显得至关重要。为了解决这一难题, 本文以富含多糖和次生代谢产物的转基因白桦成熟叶片为材料, 针对木本植物中总RNA提取方法进行了比较、改进和优化。

材料与方法

1 材料

转基因白桦(*Betula platyphylla* Suk.)的成熟叶片放在液氮中速冻后置于-80℃超低温冰箱中贮存待用。

2 总RNA的提取方法

文中采用的CTAB法、SDS法和异硫氰酸胍法分别按照文献(杨传平等2002; 王玉成等2006; 李志能等2007)中方法进行。缓冲液冰浴-CTAB法中的RNA提取缓冲液(1)为100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、1.4 mol·L⁻¹ NaCl; RNA提取缓冲液(2)为2% CTAB、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、1.4 mol·L⁻¹ NaCl。操作过程为: 取0.1~0.5 g叶片置液氮中冷冻, 研磨成粉, 迅速置入盛有1 mL RNA提取缓冲液(1)的离心管中, 颠倒混匀, 置于冰浴中30~40 min, 其间不断混匀, 防止样品结冻凝固于管底; 于4℃下以12 000×g离心1 min, 去上清液, 加入700 μL 65℃预热的RNA提取缓冲液(2)和1/10体积巯基乙醇, 震

收稿 2007-08-03 修定 2007-09-03

资助 国家自然科学基金(30471413)和黑龙省攻关课题(GB06B303-8)。

* 通讯作者(E-mail: youpractise@126.com; Tel: 0451-82191752)。

荡混匀, 于 65°C 下保温 10~15 min, 加入 $700\ \mu\text{L}$ 的氯仿并震荡混匀, 于 4°C 下以 $12\ 000\times g$ 离心 10 min; 将上清液转移至一新的离心管中, 重复抽提 2~4 次, 直到分层交界处看不到白色絮状物为止; 将上清液转移至一新的离心管中, 加入 1/2 倍体积 $6\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇, 轻微颠倒混匀后置于冰浴中 10 min; 于 4°C 下以 $12\ 000\times g$ 离心 10 min 沉淀为 RNA, 上清液弃去, 用 70% 的乙醇洗涤, 置于冰上风干 2 min 后加入适量经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的去离子水溶解沉淀; 取少量用于琼脂糖凝胶电泳, 其余置于 -80°C 冰箱中保存备用。

3 RNA 纯度及完整性检测

分别取 $4\ \mu\text{L}$ 提取的样品 RNA 溶液, 在 0.8% 非变性琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 而后在凝胶成像系统下观察并拍照。取 $2\ \mu\text{L}$ RNA 溶液稀释至 0.5 mL, 用紫外-可见分光光度计测量 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} , 并计算 A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{280} 的比值, 确定其纯度, 再计算得率。RNA 得率($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)= $(A_{260}\times 40\times \text{稀释倍数}\times \text{原液体积})/\text{叶片鲜重}(\text{g})$ 。

4 RT-PCR 分析

用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒, 按其说明书在 PCR 反应管中调制反应液及设置反应条件。反应结束后, 取 5~10 μL 以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 剩余产物置于 4°C 中保存。

5 Northern 杂交分析

Northern 杂交操作参照萨姆布鲁克和拉塞尔(2002)书中方法并稍加修改。

实验结果

1 RNA 样品质量检测

提取的 RNA 以 0.8% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 1 所示, 用 CTAB 法、SDS 法以及异硫氰酸胍法提取的总 RNA, 其 28S 和 18S 条带不明显, 且点样孔中杂质较多, 条带有明显的拖尾且沉淀不易溶解, 用 SDS 法提取的样品还存在着较严重的褐化, 说明这几种方法不能有效去除多糖和多酚等次生代谢产物。而用缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA, 其 28S 和 18S 两条带带型清楚, 28S rRNA 带的亮度明显高于 18S rRNA 带, 2 条带之间无弥散和拖尾, 点样孔中无杂质

(图 1), 说明缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA 比较完整, 可去除多糖和多酚等次生代谢产物和防止 RNase 的污染。

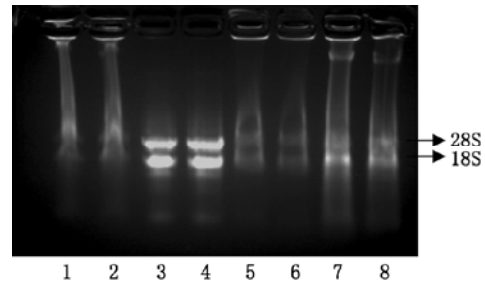


图 1 4 种不同方法提取转基因白桦成熟叶中总 RNA 电泳图谱比较

1、2: 异硫氰酸胍法; 3、4: 缓冲液冰浴-CTAB 法; 5、6: SDS 法; 7、8: CTAB 法。

2 RNA 样品纯度和得率

取 $2\ \mu\text{L}$ RNA 样品用 DEPC 水稀释到 $500\ \mu\text{L}$ 后, 用紫外分光光度法检测 RNA 浓度及纯度, 测得 RNA 的紫外光吸收值, 每个波长重复测定 3 次取平均值。用缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA, 其 A_{260}/A_{280} 值为 2.090, 说明 RNA 纯度较高, 几乎无蛋白质污染; A_{260}/A_{230} 值为 2.230, 大于 2, 说明缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA 几乎没有多糖和酚类的污染。而用 CTAB 法、SDS 法以及异硫氰酸胍法提取的总 RNA, 其 A_{260}/A_{280} 分别为 1.284、0.862、1.200; A_{260}/A_{230} 值分别为 1.325、0.356、1.046, 均远小于 2.0, 说明蛋白质、多糖和酚类等代谢产物污染严重。缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA 得率是每克叶片能够分离到大约 $134.0\ \mu\text{g}$ 的总 RNA (表 1), 是其他方法的 1.5~1.6 倍。说明采用此法提取的 RNA 产量也较高, 而其他 3 种方法不但杂质多、RNA 纯度低, 而且得率也相对较低, 效果很不理想。

3 RT-PCR 分析

以缓冲液冰浴-CTAB 法提取的总 RNA 为模板, 用转基因白桦外源基因 *bt* 的上下游引物进行 RT-PCR 扩增, 能扩增出预期长度为 675 bp 的片段。电泳结果表明可成功地扩增出目的基因产物 (图 2), 说明用此法提取的总 RNA 质量较好, 可用于 RT-PCR 分析。

表1 RNA样品的纯度和得率

提取方法	A_{230}	A_{260}	A_{280}	吸光度比值		RNA得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
				A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
CTAB法	0.026	0.042	0.026	1.284	1.325	84.8
SDS法	0.088	0.045	0.036	0.862	0.356	89.6
异硫氰酸胍法	0.031	0.040	0.027	1.200	1.046	81.6
缓冲液冰浴-CTAB法	0.030	0.067	0.032	2.090	2.230	134.0

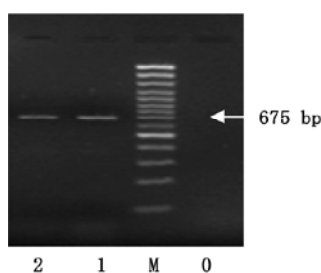


图2 RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

0: 空白对照; M: DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 以缓冲液冰浴-CTAB法提取的总RNA为模板的RT-PCR产物。

4 Northern 杂交分析

应用Northern杂交分析外源基因的转录表达对总RNA的质量要求相对较高。因此,通过Northern杂交也可进一步检验缓冲液冰浴-CTAB法能否提取出高质量的总RNA。提取6个转基因白桦无性系的成熟叶中的总RNA,以*gus*报告基因为探针进行杂交的结果(图3)显示,杂交条带清晰完整,进一步说明缓冲液冰浴-CTAB法提取的总RNA质量较高,可以满足进一步研究的需要。

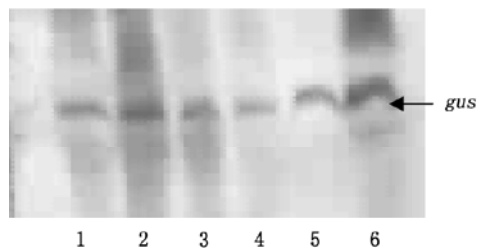


图3 Northern杂交图谱

1~6: 6个不同的转基因白桦无性系。

讨 论

要获得完整性好的RNA,植物细胞破胞必须完全、迅速。细胞破碎不完全,不仅使RNA产

量降低,而且还会因为植物细胞内部结构的破坏而产生内源性降解;时间过长则已释放的RNA酶还有可能会产生活性而降解RNA。因此这是能否获得高质量RNA的最为关键性的一步(王玉成2002)。

其次则应考虑如何去除多糖。近年来,有关去除植物组织多糖和酚类物质的相关报道已很多,但不同植物或同一植物的不同品种,往往由于种属的差异,植物组织内的多糖或多酚的组分和含量有很大不同(刘海等2006)。所以需要采用不同的RNA提取方法。Cheng等(1993)最早用CTAB提取富含多酚等物质的松柏类植物中的RNA。但CTAB法通常要结合其他操作才能有效去除多糖,常见的方法有低浓度乙醇沉淀法(Lewinsohn等1994; Fang等1992)、醋酸钾沉淀法(Bahloul和Murkard 1993)、氯化锂沉淀法、提高缓冲液的氯化钠浓度(Cheng等1993)等。其中用氯化锂沉淀RNA是RNA提取中的常用方法,此法制备的RNA具有纯度高和无多糖等生物大分子共沉淀等优点(Salzman等1999)。但由于白桦成熟叶片中多糖等次生代谢产物含量远远高于一般植物,采用上述方法均不能获得理想的效果,主要是RNA沉淀中仍有大量的多糖等次生代谢物无法去除,过多的多糖所形成的粘稠胶状物会使后续操作无法进行。因此,必须先去除细胞质中大部分多糖等次生代谢物杂质,而后再提取总RNA。本文将研磨好的材料加入到不含CTAB的提取缓冲液中冰浴0.5 h后的结果表明,用此法去除多糖等次生代谢产物的效果较好。从缓冲液冰浴-CTAB法提取的RNA的纯度、RT-PCR检测和Northern杂交的结果中不难看出,此法可有效去除多糖等次生代谢物杂质的干扰。另外,酚类物质极易导致褐化,因此,抑制褐化现象的发生也是提取植物中RNA的

重要一环。一般用 SDS 方法提取时, 常出现极为严重的褐化现象, 而采用缓冲液冰浴-CTAB 法则没有发生此种现象, 可见, 此法也可以有效地抑制褐化效应。

缓冲液冰浴-CTAB法不但可以去除大部分多糖等次生代谢产物杂质, 而且其他杂质也可减少, 因此保证了 RNA 的纯度。总之, 本文方法操作简单, 耗时少, 一般在 2 h 左右就可完成全部操作, 这相对于常用的 RNA 提取方法需 1~2 d 的时间来说, 缩短了很多。

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
- 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
- 李志能, 黄文俊, 张佳琪, 张俊卫, 包满珠, 刘国锋(2007). 异硫氰酸胍法快速提取二球悬铃木组织总 RNA 的研究. 武汉植物学研究, 25 (3): 266~269
- 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
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2002). 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理. 东北林业大学学报, 30 (2): 1~4
- 王玉成, 张国栋, 姜静(2006). 一种适用范围广泛的总 RNA 提取方法. 植物研究, 26 (1): 84~87
- 杨传平, 姜静, 那冬辰, 魏志刚(2002). 白桦花芽 RNA 的快速提取. 东北林业大学学报, 30 (3): 1~4
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW (2002). 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 532~549
- Ainsworth C (1994). Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). Plant Mol Biol Rep, 12 (3): 198~203
- Bahloul M, Burkard G (1993). An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues. Plant Mol Biol Rep, 11 (3): 212~215
- Cheng SJ, Puryear J, Cairney J (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol Biol Rep, 11 (2): 113~116
- Fang G, Hammar S, Grumet R (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques, 13: 52~56
- Lewinsohn E, Steele CL, Croteau R (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. Plant Mol Rep, 12: 20~25
- Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds of carbohydrates. Plant Mol Biol Rep, 17: 11~17
- Shirzadegan M, Christie P, Seeman JR (1991). An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. Nucleic Acids Res, 19 (21): 6055
- Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A (1989). A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res, 17 (6): 2362
- Wang T, Zhang N, Du L (2005). Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. Biotechnol Lett, 27: 629~633