

技术与方法 Techniques and Methods

两种适用于葡萄不同组织RNA提取方法的比较

初雪鹏, 佟少明, 侯和胜*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省植物生物工程重点实验室, 辽宁大连116082

摘要: 以不同葡萄组织为材料对目前常用的2种总RNA提取方法——改良SDS法和CTAB-LiCl法进行研究。2种RNA提取方法中均不使用酚。采用这两种方法从葡萄不同组织中均成功地提取到RNA, 琼脂糖凝胶电泳结果显示28S和18S rRNA条带完整清晰。检测 A_{260}/A_{280} 值分布在1.7~2.0之间, A_{260}/A_{230} 值分布于1.9~2.3之间, 说明RNA质量较高。管家基因*Actin*和*ACS5*基因的检测表明2种方法所得RNA能够满足RT-PCR和基因克隆等研究需要。改良SDS法的RNA得率是CTAB-LiCl法的RNA得率的2~3倍, 而CTAB-LiCl法获得的RNA纯度高。可以根据原料的数量和对RNA质量的要求来选取最佳提取方法。

关键词: 葡萄; 改良SDS法; CTAB-LiCl法; RNA提取

Comparison of Two Methods for RNA Extraction from Different Tissues of Grape (*Vitis vinifera* L.)

CHU Xue-Peng, TONG Shao-Ming, HOU He-Sheng*

Liaoning Key Laboratory of Plant Biotechnology, College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116082, China

Abstract: Two total RNA extraction methods commonly used at present, modified SDS and CTAB-LiCl methods, were studied with different grape tissues. Phenol wasn't used in the two methods. Higher quality total RNAs from different grape tissues were obtained with both of two methods. Agrose gel electrophoresis showed that 28S and 18S bands were clear and bright. The ratio of A_{260}/A_{280} was from 1.7 to 2.0 while that of A_{260}/A_{230} was from 1.9 to 2.3 which demonstrated the high quality of the isolated RNAs. The results of amplification of *Actin*, a housekeeping gene in plant, and *ACS5* gene showed that the RNAs obtained could meet the requirements of RT-PCR and gene cloning. The yield of RNA obtained by modified SDS method was 2–3 times that by CTAB-LiCl method. The total RNA isolated by the CTAB-LiCl method was highly integrate and pure. A preferable method could be selected according to the material quantity and the requirements of the RNA quality.

Key words: grape (*Vitis vinifera*); modified SDS method; CTAB-LiCl method; RNA extraction

葡萄是世界性的重要经济作物, 因易受到病虫害(刘永清和王国平2002)、机械伤害、生理失调和果实自身成熟等因素的影响(Bleecker和Kende 2000), 导致其经济效益损失。随着葡萄基因组全序列的测序完成, 葡萄生长发育以及其对逆境胁迫的抵抗机制成为葡萄分子生物学研究的重要内容。破译基因表达、信号转导、基因调控和转录组分析的机制需要整体范围的技术, 如Northern杂交、RT-PCR等。获得纯的且完整的RNA是开展这些研究的关键基本环节之一。

由于不同植物组织的结构与所含成分的差异, 其RNA最适用的提取方法不尽相同(Ainsworth 1994)。多年生木本植物葡萄组织中含有大量的多酚、多糖类物质、蛋白质和次级代谢产物等代谢

物质, 是影响提取高质量RNA的关键因素(Wang等1994; Schneiderbauer等1991; Logemann等1987)。常规的RNA提取方法(如胍法、苯酚法和十六烷基三甲基溴化胺法等)以及Trizol法、RNeasy mini kit均无法从葡萄材料中提取到高质量的RNA样品(Chomczynski和Sacchi 1987; 李红熙等2012; 张彦莘等2010; 张今今等2003), 他们的结果分为3种情况: 提出的RNA已被降解、RNA的得率很低和得到的RNA不能进行体外翻译(李宏和王新力1999)。本文主要用2种方法对葡萄各组织包括叶

收稿 2013-11-26 修定 2014-02-25

资助 国家自然科学基金(30671439)和教育部博士点基金(2009-2136110001)。

* 通讯作者(E-mail: hesheng_hou@126.com; Tel: 0411-82159112)。

片、卷须、茎尖、果实、花序、根和芽组织进行总RNA提取,并对获得的RNA进行纯度、得率和基因扩增的比较,以选出适合葡萄各组织器官RNA提取的最佳方法,为葡萄分子生物学研究的开展提供基本技术支持。

材料与amp;方法

1 材料

供试材料为葡萄(*Vitis vinifera* L.)的叶片、卷须、茎尖、果实、花序、根以及芽,均取自大连市辽宁师范大学西山校区葡萄种植区。

2 RNA提取方法

试验所需的溶液和离心管等耗材经0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理24 h,灭菌烘干后使用;研钵和药匙等工具经180 °C烘烤3 h,防止RNA酶污染。每种组织均用以下3种方法提取总RNA,并重复3次。

2.1 改良SDS法

取0.2 g组织材料,液氮研磨成粉末状,转入1.5 mL离心管中,迅速加入1 mL SDS提取液[3% (W/V) SDS、50 mmol·L⁻¹ EDTA、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、2% (W/V) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、100 mmol·L⁻¹ LiCl]和20 μL巯基乙醇,剧烈震荡混匀后冰浴5 min;在转速14 000×g、4 °C下离心10 min,上清加入1/3体积的5 mol·L⁻¹ KAc,混匀冰浴5 min;在转速14 000×g、4 °C下离心10 min;取上清,加入1/5体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀后冰浴5 min,在转速14 000×g、4 °C下离心15 min;取上清,重复上一步;取上清,加入预冷的3/5体积异丙醇,混匀后-20 °C沉淀0.5 h;在转速14 000×g、4 °C下离心10 min;弃上清,加入1 mL的75%乙醇洗涤沉淀;在转速14 000×g、4 °C下离心5 min,弃上清,干燥后用20 μL DEPC水溶解沉淀。

2.2 CTAB-LiCl法

取0.2 g组织材料,液氮中研磨成粉状;转入到2 mL离心管,加入1 mL 65 °C预热的CTAB提取液[2% (W/V) CTAB、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、2 mol·L⁻¹ NaCl、2% (W/V) PVP]和20 μL巯基乙醇,震荡混匀,65 °C水浴15 min,间隔震荡;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),剧烈震荡后在转速14 000×g、4 °C下离心20 min,取上清;再加入等体积氯仿:异戊醇

(24:1)重复上一步;上清液中加入1/4体积10 mol·L⁻¹的LiCl,4 °C放置过夜;在转速14 000×g、4 °C下离心20 min,弃上清,沉淀用500 μL SSET提取液[0.5% SDS、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、1 mol·L⁻¹ NaCl]溶解,加入等体积氯仿抽提;在转速14 000×g、4 °C下离心10 min,取上清;上清加入等体积氯仿抽提上清,加入2倍体积的无水乙醇,-80 °C放置0.5 h;在转速14 000×g、4 °C下离心20 min,弃上清;75%乙醇洗沉淀,14 000×g、4 °C下离心5 min,弃上清,室温干燥后加入20 μL DEPC水溶解沉淀。

2.3 Trizol法

使用TransGen公司的Transzol plant试剂盒,提取步骤参照试剂盒使用说明。

3 总RNA检测及PCR检测

用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测提取总RNA的纯度与完整性。利用紫外分光光度计测定RNA样品A₂₆₀/A₂₈₀值和A₂₆₀/A₂₃₀值。计算样品总RNA得率(μg·g⁻¹)。为进一步确定所提取RNA的完整性,将获得的总RNA经过纯化后进行反转录,反转录反应参照M-MLV反转录酶(Invitrogen公司)使用说明进行。分别对反转录后的cDNA的管家基因*Actin* (GenBank登录号XM_002282480)和*ACS5*基因 (GenBank登录号XM_002278453,1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶家族基因之一,ACS是乙烯合成过程中关键的限速酶)设计引物进行PCR扩增。引物分别为,*Actin*-F: 5' TGG AAGGTGCTGAGGGATGC 3'和*Actin*-R: 5' GCACTTGCTCCCAGCAGCAT 3';*ACS5*-F: 5' ATGGGGTACATGAGTAATCAACC 3'和*ACS5*-R: 5' TCAAGTCCTTGCTCGGAC 3'。反应体系参照翟建胜(2012)方法。预期管家基因*Actin*的PR-PCR扩增产物的大小为104 bp,*ACS5*基因的引物设计跨3个内含子,PCR扩增产物的大小为1 446 bp。

实验结果

1 总RNA的凝胶电泳检测

电泳结果显示改良SDS法和CTAB-LiCl法提取的28S和18S rRNA条带清晰,说明两种方法都能从葡萄的7个组织中提取到总RNA。其中改良SDS法提取结果(图1)中伴有DNA污染,28S和18S rRNA条带亮度接近,说明RNA有一定程度的降

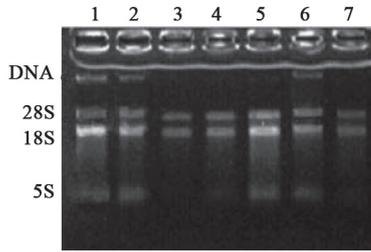


图1 改良SDS法提取葡萄各组织总RNA的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of grape total RNA from different tissues with modified SDS method

1: 叶片; 2: 芽; 3: 根; 4: 茎尖; 5: 花序; 6: 卷须; 7: 果实。

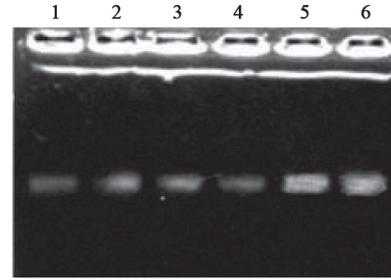


图3 Trizol法提取葡萄各组织总RNA的电泳结果

Fig.3 Electrophoresis result of grape total RNA from different tissues with Trizol method

1: 茎尖; 2: 卷须; 3: 根; 4: 果实; 5: 叶片; 6: 芽。

解。CTAB-LiCl法提取结果(图2)中的28S rRNA的条带亮度约是18S rRNA条带的2倍, 说明RNA质量较好几乎没有降解。用Trizol法从葡萄不同组织中未提取到RNA (图3), 说明该法不适合葡萄组织中RNA的提取。

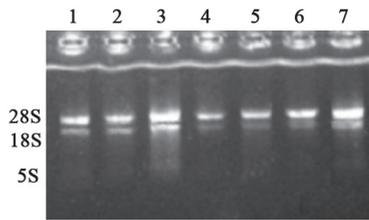


图2 CTAB-LiCl法提取葡萄各组织总RNA的电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of grape total RNA from different tissues with CTAB-LiCl method

1: 茎尖; 2: 卷须; 3: 叶片; 4: 果实; 5: 根; 6: 芽; 7: 花序。

2 总RNA的纯度和得率

通过改良SDS法从不同组织中提取RNA的 A_{260}/A_{280} 值均为1.7~1.9, 表明得到的RNA较纯, A_{260}/A_{230} 值均为1.9~2.1, 说明部分样品有酚类和多糖等的污染(表1)。用此方法提到的总RNA得率在32~201 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中果实的总RNA量最低, 得率为32.62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右。叶片和花序的总RNA得率最高, 得率范围在183~201 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表1)。

通过CTAB-LiCl法提取RNA的 A_{260}/A_{280} 值均为1.8~2.0, 表明所得到的RNA很纯, A_{260}/A_{280} 值均为2.0~2.3, 说明几乎没有酚类和多糖等的污染。其中, 果实的总RNA量最低, 得率为16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右; 叶片和花序的总RNA量较高, 得率范围在74~107 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表1)。改良SDS法提取的总RNA得率是CTAB-LiCl法提取总RNA得率的2~3倍。

表1 两种方法提取葡萄各组织总RNA的紫外吸收和得率

Table 1 Absorbance ratios and yield of total RNA isolated from different tissues of grape with three replica by using two methods

葡萄组织	方法	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
叶片	改良SDS法	1.78±0.06	2.05±0.05	201.38±7.70
	CTAB-LiCl法	1.87±0.08	2.24±0.08	107.43±5.20
卷须	改良SDS法	1.75±0.05	1.90±0.07	121.35±3.46
	CTAB-LiCl法	1.91±0.05	2.03±0.10	43.60±4.13
茎尖	改良SDS法	1.80±0.08	1.95±0.06	84.81±4.13
	CTAB-LiCl法	1.85±0.07	2.14±0.12	39.22±6.26
果实	改良SDS法	1.83±0.07	1.94±0.08	32.62±3.53
	CTAB-LiCl法	1.83±0.06	2.09±0.09	16.75±4.28
芽	改良SDS法	1.81±0.06	1.95±0.07	152.05±8.19
	CTAB-LiCl法	1.84±0.05	2.03±0.15	44.68±4.05
根	改良SDS法	1.81±0.06	1.99±0.06	79.51±5.33
	CTAB-LiCl法	1.83±0.04	2.01±0.08	40.30±4.15
花序	改良SDS法	1.79±0.05	2.02±0.09	183.37±4.73
	CTAB-LiCl法	1.80±0.04	2.15±0.04	74.96±5.78

3 PCR检测结果分析

通过对改良SDS法和CTAB-LiCl方法提取的葡萄各组织RNA进行纯化并反转录得到cDNA, 并以cDNA为模板扩增葡萄*Actin*基因和*ACS5*基因, 依据cDNA质量对相应RNA样品的完整性进行鉴定, 即

通过PCR扩增的产物质量作为评价总RNA完整性的依据。从葡萄*Actin*基因和*ACS5*基因的特异性PCR扩增产物的电泳结果(图4和5)可知, 两种方法从葡萄果实、花序、叶片、茎尖、卷须、芽和根中所提取的总RNA样品质量能够满足下游相关研究的要求。

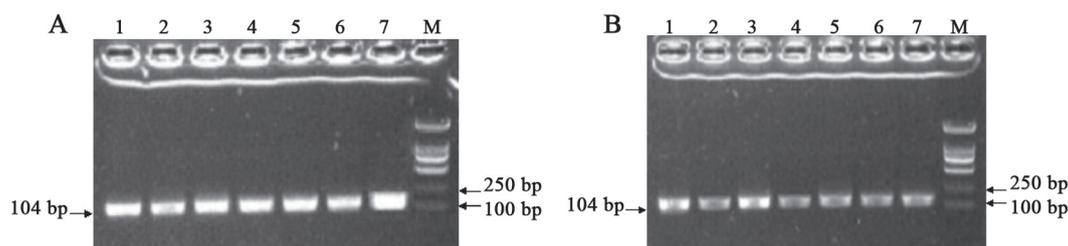


图4 两种方法提取葡萄不同组织RNA中管家基因*Actin* RT-PCR扩增的电泳结果

Fig.4 Electrophoresis result of housekeeping gene *Actin* RT-PCR amplified with the total RNA extracted from different tissues of grape with two methods

A: 改良SDS法; B: CTAB-LiCl法。M: DL2000 marker; 1: 茎尖; 2: 卷须; 3: 叶片; 4: 果实; 5: 根; 6: 芽; 7: 花序。下图同此。

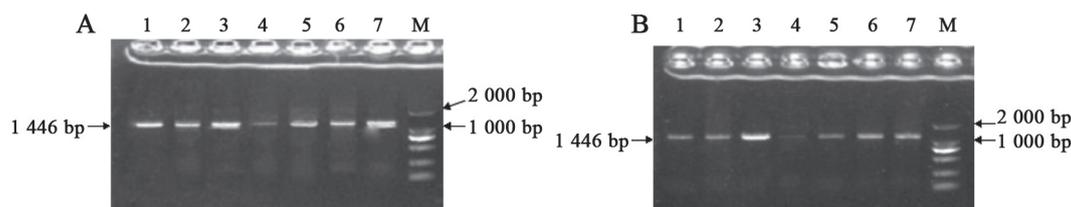


图5 两种方法提取葡萄不同组织RNA中*ACS5*基因PCR扩增的电泳结果

Fig.5 Electrophoresis result of *ACS5* gene PCR amplified with the total RNA extracted from different tissues of grape with two methods

讨 论

由于葡萄是多年生木本植物, 其细胞组成成分含有更多的酚类和多糖物质(张今今等2003), 而不同组织的细胞组成成分也有差别, 如葡萄的叶片中酚类和多糖类的含量比根中的高, 果实中的水分含量比其他组织中的高(张彦莘等2010)。为确保获得高质量的RNA以满足相关研究的要求, 有必要针对葡萄的不同器官或组织筛选出更理想的RNA提取方法(王玉成等2002)。酚类化合物被氧化后会与RNA不可逆地结合, 导致RNA活性丧失及在用苯酚、氯仿抽提时RNA的丢失(Schneiderbauer等1991), 或形成不溶性复合物(Graham 1993); 而多糖会形成难溶的胶状物, 与RNA共沉淀下来(Lewinsohn等1994); 萜类化合物和RNase会分别造成RNA的化学降解(Graham 1993)和酶解。

为了提取到高质量的葡萄RNA, 就要解决蛋白质、多酚多糖的干扰。

本文中的两种方法均使用了2% (W/V) 巯基乙醇和2% (W/V) PVP两种试剂相结合的方法来抑制酚类物质的氧化作用并将其有效的去除(Zhang等2013)。在两种方法中都舍弃了有毒性的酚的使用(李晓颖等2009), 用氯仿和异戊醇替代, 通过缓冲液的pH和变性剂来变性蛋白质并抑制RNA酶的活性(王玉成等2002), 结果证明效果很理想(房经贵等2003)。改良SDS法中的高浓度KAc能够沉淀多糖并提供偏酸性的环境, 这时RNA稳定, 而DNA则容易变性沉淀下来, 利用后续的抽提即可将其除去, 但仍会有少量基因组DNA残留, 但利用DNaseI可有效去除DNA污染。为了减少DNA污染, 也可以用氯仿和异戊醇多抽提几次, 吸上清时不要吸到

中间层。 A_{260}/A_{230} 的低比率说明提取的RNA中有酚类与多糖类物质的污染。但是该方法耗时短, 5~6 h 即可完成总RNA提取, 且RNA得率高。CTAB-LiCl法中的LiCl有选择地沉淀RNA可以更好地将RNA与DNA分离并将大多数多糖留在溶液中(Ainsworth 1994)。虽然耗时比Gambino等的方法长(24~26 h), 操作中的损耗导致RNA得率低, 但比以往的CTAB法的得率高(Gambino等2008)。可适当加长LiCl的沉淀时间有利于更好地沉淀RNA, 减少DNA污染。 A_{260}/A_{280} 的高比率说明提取的RNA没有DNA和蛋白质的污染。 A_{260}/A_{230} 的高比率说明所得RNA中也几乎没有酚类与多糖的污染。本文中的两种提取方法能够满足下游研究的需要, 这在作者研究室进行的葡萄ACS家族基因的实时定量PCR的实验中得到了证明。CTAB-LiCl法提取的RNA也被成功的用于下游的Northern blot等技术(Ophir等2009)。Trizol试剂中含有蛋白质变性剂胍盐。胍盐无法有效将RNA与非蛋白质物质分离, 从而在分离过程中大部分的RNA流失(Ghansal等2009)。也有可能是胍盐的存在使得RNA更难与非蛋白质物质分离。由于葡萄组织中含有大量的多酚、多糖类物质和次级代谢产物等代谢物质, Trizol法无法提取其中的RNA。由于葡萄果实中水分较大导致同质量提取所得RNA量远小于其他组织, 张彦莘等(2010)参考了李志强等(2008)果实提取方法用山梨醇除去果实中的部分水分, 有效地提高了RNA得率。

我们可根据原料的量和对RNA的质量要求选取最佳提取方法。当原料充足且对RNA质量要求高时可选取CTAB-LiCl法, 如实时定量PCR; 当原料不足且对RNA质量要求低时可选取改良SDS法, 如基因克隆。本实验通过用两种方法对葡萄各个组织的RNA提取均得到比较完整的RNA, 为葡萄的抗逆基因或防卫基因的表达及其抗逆机制的分子生物学研究提供了技术支持, 也为其它植物材料总RNA的提取提供参考。

参考文献

- 房经贵, 高志红, 陶建敏(2003). 一种提取葡萄芽中总RNA的方法. 生物技术, 13 (2): 24~25
- 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, (1): 36~39
- 李红熙, 徐美隆, 杨智(2012). 一种适合葡萄多种组织的总RNA提取方法. 中国农学通报, 28 (7): 155~159
- 李晓颖, 曹雪, 房经贵, 章镇(2009). 杏叶片与果实总RNA提取方法研究. 中国农学通报, 25 (24): 157~162
- 李志强, 李莹, 陶建敏(2008). 几种果实不同组织总RNA提取及质量分析. 果树学报, 25 (5): 764~768
- 刘永清, 王国平(2002). 葡萄病毒病研究进展. 中国果树, (4): 47~51
- 王玉成, 杨传平, 姜静(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
- 徐秋红, 高志红, 乔玉山, 渠慎春, 章镇(2009). 山梨醇对李果肉组织总RNA提取的影响. 第二届全国果树分子生物学学术研讨会论文集, 103~107
- 翟建胜(2012). 葡萄ACS家族基因的克隆及表达分析[学位论文]. 大连: 辽宁师范大学, 26
- 张今今, 王跃进, 王西平, 杨克强, 杨进孝(2003). 葡萄总RNA提取方法的研究. 果树学报, 20 (3): 178~181
- 张彦莘, 王晨, 于华平, 蔡斌华, 房经贵(2010). 适于葡萄不同组织RNA提取方法的筛选. 西北农业学报, 19 (11): 135~140
- Ainsworth C (1994). Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorel). Plant Mol Biol Rept, 12: 198~203
- Bleecker AB, Kende H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev Biol, 16: 1~18
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162: 156~159
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochem Anal, 19: 520~525
- Ghansal R, Raghuvanshi S, Sharma PC (2009). Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn rich in secondary metabolites. Plant Physiol Biochem, 47:113~115
- Graham GC (1993). A method for extraction of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers. Plant Mol Biol Rept, 11: 32~37
- Lewinsohn E, Steele CL, Croteau R (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. Plant Mol Biol Rept, 12: 20~25
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem, 163: 16~20
- Ophir R, Pang X, Halaly T, Venkateswari J, Lavee S, Galbraith D, Or E (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia ethylene-ABA interplay and cell enlargement. Plant Mol Biol, 71: 403~423
- Schneiderbauer A, Sandermann H Jr, Ernst D (1991). Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. Anal Biochem, 197: 91~95
- Wang CS, Vodkin LO (1994). Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. Plant Mol Biol Rept, 12: 132~145
- Zhang YJ, Hao XY, Liang ZS, Ke WD, Guo HB (2013). Efficient isolation of high-quality RNA from lotus *Nelumbo nucifera* spp *nucifera* tissues. Gene Mole Res, 12: 223~229