

大蒜不同组织总 RNA 提取与质量分析

张爱民, 张素勤, 耿广东, 盛中飞, 刘利青

(贵州大学 农学院 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以大蒜幼叶、蒜薹和鳞茎为试验材料, 采用 3 种方法提取大蒜总 RNA。通过 1.2% 非变性甲醛凝胶电泳和紫外分光光度计检测提取 RNA 质量。结果表明: 3 种方法能够从 3 个不同的组织中提取完整性较高的总 RNA, 但从蒜薹和鳞茎中提取的总 RNA 的纯度不高, 可能是因为这 2 种组织中含有大量多糖或其它代谢产物。从叶片中提取的总 RNA 质量较好, 产率较高, 提取大蒜叶片总 RNA 的效果最好。

关键词: 大蒜; 幼叶; 蒜薹; 鳞茎; RNA 提取

中图分类号: S 633.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0108-02

从植物组织中提取 RNA 是进行分子生物学研究的必要前提, 在进行 Northern 杂交分析、mRNA 纯化以用于体外翻译或建立 cDNA 文库、RT-PCR 及差示分析等分子生物学研究时, 都需要高质量的 RNA。目前, 有关植物组织 RNA 的提取方法很多, 最常用的有胍法、苯酚法、CTAB 法、Trizol 法等, 这些方法已在许多植物组织中应用并成功提取 RNA。但是, 有些植物组织所含的物质种类极为复杂, 如多糖、酚等物质的存在常常会影响提取 RNA 的产量和纯度, 针对不同的研究对象发展了一系列相对有效的提取方法^[1]。目前, 国内还未见到有关大蒜总 RNA 提取方面的文献报道。

现以大蒜幼叶、蒜薹和鳞茎为试材, 采用不同方法提取大蒜总 RNA, 通过紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的质量、浓度和完整性, 以期探索一种快捷高效的提取高质量大蒜 RNA 的方法, 为开展大蒜后续分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为贵阳紫皮大蒜的幼嫩叶片、蒜薹和鳞茎, 取自贵州大学农学院蔬菜实验基地。RNAiso Reagent 购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 其它化学试剂均购自国药集团化

学试剂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 预处理 试验所用的研钵、塑料制品及玻璃制品均用 0.1% DEPC 水浸泡过夜, 并经过高温高压灭菌处理, 以确保无 RNase 污染。

1.2.2 大蒜总 RNA 提取方法 RNA 提取采用 RNAiso Reagent 法(方法 1)^[2]、王艳红法(方法 2)^[3]和 TRIzol[®] Regent 一步提取法(方法 3), TRIzol[®] Regent 一步提取法参照试剂盒使用说明书进行。试验重复 3 次。提取的 RNA 在 -70℃ 冰箱中保存备用。

1.2.3 提取总 RNA 质量的检测 取 30 μL RNA 溶液于 4 mL 的离心管中, 加入 0.1% 的 DEPC 水 2 970 μL。在紫外分光光度计上分别测定 230、260、280 nm 处的吸光度。

1.2.4 提取总 RNA 完整性的检测 取 10 μL RNA 溶液加 2 μL 上样缓冲液, 在 1.2% 的非变性甲醛凝胶上电泳, 电压为 80 V, 电泳时间为 30~40 min。然后用紫外凝胶成像系统观察照相。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取大蒜总 RNA 的纯度和浓度

通过紫外分光光度计检测 3 种方法提取的大蒜总 RNA 的纯度和浓度可以看出(表 1), 以蒜薹和鳞茎为试验材料, 3 种方法提取的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值在 1.01~1.85 之间, 说明有多糖或其它物质污染; 而从幼叶中提取的总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 都大于 2, 说明无多糖或其它杂质污染; 采用 3 种方法从 3 种材料中提取的总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.84~1.93 之间, 说明无蛋白质或 DNA 的污染。由此可见, 3 种方法从幼叶中提取的大蒜总 RNA 质量较高, 而从蒜薹或鳞茎中提取的总 RNA 中多糖或其它杂质污染严重。第 1 种方法无论是对幼叶、蒜薹还是鳞茎, 提取的总 RNA 的浓度均高于其它 2 种方法, 分别为 0.684、1.088、1.264 μg/μL。

第一作者简介: 张爱民(1984), 女, 山东临清人, 在读硕士, 现主要从事植物学方面研究工作。E-mail: zhangaimin99@126.com。

通讯作者: 耿广东(1975), 男, 山东东阿人, 博士, 副教授, 现主要从事蔬菜栽培生理与生物技术方面的研究工作。E-mail: gengguangdong@sohu.com。

基金项目: 205(科技部、财政部“富民强县”专项行动计划)资助项目; 国家科技支撑计划资助项目(2008BADB5B03)。

收稿日期: 2009-06-20

表 1 3 种方法提取大蒜 3 种组织总 RNA 纯度和浓度

| RNA 质量 | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3 | C1 | C2 | C3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD ₂₃₀ | 0.214 | 0.190 | 0.237 | 0.283 | 0.154 | 0.256 | 0.074 | 0.043 | 0.052 |
| OD ₂₆₀ | 0.272 | 0.211 | 0.241 | 0.316 | 0.285 | 0.259 | 0.171 | 0.100 | 0.128 |
| OD ₂₈₀ | 0.146 | 0.112 | 0.126 | 0.172 | 0.154 | 0.134 | 0.092 | 0.053 | 0.069 |
| OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ | 1.27 | 1.11 | 1.02 | 1.12 | 1.85 | 1.01 | 2.31 | 2.33 | 2.46 |
| OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | 1.86 | 1.88 | 1.91 | 1.84 | 1.85 | 1.93 | 1.86 | 1.89 | 1.86 |
| RNA 浓度 μg·μL ⁻¹ | 1.088 | 0.844 | 0.964 | 1.264 | 1.140 | 1.036 | 0.684 | 0.400 | 0.512 |

注 A: 蒜薹 B: 鳞茎; C: 幼叶; 1: 方法 1; 2: 方法 2; 3: 方法 3。以下同。

2.2 3 种方法提取大蒜总 RNA 完整性的检测

由图 1 可以看出, 3 种方法提取的大蒜幼叶、蒜薹和鳞茎总 RNA 的 28 S 和 18 S 条带均清晰可见 而且条带明亮, 28 S 条带的亮度约是 18 S 条带的 2 倍, 说明提取的 RNA 均无降解, 完整性好, 而且无 DNA 污染。

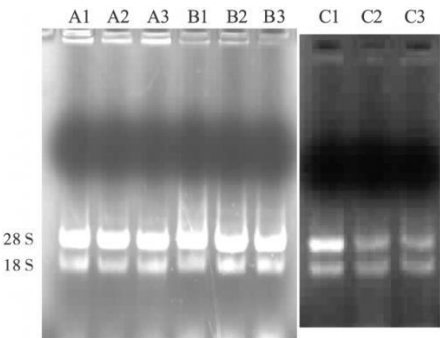


图 1 大蒜总 RNA 的琼脂糖电泳结果

3 讨论

由于植物组织特别是高等植物组织细胞内外组成成分的复杂多样性, 使得植物组织 RNA 的提取相对于其它生物材料来说困难得多, 实践中经常会发现, 即使同一种植物的不同组织其 RNA 提取方法会有很大不同^[4]。一般认为某些植物组织中富含多糖、或酚类化合物、或含有某些尚未确定的次生代谢物质、或 RNase 活性较高, 在完整的细胞内这些物质在空间上与 RNA 是隔离的, 但当组织被研磨时, 细胞破碎后, 这些物质就会与 RNA 相互作用^[5]; 多糖形成难溶的胶状物, 与 RNA 共沉淀下来^[6]; 而酚类化合物极易被氧化为褐色物质,

然后与 RNA 不可逆地结合, 导致 RNA 活性丧失及在氯仿抽提时丢失^[7], 或形成不溶性复合物^[8]。从植物组织中提取高质量 RNA 的另一个难点是植物组织尤其是成熟组织能产生某些水溶性的次级代谢产物, 这些产物很容易与 RNA 结合并与 RNA 共同被抽提出来而阻碍具有生物活性的 RNA 的分离^[9]。

该试验中所选取的大蒜 3 种组织中, 蒜薹和鳞茎中富含多糖、蛋白质、无机盐等多种成分, 蒜薹和鳞茎中所含的多糖是幼叶中的 2~5 倍, 无机盐含量是幼叶的 2 倍^[9]。该试验中, 3 种方法从蒜薹和鳞茎 2 种组织中均能提取出完整性较好的大蒜总 RNA, 但纯度不高, 易受多糖或其它杂质污染, 试验过程中借鉴前人方法, 在提取液或溶液中加入无水乙醇至终浓度的 10%~30%^[10], OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值变化不大, 仍然小于 2。由此可见, 以蒜薹和鳞茎为试验材料提取大蒜总 RNA 时, 如何有效去除多糖和其它代谢产物的污染还有待进一步研究。

参考文献

[1] 袁贞, 沈文涛, 周鹏. 番木瓜果实总 RNA 提取方法比较[J]. 广东农业科学, 2008(10): 76-79.

[2] 宋欣. 玉米双低频酶 dDNA-AFLP 体系的建立及穗数性状相关基因的差异表达分析[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2008: 17-18.

[3] 王艳红. 水稻开花基因的克隆和功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2005: 27.

[4] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of Rumex acetosa (sorrel)[J]. Plant Mol Biol Repr, 1994, 12: 198-203.

[5] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999(1): 36-39.

[6] Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnoperns[J]. Plant Mol Biol Repr, 1994, 12: 20-25.

[7] Schneiderbauer A, Sandermann H J R, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91-95.

[8] Graham G C. A method for extraction of total RNA from Pinus radiata and other conifers[J]. Plant Mol Biol Repr, 1993, 11: 32-37.

[9] 王昆, 汪兴汉, 丁超, 等. 大蒜栽培与病虫害防治技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

Extraction and Quality Analysis of Total RNA in Different Tissues of Garlic

ZHANG Ai-min, ZHANG Su-qin, GENG Guang-dong, SHENG Zhong-fei, LIU Li-qing
(Agricultural College, South District of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Garlic leaf, bolt and bulb were applied for total RNA extraction with three methods. RNA quality was detected by 1.2% non-denaturing gel electrophoresis and UV Spectrophotometer. The results showed that the integrity of the total RNA extracted from three garlic tissues by the three methods was high. But RNA quality was low for garlic bolt and bulb because the total RNA might be polluted due to a great amount of polysaccharide or other metabolites in them. RNA quality and yield were high when extracted with method 1 from garlic young leaves. Therefore, the method 1 was ideal for RNA extraction of garlic leaf.

Key words: Garlic; Young leaves; Garlic bolt; Garlic bulb; RNA extraction