

富含多糖的甜瓜果肉中提取总 RNA 方法的比较研究

郝金凤, 哈斯阿古拉

(内蒙古大学 生命科学院生物工程中心, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:以甜瓜品种河套蜜瓜果肉为试验材料, 比较了异硫氰酸胍法、CTAB 法和 SDS 法 3 种 RNA 提取方法, 结合 KAc 沉淀多糖和低浓度乙醇沉淀多糖 2 种去糖方法。结果表明: 异硫氰酸胍法结合 KAc 沉淀多糖的去糖效果最佳, 提取的 RNA 中 28S 亮度约为 18S 的 2 倍, 且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 以上, RNA 产率为 64.48 μg/g。经 RT-PCR 获得了乙烯受体基因 *etr1* 长达 2.3 kb 的 cDNA 特异性条带, 说明异硫氰酸胍结合 KAc 沉淀多糖法从甜瓜果肉中提取的 RNA 质量好、产率较高、完整性好, 适合于甜瓜进一步的分子生物学研究。

关键词:甜瓜; RNA; 多糖

中图分类号: Q 946 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)05-0015-04

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 人们对植物的许多生理特性进行了分子水平的研究。许多重要基因的克隆和表达研究, 需要从植物材料中提取纯度高、完整性好的 RNA。从甜瓜果实中分离高质量的 RNA 是从分子水平上研究甜瓜果实发育和成熟过程中相关基因表达的重要前提。

植物组织中的多糖类物质很容易与 RNA 发生共沉淀, 不仅会使 RNA 的产量和纯度受到影响^[1-3], 还会抑制许多工具酶的活性^[3], 这在很大程度上局限了对该植物分子水平上的研究。因此在提取过程中尽量去除多糖物质是获得高质量总 RNA 的关键。河套蜜瓜 (*Cucumis melo* L. cv Hetao) 是一种含糖量极高的优良甜瓜品种, 其含糖量可达 12%~18%^[4]。现以河套蜜瓜果肉为材料, 采用异硫氰酸胍法^[5-6]、CTAB 法^[7-8] 和 SDS 法^[9-10] 这 3 种方法, 结合 KAc 沉淀多糖和低浓度乙醇和 NaAc 或 KAc 联合沉淀多糖 2 种去除多糖的手段进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为甜瓜品种河套蜜瓜原种, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室保存, 在大田种植, 采摘 9 成熟的果实, 取中果肉组织, 于液氮速冻, -80℃保存备用。

异硫氰酸胍为华美生物工程公司产品, 十二烷基肌

氨酸钠和 CTAB 均为 Sigma 公司产品, SDS 为 Biotec 公司产品, β-巯基乙醇为 Amresco 公司产品。反转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品, 高保真 Taq 酶为宝生物公司产品。其它常规试剂均为国产分析纯试剂。试剂均用经过 2 次灭菌的无菌水配制, 于 121℃灭菌 20 min 后使用。提取所用到的玻璃器皿及研钵均在烘箱中于 160℃干烘 4 h 备用; 电泳槽用 10% SDS 浸泡 24 h 后使用。

1.2 RNA 提取方法

1.2.1 异硫氰酸胍法 异硫氰酸胍法 (异硫氰酸胍结合低浓度乙醇沉淀多糖法): ①取 3 g 河套蜜瓜果肉, 置于研钵中, 加入液氮充分研磨至粉末状, 转到 2 支预冷的 50 mL 离心管中。分别加入 15 mL 提取缓冲液 (含 4 mol/L 异硫氰酸胍、25 mmol/L 柠檬酸钠、0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 用前加 4% β-巯基乙醇), 后迅速混匀约 1 min; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。②取上清液, 加入 0.1× 体积 2 mol/L 醋酸钠, 再加入等体积水饱和酚和 3 mL 氯仿: 异戊醇 (24:1), 颠倒混匀, 冰浴 15 min; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。③取出上层水相放入 1 支新离心管中, 加入 1/2 体积水饱和酚和 1/2 体积氯仿: 异戊醇 (24:1), 颠倒混匀; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。④取出上清液放入 1 支新离心管中, 加入等体积的异丙醇, 置于 -20℃沉淀 45 min; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑤弃去上清液, 用 5 mL 75% 乙醇洗 2 次, 并以 4℃下 12 000 rpm 离心 5 min。⑥沉淀于室温下干燥 10 min 后溶于 2 mL 无 RNase 水, 加入 1/20 体积的 2 M NaAc 和 1/10 体积的无水乙醇, 混匀, 冰浴 1 h; 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。⑦上清液加 10 M 的 LiCl 至终浓度为 3 M, 4℃过夜; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑧弃去上清液, 用 3 M 的 LiCl 洗 1 次; 4℃, 12 000 rpm 离

第一作者简介: 郝金凤 (1977-), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 讲师, 研究方向为植物分子生物学及基因工程。

通讯作者: 哈斯阿古拉。E-mail: hasind@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660111)。

收稿日期: 2009-11-18

心 20 min。⑨弃去上清液,用 70%乙醇洗 2 次,并以 4℃ 12 000 rpm 离心 5 min。⑩干燥,用无 RNase 水充分溶解。异硫氰酸胍法Ⅱ(异硫氰酸胍结合 KAc 沉淀多糖法):①~③同异硫氰酸胍法。④取上清,加入等体积的 2 M 的 KAc,混匀,冰浴 1.5 h; 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。⑤取出上清液放入 1 支新离心管中,加入等体积的异丙醇,置于-20℃沉淀 45 min; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑥弃去上清液,用 5 mL 75%乙醇洗 2 次,并以 4℃下 12 000 rpm 离心 5 min。⑦沉淀于室温下干燥 10 min 后溶于 2 mL 无 RNase 水,加 10 M 的 LiCl 至终浓度为 3 M, 4℃过夜; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑧~⑩同异硫氰酸胍法。

1.2.2 CTAB 法 CTAB 法(CTAB 结合低浓度乙醇沉淀多糖法):①分别取 3 g 河套蜜瓜果肉置于液氮中研磨成粉末,加入 65℃预热的 15 mL 的提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 用前加 6 μL β-巯基乙醇)中,充分混匀。②将离心管在 65℃水浴锅中温浴 1 h 后,冷却至室温,并加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 4℃, 12 000 rpm 离心 15 min。③取上清液,再用等体积氯仿:异戊醇抽提,颠倒混匀, 4℃, 12 000 rpm 离心 15 min。④取上清液,加入 10 mol/L LiCl 至最终浓度为 3 mol/L,在 4℃下沉淀过夜, 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑤将沉淀用无 RNase 水溶解,依次用苯酚、苯酚:氯仿(1:1)和氯仿进行抽提。⑥上清液加入 1/10 体积的 pH 5.2 的 2 M NaAc 和 1/5 体积的无水乙醇,混匀,冰浴 2 h; 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。⑦上清液加入 pH 5.2 的 3 mol/L 的 NaAc 和 3 倍体积的无水乙醇,使 NaAc 的最终浓度为 0.3 mol/L,在-20℃下放置 1 h,沉淀 RNA; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑧弃去上清液,用 70%乙醇洗 2 次,并以 4℃ 12 000 rpm 离心 5 min。⑨干燥,用无 RNase 水充分溶解。CTAB 法Ⅱ(CTAB 结合 Kac 沉淀多糖法):①~③同 CTAB 法。④取上清液,加入等体积的 2 M 的 KAc,混匀,冰浴 1.5 h; 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。⑤取上清液,加入 10 mol/L LiCl 至最终浓度为 3 mol/L,在 4℃下隔夜沉淀 RNA, 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑥将沉淀用无 RNase 水溶解,依次用苯酚、苯酚:氯仿(1:1)和氯仿进行抽提。⑦~⑨同 CTAB 法。

1.2.3 SDS 法 SDS 法(SDS 结合低浓度乙醇沉淀多糖法):①取 3 g 河套蜜瓜果肉置于液氮中研磨成粉末,加入预冷的 15 mL 提取缓冲液(2% SDS、50 mmol/L EDTA、100 mM Tris-HCl, 用前加 1% β-巯基乙醇)中,剧烈混匀, 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。②上清液加入 0.25 体积的无水乙醇和 0.11 体积的 5 M KAc 溶液(pH

4.8),剧烈混匀约 1 min,立即加入 0.8 体积的氯仿:异戊醇(49:1),混匀后冰浴 5 min, 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。③取上清液,分别用苯酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(49:1)抽提,并在 4℃下 12 000 rpm 离心 15 min。④取上清液,加入 10 mol/L LiCl 至最终浓度为 3 mol/L,在 4℃下沉淀过夜, 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑤弃去上清液,沉淀用 3 M 的 LiCl 洗一次; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑥沉淀用 400 μL 无 RNase 水溶解后,加入 5 M 的 KAc 和 3 倍体积的无水乙醇,使 KAc 的最终浓度为 0.3 mol/L,在-20℃下放置 1 h,沉淀 RNA; 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。⑦弃去上清液,用 70%乙醇洗 2 次,并以 4℃, 12 000 rpm 离心 5 min。⑧干燥,用无菌水充分溶解。SDS 法Ⅱ(SDS 结合 KAc 沉淀多糖法):①取 3 g 河套蜜瓜果肉置于液氮中研磨成粉末后加入预冷的 15 mL 提取缓冲液(2% SDS、50 mmol/L EDTA、100 mM Tris-HCl, 用前加 1% β-巯基乙醇)中,剧烈混匀, 4℃, 12 000 rpm 离心 20 min。②上清液加入等体积 2 M KAc 溶液,混匀,冰浴 1.5 h, 4℃, 12 000 rpm 离心 30 min。③~⑧同 SDS 法。

1.3 凝胶电泳及纯度检测

分别取 RNA 提取液 2 μL,采用 1%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察并拍照。用紫外分光光度计观测 2 μL RNA 提取液的 OD 值。

1.4 RT-PCR 方法

1.4.1 cDNA 的合成 以 5 μg 异硫氰酸胍法Ⅱ提取的甜瓜总 RNA 为模板,反转录反应参照 ThermoScript™ RT-PCR Systems 说明书,反应产物于-20℃保存。

1.4.2 反转录产物的 PCR 扩增 取反转录产物 2 μL 作为模板,在 50 μL 体系中,以甜瓜乙烯受体基因 *Cm-ETR1* 的特异性引物(上游引物为 5'-CTACTCTAGATT-GCCATGGAGAACTGTT-3',下游引物为:5'-TGACG-GATCCGATATCTCTCTGTCTACT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应条件如下:94℃预变性 2 min, 94℃变性 50 s, 50℃退火 40 s, 68℃延伸 2 min,共 35 个循环,68℃延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的总 RNA 纯度分析

高纯度 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应接近 2.0。而 OD₂₃₀ 的吸收值反映了样品受碳水化合物和酚类等物质的残留程度,纯的 RNA 样品,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应接近 2.2。从表 1 可以看出,各种方法所提 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值都在 1.9 左右,去除了蛋白质;用异硫氰酸胍法结合 KAc 去除多糖的方法所提取的 RNA,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 2.0617,表明该方法可以有效地去除甜瓜果实 RNA 中的多糖,获得高纯度的总 RNA,产量为 64.48 μg/g。

表 1 不同提取方法提取的甜瓜总 RNA 的紫外分光光度检测结果

Table 1 Spectrophotometer analysis of melon total RNA by different methods

方法 Method	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀	产率 Yield /μg·g ⁻¹
异硫氰酸胍法 Guanidinium isothiocyanate I method	1.8964	1.0163	67.75
异硫氰酸胍法II Guanidinium isothiocyanate II method	1.9405	2.0617	64.48
CTAB 法I CTAB method I	1.9864	1.1307	15.90
CTAB 法II CTAB method II	1.9450	1.5328	19.87
SDS 法I SDS method I	1.8357	1.3914	17.36
SDS 法II SDS method II	1.8319	1.4065	21.84

2.2 RNA 完整性的比较

RNA 样品的凝胶电泳分析是判断 RNA 质量的一种重要手段,从电泳凝胶上 18S 和 28S rRNA 的完整性可以判断 RNA 有无降解及降解程度,也可以判断有无 DNA 污染。图 1 表明,这几种 RNA 提取方法所得 RNA 均无明显降解,表明这些方法在正规的操作过程中可有效地抑制 RNase 的活性。SDS 法和 II 提取的 RNA 都有一定的 DNA 污染。CTAB 法 I、II 和异硫氰酸胍法 I、II 获得的 RNA 完整性都比较好,且无 DNA 污染,经 BandScan 软件分析,只有异硫氰酸胍法 II 所提取的 RNA,其 28S :18S 值达到 2 :1。

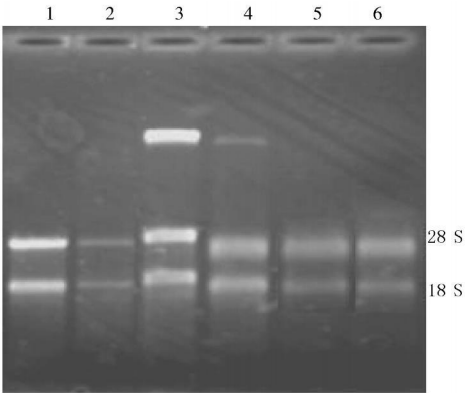


图 1 不同方法提取甜瓜总 RNA 的电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of melon total RNA by different methods

注:1. 异硫氰酸胍结合低浓度乙醇去糖法; 2. CTAB 结合低浓度乙醇去糖法; 3. SDS 结合低浓度乙醇去糖法; 4. SDS 结合 KAc 去糖法; 5. CTAB 结合 KAc 去糖法; 6. 异硫氰酸胍结合 KAc 去糖法。

Note: 1. RNA extracted by guanidinium isothiocyanate method with low ethanol concentration; 2. RNA extracted by CTAB method with low ethanol concentration; 3. RNA extracted by SDS method with low ethanol concentration; 4. RNA extracted by SDS method with KAc; 5. RNA extracted by CTAB method with KAc; 6. RNA extracted by guanidinium isothiocyanate method with KAc.

2.3 RT-PCR 检测结果

为了进一步验证所提取的 RNA 的完整性,以异硫

氰酸胍法 I 提取的总 RNA 为模板,以乙烯受体基因 *Cm-ETR1* 的序列为引物,采用 RT-PCR 的方法进行特异扩增。检测结果表明,已成功的扩增出长达 2.3 kb 的 cDNA 片段(见图 2),说明此法提取的 RNA 可满足分子生物学试验的要求。

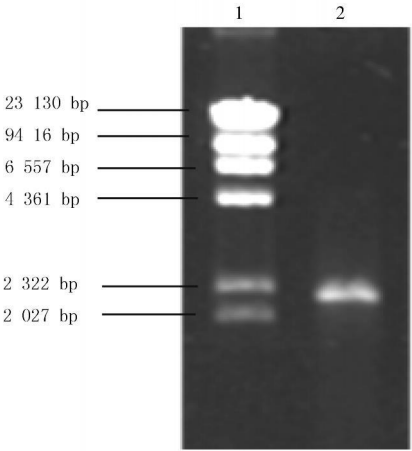


图 2 甜瓜乙烯受体基因 *Cm-ETR1* RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic analysis of RT-PCR amplified cDNA of melon *Cm-ETR1*

注 1. λDNA/HindIII 分子量标记; 2. 甜瓜乙烯受体基因的 RT-PCR 产物。
Note: 1. λDNA/HindIII marker; 2. RT-PCR amplified products of melon *Cm-ETR1*.

3 讨论

多数甜瓜品种果实糖份含量特别高,其中多糖是干扰甜瓜总 RNA 提取的重要因素。在常规方法的一些步骤中,如在高浓度 Na⁺ 和 K⁺ 存在条件下通过酚、氯仿抽提,通过 LiCl 沉淀 RNA 等,都可以去除一部分多糖^[3]。即使这样,得到的 RNA 样品仍然会有较多的多糖残留^[1],这就需要更有效地方法来解决富含多糖的果肉组织中 RNA 提取时多糖的残留问题。在提取甜瓜果肉总 RNA 过程中,试验比较了 KAc 以及低浓度乙醇和 NaAc 或 KAc 联合沉淀多糖 2 种去除多糖的方法,结果表明,在异硫氰酸胍法中,利用终浓度 1 M 的 KAc 将位于水相中的多糖选择性的沉淀出来,再用 LiCl 选择性的沉淀 RNA,能有效地排除多糖对 RNA 质量的干扰,获得符合分子生物学试验要求的高质量 RNA。而比较的其他提取方法中, RNA 产率低并且多糖的去除效果也不是很好,由此可见,对于不同的植物材料,应该采取相应不同的提取方法是成功的关键。

参考文献

[1] 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.
[2] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae [J]. Anal Biochem, 1988, 174: 650-657.
[3] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. Bio Techniques, 1992 (13): 52-56.

接种 AMF 对葡萄微繁苗生长效应的研究

谢丽源^{1,3}, 张 勇^{2,3}, 熊丙全³, 曾 明³

(1. 四川省农业科学院 土壤肥料研究所 四川 成都 610066; 2. 电子科技大学 生命科学与技术学院 四川 成都 610054 3. 西南大学 研究生部, 重庆 400716)

摘 要:以葡萄为试验材料,在练苗期间接种 AMF 孢子菌剂,研究微繁苗移栽过程中 AMF 侵染过程,分析菌根化进程中微繁苗根系活力的变化以及 AM 共生体对微繁苗生长发育的促进效应。结果表明:AMF 对葡萄微繁苗的生长发育具有重要促进作用,能够促进根系活力,微繁苗根系磷酸酶活性与 AMF 侵染率存在显著相关性。接种 AMF 可增强幼苗根系活力,促进根系对 N、P 等矿质养分的吸收和积累,并促进植株的光合作用,提高幼苗的生长势。

关键词:葡萄;微繁苗;丛枝菌根真菌;生长效应

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)05-0018-06

第一作者简介:谢丽源(1977-),女,硕士,助研,现从事菌根生物技术研究工作。

通讯作者:曾明(1963-),男,博士,教授,现主要从事果树菌根技术研究工作。E-mail:xieliyuan77@163.com。

基金项目:国家科技攻关资助项目(2001BA604A05);重庆市应用基础研究资助项目(20001095)。

收稿日期:2009-12-16

自然条件下,绝大多数植物都可形成菌根,其中丛枝菌根(Arbuscular Mycorrhiza, AM)是最普遍的类型。AM 是植物根系和丛枝菌根真菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)形成的共生体(Symbiont),目前已经确知,AM 在促进植物生长,提高养分吸收率,生态系统养分循环及保护植物抵御不良环境胁迫中起关键作用。

[4] 马玉明.内蒙古资源大辞典[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社 1997:1362-1363.

[5] 郑晓飞.从富含多糖的植物组织中提取和纯化 RNA[M]//RNA 实验技术手册.北京:科学出版社,2004:44-46.

[6] 杨亮,付丽娅,刘仲齐,等.富含多糖番茄果实组织中总 RNA 的有效提取方法[J].南开大学学报(自然科学版),2005,38(5):36-39.

[7] 夏海武,吕柳新,陈桂信.羊蹄甲果实中总 RNA 提取的新方法[J].分子植物育种,2006,4(1):147-149.

[8] 庄军平,苏菁,陈维信.一种从香蕉果实提取高质量 RNA 的方法[J].

分子植物育种,2006,4(1):143-146.

[9] López-Gómez R, Gómez-Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp[J]. HortSci, 1992, 27:440-442.

[10] 杜中军,徐兵强,黄俊生,等.一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法[J].植物生理学通讯,2005,41(2):202-204.

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

Comparative Test of Methods of Extracting Total RNA from Melon (*Cucumis melo*) Rich in Polysaccharides

HAO Jin-feng, HASI Agula

(Biotechnology Center, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Inner Mongolia Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Hohhot, Inner Mongolia 010021)

Abstract: Took melon fruit as experimental material, three extraction methods of total RNA including guanidinium isothiocyanate extraction, CTAB extraction and SDS extraction were compared, combining two methods of eliminating polysaccharide by KAc or low concentration ethanol, respectively. The results showed that guanidinium isothiocyanate with KAc extraction method was more capable of efficiently eliminating polysaccharide compared with the others. For this method, the brightness of 28S rRNA of obtained RNA was two times as much as that of 18S rRNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ value was above 1.8, and the RNA productivities were 64.48 μg/g. The obtained RNA was successfully used to amplify a specific 2.3 kb cDNA fragment of melon *Cm-ETR1* gene by RT-PCR. These results showed that guanidinium isothiocyanate with KAc extraction method was an effective RNA extraction method for those materials affluent in polysaccharide content, and the integrity and purity of extracted total RNA could meet the demand of molecular biology experiments.

Key words: melon; RNA; polysaccharide