

番木瓜叶片总 RNA 提取方法比较研究

陈 萍, 姜成东, 卢业凌

(海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南大学 园艺园林学院, 海南 儋州 571737)

摘 要:采用了 CTAB 法和 GHCL 法及 SDS 法 3 种方法分别对番木瓜的叶片进行 RNA 的提取。该试验采用 SDS 法、GHCL 法提取番木瓜总 RNA, 并对提取的 RNA 进行质量比较。结果表明: GHCL 法(方法 2)提取的 RNA 产率高, 无明显降解, OD_{260}/OD_{280} 比值较好, 是有效提取总 RNA 的方法。

关键词:番木瓜; RNA; 提取方法

中图分类号:S 662.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0133-03

番木瓜(*Carica Papaya*)原产热带美洲及非洲, 是番木瓜科番木瓜属植物, 通常不分枝, 具乳汁, 番木瓜味甘、性平、无毒^[1], 番木瓜果实内的维生素 A 和 VC 的含量比较丰富^[2], 另外还含有木瓜蛋白酶^[3], 具有较高的食用、加工、医学、观赏价值。番木瓜病毒病是番木瓜生产和发展的主要限制因素^[4-5], 对番木瓜叶片总 RNA 进行快速、高效提取是番木瓜病毒病分子探针检测技术成功的关键, 也是相关基因组学、蛋白质学研究开展的前提。

该试验通过对 3 种不同方法提取的番木瓜叶片总 RNA 的效果进行较全面的比较, 以寻求适合于提取高质量番木瓜叶片总 RNA 的有效方法, 进而为以后的番木瓜相关的分子生物研究打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为番木瓜叶片(采自海南大学儋州校区园艺园林学院果园)。提取试验开始前, 分别剪取番木瓜的不重于 0.1 g 的叶片各 3 份, 分别放置于高温烘过的干净研钵中。

1.1.1 试验试剂 采用巯基乙醇、氯仿、异戊醇、无水乙醇、75%和 95%无水乙醇 3 M NaAc、10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、1‰的 DEPC 水、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、TE 缓冲液等。均为国产分析纯及以上纯度。提取相关缓冲液: CTAB 提取液: 2×CTAB 提取缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 20 mmol/L EDTA,

1.4 mmol/L NaCl, 2% CTAB, 5% PVP, β -巯基乙醇]; 1×CTAB 提取液提取缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 1% CTAB, 20 mmol/L β -巯基乙醇][GHCL x-traction buffer[5 M Guanidium hydrochloride, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaAc pH 5.5, 100 mM β -乙醇, 现用现加]; TRI reagent buffer(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% SDS, 2.5 mM EDTA)Ⅲ。TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)], 高压灭菌备用^[6-8]。Ⅲ SOS 提取液: 提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl cp-pH 8.0, 1.0 mmol/L EDTA pH 8.0, 140 mmol/L NaCl, 10% SDS, 8% PVP, 5%的 β -巯基乙醇(现加现用))。

1.1.2 试验仪器 H-8 数显恒温水浴锅、UNIVERSAL-32R 高速冷冻离心机、HVE-50 全自动高压灭菌器、UV-1601PC 紫外可见分光光度计、GAS7401X 凝胶成像系统、DYY-Ⅲ-4 型稳压稳流电泳仪、液氮罐、电子天平、手持微量移液器、研钵、烧杯、-70℃~4℃冰箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 方法 1(CTAB 提取法)提取步骤(根据牛建新^[6]方法, 有改动) (1)取装有 0.1 g 叶片粉末 1.5 mL 离心管 2 个, 加入 650 μ L 2×CTAB 提取缓冲液, 再加入 20 μ L 10% SDS, 30 μ L 10% PVP, 5 μ L 巯基乙醇, 轻轻上下晃动, 充分混合。(2)65℃水浴 30 min。(3)放入离心机内 10 000 r/min 离心 10 min。取上清, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)溶液, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。(4)取上清转入新的离心管, 加入等体积氯仿: 异戊醇(24: 1)10 000 r/min 离心 10 min。(5)取上清液加入等体积异丙醇, 室温放置 30 min。(6)10 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 70%乙醇洗 1 次。(7)弃上清液, 风干, 加入 20 μ L TE 或 DEPC 处理水溶解, 放入冰箱内备用。

1.2.2 方法 2(GHCL 法)提取步骤(根据蔡文伟^[7]方

第一作者简介: 陈萍(1977-), 女, 湖北新洲人, 博士, 副教授, 现主要从事热带果树和农业生物技术教学和研究工作。E-mail: chenping200636@163.com。

基金项目: 海南大学校基金资助项目(hd09xm62); 海南省教育厅高等学校科学研究资助项目(Hjkj2010-17); (原)华南热带农业大学科技基金资助项目(Rnd0710)。

收稿日期: 2010-05-12

法,有改动) (1)分别取 0.1 g 新鲜番木瓜叶片,于液氮中研磨成粉末,向其中加入 1.5 mL GHCL extraction buffer,研磨均匀后加入 100 μ L 20% PEG 20000。(2)转入 1.5 mL 聚丙烯管,室温放置 10 min,4℃ 13 000 r/min 10 min,上清液转入另 1 个 50 mL 离心管,加入 1 mL TRI reagent buffer,涡旋混匀,室温 5 min,加入 125 μ L 氯仿并充分涡旋,4℃ 13 000 r/min 10 min。(3)上清转入另 1 个 50 mL 离心管,加入 1/10 V 3 M NaAc pH 4.8,2.5 V 无水乙醇,涡旋混匀,-20℃ 1 h,4℃ 13 000 r/min 20 min。(4)去上清,沉淀用 75%乙醇洗 2 次,吹干后溶于 20 μ L Rnase free water,-20℃保存备用。

1.2.3 方法 3(SDS 法)提取步骤(参考侯义龙^[8]的方法有改动) (1)取不多于 0.1 g 的新鲜叶片,加液氮研磨成粉末状,迅速移入 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 600 μ L 的 SOS 提取缓冲液,2 μ L 2-巯基乙醇,30 μ L 10% PVP,混匀。4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。(2)取上清,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。(3)取上清,加入等体积的氯仿:异戊醇,(24:1)溶液,混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。(4)取水相,加 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.3),混离混匀,-20℃放置 3 h。4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。(5)弃上清,用 70%无水乙醇洗沉淀 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,弃去乙醇。(6)重复上述步骤 1 次,重复弃去乙醇,室温晾干 2~3 min。加入 20 μ L TE 或 DEPC 处理水溶解,放入冰箱内备用。

1.3 RNA 含量和纯度的测定

吸取 3 μ L 的 RNA 溶液,加入 3 mL 蒸馏水中,转入分光光度计的石英比色杯中,用紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,根据公式 RNA 浓度(ng/ μ L)=40 \times (OD₂₆₀) \times 稀释倍数,计算 RNA 浓度,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 判断 RNA 的大致浓度。一般 A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,可以满足试验要求。

1.4 凝胶电泳分析

称取 0.5 g 左右的琼脂糖于三角瓶中,加入 50 mL 0.5 \times TBE 电泳缓冲液,配制成 1%琼脂电泳凝胶,加热使其完全融化,稍冷却,加 1 μ L 核酸染料,小心倒入胶膜内,室温放置 0.5~1 h,待凝胶形成后,将提的 RNA 分别取 5 μ L RNA 与 2 μ L 溴酚蓝上样缓冲液混匀后,点样,置于 0.5 \times TBE 电极缓冲液中,150 V 恒压电泳约 20 min。在凝胶成像系统上观察电泳结果,拍照。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取的 RNA 浓度及纯度

将上述 3 种方法制备的番木瓜叶片总 RNA 经紫外分光光度计检测其浓度及纯度,各种方法所提取的 RNA 样品在 260、280 nm 波长的紫外吸收值结果见表 1。从

表 1 可知,3 种方法提取的 RNA 其紫外吸收值有较明显的差异,提取的番木瓜叶片总 RNA 效果不同,从提取 RNA 纯度方面来看,方法 2 是较好的方法,该试验中方法 2 的 RNA 提取方法紫外吸收值 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间,说明所提的总 RNA 纯度较高,方法 1 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值约为 2.3,说明使用该方法提取的 RNA 可能已经降解,方法 3 提取的 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值约为 1.67,说明可能存在较多的蛋白质、酶类等干扰。

表 1 不同方法提取 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值比较

方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	RNA 含量 /ng $\cdot\mu$ L ⁻¹	提取时间 /h
方法 1	0.023	0.010	2.30	920.93	约 1.6
方法 2	0.021	0.011	1.91	840.84	约 1.4
方法 3	0.015	0.009	1.67	600.60	约 4.2

2.2 RNA 的电泳检测结果

由图 1 可见,3 种方法均可提出 RNA。从 RNA 的电泳检测结果来看,相对来说利用方法 2(GHCL 法)所提取番木瓜的叶片无拖尾和模糊现象,且 28S 与 18S 的比值接近 2:1,表明用方法 2 提取 RNA 的完整性较好。

在方法 1 中,可以看到 28S、18S 和 5S 的 RNA 谱带,但是 18S 亮度大于 28S,而且有拖尾现象,说明 RNA 提取过程中可能被降解或被污染。

在方法 3 中,可以也看到 8S、18S 和 5S 的 RNA 谱带,但 RNA 的图像存在较明显的通道现象,图像不够清晰,成像效果差于方法 2 提取法。

综上 3 种方法的 OD 值和电泳成像分析,可以对比看出,方法 2 提取番木瓜叶片总 RNA 的纯度接近 1.9,纯度较高,总 RNA 成像效果最佳,是该次番木瓜叶片总 RNA 提取中的最佳方法。

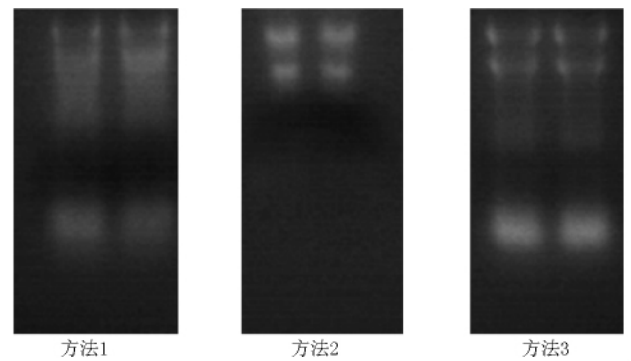


图 1 3 种不同方法提取的番木瓜叶片总 RNA 的电泳检测图

3 结论与讨论

3.1 结论

通过该次试验可知几种方法都可以提取出番木瓜叶片 RNA,但在纯度和完整性上存在较大差别,经紫外检测及电泳分析后,方法 2 提取的 RNA 是番木瓜叶片

RNA 提取并开展分子生物学研究的较好方法。

3.2 讨论

目前 RNA 提取应用较多的方法主要有试剂盒法、CTAB 法、SDS 法、热硼酸盐法和异硫氰酸胍法^[9]。

在该试验中主要采用了 CTAB 法和 GHCL 法及 SDS 法 3 种方法分别对番木瓜的叶片进行 RNA 的提取。在 RNA 分离提取后,可以通过紫外吸收值和琼脂糖电泳来检测其浓度和质量。在分光光度计上测 RNA 的紫外吸收值 OD_{260} 和 OD_{280} ,对于纯净的 RNA 样品, OD_{260}/OD_{280} 的比值应介于 1.8~2.0 之间。

在试验中,因为 RNA 是极易降解的核酸物质,防止 RNA 降解,是影响番木瓜的叶片 RNA 提取成功的关键,通过该次对 RNA 的提取进行总结得出,如下试验操作中的如下经验,对防止 RNA 的降解有很大作用。一是植物组织的称取。材料过多会使所加试剂与所加材料反应不充分,造成其间没有反应的部分可能会携带很多的 RNA 降解酶使 RNA 降解,影响试验结果。反之如果材料过少,又使提取的 RNA 量减少,得不到高的 RNA 产量和质量,所以对材料的用量要准确。二是试验前的处理。RNA 的提取是相当精密细致的试验,在进行 RNA 提取试验之前,要预先做好对试验前的准备工作,充分消除各种所用器材上所带有的 RNase 酶,如塑料材料要用 DEPC 水浸泡 12 h,玻璃器皿用烘箱在 180℃ 下烘烤 15 h,最好在超净工作台中进行试验操作,避免在试验操作过程中有新的 RNase 酶侵入。在操作

过程中要戴好手套和口罩,各种药品(除酒精、巯基乙醇、氯仿和异戊醇等)用高压灭菌器灭菌 2 h 左右。三是尽量快速提取。因为在外界环境空气中存在大量的 RNase 酶,而 RNA 又是极易降解的,所以,在进行 RNA 提取时要严格按照步骤、试剂剂量和加入次数快速、准确地进行,并在短期内完成提取工作。四是提取的 RNA 应及时地保存于 -70℃ 低温下,避免频繁冻融影响其质量和避免 RNA 的降解。

参考文献

- [1] 邓春梅,罗良平. 番木瓜的开发与利用[J]. 广州食品工业科技,1996,12(4):16-18.
- [2] 夏杏洲,胡雪琼. 木瓜资源的发展和工业用途[J]. 热带农业科学,2002,22(4):72-75.
- [3] Pendzhiv A M. Proteolytic enzymes of PaPaya; medicinal applications [J]. Pharm chem J,2002,36(6):315-317.
- [4] 蔡英卿. 番木瓜环斑病毒病研究进展[J]. 泉州师范学院学报,2000,18(4):52-55.
- [5] 车海彦,罗大全,杨旭光,等. 海南岛番木瓜和扶桑上粉虱传双生病毒的检测及序列分析[J]. 中国病毒学,2005(5):37-39.
- [6] 牛建新,陈萍,李西平,等. 葡萄卷叶病毒 RT-PCR 检测技术研究[J]. 西北农业学报,2004(1):28-32.
- [7] 蔡文伟,杨本鹏,张树珍,等. 龙血树总 RNA 提取方法的研究[J]. 中国热带医学,2006,6(2):242-243.
- [8] 侯义龙,张开春,吴禄平,等. 果树组织中总 RNA 提取的新方法[J]. 沈阳农业大学学报,2002(2):122-125.
- [9] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2001:399-403.

Comparative Study of RNA Extraction From on The *Papaya*

CHEN Ping,JIANG Cheng-dong,LU Ye-ling

(Minstry of Education Key Laboratory of Tropical Crop Germplasm Resources Protection and Utilization,College of Horticulture and Landscape Architecture,Hainan University,Danzhou,Hainan 571737)

Abstract: Total RNA of *Carica papaya* was extracted by means of three different methods. They were CTAB method and GHCL method and SDS method. The quality of extraction RNA by these methods had been compared. The results showed that, the GHCL method(method two) was an effective way, degradation was little. This was the better method since the RNA extracted the OD_{260}/OD_{280} ratio was better.

Key words: *Carica papaya*; RNA; extraction method