

彩色马铃薯试管苗总 RNA 提取方法的改进与分析

张艳萍, 陈玉梁, 谢志军, 厚毅清, 王红梅

(甘肃省农业科学院 生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以彩色马铃薯品系 03-1 的试管苗为材料, 分别采用苯酚法和 Trizol 法提取马铃薯总 RNA, 通过对前人的操作和提取方法进行改进, 旨在寻求一种低成本、操作简单、省时、适宜彩色马铃薯试管苗总 RNA 提取, 且 RNA 质量能直接用于后续病毒检测研究的方法。结果表明: 2 种方法在操作改进后依然均能得到马铃薯试管苗的总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 都可获得 28S、18S 和 5S rRNA 3 条带, 并对所得的总 RNA 进行马铃薯 PVY 病毒的检测, 均可特异扩增出目标片段; Trizol 法较苯酚法更简单省时, 且所得总 RNA 完整性更强、纯度更高。

关键词: 彩色马铃薯; 试管苗; 总 RNA 提取

中图分类号: S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0161-03

天然色素在人们的饮食中起到抗氧化剂的作用, 可以防治疾病, 是维护人体健康直接、有效、安全的自由基清除剂。近几年彩色马铃薯因其含有丰富的天然色素而在市场上慢慢占有一席之地, 越来越受到消费者的欢迎。但马铃薯常见的诸多病毒病也是影响其生产的重要因子。近年来 RT-PCR 分子技术在马铃薯病毒检测上得到广泛应用, 但进行这一分子技术的必要前提和关键是从植物组织中提取高纯度、高质量的 RNA。分离 RNA 的主要困难在于 RNA 分子自身存在 2'-OH, 稳定性差, 很容易被广泛存在于植物组织的细胞及外部环境中非常稳定的 RNA 酶降解^[1]。此外, 植物组织中含有的多酚、多糖和蛋白质以及其它次生代谢物质也会严重影响 RNA 的提取^[2]。目前常用的 RNA 提取方法有多种^[3-11]。该试验采用苯酚法和 Trizol 法, 在参照前人的研究基础上, 经过不断摸索和方法改进, 对这 2 种方法的提取效果进行比较, 并通过马铃薯 Y 病毒(PVY)的检测, 进一步验证提取所得的总 RNA 质量, 进而形成一套低成本、操作简单、省时的方法, 为更好地利用基因工程手段检测马铃薯病毒病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料: 彩色马铃薯品系“03-1”的新鲜试管苗。

第一作者简介: 张艳萍(1978-), 女, 本科, 助理研究员, 现主要从事分子生物学研究及病毒检测工作。E-mail: tangzihan0501@yahoo.cn.

通讯作者: 陈玉梁(1973-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: CHENYI925@163.com.

基金项目: 兰州市科技局计划资助项目(2008-1-44); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项资助项目(nky07-yz-02)。

收稿日期: 2010-07-13

由甘肃省农科院生物技术研究所提供。供试试剂: Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司; 所需的 M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂(RNasin)购于 Promega 公司; Marker、Taq 酶等其它试剂购自 TaKaRa 公司; 引物由 Invitrogen 公司合成; 其余常用试剂均为国产分析纯。供试仪器: 琼脂糖凝胶电泳系统(JUNYI600⁺)、紫外凝胶成像系统(FTI-500)、PCR 扩增仪(MJ PTC-100)、台式高速离心机(Heraeus)。

1.2 试验方法

1.2.1 RNase 的灭除 常规方法: 所用研钵、研杵、药匙、离心管、移液枪头、试剂瓶、烧杯、容量瓶等器具, 均经 0.1%DEPC 溶液浸泡, 37℃过夜, 次日高压灭菌烘干后备用。所用试剂均用 0.1%DEPC 处理后的超纯水配置, 放置过夜后高压灭菌, 常温保存备用。剪刀在研磨前于酒精灯上烘烤 1 min, 液氮冷却。改进方法: 研钵、研杵、药匙、离心管、各种移液枪头、剪刀等无需 DEPC-H₂O 浸泡, 直接高压灭菌(121℃, 20 min)烘干备用。所需试剂均用超纯水配置, 高压灭菌后备用。

1.2.2 总 RNA 提取 苯酚法: 取 5~10 g 材料, 液氮研磨至粉末状加入 65℃水浴预热的 RNA 抽提 buffer 13 mL (50 mmol Tris-HCl, pH 9.0, 100 mmol NaCl, 10 mmol EDTA, pH 8.0, 0.5%SDS, 0.2%β-巯基乙醇)和水饱和酚 7 mL, 剧烈振荡 10 min, 再加入氯仿 8 mL, 混匀, 冰浴 10 min, 10 000 r/min, 4℃离心 20 min; 取上清液, 氯仿抽提, 加 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 4℃过夜, 10 000 r/min, 4℃离心 20 min; 留沉淀, 乙醇洗涤后, 超净工作台上晾干, 加 DEPC-ddH₂O 溶解 RNA 沉淀。改进的苯酚法: 取 0.5~1 g 材料, 液氮研磨至粉末状, 加入 65℃水浴预热的 RNA 抽提 buffer 1.3 mL (50 mmol Tris-HCl, pH 9.0, 100 mmol NaCl, 10 mmol EDTA, pH

8.0, 0.5% SDS) 和水饱和酚 0.7 mL, 剧烈振荡 10 min; 再加入氯仿 0.8 mL, 混匀, 冰浴 10 min; 10 000 r/min, 室温离心 10 min, 取上清液, 加等体积氯仿抽提, 混匀, 冰浴 10 min; 10 000 r/min, 室温离心 10 min, 取上清, 加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和等体积的异丙醇, 混匀, -20°C 沉淀 4 h; 室温 12 000 r/min 离心 10 min, 留取沉淀, 4°C 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 在超净工作台上晾干, 用 ddH₂O 溶解 RNA 沉淀。Trizol 法: 参照 TRIzol Reagent (InvitrogenTM) 说明书。改进的 Trizol 法: 取 0.1 g 材料, 液氮研磨至粉末状, 加入 1 mL Trizol 试剂, 充分混匀后迅速转移到 1.5 mL 离心管中, 室温静置 5 min; 以每 1 mL Trizol 液加入 0.2 mL 的比例加入氯仿, 加盖封严, 剧烈振荡 15 ~ 30 s, 室温放置 2 ~ 3 min; 常温 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于一新的离心管, 按 1 mL Trizol 液加入 0.5 mL 的比例加入异丙醇, 室温放置 10 min; 常温 10 000 r/min 离心 10 min, 留取沉淀, 按每 1 mL Trizol 液加入至少 1 mL 的 75% 乙醇 (高压灭菌的超纯水配制) 的比例加入预冷的乙醇清洗沉淀, 在超净工作台上晾干, 用 ddH₂O 溶解 RNA 沉淀。

1.2.3 总 RNA 质量检测 琼脂糖凝胶电泳检测: 取 3 μL 总 RNA 母液, 加入 2 μL Loading Buffer, 再加入 3 μL 超纯水, 混匀, 稍作离心后加样于 1% 的非变性琼脂糖凝胶样品槽内, 在 80 V 电压下, 1 \times TAE 缓冲液中电泳约 20 min, 并在紫外凝胶电泳成像系统下检测与拍照。马铃薯 PVY 病毒的 PT-PCR 检测: 根据马铃薯 Y 病毒的外壳蛋白基因, 利用 Primer 引物设计程序, 设计并合成了一对特异引物: 5' 端引物: 5' GCAAACGATACAAATTGATGC 3'; 3' 端引物: 5' AGTATTGCATACTTGAGAGAA 3'。参照 Promega 公司提供的反转录酶

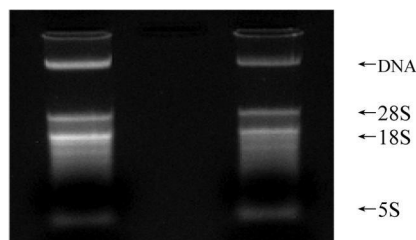
(M-MLV) 操作程序, 合成 cDNA 的第 1 条链。在 20 μL 的反应体系中, 取反转录产物 2 μL , 加 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 5' 端和 3' 端引物各 1 μL , Taq 酶缓冲液 2 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , 1 U Taq 酶, 加水至总体积 20 μL , 在 PCR 仪上扩增, 反应条件是 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 40 s, 45°C 复性 45 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环。72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 10 min, 取出扩增产物 3 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

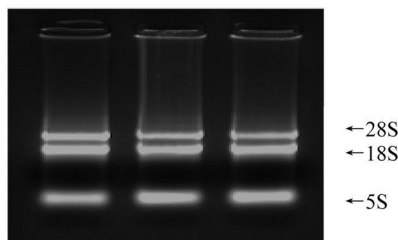
2.1 改进方法提取彩色马铃薯试管苗总 RNA 的完整性检测

RNA 样品的凝胶电泳分析是判断 RNA 质量的一种重要手段, 从电泳胶上 18S 和 28S 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^[2]。

试验中分别采用改进的苯酚法和 Trizol 法提取彩色马铃薯试管苗的总 RNA, 利用 1% 普通琼脂糖凝胶电泳对 2 种方法获得的总 RNA 样品的完整性进行检测, 电泳结果见图 1。从图 1a 可看出, 改进的苯酚法提取的总 RNA 的 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰可见, 稍有弥散现象, 有基因组 DNA 的污染。从图 1b 可看出, 改进的 Trizol 法提取的总 RNA 的 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰可见, 无弥散现象, 也无基因组 DNA 的污染。说明 Trizol 法较苯酚法提取的总 RNA 降解程度低, 且在没有 DNA 酶消化的情况下, Trizol 法较苯酚法提取的总 RNA 纯度高。2 种方法提取的总 RNA, 28S 条带的亮度基本和 18S 的亮度一致, 没有达到 2 倍的比例, 只能说明总 RNA 样品基本完整。



(a) 改进的苯酚法提取的总 RNA



(b) 改进的 Trizol 法提取的总 RNA

图 1 改进方法提取彩色马铃薯试管苗总 RNA 完整性的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

2.2 马铃薯 PVY 病毒的 PT-PCR 检测验证提取的总 RNA 结果

为进一步验证总 RNA 提取的质量。分别以上述改进的 2 种方法获得的彩色马铃薯试管苗总 RNA 为模板, 利用 PT-PCR 技术进行了马铃薯 PVY 病毒的检测, 用 2% 普通琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 电泳结果见图 2。以改进的 Trizol 法提取的总 RNA 为模板,

通过 PT-PCR 获得一条清晰的大小为 680 bp 的特异性条带, 与所需目的片段大小一致, 同时有微弱的杂带扩增出 (图 2 中 2 ~ 5 泳道); 以改进的苯酚法提取的总 RNA 为模板, 也扩增得到了大小为 680 bp 目的片段 (图 2 中 6 ~ 9 泳道), 扩增出的杂带较多, 且泳道出现轻微的拖尾现象。总体来看, 2 种方法提取的总 RNA 均能够满足 PT-PCR 法检测马铃薯 PVY 病毒的要求。

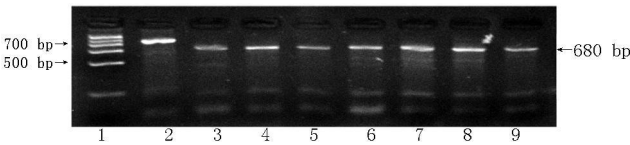


图2 马铃薯 PVY 病毒的 PT-PCR 检测

注: 1: Marker; 2~ 5: 模板为改进的 Trizol 法提取的总 RNA; 6~ 9: 模板为改进的苯酚法提取的总 RNA。改进的苯酚法提取的总 RNA 用 DNA 酶处理之后, 才进行 PT-PCR 马铃薯 PVY 病毒检测。

3 结论与讨论

试验中所采用的改进法省去了对器皿、水的 DEPC 处理, 只要高温灭菌即可。提取过程均在常温下进行, 用普通高速离心机代替了冷冻高速离心机。对提取出的总 RNA 使用高温灭菌的 ddH₂O 直接溶解, 进行质量检测, 序列完整, 不影响后续 PT-PCR 分子生物学实验。试验中用普通琼脂糖凝胶代替甲醛变性胶, 加大电泳的电压, 短时间内完成电泳检测, 完全可以满足 RNA 完整性鉴定的要求。利用改进法提取 RNA, 能降低成本、节约时间、方便操作, 也避免了使用 DEPC 和甲醛等有害试剂^[13]。

RNA 提取和鉴定过程中, 操作细节是预防外源性 RNase 的关键。前人研究过程中也证实了这一点^[14,15]。在 RNA 提取过程中, 植物材料的研磨和后续操作均在超净台里操作。RNA 电泳装置用无水乙醇清洗晾干后使用。整个操作过程均戴一次性 PE 手套, 尽量避免接触其它物件, 操作者还需戴口罩。试验结果表明, 通过采用上述预防措施可以在一定程度上有效防止由外源性 RNase 污染引起的 RNA 降解。

通过对改进的苯酚法和 Trizol 法 2 种方法提取的彩色马铃薯试管苗总 RNA 进行验证比较, 可以得出 2 种方法在操作改进后依然均能得到基本完整的总 RNA, 并能满足 PT-PCR 法检测马铃薯 PVY 病毒的要求, 扩增

出特异目标片段; 改进的 2 种方法, 苯酚法所得的总 RNA 中有基因组 DNA 干扰, DNA 虽可以利用 DNase 去除, 但这样增加了试验步骤, 并使 RNA 降解增加。Trizol 法所得总 RNA 完整性更强、纯度更高, 相比较起来就简单省时些, 实用性更强。不过实验者可根据实际情况选择提取的方法。

参考文献

[1] 朱昀, 王猛, 贾志伟, 等. 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法 [J]. 植物学通报, 2007, 24(5): 624-628.
[2] 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.
[3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1995.
[4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 734-873.
[5] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.
[6] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159.
[7] 张容, 郑彦峰, 吴瑶, 等. 一种简单有效的植物 RNA 提取方法 [J]. 遗传, 2006, 28(5): 583-586.
[8] 夏兰芹, 郭三堆. 棉花 RNA 的快速提取方法 [J]. 棉花学报, 2000, 12(4): 205-207.
[9] ZHENG Y, YANG T. RNA isolation from highly-scos samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. Plant Mol Bio Rep, 2002, 20: 417.
[10] 淳俊, 郑彦峰, 王胜华, 等. 一种广泛适用的 RNA 提取方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(5): 591-597.
[11] 赵双宜, 吴耀荣, 夏光敏, 等. 介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法 [J]. 遗传, 2002, 24(3): 337-338.
[12] 王英, 羊玉花, 邱海燕, 等. 甘蔗种质总 RNA 提取方法的研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 68-72.
[13] 王长晔. RNA 提取过程中 DEPC 的毒性 [J]. 天津科技, 2008(5): 5-6.
[14] 崔秋红, 罗莹, 祁晓廷, 等. 一种简便提取植物总 RNA 的制备和操作 [J]. 生物学通报, 2009, 44(2): 44-45.
[15] 白云凤, 郭志华, 白冬梅, 等. 马铃薯总 RNA 提取和鉴定方法的改进 [J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1059-1062.

Modified and Analysis of the Methods of Total RNA Extracted for Colour-potato Plantlets

ZHANG Yan-ping, CHEN Yu-liang, XIE Zhi-jun, HOU Yi-qing, WANG Hong-mei

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: The plantlets of colour-potato strain 03-1 were used as materials. Two methods (phenol method and Trizol method) were used to extract the total RNA from potato. Through modifying the predecessors' work, we want to seek a low-cost, simple, time-saving method suitable for potato total RNA extraction, and RNA quality can be directly used for virus detection. The results showed that both methods, after being modified, can be used to get integrity potato total RNA, and the total RNA for the detection of potato viruses PVY, can be amplified specific fragment; Trizol method was more simple than the phenol method, and can get more integrity total RNA with higher purity

Key words: colour-potato; plantlets; total RNA extracted