

核桃内果皮 RNA 提取方法研究

唐 燕^{1,2}, 徐 龙^{1,2}, 王新建¹, 张 锐³

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆 阿拉尔 843300; 3. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以核桃果壳硬化期的内果皮为试材, 针对核桃内果皮木质化程度高且富含多酚多糖的特点, 比较 CTAB 法Ⅰ、CTAB 法Ⅱ和试剂盒 3 种方法提取核桃内果皮 RNA 的效果。结果表明: 3 种方法提取的 RNA 均可见 3 条带。CTAB 法Ⅰ提取的 RNA 略微拖带, OD_{260}/OD_{280} 为 1.540, RNA 产率为 75.9 $\mu\text{g/g}$, RNA 完整性差, 质量低; CTAB 法Ⅱ的 RNA 图谱较完整, 但亮度较弱, OD_{260}/OD_{280} 为 1.801, 产率为 86.1 $\mu\text{g/g}$, 但 RNA 提取过程耗时太长; 试剂盒法提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 为 2.055, RNA 产率 96.4 $\mu\text{g/g}$, RNA 图谱清晰、稳定、明亮, 证明得到的 RNA 多糖及酚类等去除较彻底, 纯度、完整性和产率均较高。因此, 应用复杂植物总 RNA 提取试剂的试剂盒法可获得高质量与高产率的核桃内果皮总 RNA, 完全满足后续分子生物学研究。

关键词:核桃内果皮; RNA 提取; CTAB 法; 试剂盒法

中图分类号:S 664.1; Q 78 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0117-03

核桃(*Juglans regia* L.)属于核桃科核桃属。我国栽培核桃历史悠久。目前, 我国核桃栽培面积和产量均居世界第一位^[1]。新疆是我国核桃重要产区之一, 栽培地区遍及新疆, 产量居全国前列。目前, 核桃果皮的薄、厚特征已成为衡量核桃品质的重要经济指标之一, 培育果皮极薄核桃品种已成为核桃育种的主要目标。为深入研究核桃内果皮形成机理及发育研究, 克隆内果皮发育过程中关键酶基因, 因此提取纯度、产率高, 完整性好的 RNA 是前提条件。提取高质量的核桃内果皮 RNA, 为今后开展核桃遗传图谱构建、分子标记辅助选择和品质育种、重要性状基因的克隆与功能验证等分子育种工作打好基础。

核桃组织中富含多酚多糖等物质, 对 RNA 的分离和纯化造成很大的干扰, 如果在 RNA 提取过程中多糖和酚类不去除完全, 会导致 RNA 埋在酚类和多糖形成的粘稠胶状物中而难于溶解, 最终 RNA 产率低、质量差, 使用这种质量的 RNA 会严重影响试验的稳定性和重现性^[2-3]。目前, 刘晓菊等^[4]针对核桃的这种特异性, 改进了传统 CTAB 法, 运用改良 CTAB 法提取得到质量较高的 RNA。但是, 对于核桃内果皮 RNA 的提取研究

却未见报道。该研究用 CTAB 法Ⅰ、CTAB 法Ⅱ、试剂盒法, 提取核桃内果皮 RNA, 通过比较 RNA 的完整性和纯度, 找到最适合核桃内果皮 RNA 提取的方法, 为下一步的反转录和分子克隆等试验提供高质量的材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 试验材料于 2011 年采自新疆温宿县核桃林场, 盛花后 50 d(6 月 15 日)开始采样, 每隔 7 d 取样 1 次, 采样覆盖核桃果壳硬化期(硬核期), 随机从树的不同方位取生长发育正常, 无病虫害的核桃果实, 放入采样箱中带回实验室, 立即进行核桃内果皮的分离, 置于-75℃超低温冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为德国 BASF 公司进口分装产品, 琼脂糖为西班牙分装产品, 焦碳酸二乙酯(DEPC)为 Sigma 产品, 三羟甲基氨基甲烷(Tris)为 Amersco 产品, 复杂植物总 RNA 提取试剂购自康为世纪生物科技公司, 其余试剂均为国产分析纯。CTAB Extraction buffer: 2% (W/V) CTAB, 4% (W/V) PVP, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 4 mol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 4% BME(使用前加入)。SSTE Buffer: 1.0 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 mmol/L EDTA (pH 8.0)。提取 RNA 所用试剂除 Tris 外均用 0.1% DEPC 水处理并高温高压灭菌 40 min; 含 Tris 的溶液用经高温高压灭菌的 0.1% 的 DEPC 水直接配制; 玻璃器皿于 180℃烘烤 12 h; 塑料易耗品用 0.1% 的 DEPC 水 37℃浸泡过夜后高压灭菌,

第一作者简介:唐燕(1987-), 女, 在读硕士, 现主要从事果树遗传育种研究工作。E-mail: 422074689@qq.com。

责任作者:张锐(1979-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事果树分子育种研究工作。E-mail: zhrghs@163.com。

基金项目:兵团博士基金资助项目(2011BB006)。

收稿日期:2012-03-26

以避免 RNA 酶污染。

1.2 试验方法

1.2.1 CTAB 法I 参照许锋等^[5]的方法。

1.2.2 CTAB 法II 参照刘晓菊等^[4]的方法。缓冲液作部分改良。

1.2.3 试剂盒法 参照康为世纪生物技术公司使用手册方法操作。①取 100 mg 的核桃内果皮材料在液氮中充分研磨,将研磨的粉末收集到 1.5 mL 的离心管中。②加入 500 μ L 复杂植物总 RNA 抽提试剂,反复吹打几次,使样本充分裂解。室温放置 5 min,使蛋白核酸复合物分离。③4℃,12 000 r/min 离心 1 min,将上清转移到一个新的离心管中。④在得到的水相溶液中加入 100 μ L 5 mol/L NaCl,混匀。⑤加入 300 μ L 氯仿,上下颠倒充分混匀。⑥4℃,12 000 r/min 离心 10 min,将上清转移到一个新的离心管中。由于提取的核桃内果皮组织中富含多糖多酚,需重复 1 次步骤 5、6。⑦加入等体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min。⑧4℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心吸弃上清,注意不要吸弃 RNA 沉淀。⑨加入 1 mL 75%乙醇,4℃,5 000 r/min 离心 3 min,小心吸弃上清,注意不要吸弃沉淀。⑩室温放置 2~3 min,晾干。加入 30~50 μ L 无 RNase 的水,充分溶解 RNA,得到的 RNA 保存在-70℃,防止降解。

1.2.4 RNA 完整性分析 将以上方法提取的 RNA 分别取 2 μ L,在 1.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。在凝胶成像系统下观察 RNA 条带完整性,并照相记录。

1.2.5 RNA 纯度分析 用紫外分光光度计测定所提 RNA 样品在波长为 230、260、280 及 340 nm 的 OD 值以及测定 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 的值,计算 RNA 产率。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取总 RNA 完整性比较

CTAB 法II和试剂盒法提取核桃内果皮 RNA 得到的白色 RNA 沉淀,透明且较易溶于无 RNase 的水,CTAB 法I提取 RNA 得到白色沉淀,但沉淀不透明,不易

表 1

3 种方法提取总 RNA 纯度和产率

Table 1

The quality and output of total RNA isolated by three methods

RNA 提取方法 The method of RNA isolated	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{340}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	RNA 产率 Production rate of RNA/ μ g \cdot g ⁻¹
CTAB 法I The CTAB I method	0.486	0.759	0.493	0.102	1.540	1.562	75.9
CTAB 法II The CTAB II method	0.430	0.861	0.478	0.086	1.801	2.002	86.1
试剂盒法 The RNA plant Reagent	0.424	0.964	0.469	0.021	2.055	2.247	96.4

3 结论与讨论

好的 RNA 提取方法要求 RNA 没有降解,质量好、产率高,保证 RNA 的完整性。由于核桃内果皮在结构和组成上有自身的特点,其组织木质化程度高,细胞壁较厚,前期细胞壁破碎困难,耗时长,RNA 易污染、降解;

溶解。3 种方法从核桃的内果皮中提取的总 RNA 经非变性琼脂糖凝胶电泳,紫外照相检测可见清晰的 3 条 rRNA 带,无明显拖尾。由图 1 可知,3 种方法提取的核桃内果皮总 RNA 均可见 28 s、18 s 和 5 s RNA 带谱。试剂盒法提取的 RNA 明显优于 CTAB 法I和 CTAB 法II,其条带清晰、稳定、明亮,说明提取的 RNA 样品完整,未发生降解;CTAB 法II提取得到的 RNA 较完整,但与试剂盒法提取的 RNA 相比亮度较弱,说明 RNA 得率没有试剂盒法 RNA 得率高;CTAB 法I提取的 RNA 电泳后的 3 条带模糊、略微拖带,且 5 s rRNA 较宽,说明在提取过程中 RNA 降解严重,条带的亮度较弱,说明此方法提取 RNA 的得率不高。

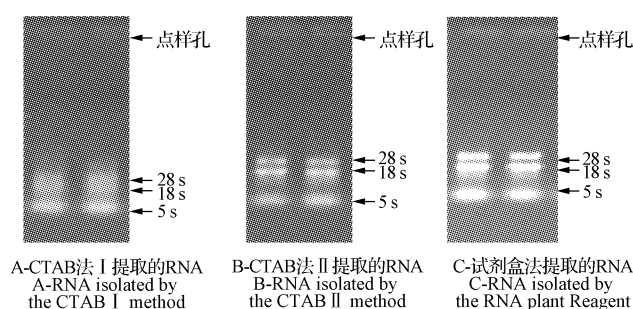


图 1 3 种方法提取总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis RNA isolated by the three methods

2.2 3 种方法提取总 RNA 纯度和产率比较

高纯度 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.1。 OD_{260}/OD_{280} 值小于 1.8,表明蛋白杂质较多; OD_{260}/OD_{280} 值大于 2.2,表明 RNA 已经降解^[6]。由表 1 可知,试剂盒法和 CTAB 法II提取的 RNA OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.1,这表明所提取的总 RNA 中无蛋白质、多糖和酚类物质的干扰。 OD_{340} 表示样品的浑浊度,试剂盒法提取的 RNA 浑浊度最低,其纯度较高,产率也较高,完全满足逆转录的要求^[7]。CTAB 法I提取的核桃内果皮 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.540,说明在提取 RNA 过程中存在太多的蛋白杂质和小分子物质,RNA 发生降解,且 CTAB 法I提取的 RNA 产率也较低,RNA 质量较差。

且富含多糖多酚,酚类化合物被氧化后会与 RNA 不可逆地结合,导致 RNA 活性丧失或形成不溶性复合物,而多糖会形成难溶的胶状物,与 RNA 共沉淀下来^[8-10]。

该研究的 3 种试验方法均可提取出 RNA,但提取出的 RNA 质量有很大差别,与试剂本身的各种成分差

异有关^[11]。高浓度的 NaCl 是去除多糖最主要的成分之一,CTAB 法I和 CTAB 法II所用缓冲液的 NaCl 浓度为 4 mol/L,而试剂盒法单独用 5 mol/L 的 NaCl 去除多糖较彻底。较高浓度的 β -巯基乙醇与 CTAB 协同作用可以部分去除多糖杂质, β -巯基乙醇还可以作为强还原剂防止多酚氧化,打断多酚氧化酶的二硫键使之失活,与 PVP 进行协同作用有效抑制酚类物质对 RNA 纯度的影响^[12],CTAB 法I和 CTAB 法II缓冲液中用 4% β -巯基乙醇,而试剂盒法中 β -巯基乙醇与提取试剂以 1:4 体积混合,试剂盒法中用高浓度的 β -巯基乙醇充分去除多酚。试剂盒法用异丙醇沉淀 RNA,异丙醇沉淀的核酸比较紧凑,贴壁紧,用乙醇漂洗时 RNA 不易损失,所得 RNA 产率高;且试剂盒法提取 RNA 用时短,RNA 沉淀完全,效率高。CTAB 法II用 LiCl 沉淀 RNA,虽然沉淀效果较好,但是需 4℃ 沉淀过夜,所用时间过长;且后续要完全去除 LiCl,才能保证 RNA 沉淀无污染。CTAB 法I用 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积无水乙醇沉淀 RNA,沉淀的核酸比较蓬松,容易从壁上移动,漂洗过程中 RNA 易脱落,所得 RNA 产率低;且存在污染,后续对 RNA 进行纯化增加了试验成本^[13]。

该试验用复杂植物总 RNA 提取试剂的试剂盒方法提取核桃内果皮 RNA,此法获得的核桃内果皮总 RNA 纯度和产率较高,完整性较好,多糖及酚类等物质去除较彻底,为核桃内果皮的后续分子生物学研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 郝荣庭,张毅萍. 中国果树志核桃卷[M]. 北京:中国林业出版社,1996.
- [2] 程水源,陈昆松,杜何为,等. 银杏 RNA 的提取[J]. 果树学报,2005,22(24):428-429.
- [3] 徐昌杰,陈昆松,张波,等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报,2004,21(2):136-140.
- [4] 刘晓菊,洪海波,李敏,等. 改良 CTAB 法提取核桃总 RNA 试验[J]. 山东农业科学,2008(1):97-99.
- [5] 许锋,蔡荣,陈柳吉,等. 核桃不同组织高质量总 RNA 的提取方法[J]. 果树学报,2008,25(2):435-439.
- [6] 黄钰,李旭双,陈典,等. 分蘖洋葱叶片 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 北方园艺,2011(14):111-113.
- [7] 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,2002,33(2):122-125.
- [8] Schneiderbauer A, Sandermann H Jr, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem,1991,197:91-95.
- [9] Graham G C. A method for extraction of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers [J]. Plant Mol Biol Reprtr,1993,11:32-37.
- [10] Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms [J]. Plant Mol Biol Reprtr,1994,12:20-25.
- [11] 沈乾,夏国华,张秋月,等. 山核桃花芽总 RNA 提取方法研究[J]. 浙江林业科技,2009,29(3):57-60.
- [12] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter,1993,11:113-116.
- [13] 宋蓓,赵锦,刘孟军,等. 改良 CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立[J]. 中国农学通报,2007,23(7):79-83.

Methods for RNA Isolation from Fruit Endocarp of *Juglans regia* L.

TANG Yan^{1,2}, XU Long^{1,2}, WANG Xin-jian¹, ZHANG Rui³

(1. College of Plant Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production Construction Corps, Alar, Xinjiang 843300; 3. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: *Juglans regia* L. endocarp were employed as materials in this report, because *Juglans regia* L. endocarp had high degree of lignification and endocarp were rich in polysaccharides and polyphenol compounds, the performances of three extraction methods of total RNA: CTAB1, CTAB2 and RNA plant Reagent were compared using in the *Juglans regia* L. endocarp. The results showed that the total RNA isolated by three methods had three bands. The total RNA isolated by the method of CTAB1 had trailed bands, the OD_{260}/OD_{280} value of total RNA was 1.540, the yield was 75.9 $\mu\text{g/g}$, the RNA integrality and quality were faulty. The total RNA isolated by the method of CTAB2 had intact bands, but it was caliginous, the OD_{260}/OD_{280} value of total RNA was 1.801, the yield was 86.1 $\mu\text{g/g}$, but the time of RNA isolation was consumed. The OD_{260}/OD_{280} value of RNA isolated by the method of RNA plant Reagent was 2.055, the yield was 96.4 $\mu\text{g/g}$, three bands were clean, steady and bright, that proved the method could remove polysaccharides and polyphenol compounds completely, it could extract high purity and complete RNA at a high productivity. The total RNA isolated by the method of RNA plant Reagent was high quality and productivity, the method completely was fit for further biological research.

Key words: *Juglans regia* L. endocarp; RNA isolation; the method of CTAB; the method of RNA plant Reagent