

枣树幼叶总 RNA 提取方法的比较研究

陈国梁, 陈宗礼, 孙 萍, 杨清湖, 刘咪咪

(延安大学 生命科学学院, 陕西省红枣重点实验室, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘 要:以枣树幼嫩叶片为试材, 分别采用 DEPC 水法、SDS 抽提法、CTAB-LiCl 和异硫氰酸胍法 4 种方法进行总 RNA 的提取试验, 并对其进行了紫外、变性琼脂糖凝胶电泳及 RT-PCR 检测。结果表明: 4 种提取方法中 DEPC 水法提取的总 RNA 质量最好, SDS 抽提法和 CTAB-LiCl 法次之, 异硫氰酸胍法效果最差。

关键词:枣树叶片; 总 RNA; 提取方法; 电泳

中图分类号:Q 75 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0131-03

枣原产我国, 在我国已有 2 700 余年的栽培历史, 栽培面积极广, 有 700 多个品种, 种质资源十分丰富, 但在长期的人工栽培过程中, 存在品种混杂、良莠不齐的现象^[1], 加之枣树是多年生木本果树, 具有童期长、花器小、坐果率低、无种仁或种仁率低等特点, 给杂交育种带来了较多的困难, 使得仅仅依靠常规育种的方法培育新品种举步维艰。随着生物技术的迅速发展, 给枣育种工作带来了新的思路。但是无论是利用分子生物学技术还是转基因技术开展种质资源创新或培育新品种枣树, 获得纯度高、完整性好的 RNA 是其前提条件之一。虽然植物总 RNA 的提取有一些较成熟的方法, 但由于不同植物化学组分的差异, 没有一种特定的方法适用于所有植物总 RNA 的提取。诸如枣树等木本植物叶片含有较多的蛋白质、酚类、单宁、色素、多糖, 尤以生长旺盛的幼嫩组织为甚, 严重影响枣 RNA 的提取效率, 进一步影响到其后续试验操作^[2-3]。基于此, 该研究拟以枣树幼嫩叶片为材料, 在参考多种总 RNA 提取方法的基础上^[4-11], 选取 4 种方法进行提取试验, 以期从中找出 1 种较适合枣树幼嫩叶片总 RNA 提取的方法, 为分子生物学及基因工程育种研究奠定基础。

第一作者简介:陈国梁(1974-), 男, 陕西定边人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: glc9359@163.com.

责任作者:陈宗礼(1954-), 男, 本科, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: zongli_chen@yahoo.com.cn.

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(S2009JC970); 陕西省教育厅自然科学基金资助项目(11JK0617); 延安市科学技术研究发展计划资助项目(2010kn-03); 延安大学专项科研基金资助项目(YD2010-19); 延安大学大学生科技创新训练计划资助项目(D2011-43)。

收稿日期:2012-05-18

1 材料与方法

1.1 试验材料

以狗头枣幼嫩叶片为试材, 5 月中下旬采于延安大学晨曦园, 采摘后立即用 DEPC 水清洗, 液氮速冻后于 -75℃ 冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 称取上述叶片约 100 mg, 分别采用 DEPC 水法、SDS 抽提法、CTAB-LiCl 法及异硫氰酸胍法进行总 RNA 的抽提。

1.2.2 总 RNA 质量及完整性检测 所提总 RNA 的纯度采用 Eppendorf 核酸蛋白测定仪对其吸光值及浓度进行测定^[5], 分别记录 260、230、280 nm 下的 OD 值并计算 $OD_{260/280}$ 、 $OD_{260/230}$ 及其产量。RNA 浓度 = $40 \times OD_{260}$ $\mu\text{g/mL}$, RNA 产量 = (RNA 浓度 \times 总体积数) / 来源材料的质量。根据所测的浓度, 取相同含量的 RNA 于 1.0% 的变性琼脂糖凝胶上 200 V 稳压电泳 6~10 min, 取出, EB 染色 5~10 min, 成像。

1.2.3 RT-PCR 检测 用大连宝生物公司的 M-MLV 反转录酶将 mRNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 在含有枣 ACC1 氧化酶基因的引物 ACC1-U(5'-ATG-GAGAATTTCCCAGTTATCA-3') 与 ACC1-L(5'-TTA-AGCTGTAGCAATTGGACC-3') 的 25 μL 体系(反应体系参照宝生物试剂盒)中进行 PCR 扩增。95℃ 预变性 5 min; 95℃ 40 s, 59℃ 50 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 取 5.0 μL 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 样品的纯度分析

由表 1 可知, 4 种方法提取的总 RNA 的 $OD_{260/280}$ 的值在 2.046~2.250, $OD_{260/230}$ 的值在 1.758~1.982。其中 DEPC 水法、SDS 法与 CTAB-LiCl 3 种方法的 $OD_{260/280}$ 值在 2.046~2.136, 表明 3 种方法所提总 RNA 质量较高,

蛋白质或酚类污染较少(在可容忍范围之内); $OD_{260/230}$ 值在 1.917~1.982,表明 3 种方法所提总 RNA 中有少量的小分子或盐存在。而异硫氰酸胍法的 $OD_{260/280} > 2.2$ 则表明采用该方法提取的总 RNA 大量降解, $OD_{260/230} < 1.8$ 则表明其中存在大量的小分子或盐。从

表 1 4 种方法提取总 RNA 纯度及产量的比较

Table 1 Comparison of total RNA purity and quantity of jujube leaves by different methods

	OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	$OD_{260/230}$	$OD_{260/280}$	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RNA 产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
DEPC 水法 DEPC water method	0.381	0.755	0.369	1.982	2.046	30.20	0.3020
SDS 法 SDS extract method	0.267	0.514	0.251	1.925	2.048	20.56	0.2056
CTAB-LiCl 法 CTAB-LiCl method	0.254	0.487	0.228	1.917	2.136	19.48	0.1948
异硫氰酸胍法 Isothiocyanateguanidine method	0.297	0.522	0.232	1.758	2.250	20.88	0.2088

2.2 RNA 的完整性分析

用变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 样品,不仅能判断样品中是否有 DNA 和蛋白的污染,更能从 18 S rRNA 和 28 S rRNA 的完整性判断 RNA 有无降解,因此是判断总 RNA 质量的一种重要的手段^[10]。由图 1 可知,4 种方法提取枣树叶总 RNA 经琼脂糖凝胶变性电泳检测,均出现整齐、较清楚的 28 S 与 18 S 条带。其中 DEPC 水法提取的总 RNA 电泳结果显示 28 S、18 S 与 5 S 带型整齐、无拖尾,且 28 S 带的亮度约为 18 S 带的 2 倍,加样孔及泳道均未发现有 DNA 的污染,可看出 DEPC 水法提取的总 RNA 纯度高、完整性好,但 5 S 带较宽且较亮,表明有一定程度的降解;SDS 法与 CTAB-LiCl 法提取的总 RNA 电泳出现了完整、较清晰的 28 S 与 18 S 亮度相当的条带,且几乎看不到 5 S 带型,但亮度与 DEPC 水法相比较暗,这与表 1 中产量相符。异硫氰酸胍法提取的总 RNA 18 S 带的亮度约为 28 S 带的 2 倍,表明有较大幅度的降解,这与表 1 中其 $OD_{260/280} > 2.2$ 结果相吻合。

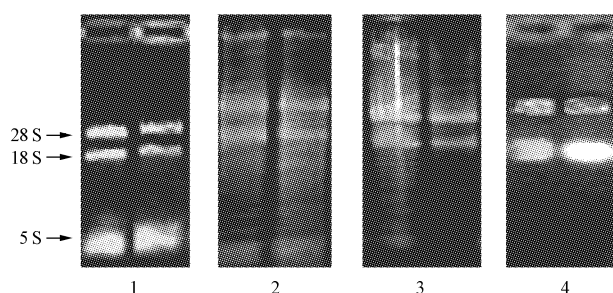


图 1 4 种方法抽提的总 RNA 电泳图

注:1:DEPC 水法;2:SDS 法;3:CTAB-LiCl 法;4:异硫氰酸胍法。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA jujube leaves by four methods

Note:1:DEPC water method;2:SDS extract method;3:CTAB-LiCl method;4:Isothiocyanateguanidine method.

RNA 产量看,DEPC 水法为 $0.302 \mu\text{g}/\text{mg}$,其它 3 种方法在 $0.20 \mu\text{g}/\text{mg}$ 左右。综合分析,DEPC 水法提取的枣树叶总 RNA 纯度、产量均高于其它 3 种方法,SDS 抽提法和 CTAB-LiCl 法次之,异硫氰酸胍法效果最差。

2.3 RT-PCR 结果电泳检测

分别用紫外及电泳检测较好的 DEPC 水法和较差异硫氰酸胍法提取的总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR,产物进行电泳分析。由图 2 可知,DEPC 水法提取的 RNA 反转录后进行 PCR,产物大小约为 960 bp,与预期结果相符。异硫氰酸胍法提取的 RNA 反转录后进行 PCR,没有任何条带。经重复试验,结果一致。可见 DEPC 水法是提取枣幼嫩叶片总 RNA 的较好方法,提取的 RNA 产物可满足诸如 RT-PCR 等后续分子生物学研究,而异硫氰酸胍法提取的总 RNA 则不能用于进一步试验。

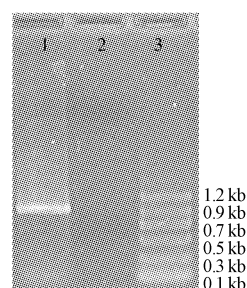


图 2 枣 ACC1 氧化酶基因的 RT-PCR 产物电泳图

注:1:DEPC 水法的 RT-PCR 产物;2:异硫氰酸胍法的 RT-PCR 产物;3:Marker II。

Fig. 2 RT-PCR amplification of ACC1 oxidase gene from jujube leaf

Note:1. RT-PCR products of DEPC water method;2. Isothiocyanateguanidine method spectively; 3:Marker II.

3 讨论

该试验所采用的 4 种方法均需研磨、抽提、沉淀、洗涤 4 个步骤。4 种方法除研磨和洗涤 2 个步骤完全相同外,其在抽提过程所用试剂、抽提次数及沉淀过程中所用试剂和沉淀次数均有所不同,所耗时间也略不同(表 2)。结合紫外、甲醛-琼脂糖变性电泳及 RT-PCR 检

表 2 枣树幼叶总 RNA 4 种提取方法的过程比较

Table 2 Comparison of four methods process for extracting of total RNA from jujube leaves

	DEPC 水法	SDS 法	CTAB-LiCl	异硫氰酸胍法
	DEPC water method	SDS extract method	CTAB-LiCl method	Isothiocyanateguanidine method
研磨 Grind	*	*	*	*
抽提 Extract	DEPC 水及 1 : 1 酚氯仿 1 次、氯仿 2 次	SDS 提取液与酚 : 氯仿 : 异戊醇 (25 : 24 : 1) 及氯仿各 1 次	CTAB 提取液与氯仿 / 异戊醇及氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 各 1 次	异硫氰酸胍与氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 1 次
沉淀 Precipitation	400 μL 10 M 的 LiCl 和无水乙醇 1 次	NaAc 和无水乙醇沉淀	250 μL 10M 的 LiCl 1 次	异丙醇 (−20℃) 2 次
洗涤 Scrubbing	无水乙醇 2 次	无水乙醇 2 次	无水乙醇 2 次	无水乙醇 2 次
时间 Time	约 3.0 h	约 2.5 h	约 3.5 h	约 3.0 h
质量 Quality	+++++	+++	+++	+

注：* 表示此步骤过程相同，+ 表示提取质量的好坏。

测,可得出 4 种提取方法中 DEPC 水法提取的总 RNA 质量最好,SDS 抽提法和 CTAB-LiCl 法次之,异硫氰酸胍法效果最差。DEPC 水法所用的试剂均为常规试剂,成本低,而且操作简单、易行,耗时较短,不需要特别的仪器设备,所得 RNA 完整性好且纯度、产量较高,可满足诸如 RT-PCR 之类的试验要求,是一种较简单、高效、经济的适合枣树幼嫩叶片总 RNA 提取的好方法。

成熟的叶片组织多糖及酚类化合物含量一般较高,多糖以及糖蛋白会形成难溶的胶状物影响 RNA 的提取效率,进而影响到其后续试验操作。该试验材料为枣树幼嫩叶片,多糖及酚类物质含量相对较低,在抽提过程中通过加入 1/3 体积的 5 mol/L 醋酸钾溶液以沉淀多糖,减少多糖的干扰,同时加大了变性液的用量,以抑制内源性 RNase 活性,均收到了较好的效果。但是不同的总 RNA 提取方法各有优缺点,在不同物种或不同组织,或同一物种相同组织的不同生长时期存在差异,为确保获得高质量的 RNA 以及和相关研究中能更好的利用,有必要针对上述差异建立更理想的总 RNA 提取方法^[12]。

参考文献

[1] 李继东,武应霞,冯建灿,等. 枣 RNA 提取方法的比较[J]. 经济林研究,2010,28(4):15-19.

[2] 王玉成,杨传平,姜静. 木本植物总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2):1-4.

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

[4] 彭学贤,刘俊君,项瑜,等. 植物分子生物技术手册[M]. 北京:化学工业出版社,2006:7-16.

[5] 何光源,陈明洁,杨广笑,等. 植物基因工程实验手册[M]. 北京:清华大学出版社,2007:12-14.

[6] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南.[M]. 3 版. 黄培堂,等,译. 北京:科学出版社,2003:582-584.

[7] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京:科学出版社,2004:43-49.

[8] 张雅琼,郭华春. 魔芋叶片中 4 种总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2010,8(1):196-200.

[9] 王暑辉,徐倩,徐筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(1):76-80,89.

[10] 谭丽丽,燕正民,徐亚英,等. 番茄叶片总 RNA 提取方法的比较[J]. 东北农业大学学报,2010,41(4):29-32.

[11] 肖旭峰,姜文轩,吴才君,等. 野葛块根总 RNA 的不同提取方法比较研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(1):147-150.

[12] 李晓颖,曹雪,房经贵,等. 杏叶片与果实总 RNA 提取方法研究[J]. 中国农学通报,2010,26(2):152-156.

Comparison of Four Methods for Extracting of Total RNA From Young Jujube Leaves

CHEN Guo-liang, CHEN Zong-li, SUN Ping, YANG Qing-hu, LIU Mi-mi

(College of Life Science, Yan'an University, Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube, Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conversation and Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an, Shaanxi 716000)

Abstract: Taking young jujube leaves as material, RNA in jujube leaves was extracted by the DEPC water method, SDS method, CTAB-LiCl method and isothiocyanate guanidine method. The quality of the total RNA was tested by nuclear acid/protein analyzer, denaturation agarose gel electrophoresis and RT-PCR. The results showed that total RNA extracted by DEPC water method had the best quality and reliability, followed by SDS extraction method and CTAB-LiCl method, the isothiocyanate guanidine method was the worst.

Key words: young jujube leaves; total RNA; extraction method; electrophoresis