

葡萄叶片中提取总 RNA 的三种方法比较

杨晓燕¹, 张波^{1,2}, 黄方爱¹, 颜欢¹, 李月荣¹

(1. 石河子大学 药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 农业部新疆特种资源植物药重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘 要:采用试剂盒法、热酚法和 LiCl 沉淀法 3 种方法提取葡萄叶片总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 检测总 RNA 的完整性和提取纯度。对红地球葡萄叶片总 RNA 提取方法做比较, 以得到完整的、高质量的葡萄 RNA。结果表明: LiCl 沉淀法提取的 RNA 收率高, 完整性好, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.80~2.00, 纯度高, 28S、18S 条带清晰完整。可以满足后续分子生物学的研究。

关键词:红地球葡萄叶片; 总 RNA; LiCl 沉淀法; 提取方法

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0087-04

RNA 是基因表达过程中非常重要的生物分子, 如 mRNA, 它携带了 DNA 的全部编码信息。RNA 的分离是研究基因功能的重要基础之一, 在分子生物学中占有重要的地位。植物细胞内的 RNA 主要是 rRNA (占 80%~85%)、tRNA 及小分子 RNA (占 10%~15%) 和 mRNA (占 1%~5%)。rRNA 含量最丰富, 由 25S、18S 和 5S 组成。一般情况下, 提取的总 RNA 也可用于构建 cDNA 文库, 或通过 Northern blot 及 RT-PCR 分析基因表达情况, 还可用于基因表达谱分析。近年来发展的高通量测序技术和高性能的生物信息分析技术对于 RNA 的质量要求极高, 这使得 RNA 提取在完整性和纯度方面有了更高的要求。RNA 提取一般使用蛋白质强变性剂有效抑制 RNA 酶活性, 同时使 DNA 变性, 再通过有机溶剂反复抽提去掉蛋白质、多糖等物质, 在 RNA 沉淀剂的作用下, 针对性分离出 RNA。由于 RNA 酶活性强, 故要得到无降解 RNA 难度比较大。尤其是植物细胞具有坚硬的细胞壁, 细胞内有较大的液泡及内含物, 以及与核酸极性接近的多糖、多酚及其它次生代谢物, 使得植物材料 RNA 的提取难度高于动物材料。

目前适用于植物材料 RNA 提取的方法有多种, 其中异硫氰酸胍法^[1-2]、SDS 法^[3]、CTAB 法^[4]、热硼酸盐法^[5]、冷酚法^[6]、氯化锂沉淀法及商品化的 Trizol 试剂盒较为常用^[7]。在不同因子对葡萄植保素合成途径调控

的研究中, 需要使用葡萄叶提取高质量 RNA。虽然曾有提取葡萄各组织 RNA 的方法报道^[8-11], 但在实际操作过程中, 次生代谢产物一直是 RNA 测序分析研究中的障碍^[12]。葡萄叶片多糖多酚物质含量较高, 由于其一些理化性质与 RNA 相似, 所以在去除多糖多酚操作的同时 RNA 也容易被裹带走, 很难将它们分开, 造成 RNA 产量的减少。在沉淀 RNA 时也容易产生含有多糖的 RNA 凝胶状沉淀, 这种 RNA 沉淀难溶于水, 或溶解后产生粘稠状的溶液, 不利于后续试验操作。此外, 多糖还可以抑制许多酶的活性; 因此, 污染了多糖的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究^[13-14]。多酚类物质是葡萄等植物优势的次生代谢产物, 它很容易被氧化成褐色的醌类物质, 而醌类物质与 RNA 不可逆的结合, 同样抑制了 RNA 的活性^[15]。因此, 含有多糖多酚的 RNA 样品很难满足进一步分子生物学的需要。为此, 该试验试图通过比较试剂盒法、热酚法和 LiCl 沉淀法的提取效果, 以期找到一种适合于葡萄叶片 RNA 提取的最优方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为红地球葡萄 (*Vitis vinifera* L. cv. Red Globe) 1 月龄叶片, 取自于石河子大学药园。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取方法 试剂盒法 (试剂盒购自上海生工生物公司): 参照说明书, 步骤如下: 将 0.1 g 新鲜叶片剪成碎片放入 1.5 mL 离心管中, 直接在 1 mL Trizol 中研磨, 将裂解后的液体或匀浆液在室温下放置 5 min, 加 0.1 mL 100 μ L 氯仿, 盖上 EP 管, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min 或上下颠倒混合 2 min; 将混合液在 4℃、10 000 r/min 下离心 10 min; 将上清液尽可能多的转移

第一作者简介:杨晓燕(1987-), 女, 硕士, 研究方向为生物技术制药。E-mail: yezixy@sina.com

责任作者:张波(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术制药。E-mail: Bozhang_lzu@126.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860032; 31160058); 兵团博士资金资助项目(2011BB018)。

收稿日期:2012-10-18

到新的离心管中,缓慢加入无水乙醇(为转移液体积 0.5 倍),均匀混合;将得到的溶液和沉淀一起转入到 UNIQ-10 柱中,室温下 10 000 r/min 离心 30 s,弃流出液,向 UNIQ-10 柱中加 500 μ L 漂洗液 RPE(用前按照说明书加入乙醇),室温静置 2 min,10 000 r/min,室温离心 30 s;重复 1 次。将 UNIQ-10 放入 2 mL 离心管中,10 000 r/min,室温离心 1 min,去除残留液,置超净工作台通风 5~10 min,将 UNIQ-10 转入新的离心管中,加 40 μ L ddH₂O,室温放置 2 min;10 000 r/min,室温离心 2 min,置于-80℃冰箱中保存备用,每个样品做 3 次重复。

热酚法:参照文献[16],称取 0.1 g 葡萄叶片,于液氮中研磨成粉末,加入到 60℃预热的 750 μ L RNA 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 5.6, 20 mmol/L EDTA, 2% SDS, 100 mmol/L LiCl, 0.2% PVP)和 750 μ L 酚氯仿(水饱和酚和氯仿 1:1)中,涡旋器上震荡 20 s,继续加热 5 min;然后置于室温下数分钟,置于 4℃、10 000 r/min 下离心 15 min;取上清液(尽量不要吸取下层杂质),加入等体积的预冷的酚氯仿,混匀,10 000 r/min 离心 15 min;取上清液,加入等体积的预冷的氯仿,混匀,10 000 r/min 离心 15 min;取上清,加入等体积的预冷的异丙醇,混匀,室温放置 10 min,10 000 r/min 离心 15 min,弃上清;沉淀用预冷的 75%乙醇洗 1 遍;倒去 75%乙醇,离心机轻甩一下,用枪头吸干余下 75%乙醇,室温放置 5~10 min。加入 40 μ L DEPC 水,置于-80℃冰箱中保存备用,每个样品做 3 次重复。

LiCl 沉淀法是基于改良 CTAB 法^[17-18]改进获得,称取 0.1 g 葡萄叶片,于液氮中研磨成粉末,迅速转入 1.5 mL 离心管内,加 600 μ L 的 RNA 提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 1% SDS, 2% PVP), 30 μ L β -巯基乙醇,离心 15 min 取上清液加等体积的抽提液(水饱和酚:氯仿=1:1), 4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 重复抽提 1 次,取上层水相加 2 倍体积的 4 mol/L LiCl 溶液, 4℃过夜, 4℃ 10 000 r/min, 离心 15 min, 75%的乙醇洗 2 次沉淀,置超净工作台吹风 8 min,加 40 μ L DEPC 水,置于-80℃冰箱中保存备用,每个样品做 3 次重复。

1.2.2 总 RNA 检测及纯度分析 RNA 样品非变性琼脂糖凝胶电泳检测。取总 RNA 溶液在 1%琼脂糖凝胶上电泳,电压 120 V, 15 min(恒流恒压电泳仪,美国 Bio-Rad 公司),用凝胶成像系统(Bioshine Gel X 1650 凝胶成像系统,上海欧翔科学仪器有限公司)拍照记录。浓度检测方法:Qubit 2.0 Fluorometer(美国 invitrogen 公司);琼脂糖凝胶电泳定量;Agilent 2100(美国安捷伦科技公司)。28S:18S 检测方法:Agilent 2100。

1.2.3 RNA 样品的 RT-PCR 检验 RT-PCR 是基因克隆、转基因植物分子鉴定等分子学试验的重要方法之

一,它对 cDNA 的纯度和质量都有较高的要求。提取葡萄叶片的 RNA 可用性效果,进行 RT-PCR 验证。cDNA 第 1 条链合成根据(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit,美国 Fermentas 公司)推荐方法进行;内参选用 18S rRNA 基因(美国 BIO-RAD, C-1000)^[19]见表 1, RT-PCR 反应及电泳相关步骤参考文献[19]。

表 1 引物序列

引物缩写	登录号	引物序列	分子量/kD
18S	AF207053	5'-TGGCCTTCGGGATCGGAGTAA-3' 5'-ATCCCTGGTCGGCATCGTTTAT-3'	201

2 结果与分析

2.1 不同方法提取 RNA 完整性检测

由图 1 可以看出,试剂盒中采用 Trizol 裂解细胞, RNA 条带不清晰,有拖尾现象,未能得到完整性较好的 RNA(图 1 A),说明 Trizol 法裂解细胞提取 RNA 的试剂盒不适合该试验所选取葡萄叶材料。采用热酚法提取的 RNA 条带分离的不清晰(图 1 B),有拖尾现象。热酚法未能消除多糖多酚的干扰,加异丙醇沉淀 RNA 时会出现一些沉淀物质,虽然在加水溶解 RNA 时沉淀也随之溶解,但从电泳结果看,加样孔和泳道有明显亮点。LiCl 沉淀法提取的 RNA, 28S 和 18S 条带清晰完整,前者亮度及可见性显著高于后者,无可见的弥散现象(图 1 C),无 DNA 污染, RNA 的完整性较好。

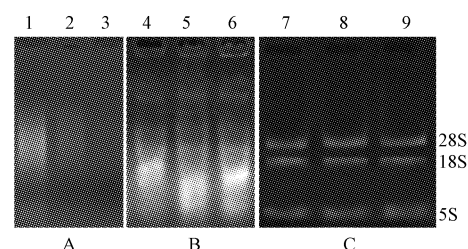


图 1 3 种方法提取葡萄叶片总 RNA 电泳图

注: A(1~3): 试剂盒法; B(4~6): 热酚法; C(7~9): LiCl 沉淀法。

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA by three methods from grape leaves

Note: A(1~3): RNeasy Mini Kit method; B(4~6): Hot phenol method; C(7~9): LiCl precipitation method.

2.2 RNA 纯度和浓度检测

260、280 nm 下的吸光值代表了核酸、蛋白及有机物的含量。高纯度的 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应该介于 1.8~2.0 之间。从表 2 可以看出,采用 LiCl 沉淀法提取的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.8~2.0 之间,说明采用 LiCl 沉淀法提取的 RNA 没有蛋白质和多糖多酚等其它杂质,而且 RNA 的产量都大于 100 ng。而试剂盒法和热酚法提取的 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 未达到 1.8,这种纯度更适合做 RT-PCR 试验,但是如需做高通量测序和高性能的一些生

物信息分析试验,试剂盒法和热酚法提取的 RNA 质量还不能满足要求。为了保证后续试验的准确性,试验又采用 Agilent 2100 对 LiCl 沉淀法提取的 RNA 样品纯度和质量进行深度分析,检测结果见图 2。

表 2 不同方法提取的葡萄叶片
总 RNA 纯度及产量的比较

Table 2 Purity and yield comparison of total RNA from
grape leaves by different methods

方法	编号	原液浓度/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	体积/ μL	总量/ μg	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
试剂盒法	1	30.0	13.0	0.3900	1.78
	2	18.0	12.8	0.2304	1.64
	3	27.0	25.0	0.675	1.77
热酚法	4	516.0	9.6	4.9536	1.43
	5	171.0	12.0	2.0520	1.57
	6	585.0	12.8	0.2304	1.44
LiCl 沉淀法	7	501.0	21.5	10.7715	1.84
	8	576.0	21.0	12.0960	1.84
	9	522.0	30.0	15.6600	1.93

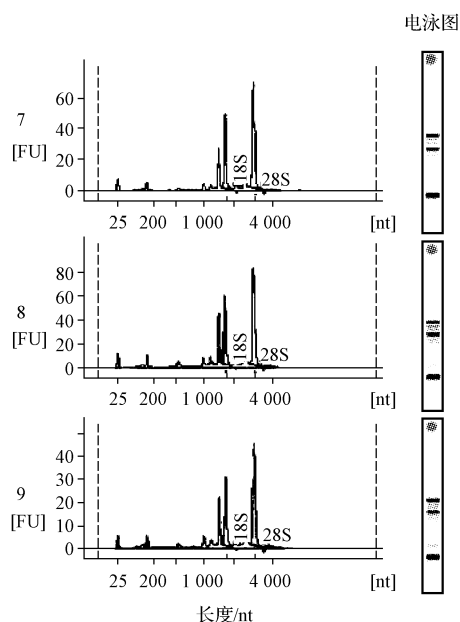


图 2 Agilent 2100 RNA 芯片对 LiCl 沉淀法提取的
总 RNA 电泳 28S 和 18S 质量

注:7~9;LiCl 沉淀法提取的总 RNA。

Fig. 2 Electrophoresis quantitation of total RNA from LiCl
precipitation method by Agilent 2100 chip inspection

Note:7~9 mean total RNA extracted by LiCl precipitation method.

从表 3 中可以看出,采用 Agilent 2100 RNA 芯片检测 LiCl 沉淀法提取的 3 个 RNA 重复样品,3 个 RNA 重复样品的 28S 条带大小都是 18S 的 1.6 倍,分离度好。Agilent 2100 RNA 芯片检测 LiCl 沉淀法提取的 7 号 RNA 样品总范围为 217.0,浓度为 167 $\text{ng}/\mu\text{L}$,RNA 完整性为 8.40;8 号 RNA 样品总范围为 340.2,浓度为 192 $\text{ng}/\mu\text{L}$,RNA 完整性为 7.70;9 号 RNA 样品总范围为 182.6,浓度为 174 $\text{ng}/\mu\text{L}$,RNA 完整性为 7.90。这些结果表明 RNA 的纯度和完整性都是较高的。

表 3 Agilent 2100 RNA 芯片
检测 LiCl 沉淀法提取总 RNA 质量

Table 3 Quantitation of total RNA from
LiCl precipitation method by Agilent 2100 chip inspection

编号	名称	始长/nt	末长/nt	面积	占总面积的百分比/%	28S:18S
7	18S	1 636	1 933	41.1	19.0	1.6
	28S	2 771	3 455	67.7	31.2	
8	18S	1 642	1 944	51.8	15.2	1.6
	28S	2 799	3 409	84.7	24.9	
9	18S	1 638	1 923	28.3	15.5	1.6
	28S	2 826	3 449	45.1	24.7	

2.3 RT-PCR 扩增的内参基因

图 3 是 LiCl 沉淀法中 7、8、9 号样品的内参基因表达情况,可以看出内参基因 18S rRNA 稳定表达,表达量几乎不变,这 3 个样品经过 cDNA 逆转录和 PCR 扩增试验后,18S rRNA 的含量测定未受影响,说明用 LiCl 沉淀法提取的 RNA 完整性好。

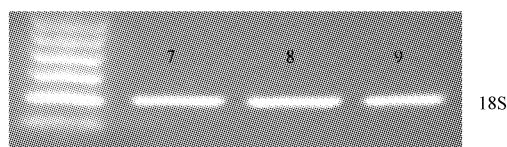


图 3 18S rRNA 的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR amplification results of the 18S rRNA

3 讨论

RNA 的提取程序一般包括裂解细胞、沉淀细胞、抽提和沉淀。葡萄叶片材料中富含大量的多酚,在裂解细胞时,在多酚氧化酶作用下,被氧化成醌类物质,另外,多糖也会造成一定量 RNA 的降解和丢失,从而影响核酸的提取及降低提取质量^[20]。试验结果证明,利用试剂盒法和热酚法可以从葡萄叶片中提取到总 RNA,而 LiCl 沉淀法更适合葡萄叶片总 RNA 抽提。与试剂盒法和热酚法相比,LiCl 沉淀法在提取液中同时加入还原剂 PVP 和 β -巯基乙醇,避免了醌类物质与 RNA 相结合^[21]。

另外,LiCl 沉淀法中高浓度盐 NaCl 存在将使大量多糖存在下层沉淀溶液中,RNA 则保留在上层溶液中,从而可达到去除多糖的作用^[22],但高浓度的盐存在会影响核酸的进一步操作,因此必须用乙醇多次洗涤脱盐。在核酸提取时,酚与氯仿均起到变性的作用。酚的变性能力强于氯仿,但酚与水有一定的互溶,因此酚抽提后,除可能损失部分核酸外,水相中还会残留酚,而酚的存在将对核酸的酶反应产生强的抑制,因此在 LiCl 沉淀法的操作中适用酚/氯仿混合变性。该试验操作过程中发现,抽提过程中若蛋白质含量或其它的杂质还较多,可以增加抽提次数,以增加提取率;另外提取 RNA 尽量在低温下操作,如果条件不允许,在室温下操作的时间要尽可能的短。

葡萄叶片组织的粉碎亦是一个不容忽视的环节,

LiCl 沉淀法采用液氮研磨法,前期液氮不能挥干,边研磨边加液氮,待叶片放热后快速研磨,研至细粉末即可,且时间不可过长。

利用 LiCl 沉淀法提取的葡萄叶片总 RNA 完整性好、产率高。LiCl 沉淀法得到的总 RNA 适合用于 cDNA 构建及进行相关 RT-PCR 等分子生物学分析,有关 LiCl 法 RNA 脱糖及多酚效果提升仍有一定空间,条件满足后,也可以给 RNA 测序提供合适的样品。

参考文献

- [1] 王文锋,肖月华,侯磊,等. 棉花总 RNA 的快速提取方法[J]. 河南农业大学学报,2002,36(3):229-231.
- [2] 胡国斌,梅兴国,刘怡. 改良异硫氰酸胍一步法提取红豆杉细胞 RNA[J]. 生物技术,2001,11(5):31-33.
- [3] 成建红,张玉刚,李天忠. 室温离心 SDS 法快速提取苹果等植物组织 RNA[J]. 园艺学报,2006,33(3):470.
- [4] 刘洋,何心尧,马红波,等. 用 CTAB-PVP 法提取棉花各组织总 RNA 的研究[J]. 中国农业大学学报,2006,11(1):53-56.
- [5] Wan C H, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton(*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Anal Biochem,1994,223(1):7-12.
- [6] 刘长军,孟玉玲,侯嵩生,等. 棉花法呢基焦磷酸合酶 cDNA 克隆、序列分析及其在种子发育过程中的表达特征[J]. 植物学报,1998,40(8):703-710.
- [7] Reid K E, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development[J]. BMC Plant Biology,2006,6(27):1-11.
- [8] 赵巍巍,宗成文,曹后男,等. 葡萄花序总 RNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(32):16161-16162.
- [9] 张今今,王跃进,王西平,等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. 果树

学报,2003,20(3):178-181.

- [10] 房经贵,高志红,陶建敏. 一种提取葡萄芽中总 RNA 的方法[J]. 生物技术,2003(2):24-25.
- [11] 鲁晓燕,赵英,孙文英. 一种有效的葡萄叶片总 RNA 提取方法[J]. 新疆农业科学,2004,41(6):456-457.
- [12] 李西萍,牛建新,张强,等. 葡萄茎痘病毒病的 RT-PCR 检测[J]. 果树学报,2005,22(6):715-716.
- [13] 宋红苗,马杰,徐祥彬. 一种从富含多糖果实中提取 RNA 的方法[J]. 浙江农业科学,2012(1):87-89.
- [14] Lewinsohn E, Steel L C, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms[J]. Plant Mol Biol Rep,1994(12):20.
- [15] 周向红,易乐飞,王萍. 桑椹总 RNA 抽提方法的比较[J]. 食品科学,2011,32(12):209-212.
- [16] 司爱君,阮孟斌,谢宗铭. 改良热酚法快速提取棉花不同组织 RNA [J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8830-8832.
- [17] Wang Y, Li Z, Liu X X, et al. A Comparative Study on Three Methods for the Extraction of Total RNA from *Pinus bungeana* [J]. Agricultural Biotechnology,2011,12(5):663-665.
- [18] 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.
- [19] 赵晓,马会勤,陈尚武,等. 葡萄果实发育后期半定量 RT-PCR 内参基因的优选[J]. 中国农业大学学报,2010(15):7-14.
- [20] Wang C S, Vodkin L O. Extraction of RNA from tissues containing high levels of proeyanidins that bind RNA[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994,12(2):132-145.
- [21] 闫光照,郑根昌,等. β -巯基乙醇与 PVP 在红干椒 DNA 提取中的比较研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2009,24(1):51-53.
- [22] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio Techniques,1992,13(1):52-56.

Comparative Study on Three Methods for the Extraction of Total RNA from Grape Leaves

YANG Xiao-yan¹, ZHANG Bo^{1,2}, HUANG Fang-ai¹, YAN Huan¹, LI Yue-rong¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002; 2. Constructing Key Lab by Province and MOST of Xinjiang Special Plant Resources, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: Three extraction methods of RNeasy Mini Kit, hot phenol method and LiCl precipitation were used to extract total RNA from grape leaves, and their integrity and purity were detected by via agarose gel electrophoresis and Agilent 2100 analyser for a comparative study, in order to compare three RNA extraction methods and find out the suitable one for isolating intact and high quality total RNA from grape leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Red Globe). The results showed that among the three extraction methods, LiCl precipitation method demonstrated higher yield and better integrity of total extracted RNA, with a OD_{260}/OD_{280} ratio between 1.8~2.0 and clear 28S and 18S bands in electrophoresis pattern. It could meet the need in molecular biological studies.

Key words: grape leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe; total RNA; LiCl precipitation method; extraction methods