

不同方法提取木薯茎总 RNA 效果的比较研究

曾文丹^{1,2}, 罗兴录¹, 袁圣勇¹, 杨鑫¹, 郭雅静^{1,2}

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西 南宁 530007)

摘 要:以木薯为试材, 采用异硫氰酸胍法、热硼酸盐法、Trizol 法、TransZol Plant 试剂盒法 4 种不同方法分别提取木薯茎中总 RNA, 并对其提取效果进行了比较分析, 探讨木薯总 RNA 的有效提取方法。结果表明: 除了热硼酸盐法不能有效地提取木薯茎中总 RNA 以外, 其余 3 种方法均能有效地提取木薯茎中总 RNA。其中异硫氰酸胍法提取效果最好, 不仅提取耗时最短, 仅为 1.5 h, 而且提取的总 RNA 质量和纯度相对最好。该方法是一种适合于木薯茎中总 RNA 提取的简单高效的方法。

关键词:木薯; 总 RNA; 不同提取方法; 提取效果

中图分类号:S 533 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0103-04

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属大戟科 (Euphorbiaceae) 植物, 与马铃薯、红薯并列为世界三大薯类作物。木薯具有良好的综合利用价值, 其产品用途涉及领域广泛, 在饲料、食品、化工、造纸、纺织、医药、建筑等行业中广泛应用。同时, 随着煤、石油、天然气等不可再生能源的日渐枯竭, 木薯作为一种生物质燃料—酒精原料, 越来越为产业界所重视。木薯茎富含大量的黄酮类、酚类、多糖、蛋白质、脂肪及纤维素等次级代谢产物, 严重干扰了总 RNA 的提取^[1]。而高质量的 RNA 是进行植物分子生物方面研究的基础。RT-PCR、cDNA 合成、基因分析、Northern 印迹杂交等均需要高纯度、高完整性的 RNA。目前, 针对木薯块根中总 RNA 的提取已有一些试验报道^[2]; 且该课题组曾针对木薯组织中总 RNA 提取也进行了一定的试验研究^[3-4]。但均未取得理想的效果。该试验以“SC124”和“FX01”2 个木薯品种的茎为试材, 研究比较了改良异硫氰酸胍法、热硼酸盐法、Trizol 法、TransZol Plant 法 4 种不同方法分别提取木薯茎总 RNA 的效果。旨在寻找一种有效的提取木薯茎中总 RNA 的方法, 为木薯分子生物学及基因工程育种研究的开展奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取在广西大学农学院科研种植基地生长 120 d 的木薯品种“SC124”和“FX01”的茎作为试验材料。取新鲜样品, 用液氮速冻后, 立即放入 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

试剂: 异硫氰酸胍、DEPC、Tris-HCl、蛋白酶 K、DTT、SDS、EDTA、醋酸钠、柠檬酸钠、氯仿、异丙醇、无水乙醇、氯化钾、PVP 等均购于上海生工。Trizol 购于天根 (TIANGEN) 生化科技有限公司。TransZol Plant 提取试剂盒购于北京全式金公司。

仪器: 紫外凝胶成像系统、紫外分光光度仪、水浴锅、台式离心机、超低温高速离心机、超净工作台。

试验中所用的塑料制品均在含浓度为 0.1% DEPC 水中 37℃ 浸泡过夜, 然后 121℃ 灭菌 30 min, 60℃ 烘干备用。玻璃器皿与用具均在 180℃ 下烘烤 12 h。

1.2 试验方法

1.2.1 改良异硫氰酸胍法 参照潘华清等^[5]的方法略有改动。取 0.1 g 左右样品放入研钵中 (高温处理好的), 加入 2.0 mL 异硫氰酸胍裂解溶液 (异硫氰酸胍 150 g, 42 mmol/L 柠檬酸钠 19.8 mL, 8.3% 十二烷基肌酸钠 19.8 mL 用 DEPC 水定容至 200 mL), 研磨至看不到茎碎片。将研磨好的混合液转移到 2.0 mL 的离心管中, 加入 100 μ L 3.0 mol/L NaAc 溶液, 置于冰上 5 min。用 DEPC 水补满, 使各管平衡后, 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min。转移上清液到另 1 个管中, 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 混匀。将混合上清液转移到 RNA 纯化柱中, 冰上静置 2 min, 4℃ 8 000 r/min 离心 1 min, 弃去收集管内的液体, 重复该步操作直至将混合上清液全部转移

第一作者简介:曾文丹 (1982-), 女, 湖北随州人, 硕士, 研究方向为木薯种质资源的研究与利用。E-mail: zengwendan0700208@163.com.

责任作者:罗兴录 (1957-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为木薯栽培和育种及种质资源利用。E-mail: luoxinglu@sina.com.

基金项目:国家“973”计划资助项目 (2010CB126601); 广西自然科学基金重点资助项目 (2010GXNSFD013025); 南宁市科技攻关计划资助项目 (201109044B)。

收稿日期:2012-12-17

完毕。加入 500 μL 70%酒精(用 DEPC 水溶解)溶液, 4℃ 8 000 r/min 离心 1 min, 倒去收集管内的液体, 重复该步骤 3 次。倒去收集管内的液体后, 再次于 4℃ 8 000 r/min 离心 1 min, 以利于完全去掉离心柱内的酒精。将离心柱转至另外 1 个干净的离心管, 向离心柱中加入 30~50 μL 的 DEPC 水。冰上静置 2 min 中, 以便于溶解离心柱中的 RNA。最后于 4℃, 12 000 r/min 离心 1 min。弃去离心柱, 离心管中的液体便是 RNA 溶液, 于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 热硼酸盐法 参照裴东等^[6]的方法略有改动。用液氮将 3.0 g 样品研磨成粉末后转入 50 mL 无菌的 EP 管中, 加入 30 mL 80℃预热的 RNA 提取缓冲液(0.2 mol/L 脱水四硼酸钠、30 mmol/L EDTA、1% SDS、1%脱氧胆酸钠盐、10 mmol/L DTT、10%乙基基聚甘醇(NP-40)、2% PVP), 再加入 120 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL), 盖好管盖, 42℃保持 1.5 h。向样品管中加入 3.6 mL 2.0 mol/L KCl, 振荡混匀, 将样品管置于 4℃条件下 1~1.5 h。在 4℃条件下以 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液置于新的离心管中, 加入 1/4(或 1/3)大小 9 mol/L LiCl, 振荡混匀, 于 4℃沉淀过夜。4℃下以 12 000 r/min 离心 20 min, 去除上清液, RNA 沉淀停留于管底。加入 1.5 mL 2.0 mol/L LiCl, 轻缓振荡, 4℃下以 12 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液。重复该步骤 2~3 次, 直至上清中无色素类物质。用 450 μL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)充分溶解沉淀, 再加 50 μL 2.0 mol/L 醋酸钾(pH 5.5)颠倒混匀。于 4℃温浴中放 30 min。4℃下以 12 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至新离心管中加入 1 mL 无水酒精, 摇匀并置于 -80℃条件下沉降 RNA 2 h。4℃下 9 800 r/min 离心 30 min, 去除上清液, RNA 沉淀停留于管底。用 70%酒精清洗沉淀, 4℃下 9 800 r/min 离心 5 min, 去除上清液。室温下干燥 RNA 沉淀 5 min 左右, 用 100~300 μL 的 DEPC 水溶解沉淀, 于 -80℃冰箱中存放。

1.2.3 Trizol 法 具体步骤按照 Trizol 试剂说明书操作。

1.2.4 TransZol Plant 法 具体步骤按照 Plant Trizol 试剂盒说明进行。

1.2.5 RNA 完整性和纯度的检测 取 5.0 μL 总 RNA 样品, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 130 V 电压下电泳 15 min。电泳结束后, 在紫外凝胶成像系统下观察总 RNA 的谱带, 检测其完整性。取 1.0 μL 总 RNA 样品用 DEPC 灭菌水稀释 100 倍, 利用紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值及总 RNA 样品浓度。

2 结果与分析

2.1 4 种方法提取木薯茎总 RNA 纯度分析

该试验采用的 2 种木薯材料, 1 种是高淀粉木薯品种("FX01"), 1 种是低淀粉品种("SC124"), 是比较具有

代表性的 2 个木薯品种。通过 4 种方法反复多次提取木薯茎总 RNA 进行了试验验证, 4 种方法提取的总 RNA 纯度见表 1。由表 1 可看出, 改良过的异硫氰酸胍法和 TransZol Plant 法提取木薯茎总 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值分别为 2.03 和 1.83, 均在 1.8~2.1 之间, 表明 RNA 纯度好, 不存在蛋白质、多糖和酚类物质等杂质; 热硼酸盐法和 Trizol 法提取的木薯茎总 RNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值分别为 1.76 和 1.54, 均小于 1.8, 表明 RNA 的纯度较差, 不能有效去除总 RNA 中的蛋白质、多糖和酚类物质等杂质。从总 RNA 的浓度上看, 改良异硫氰酸胍法和 TransZol Plant 法的总 RNA 浓度均为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 热硼酸盐法和 Trizol 法的总 RNA 浓度分别为 0.059 和 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其浓度较低。从试验所需时间上看, 改良异硫氰酸胍法所需的时间最短, 仅 1.5 h, 热硼酸盐法所需时间最长, 为 32 h, TransZol Plant 法和 Trizol 法所需时间适中, 分别为 2 和 2.5 h。试验数据综合表明, 改良的异硫氰酸胍法和 TransZol Plant 法抽提获得的木薯茎中总 RNA 纯度高于热硼酸盐法和 Trizol 法提取的, 且改良的异硫氰酸胍法提取的木薯茎中总 RNA 纯度最高。

表 1 4 种方法提取的总 RNA 的纯度比较

Table 1 Comparison of purity of RNA extracted using four different kinds of methods

RNA 提取方法	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	总 RNA 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	提取时间/h
改良异硫氰酸胍法	2.03	0.25	1.5
热硼酸盐法	1.76	0.059	32.0
Trizol	1.54	0.15	2.5
TransZol Plant 法	1.83	0.25	2.0

2.2 4 种方法提取木薯茎中总 RNA 完整性分析

4 种方法提取的总 RNA 经 1.0%的变性琼脂糖凝胶电泳检测, 显示 RNA 完整性的电泳结果见图 1。异硫氰酸胍法(图 1-A)所提取的 RNA 完整性好, 可清晰的看到 28S、18S, 且 28S 亮度大约是 18S 的 2 倍, 无弥散现象, 点样孔及附近无亮斑, 表明 RNA 完整性好, 无蛋白质和多糖等杂质污染。TransZol Plant 法(图 1-B)和 Trizol 法(图 1-C)提取的总 RNA 在琼脂糖凝胶上也能清楚的看见 28S、18S, 但点样孔有明显的亮斑, 说明存在一定的杂质污染, 且 Trizol 法提取的总 RNA 谱带中 5S 带亮度较亮, 说明该法提取的总 RNA 存在一定的降解; 热硼酸盐法(图 1-D)所提取的 RNA 完整性较差, 28S、18S 条带模糊, 表明总 RNA 存在严重降解现象。变性琼脂糖凝胶电泳检测结果与紫外分光光度计检测结果相符, 一致表明改良的异硫氰酸胍法所提取的木薯茎中总 RNA 质量最好, TransZol Plant 法提取的木薯茎中总 RNA 质量次之, Trizol 法提取的木薯茎中总 RNA 质量第 3, 热硼酸盐法获得的总 RNA 质量较差。

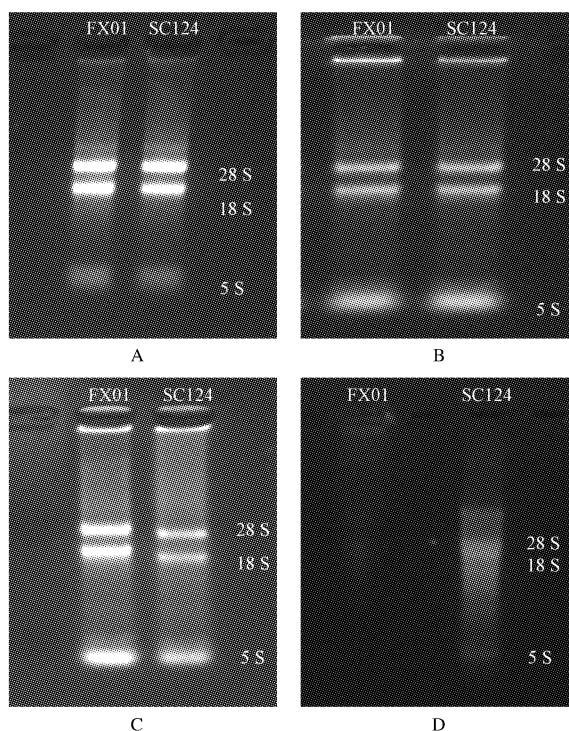


图1 不同方法提取木薯茎总 RNA 完整性的电泳图

注:A:异硫氰酸胍法;B:TransZol Plant 法;C:Trizol 法;D:热硼酸法。

Fig.1 Electrophoresis pattern of total RNA from cassava using different kind of methods

Note: A: Guanidinium isothiocyanate method; B: TransZol Plant method; C: Trizol method; D: Thermal borate method.

3 讨论与结论

RNA 的纯度和完整性是分子生物学试验成功的关键因素,进行 Northern 杂交、纯化 mRNA 以用于构建文库、RT-PCR 等分子生物学研究,都需要高质量的 RNA。木薯茎含有大量黄酮类、酚类、多糖、蛋白质、脂肪及纤维素等次级代谢产物,严重干扰了总 RNA 的提取^[1]。其中,酚类化合物在材料匀浆时释放出来,产生褐化效应,使匀浆液呈褐色,其氧化产物与不可逆结合,导致活性丧失,在用苯酚氯仿抽提时会丢失,或产生不溶性复合

物;多糖形成的难溶胶状物会一起沉淀下来;其它次生物质也会严重影响提取的质量与数量^[7]。余洁等^[2]研究发现,Trizol 用于其它植物材料或木薯的叶子时,可提取到高质量、高产量的总 RNA,但是在提取木薯块根中总 RNA 时,存在严重的降解,DNA 污染比较明显,不能很好的去除多糖的干扰。可能是由于该法只用氯仿抽提,仅可去除一部分的多糖,仍有大部分多糖不能有效地去除,因而只适用于细胞内含物相对较少的一些植物或植物组织。且试剂盒价格较高,在实验室进行大规模 RNA 提取时成本过高。热硼酸法操作较复杂,耗时较长,容易被外源 RNA 酶降解,其重复性较差。赵德征等^[3]、许娟等^[4]研究发现,用异硫氰酸胍法能较好的从木薯根、茎、叶混合样中提取总 RNA,且纯度和完整性较好,该试验也证实了此方法能较好的提取木薯茎中的总 RNA。

该研究结果表明,除了热硼酸盐法不能有效的提取木薯茎中总 RNA 以外,其余的 3 种方法均能相对有效提取木薯茎中总 RNA。综合分析,以改良异硫氰酸胍法耗时最短,仅为 1.5 h,且提取的总 RNA 质量和纯度相对最好,适宜于进行木薯茎中总 RNA 的提取。TransZol Plant 试剂盒法提取的总 RNA 质量和纯度次之,Trizol 法提取的茎中总 RNA 质量第 3。

参考文献

- [1] 何翠薇,陈玉萍,覃洁萍,等. 木薯茎秆及叶化学成分初步研究[J]. 时珍国医国药,2011(4):908-909.
- [2] 余洁,郭运玲,郭安平,等. 木薯块根总 RNA 提取方法的比较和改进[J]. 安徽农业科学,2008,36(12):4872-4873.
- [3] 赵德征,罗兴录,唐娟娟,等. 木薯 AGPase 基因的克隆与载体构建[J]. 中国农学通报,2012,28(21):76-80.
- [4] 许娟,罗兴录. 木薯 Actin 基因片段的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报,2011(6):65-70.
- [5] 潘华清,何龙飞,何海旺. 3 种飞机草总 RNA 提取方法比较研究[J]. 广西农业科学,2009,40(8):957-960.
- [6] 裴东,谷瑞升. 几种提取木本植物中 RNA 方法的比较和改进[J]. 植物生理学通讯,2002,38(4):362-365.
- [7] 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.

Comparative Study on Different Extraction Methods of Total RNA from Stem of *Manihot esculenta* Crantz

ZENG Wen-dan^{1,2}, LUO Xing-lu¹, YUAN Sheng-yong¹, YANG Xin¹, GUO Ya-jing^{1,2}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Taking *Manihot esculenta* Crantz as material, the effects of four different extraction methods (Guanidinium isothiocyanate method, Thermal Borate method, Trizol and TransZol Plant) of total RNA from stems of *Manihot esculenta* Crantz were studied, in order to obtain the efficient method for RNA extraction. The results showed that total

外源褪黑素对滇黄芩愈伤组织增殖和分化的影响

张来军^{1,2}, 贾敬芬²

(1. 琼州学院 生命科学与技术学院, 海南 三亚 572022; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:以滇黄芩(*Scutellaria amoena*)为试材,研究了不同浓度外源褪黑素(MEL)对滇黄芩愈伤组织增殖和不定芽分化的影响,并与相应浓度的 IAA 和 NAA 作了效果比较。结果表明:在附加 0.1、1.0、10.0 和 100.0 μM MEL 的 MS 培养基上,愈伤组织增殖率均显著高于对照,其作用类似于 IAA,而 NAA 无明显促进作用;低浓度的 MEL(0.1、1.0、10.0 μM)有助于愈伤组织的增殖,0.1 μM MEL 愈伤组织的增殖率最高,达到 171%。同时培养基中附加低浓度 MEL(0.1 或 1.0 μM)有助于不定芽分化,1.0 μM 的 MEL 作用下得到最高分化率为 30.4%,而高浓度 MEL(100.0 μM)则对不定芽分化有抑制作用,与 IAA 作用相似。

关键词:褪黑素;滇黄芩;愈伤组织;芽增殖

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0106-04

褪黑素(N-acetyl-5-methoxytryptamine; Melatonin; MEL)是由松果腺合成的一种广泛存在于动物界的激素,具有调节昼夜节律、促进睡眠、抗氧化、清除自由基等作用。自从 1995 年发现 MEL 广泛存在于植物中后^[1-2],对 MEL 在植物中功能的研究引起了学者们的广泛关注。多数研究报道了对不同植物及植物的不同器官 MEL 含量的测定结果^[3-4]。也有报道提出,MEL 可能作为一种抗氧化剂广泛存在于细菌、真菌、植物^[5-6]中。王英利等^[7]发现外源褪黑素对绿豆在增强 UV-B 辐射下有防护作用。Lei 等^[8]以胡萝卜悬浮细胞为试材,研究指出外源 MEL 的加入降低了低温胁迫下细胞的凋亡。Zhao 等^[9]以大花红景天(*Rhodiola crenulata*)愈伤组织

为材料进行研究,表明 MEL 提高了低温胁迫下愈伤组织的存活率。这些离体培养试验揭示了外源 MEL 可能对植物抗环境胁迫方面有防护作用。另外研究发现,MEL 对植物生长也有促进作用,用 MEL 处理贯叶连翘,促进了根的形成^[10]。将不同浓度 MEL 与 IAA 分别作用于羽扇豆(*Lupinus albus* L.)的下胚轴和子叶,可促进下胚轴形成不定根^[11],子叶也显著扩展^[12],推测 MEL 与 IAA 可能以相似的作用方式促进了植物的生长。近年来植物中 MEL 的功能研究虽然取得了很大进展,但多侧重于植物中 MEL 含量的测定;MEL 对某些植物抗逆性影响,或对植物生长、形态发生的研究所涉及到的方面非常有限,报道极少,对于阐明植物 MEL 的功能还是初步的,还需要提供更多的科学试验证据。

滇黄芩(*Scutellaria amoena* C. H. W right)属唇形科黄芩属植物,分布于我国西南地区,主要含黄芩素(Baicalin),汉黄芩素(Wogonin),黄芩苷(Baicalin),汉黄芩苷(Wogonoside)等黄酮类化合物,是西南地区药用黄芩的主流品种,药用历史悠久。主要用于治疗各种炎症。滇黄芩的黄芩苷含量居同属药用植物之首,有很大的药用价值及开发潜力^[13]。该试验以滇黄芩的愈伤组织为试材,在培养基中添加不同浓度 MEL,观察其对愈

第一作者简介:张来军(1968-),女,甘肃庆阳人,博士,副教授,现主要从事细胞生物学研究等工作。

责任作者:贾敬芬(1938-),女,硕士,教授,博士生导师,研究方向为细胞生物学。E-mail:jiajf38@nwnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260139);陕西省教育厅科学研究计划资助项目(11JS086);三亚市院地科技合作资助项目(2012YD37);琼州学院博士科研启动基金资助项目(QYXB201203)。

收稿日期:2012-12-11

RNA of *Manihot esculenta* Crantz can't be extracted using the Thermal Borate method, and total cassava stems RNA can be extracted effectively using the other three methods. The time (only 1.5 h) and quality of RNA extracted by Guanidinium isothiocyanate method were the best, which was a kind of simple and efficient method suitable for the extraction of total RNA from the stems of *Manihot esculenta* Crantz.

Key words: *Manihot esculenta* Crantz; total of RNA; different extraction methods; extraction effect