

# 分蘖洋葱叶片 RNA 提取方法的比较和分析

黄 钰, 李 旭 双, 陈 典, 王 勇

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以新鲜的分蘖洋葱叶片为材料,比较了 Trizol 法、Trizol 改进法、SDS 法、SDS 改进法以及柱式植物 RNA 提取法提取总 RNA 的效果。结果表明: Trizol 法和 Trizol 改进法所提取的 RNA 得率很低,且不能有效除去叶片中的多糖成分;SDS 改进法能够有效的去除分蘖洋葱叶片中的多糖,提取的 RNA 中 28S RNA 亮度约为 18S RNA 的 2 倍,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值介于 1.7~2.2 之间,但 RNA 的得率偏低,约为 56.32 μg/g;柱式植物 RNA 提取法提取的 RNA 28S、18S、5S 条带清晰,完整性好, RNA 的得率最高,为 123.58 μg/g,完全适合于分蘖洋葱进一步的分子生物学研究。

**关键词:** RNA; 分蘖洋葱; SDS 改进法; 柱式植物 RNA 提取法

**中图分类号:** S 633.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0111-03

分蘖洋葱(*Allium cape* L. var. *multiplans* Bailey)为百合科葱属草本植物,俗称毛葱,是洋葱的一个变种。其叶为中空圆筒状,植株密集丛生,不抽薹、不开花,或极少抽薹开花结实,以分蘖小鳞茎进行繁殖。鳞茎为狭卵形或卵形,聚生。每株蘖生多个至十多个大小不规则的鳞茎,多为铜黄色,耐贮藏,植株抗寒性强,适于北方地区栽培,是黑龙江传统栽培品种<sup>[1]</sup>。

RNA 是一种重要的遗传信息分子,完整 RNA 的提取和纯化是进行 Northern 杂交、RT-PCR、定量 PCR 等 RNA 相关研究的重要前提。目前提取 RNA 的方法有很多种,但对于分蘖洋葱 RNA 的提取研究却未见报道。分蘖洋葱各组织中富含多糖,在沉淀 RNA 时,往往产生富含多糖的凝胶状沉淀,这种含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水,或溶解后产生粘稠状的溶液,在去除多糖的同时 RNA 也容易被带走,造成 RNA 得率的减少,因此从分蘖洋葱中提取高质量的 RNA 有相当的难度。另外,多糖还会抑制许多酶的活性<sup>[2]</sup>,因此含有多糖的 RNA 样品很难满足进一步分子生物学的需要。现通过比较 Trizol 法、Trizol 改进法、SDS 法、SDS 改进法以及 TIANDZ 柱式植物 RNAout 试剂盒方法以期找到一种适合于分蘖洋葱叶片 RNA 提取的最优方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**第一作者简介:**黄钰(1985-),女,在读硕士,研究方向为寒地作物(葱蒜类)分子育种。E-mail: huangyu0524@sina.com。

**责任作者:**王勇(1972-),女,博士,副教授,研究方向为寒地作物(葱蒜类)分子育种。E-mail: acaciawy@yahoo.com.cn。

**基金项目:**黑龙江省高校重点实验室开放基金资助项目(GS2009004);农业部公益性行业资助项目(200903018)。

**收稿日期:** 2011-04-20

选取分蘖洋葱新鲜幼嫩的叶片,液氮速冻后带回实验室使用。试材由东北农业大学葱蒜类课题组提供,栽种于东北农业大学园艺设施中心。主要试剂: Trizol 购自 Invitrogen 公司,柱式植物 RNA 提取试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,其余生化试剂均为进口及国产分析纯。

### 1.2 分蘖洋葱叶片 RNA 的提取方法

试验所需塑料制品如 Eppendorf 管、吸头、PCR 管等均用 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水 37℃处理 12 h 以上,高温高压灭菌 40 min,180℃烘干后使用。玻璃器皿于 180℃干热灭菌 3 h。用于 RNA 提取的所有配制的溶液(Tris 除外)均经 0.1% DEPC 水处理 12 h,高温高压灭菌后使用;含 Tris 的溶液用经高温高压灭菌的 0.1% DEPC 处理水配制。

**1.2.1 Trizol 法** 参照 Invitrogen 公司的试剂说明书进行(Cat. No. 15596-018)。

**1.2.2 Trizol 改进法** 依 Trizol 步骤,清洗沉淀后弃去上清,沉淀中加入 0.5 mL DEPC 水,1/3 体积 8 mol/L LiCl 溶液,4℃静置 6~8 h。4℃,12 000 r/min 离心 10 min。弃去上清,加入适量 DEPC 水,再加入 2 倍体积无水乙醇,室温静置 10~20 min。4℃,12 000 r/min 离心 10 min,沉淀 RNA。弃去上清,用 75%乙醇清洗沉淀。将沉淀室温自然晾干后加入适量 DEPC 水,将沉淀充分溶解,-70℃保存。

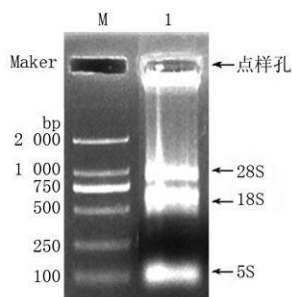
**1.2.3 SDS 法** 参照王玉成等<sup>[3]</sup>方法。

**1.2.4 SDS 改进法** 向 1.5 mL 离心管中分别加入了 0.6 mL SDS 提取液、0.06 mL β-巯基乙醇、0.4 mL Tris-苯酚和 0.3 mL 氯仿;将 0.1 g 分蘖洋葱叶片液氮速冻研磨后,迅速加入 EP 管中,剧烈震荡 3 min。12 000 r/min 离心 5 min,取上清,加入 0.3 mL Tris-苯酚和 0.3 mL 氯仿,震荡 2 min。以下依照 SDS 方法进行。

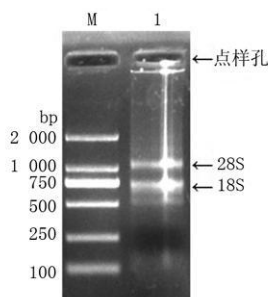
**1.2.5 试剂盒方法** 参照天恩泽公司使用手册方法

操作(Cat. #. 71203-50)。

1.2.6 RNA 完整性分析 将以上 4 种方法提取的 RNA 溶解于 30  $\mu$ L 0.1% DEPC 处理水中, 分别取 2  $\mu$ L RNA 样品, 在 1.0% 的非变性溴化乙锭(EB)琼脂糖凝胶上进行电泳检测。在紫外透射仪下观察 RNA 条带完整性, 并照相记录。



a- Trizol 法



b-改进 Trizol 法

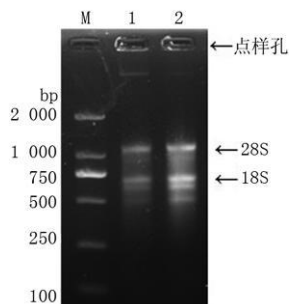
图 1 分蘖洋葱叶片 RNA 凝胶电泳图谱

用 1.0% 的非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 从图 1(a) Trizol 法提取分蘖洋葱叶片的总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图可以明显看出有 3 条带, 分别为 28S、18S 和 5S, 且 5S 亮度与其它 2 条带的亮度相差无几, 由点样孔向下 smear 清晰, 说明在提取过程中 RNA 降解严重。图 1(b)为改进 Trizol 法提取分蘖洋

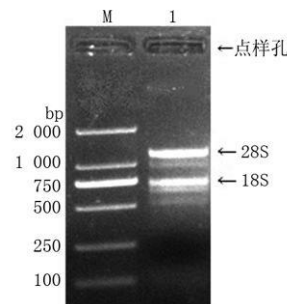
葱叶片 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图。与图 1(a)相比, 5S 的荧光亮度较浅, 并且 smear 较淡, 但是与 Maker 相比, 条带亮度较弱, 说明此方法提取 RNA 的得率不高。图 1(a)和(b)可以明显看出点样口周围发亮, 说明 RNA 样品中含有多糖类物质<sup>[4]</sup>。因此表明 Trizol 法和 Trizol 改进法对分蘖洋葱叶片的提取效果不佳。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方法提取的总 RNA 完整性比较



a-SDS 法



b-改进 SDS 法

图 2 分蘖洋葱叶片 RNA 凝胶电泳图谱

葱叶片 RNA 的提取效果比 Trizol 法好, 可以清晰的看到 28S 和 18S 2 条亮带, 没有 5S RNA 条带, 2 种方法点样孔正常无发亮, 说明其多糖去除较干净。由图 2(a)SDS 法虽然也能明显看出 2 条 RNA 主带, 但与 SDS 改进法图 2(b)相比, 2 条带的拖尾严重, 并且 18S 有降解现象, RNA 完整性较 SDS 改进法较差。SDS 改进法得到的 RNA 28S 和 18S 条带亮度接近 2:1。

图 3 为采用 TIANDZ 柱式植物 RNA 提取试剂盒所提取分蘖洋葱叶片的 RNA。与其它 4 种方法相比较, 此种方法提取的 RNA 条带清晰, 亮度较好, 没有明显的拖尾和降解。泳道 1 为直接提取结果, 含有 DNA 条带; 泳道 2 为经 DNAase 处理后的条带, RNA 完整, 亮度较高, 其中 28S 与 18S 的亮度比约 2:1, 且无降解现象, 是一种较适合分蘖洋葱叶片 RNA 提取的方法。

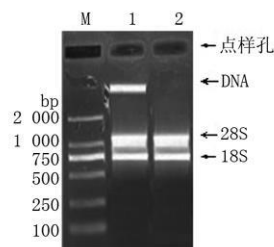


图 3 分蘖洋葱叶片 RNA 凝胶电泳图谱-试剂盒法

### 2.2 不同方法提取总 RNA 纯度和得率比较

5 种方法提取的总 RNA 经过紫外分光光度计检测, 准确计算 RNA 的纯度和得率, 结果见表 1。高纯度 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.8~2.1 之间。  $OD_{260}/OD_{280}$  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。表 1 的结果表明, 以

上 5 种方法所提取的 RNA 纯度都较高, 其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.7~2.1 之间。但从 RNA 的得率上看, 用试剂盒的方法 1 g 样品可以获得 123.58 μg 的总 RNA, 明显高于其它方法, SDS 改进法仅次于试剂盒法高于其它 3 种方法, 其得率为 56.32 μg/g。Trizol 法及 Trizol 改进法所提取的 RNA 得率较低。

表 1 分蘖洋葱叶片总 RNA 不同提取方法纯度和得率比较

RNA 提取方法	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	得率/μg·g <sup>-1</sup>
Trizol 法	0.1278	0.0702	1.820	18.00
Trizol 改进法	0.1283	0.0735	1.746	21.58
SDS 法	0.730	0.373	1.980	32.15
SDS 改进法	0.695	0.355	1.957	56.32
试剂盒法	1.537	0.747	2.058	123.58

3 结论与讨论

传统提取 RNA 的方法有热酚法、Trizol 法、异硫氰酸胍法、CTAB 法、SDS 法等, 这些方法可以很好的提取微生物和动物组织的 RNA。但是高等植物组织内含有一些多糖类和酚类物质, 使用苯酚、胍都很难去除<sup>[4]</sup>。由于植物材料的酚类物质残留在样品中发生氧化产生深褐色的物质, 所以使用传统方法提取的 RNA 往往带有很深的铁锈色; 由于多糖类的存在, 使 RNA 呈现凝胶状, 且难于溶解。即使加热溶解, 酚类和多糖的干扰也抑制了后继的反转录以及 PCR 反应。

试验在传统的 Trizol 和 SDS 方法基础上加以改进。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂, 内含异硫氰酸胍等变性剂, 能迅速破碎细胞, 抑制细胞释放出的核酸酶。改进的 Trizol 法首先在加入 1 mL Trizol 试剂后再加入 0.01 mL-巯基乙醇, 以有效地防止酚氧化成醌, 避免褐变; 其次在沉淀 RNA 时, 采用 LiCl-无水乙醇的方法沉淀 RNA。利用 LiCl 沉淀 RNA, 是 RNA 制备中常用的方法, 该方法的优点是制备的 RNA 纯度高, 无多糖等生物大分子的共沉淀而且对小片段 RNA

如 5SRNA 不产生沉淀<sup>[3]</sup>, 可以有效去除 DNA。但是由于分蘖洋葱叶片中多糖含量较高, 而多糖的理化性质与 RNA 很相似, 在沉淀 RNA 时, 多糖也随之沉淀, 这样很难将二者分离, 从而造成一定量 RNA 的降解和丢失<sup>[5]</sup>。所以 Trizol 法及改进 Trizol 法并不适合分蘖洋葱叶片的总 RNA 提取。SDS 是强的蛋白质变性剂, 对 RNase 有较强的抑制作用, 改进的 SDS 方法首先加入了 CTAB 首步的缓冲裂解液, 其中含有 Tris-HCl、EDTA 以及高浓度的氯化钠(1.4 mmol/L)协同作用, 使部分多糖随着抽提过程而逐渐去除<sup>[2]</sup>。其次利用高盐 LiCl 可以选择沉淀总 RNA, 使部分多糖留在溶液中而不随 RNA 沉淀下来<sup>[6]</sup>。这样极大地降低了沉淀中多糖的含量, 获得质量和纯度较高的 RNA。但是操作步骤稍显复杂, 多次离心可能损失部分 RNA, 使 RNA 的得率降低。

由该试验结果可看出, 采用 TIANDZ 柱式植物 RNAout 能够快速高效的提取分蘖洋葱叶片的 RNA, 并且 RNA 纯度较高, 有效去除其中的多糖, RNA 回收效率更高, 但是提取结果中有 DNA 污染, 需进行去 DNA 处理。得到的 RNA 经过 DNAase 处理后可以直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 合成等试验。

参考文献

[ 1 ] 徐启江. 分蘖洋葱组织培养染色体数目变化[ J ]. 东北农业大学学报, 2001, 32(4): 313-319.  
[ 2 ] Fang G, Hammar S, Gnumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[ J ]. Biotechniques, 1992, 13(1): 52-56.  
[ 3 ] 王玉成, 张国林, 姜静. 一种适用范围广的总 RNA 提取方法[ J ]. 植物研究, 2006, 26(1): 85-86.  
[ 4 ] 葛晓萍, 石琰璟. 一种合适富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法[ J ]. 青岛科技大学学报, 2007, 28(1): 7-8.  
[ 5 ] Wang C S, Vodkin O. Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA[ J ]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12(2): 132-145.  
[ 6 ] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae. AnalBiochem, 1988, 174(2): 650-657.

Comparison of Different Methods for Total RNA Extraction from Leaves of Tillering Onions

HUANG Yu, LI Xu-shuang, CHEN Dian, WANG Yong  
(College of Horticulture Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** Fresh leaves of tillers onion were used as material, extracted results of total RNA by the method of trizol, modified trizol, SDS, modified SDS and the TIANDZ column plant RNAout were compared. The results showed that trizol method and modified trizol extracted RNA yield was very low, and can not effectively remove the polysaccharide in the leaves. The modified SDS extraction was capable of efficiently removing polysaccharides, the brightness 28S RNA of the RNAs isolated by the modified SDS was two times as much as that of 18S RNA, OD260/OD280 ranged between 1.7~2.2, and the RNA productivities from the leaf of tillering onions was 56.32 μg/g which was lower than that TIANDZ column plant RNAout. The clear bands, good integrity of 28S, 18S, 5S RNA by the method of TIANDZ column plant RNAout, The RNA productivities was 123.58 μg/g. It was indicated that the TIANDZ column plant RNAout completely was fit for further biological research.

**Key words:** RNA; tillering onions; modified SDS; TIANDZ column plant RNAout