

三种提取酿酒葡萄不同组织总 RNA 的方法比较

宋 洋 波, 刘 延 琳, 耿 万 刚

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:通过对比改良 SDS-酚法、改良 CTAB 法和改良 Trizol 法 3 种 RNA 提取方法, 提取“赤霞珠”(‘Cabernet Sauvignon’)葡萄芽、叶片和果皮 RNA 的质量及浓度, 并进一步分离、纯化得到较高质量的 RNA。结果表明:改良 SDS-酚法与改良 CTAB 法适用于芽和叶片的提取, 可以获得较好质量、高浓度的总 RNA, 其 28S 与 18S 亮度极高, 5S 清晰可见, 完整性较好;改良 Trizol 操作环节较少, 省时, 质量好, 条带锐利, 可清晰看出 28S 与 18S 亮度比为 2:1, 虽提取的样品浓度较低, 但足以供下一步研究使用。

关键词:葡萄;总 RNA;提取;改良 SDS-酚法;改良 CTAB 法;改良 Trizol 法

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0119-04

葡萄基因组全序列的测序完成释放、葡萄与葡萄酒分子生物学研究领域已经扩展到各个方向, 基因组学、蛋白质组学、植物生理及病理等方向, 更细致到基因分析、cDNA 文库构建、蛋白质互作研究等。然而, 在进行这类科研工作时, 都需要纯度好、浓度高的 RNA 样品作为试验的基础, 所以葡萄各个组织总 RNA 提取是葡萄与葡萄酒分子时代研究的根基试验之一。据相关文献报导, 相较于提取动物或者微生物组织总 RNA 的提取, 提取植物各组织的总 RNA 难度要大得多。其原因是所有植物组织拥有坚硬的细胞壁, 与此同时, 细胞内含有丰富的多种次级代谢产物, 破碎细胞后, 此类物质将在不同时间、不同形式干扰总 RNA 的提取^[1]。同时, 葡萄的不同组织在不同发育阶段其结构和成分有着或多或少的差异。另外, 组织细胞内的核糖核酸抑制剂以及操作过程中产生的核糖核酸抑制剂均会对分离样品中的 RNA 进行降解。核糖核酸抑制剂的高稳定性是造成 RNA 分离困难的主要原因。鉴于这些原因, 葡萄组织 RNA 的提取效率不高, 一直是研究的基础与难点, 往往耗费大量的时间及试验成本。

目前, 植物 RNA 的提取方法有多种, 各种方法均有其可取之处^[2-7], 常用方法有异硫氰酸胍法、阴离子去污剂法、苯酚法、改良 Gomez 法^[8]、LiCl-尿素法、CTAB

法^[9]、热硼酸法及改良热硼酸法^[10]、Trizol 试剂快速提取法^[11]。针对试验材料的不同, 不同的方法各有其优劣性。房经贵等^[2]和巩艳明等^[12]采用改良 CTAB 法同样提取到高质量、完整性的总 RNA。针对葡萄组织中多酚、多糖类物质含量较高, 张今今等^[13]比较了改良 SDS-酚法、成品试剂盒和异硫氰酸胍法这 3 种完全不同的方法, 以期获得质量高、完整性好的总 RNA。巩艳明等^[12]以苹果梨为试材, 使用改良 CTAB 法同样提取到高质量, 完整性的 RNA;胡微等^[14]以人参为试材, 采用改良 Trizol 法能从成熟的根组织中获得完整性好的总 RNA。各部分组织都有其相适宜的方法, 往往适用于叶的不适用于果皮或芽。

考虑到试验方法的广泛性及试验条件的要求, 最常用的方法有 CTAB 法、SDS-酚法和 Trizol 法。前人经过大量试验对这 3 种 RNA 提取法进行调整、优化, 总结出了新一代相应的改良法。而这几种改良方法对葡萄不同组织的总 RNA 的提取效果尚未见系统的比较研究。该试验采用 3 种改良法对葡萄芽、叶片以及果皮材料提取总 RNA, 从 RNA 的质量、试验消耗的时间和药品等多方面进行对比研究, 以期选择出适合各部分组织的最适方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“赤霞珠”(‘Cabernet Sauvignon’)葡萄芽、叶片和果皮均采自于陕西杨凌西北农林科技大学葡萄酒学院葡萄与葡萄酒实习基地。主要试剂: DEPC、Tris、LiCl、CTAB 购自 Amresco, DNase I 为 Promega 产品, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、SDS 为沃尔森产品、 β -巯基乙醇购自 Sigma, 琼脂糖购自 HydraGene, 其它试剂为西安三浦分

第一作者简介:宋洋波(1985-), 男, 硕士, 研究方向为酿酒酵母基因工程。

责任作者:刘延琳(1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向为葡萄与葡萄酒工程及酿酒微生物。

基金项目:国家葡萄产业技术体系建设专项经费资助项目(CARS-30-jg-03)。

收稿日期:2012-05-23

析纯。所有塑料试验耗材及所有试验试剂(除 Tris 外)均使用 0.1%DEPC 水处理和配制,并且经高温高压灭菌除去 DEPC,玻璃器皿均在 180℃ 烘烤 12 h,灭活 RNase。

1.2 试验方法

每种葡萄组织材料均使用了改良 CTAB 法、改良 SDS-酚和改良 Trizol 法,全过程操作在冰上进行。

1.2.1 改良 SDS-酚提取法 针对葡萄各部分组织中多酚、多糖类物质含量较高的特点,液氮研磨芽约 1 g,幼嫩叶片 2 g,果皮 4 g,参照张今今等^[13]改良 SDS-酚法共 11 个步骤进行。

1.2.2 改良 CTAB 提取法 称取葡萄芽约 1 g,幼嫩叶片 2 g,果皮 4 g 样品,参照房经贵等^[2]的方法共 10 个步骤进行。

1.2.3 改良 Trizol 提取法 称取葡萄芽约 1 g,幼嫩叶片 2 g,果皮 4 g 样品,参考胡薇等^[14]的方法共 6 个步骤进行。

1.2.4 总 RNA 的纯化 置于温浴器中,37℃ 温浴 15 min;将 200 μ L 异戊醇:氯仿:水饱和酚(1:24:25)注入 1.5 mL 离心管中,在 4℃,12 000 r/min,离心 15 min;吸取上清液,向 1.5 mL 离心管中注入等体积的异戊醇:氯仿(1:24)抽提 1 次,在 4℃,12 000 r/min,离心 15 min;离心结束之后,将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中,注入 1/10 体积的 3 mol/L NaAC,再注入 2.5 体积的 100%乙醇;置-20℃ 冰箱中放置 4 h;离心 15 min,4℃,12 000 r/min,弃上清,用 75%的乙醇洗涤 2 次,晾干;将沉淀溶于 15 μ L DEPC \cdot H₂O 中,电泳后以质量而定需要保留的总 RNA,-80℃ 保存。

表 2 3 种方法提取总 RNA 的结果比较(Mean \pm SD,n=3)

Table 2 The results of grapevine's different tissues total RNA using different optimized method

组织名称	改良 SDS-酚法		改良 CTAB 法		改良 Trizol 法	
	R (A_{260}/A_{280})	浓度/ng $\cdot \mu$ L ⁻¹	R (A_{260}/A_{280})	浓度/ng $\cdot \mu$ L ⁻¹	R (A_{260}/A_{280})	浓度/ng $\cdot \mu$ L ⁻¹
芽	1.95 \pm 0.036	568.67 \pm 168.2406	1.94 \pm 0.029	942.70 \pm 113.74	1.93 \pm 0.054	624.00 \pm 29.92
叶片	1.89 \pm 0.068	1096.30 \pm 249.49	1.86 \pm 0.0082	848.13 \pm 66.11	1.85 \pm 0.045	478.90 \pm 82.61
果皮	1.84 \pm 0.043	421.13 \pm 187.01	1.91 \pm 0.051	309.33 \pm 182.93	1.90 \pm 0.051	562.53 \pm 27.49

由表 2 可知,改良 SDS-酚提取叶片的质量及浓度要远高于其它组织;而改良 CTAB 法对提取葡萄的芽有特别好的效果;改良 Trizol 提取各组织的浓度都不是很高。总的来说改良 SDS-酚法及改良 CTAB 法能更好的除去多糖、多酚类物质,获得浓度较高的 RNA 样品。葡萄果皮用 3 种提取方法所得的浓度都比较低。

2.2 RNA 的电泳图谱

分别取每种方法中的第 1 组进行电泳检测,经 1.2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色 20 min 结果见图 1。

通过电泳检测总 RNA 的 28S 及 18S 条带的清晰程度与人眼观察 2 处条带亮度的比值,或者是 mRNA smear 的完整性。通常情况下,若 28S 及 18S 2 处条带亮

依照 3 种改进方法提取葡萄各部分组织的总 RNA。为了消除个人操作对试验效果的影响,分别用各种方法提取葡萄芽、叶片及果皮各 10 次。然后纯化,取其中经 NanoDrop 检测 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 的、浓度最大的样品 3 组于表 1 中列出。然后取每种方法的第 1 组,也就是浓度最大的 1 组,进行凝胶电泳检测,上样量为 1.5 μ L 加 0.5 μ L 10 \times Loading Buffer。

表 1 200 μ L 纯化体系

Table 1 200 μ L RNA clean-up system

药品	用量
总 RNA	X μ L
DNAse I	20 U
10 \times Buffer	20 μ L
RNasin	200 U
DEPC \cdot H ₂ O	200-X μ L
体系总量	200 μ L

2 结果与分析

2.1 RNA 的浓度和质量检测

RNA 样品在 280 nm 与 260 nm 下的吸光度各表示 RNA 样品中核酸物质、蛋白和有机物等的含量。通常情况下, A_{260}/A_{280} (Ratio,R)完全可以体现 RNA 样品的质量好坏。当 R 值处于在 1.8~2.0 区间,说明 RNA 样品中含有少量的蛋白质或者有机物,但是质量较好,可以正常使用;当 R 在 1.8 之下时,RNA 样品中蛋白质与其它有机污染物的量较大,需要经过一定方法使样品纯化,当 R 值达到 1.8 以上且 2.0 以下时,方可以使用;当 R 值在 2.2 之上时,此时样品中的 RNA 已经被水解成单核酸,则不能使用^[14-15]。根据上述条件选择出各改良方法最优样品 3 组数据进行处理,在表 2 中列出。

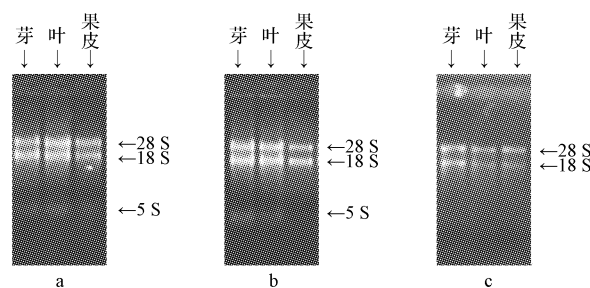


图 1 3 种方法提取葡萄不同组织总 RNA 电泳结果

注:a;改良 SDS-酚;b;改良 CTAB;c;改良 Trizol 法。

Fig.1 Electrophoresis profile of grape total RNA with three methods

Note:a;Optimized SDS-phenol;b;Optimized CTAB;c;Optimized Trizol.

度高、边缘锐利且易分辨,并且 28S 与 18S 的条带明亮程度约为 2:1,说明不但 RNA 样品的品质较好而且浓度较高^[14-15]。从图上看虽然改良 SDS-酚法和改良 CTAB 法提取的样品的条带亮度较高,边缘较清晰,但条带不够锐利—成长扁的“H”型,同时 28S 与 18S 的亮度比并不是,却可以看到有明显的 5S。与前 2 种方法相反,改良 Trizol 的亮度虽然不高,但是 28S 与 18S 的亮度比明显是 2:1,并且边缘清晰、条带锐利成 1 条线。

3 讨论与结论

葡萄总 RNA 提取,几乎是所有现代葡萄与葡萄酒分子生物学方面研究的最重要环节之一。但葡萄因其本身的特性,决定其各部分组织的细胞包含有种类繁多、数量大的多酚类、多糖类物质及其它影响 RNA 提取的物质^[15]。一方面,匀浆时,组织细胞中的酚类化合物极易与空气中的氧气结合,氧化生成醌类物质。而醌类物质与 RNA 的极易反应,这正是影响 RNA 分离纯化的重要原因之一^[16]。另一方面,RNA 无论是物理性质还是化学性质都有许多的相似之处,这一特性导致在提取过程中多糖与 RNA 极易共沉淀^[17],而普通处理很难分离多糖与 RNA。以上 2 种因素会严重制约提取 RNA 样品的品质和浓度。除此之外,随葡萄植株各部分组织的生长和成熟,如果皮的转色等,在葡萄各组织细胞的代谢过程中 RNA 的合成能力逐渐小于降解能力;不仅如此,细胞内还会逐渐积累包括核糖核酸抑制剂在内的各种 RNA 水解酶,与此同时多酚和多糖的量也有显著的提升。最后,当葡萄果皮完全成熟之后,其组织细胞内水分含量较高,这大大降低了样品的产出率,这些都对葡萄总 RNA 的提取造成了极大的不良影响,甚至影响到葡萄生长发育、基因调控和代谢等多方面研究^[12]。

多糖是提取葡萄总 RNA 众多干扰因素中最主要的一个因素,改良 SDS-酚法适用于多种组织的 RNA 提取是因为在上清液中加入 1/3 体积的 KAc,多糖可溶于浓度较高的盐溶液,从而有效除去了多糖,降低了多糖的影响。再者,降低多酚类物质氧化成多醌,也是提高葡萄总 RNA 提取效果的关键。PVP 可以有效地防止多酚氧化成多醌类物质,它对多酚具有强结合能力。同时配合 β -巯基乙醇提供还原条件,从根本上杜绝多酚类物质的氧化,提高总 RNA 的质量。

从试验结果看,改良 Trizol 法得到的总 RNA 质量较高,而且此方法最大程度的简化了操作程序^[13],避免了由于额外的操作而造成的 RNase 污染,同时在整个过程中样品始终处于强变性剂中,适当的提高了 PVP 与 β -

巯基乙醇的浓度,同时试验完全在低温下进行,基本上保证了 RNase 的无活性。

因此,在参考已报道的总 RNA 改良提取方法的前提下根据葡萄组织和试验用途选择相适宜的方法,才会获得理想的总 RNA 提取效果。

参考文献

- [1] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 711-712.
- [2] 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.
- [3] 李晓毓,赵德刚,李丰伯. 一种适用于木本植物 RNA 提取的方法[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(23): 42-43.
- [4] 李志强,李莹,陶建敏,等. 两种改良 CTAB 法在多种果实总 RNA 提取中的应用[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 764-768.
- [5] 周波,张畅,李玉花. 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(1): 48-50.
- [6] 代永欣,杨相昆,王林. 核果类果树总 RNA 的快速提取方法[J]. 果树学报, 2007, 13(7): 30-31.
- [7] Jaillon O, Aury J M, Noel B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. Nature, 2007, 449: 463-467.
- [8] 姚红艳,赵双宜,夏光敏. 改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总 RNA [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 86-88.
- [9] 程水源,陈昆松,杜何为,等. 银杏 RNA 的提取[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 428-429.
- [10] 黄凤兰,李长海,孙婷婷,等. 芍药花瓣总 RNA 的提取[J]. 生物技术通报, 2005, 3(4): 282-283.
- [11] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 77-83.
- [12] 巩艳明,曹后男,宗成文,等. 三种方法提取不同品种梨叶片总 RNA [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(15): 3204-3206.
- [13] 张今今,王跃进,王西平,等. 葡萄总 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报, 2003 20(3): 178-181.
- [14] 胡薇,白石,祝涛,等. 人参根组织 RNA 提取方法的研究与优化[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(5): 505-508, 522.
- [15] Ausubel, Frederick M. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [16] Spangler, Brenda D. 分子生物学与蛋白质化学实验方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [17] Schneiderbauer A, Sandermann H Jr, Emst D. Isolation of functional RNA from plant tissue rich in phenolic compounds [J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91-95.
- [18] Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles [J]. Meth Enzymol, 1974, 31: 528-545.
- [19] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues [J]. Anal Biochem, 1987, 163: 16-20.

新疆甜瓜“皇后”再生体系的建立

张铁刚, 宁雪飞, 王贤磊, 李冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 生物工程研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:以厚皮甜瓜“皇后”为试材,研究了 6-BA 及其与 NAA、GA₃ 组合对植株离体再生的影响,以期建立以子叶为外植体的快速高效再生体系。结果表明:甜瓜子叶用 MSB+1.0 mg/L 6-BA 诱导分化培养基,不定芽诱导率可达 86% 以上;培养基中添加 NAA 不利于“皇后”子叶不定芽的产生;产生的不定芽丛或单芽转至 MSB+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃ 培养基,不定芽均可伸长,且生长状况良好;再生苗转至不添加任何激素的 MS 培养基生根,生根率达 99%。

关键词:甜瓜“皇后”;子叶;不定芽;再生体系

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0122-04

新疆是厚皮甜瓜次生起源中心之一,品种多,品质佳,栽培面积广,是我国厚皮甜瓜种植面积最大和种质资源最丰富的地区,也是新疆重要经济作物之一,其独特的品质享誉海内外^[1]。随着植物基因工程的兴起和发展,尤其是无选择标记转基因技术的产生和不断完善,使得通过转基因技术改良甜瓜品质成为新的研究热点,这为提高甜瓜品质和抗逆性开辟了更加安全可靠、快捷可行的途径。而建立高效离体培养再生体系是通

过转基因技术改良甜瓜品质的基础。

目前甜瓜组织培养再生方面,已能通过子叶、下胚轴、真叶等外植体再生出完整植株^[2-6]。但甜瓜再生周期较长,影响因素多,即使不同基因型甜瓜在再生效率上也存在差异。此外,培养基种类以及生长调节物质的种类和浓度等因素均会影响甜瓜再生效率^[7-10]。目前关于甜瓜离体培养再生体系的报道较多,但再生效率多不稳定、再生体系不通用,限制了通过转基因技术改良新疆厚皮甜瓜品质的研究,因此急需建立适宜的高效离体培养再生体系。

该研究以新疆优质厚皮甜瓜“皇后”为试材,系统研究厚皮甜瓜再生体系,旨在建立厚皮甜瓜快速高频再生系统,为遗传转化改良厚皮甜瓜品质奠定基础。“皇后”是吴明珠院士等采用远生态、远地域、多亲复合杂交、回交等技术选育出的优良品种,它不仅质优美观而且抗病能力强,是新疆甜瓜的主栽品种之一,累计种植面积达 6.7 万 hm²,畅销海内外。该研究的成功开展也将为厚

第一作者简介:张铁刚(1985-),男,硕士,现主要从事植物生物学研究工作。E-mail:zhangtiegang02@163.com.

责任作者:李冠(1949-),男,教授,博士生导师,研究方向为植物生理生化与分子生物学。E-mail:guanli@xju.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060148;31150004);新疆高新技术研究发展基金资助项目(201111120);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2011211B09)。

收稿日期:2012-04-26

Comparison of Three Optimized Method for Isolating Total RNA from Grapevine Tissues

SONG Yang-bo, LIU Yan-lin, GENG Wan-gang

(College of Enology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: In order to choose the best optimized method for isolating total RNA from grapevine tissues, the effects of optimized SDS-phenol method, optimized CTAB method and optimized Trizol method were compared by isolating total RNA from the grapevine buds, leaves and ripe berry skins. The results showed that quality and high concentration RNA were harvested by the optimized SDS-phenol method and the optimized CTAB method and the two methods are more suitable for RNA isolation from leaves and buds. At the same time, quality but less concentration RNA were gotten by the optimized Trizol method, while the total RNA was still enough for further research.

Key words: grapevine; total RNA; isolation; optimized SDS-phenol method; optimized CTAB method; optimized Trizol method