

小黑杨花粉总 RNA 提取方法的比较研究

袁红梅^{1,2}, 赵丽娟³, 郭文栋⁴, 吴建忠², 张利国², 关凤芝²

(1. 东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 黑龙江省科学院 自然与生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以小黑杨(*Populus simonii* × *P. nigra*)成熟花粉为试材,分别采用传统 CTAB 法、柱式植物 RNAout 试剂盒法、改良 CTAB 法及 SDS 法 4 种方法提取小黑杨花粉总 RNA;通过琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计及 RT-PCR 检测,研究比较了 4 种方法的优劣。结果表明:SDS 法提取的总 RNA 纯度高、完整性好,总 RNA 质量显著高于其它 3 种方法,且该方法具有步骤简单、提取时间短、成本低等优点,是一种适用于小黑杨花粉总 RNA 提取的比较理想的方法。

关键词:小黑杨;花粉;总 RNA 提取;RT-PCR

中图分类号:S 792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0113-04

杨树是世界范围内广泛种植的速生用材树种之一。它分布广,适应性强,是重要的栽培树种,也是重要的工业用材树种。杨树属雌雄异体,种间杂交较易,杂种优势明显,杨树杂种优势的利用主要是通过控制花粉育性来实现的^[1]。对杨树花粉发育调控机制的研究,如花粉的个体发育、花粉管的极性生长以及花粉管与雌蕊的识别与互作等可以极大地提高育种实践中杂种优势利用的程度和范围^[2]。深入研究花粉发育的分子调控机制,克隆花粉中特异表达的基因,获得高质量的完整性好的花粉总 RNA 是关键。杨树花粉中富含多种次生代谢物,如多糖、多酚、单宁等物质。在细胞破碎后,这些物质将以不同的方式干扰 RNA 的提取,严重影响所提取 RNA 的质量和产量^[3-5]。目前,关于杨树花粉总 RNA 提取方法尚鲜见报道,该研究首次建立了杨树花粉总 RNA 的提取方法,以期杨树花粉发育的分子机理研究建立平台,也为其它林木花粉总 RNA 的提取提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009 年 4 月采集东北林业大学林场内 3 棵小黑杨含苞待放的雄花枝,进行修剪时主干顶端尽量不剪,每个枝条叶芽保留 2~3 个,室温水培。收集盛花期前 2 d 的花粉,室温自然晾干 24~48 h,贮藏于 -80℃ 冰箱备用。

第一作者简介:袁红梅(1979-),女,黑龙江依安人,博士,助理研究员,现主要从事作物遗传育种等研究工作。E-mail: yuanhm1979@163.com.

收稿日期:2012-11-07

试剂:柱式植物 RNAout 试剂盒购自北京天泽恩基因科技有限公司;氯仿、Tris 平衡酚(pH 7.8, pH 4.0)、异丙醇、无水乙醇等均为国产分析纯。提取 RNA 时所用的量筒、试剂瓶等玻璃制品以及研钵、药勺等均用 0.1% DEPC 处理。

溶液:(1) SDS 提取液:2% SDS (W/V), 硼砂 0.025 mol/L, pH 8.5, DEPC 处理。(2) 2×CTAB 提取液:2% (W/V) CTAB, 2 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。(3) 改良 CTAB 提取液:2.5% (W/V) CTAB, 硼砂 0.025 mol/L, NaCl 1.4 mol/L, pH 8.5, DEPC 处理。(4) SSTE 溶液:1.0 mol/L NaCl, 0.5% (W/V) SDS, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。

1.2 试验方法

1.2.1 传统的 CTAB 法 加 600 μL 2×CTAB 提取液和 15 μL β-巯基乙醇于 10 mL 离心管中, 65℃ 温浴 15 min。液氮研磨 0.1 g 花粉样品, 装入离心管中, 再将温浴过的提取液加入到该离心管中漩涡混匀, 室温下静置 10 min。12 000 r/min 室温下离心 10 min。吸取上清于新的离心管中, 加入等体积氯仿漩涡混匀, 室温下 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清, 加 1/4 体积的 8 mol/L LiCl, 上下颠倒混匀, 4℃ 沉淀过夜(或 -20℃ 沉淀 2 h)。12 000 r/min 4℃ 离心 15 min 收集沉淀; 用 500 μL SSTE 溶解沉淀, 洗去 DNA 及其它杂质。加等体积的酚/氯仿漩涡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清, 重复抽提 1 次。吸取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇混匀; -70℃ 沉淀 30 min 或 -20℃ 沉淀 2 h。12 000 r/min 4℃ 离心 20 min; 弃上清, 用 200 μL 70% 乙醇洗涤沉淀, 晾干, 溶于 20 μL DEPC

处理水中,充分溶解沉淀。然后加 DNase 进行消化反应,琼脂糖凝胶电泳检测^[4]。重复 3 次。

1.2.2 改良的 CTAB 法 向 1.5 mL 离心管中加入 600 μ L 改良 CTAB 提取液,60 μ L β -巯基乙醇;将杨树花粉用液氮研磨后迅速加入到离心管中,65℃温浴 8 min,迅速置于冰上,待冷却后,加入 400 μ L Tris 苯酚和 300 μ L 氯仿,用漩涡振荡器剧烈震荡 3 min;12 000 r/min,4℃离心 5 min,转移上清液到新离心管中,向上清液中加入 300 μ L Tris 苯酚和 300 μ L 氯仿,剧烈震荡 2 min,12 000 r/min,4℃离心 5 min,取上清液;用等体积氯仿抽提 1 次;向上清液中加入等体积的 LiCl(4 mol/L)和 1/2 上清液体积的无水乙醇,混匀,冰浴 10 min,12 000 r/min,4℃离心 10 min,沉淀 RNA;用 75%的乙醇洗涤沉淀,溶于适量的 DEPC 水中待用。然后加 DNase 进行消化反应,琼脂糖凝胶电泳检测^[6]。重复 3 次。

1.2.3 柱式植物 RNAout 试剂盒法 根据北京天泽恩基因科技有限公司 RNA 提取试剂盒(柱式植物 RNAout)说明进行操作。重复 3 次。

1.2.4 SDS 法 向 1.5 mL 离心管中加入 600 μ L SDS 提取液,60 μ L β -巯基乙醇,400 μ L Tris 酚,300 μ L 氯仿。将杨树花粉用液氮研磨后迅速加入到离心管中,用漩涡振荡器剧烈震荡 3 min。12 000 r/min 4℃离心 5 min。转移上清液到新离心管中,并加入 300 μ L Tris 酚和 300 μ L 氯仿,漩涡震荡 2 min。12 000 r/min 4℃离心 5 min。转移上清液到新离心管中,加入等体积的氯仿,漩涡震荡 2 min。12 000 r/min 4℃离心 5 min。转移上清液到新离心管中,加入等体积的 4.0 mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇混匀,冰浴 10 min。12 000 r/min 4℃离心 10 min。沉淀溶于适量 DEPC 水中,待溶解后加入 1/10 体积的 2.0 mol/L NaAc,3 倍体积的无水乙醇,冰浴 10 min。10 000 r/min 4℃离心 10 min。用 75%乙醇洗涤沉淀 1 次,将沉淀溶于适量的 DEPC 水中。然后加 DNase 进行消化反应,琼脂糖凝胶电泳检测^[7]。重复 3 次。

1.2.5 RNA 纯度分析 紫外分光光度计分别测定所提 RNA 样品 230、260 和 280 nm 处的吸光值,计算 OD_{260}/OD_{280} 的比值,估算 RNA 的纯度。

1.2.6 RNA 完整性分析 用 1.5%琼脂糖凝胶于 150 V 电压下电泳 7 min,在凝胶成像系统上观察 RNA 条带的清晰度和完整性。

1.2.7 RT-PCR 分析 参照 TaKaRa PrimeScript™ RT Regant Kit(大连宝生物公司 Code:DRR037S)说明,以 Oligo dT 为引物,以消化后的 RNA 为模板,反转录合成 cDNA。根据 *Actin* 基因 EF418792 设计 1 对特异性引物,上游引物:5'-GCTGGGTTTGCTGGGGAT-3',下游引物:5'-TCTGTAAAGGAGGACTGGGTGCT-3' 进行

PCR 反应。25 μ L 反应体系为:10×Buffer 2.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,dNTP(10 mmol/L)2.5 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)2.0 μ L,cDNA 1 μ L,*Taq* 酶(5 U/L)0.25 μ L,ddH₂O 14.75 μ L。扩增条件为:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存,PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度检测

230、260 和 280 nm 下的吸光值分别代表了盐、核酸和蛋白质等有机物的含量。 OD_{260}/OD_{280} 的值反映了 RNA 中的蛋白质等有机物的污染程度; OD_{260}/OD_{230} 值反映了 RNA 中的盐离子或多糖的污染程度。4 种方法提取 RNA 样品的吸光值见表 1。由表 1 可以看出,传统 CTAB 法、试剂盒法提取的 RNA 样品 OD_{260}/OD_{230} 、 OD_{260}/OD_{280} 的值均偏低,样品中蛋白、盐离子和多糖等污染严重,如进行后续试验需要进一步纯化去杂质。改良 CTAB 法、SDS 法所提取的 RNA 样品 OD_{260}/OD_{230} 和 OD_{260}/OD_{280} 的值均在正常范围内,样品中蛋白、盐离子和多糖等污染较少,RNA 纯度较高,符合后续试验的要求。小黑杨花粉具有坚韧的细胞壁,破壁困难,在液氮研磨过程中花粉材料易溅到研钵外造成不同程度的损失,因此未计算 RNA 的得率。

表 1 不同方法提取总 RNA 的纯度比较

Table 1 The purity comparison of total RNA extracted using different methods

| 方法 | OD_{260}/OD_{230} | OD_{260}/OD_{280} | 浓度/ μ g· μ L ⁻¹ |
|-----------|---------------------|---------------------|------------------------------------|
| 传统 CTAB 法 | 1.54 | 1.43 | 0.58 |
| 试剂盒法 | 1.62 | 1.57 | 1.15 |
| 改良 CTAB 法 | 1.92 | 1.96 | 1.32 |
| SDS 法 | 2.14 | 2.08 | 2.38 |

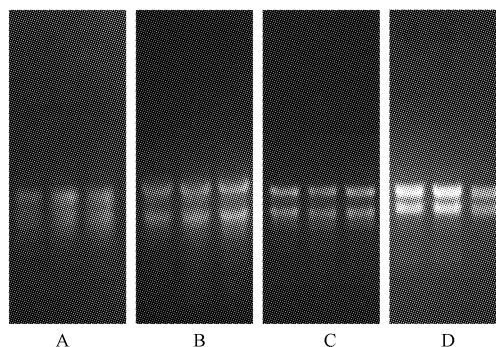


图 1 不同方法提取总 RNA 电泳图

注:A:传统 CTAB 法;B:试剂盒法;C:改良 CTAB 法;D:SDS 法。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of total RNA extracted using different methods

Note: A. CTAB method; B. RNAout kit; C. The improved CTAB method; D. SDS method.

2.2 RNA 完整性比较

用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 4 种不同方法提取的小黑杨花粉 RNA 的完整性。由图 1 可见, SDS 法提取的总 RNA 有清晰的 28S 和 18S 2 条带, 且 28S 条带的亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍, 带与带之间无明显弥散现象, 表明提取的 RNA 完整性较好。改良 CTAB 法提取的总 RNA 样品 28S 和 18S 2 条带清晰, 无明显弥散现象, 但 28S 与 18S 2 条带的亮度相似, 表明该方法提取的总 RNA 有降解, RNA 样品的完整性不及 SDS 法提取的效果好。试剂盒法提取的总 RNA 样品亦有 28S 和 18S 2 条带, 但 28S 与 18S 2 条带的亮度无 2 倍关系, 带与带之间有明显拖尾, 降解现象明显, RNA 的完整性较差。传统 CTAB 法提取的总 RNA 具有多条带, 28S 和 18S 2 条带不清晰, 呈现弥散状态, RNA 降解严重。

2.3 RT-PCR 检测结果

以 4 种不同方法提取的 RNA 反转录获得的 cDNA 为模版, 利用 *Actin* 特异引物进行 RT-PCR 扩增反应, 结果如图 2 所示, SDS 法和改良 CTAB 法提取的 RNA 经 RT-PCR 反应后均扩增到 1 条 266 bp 的 DNA 片段, 电泳条带清晰, SDS 法条带的亮度高于改良 CTAB 法, 基因片段大小与理论值一致。结果表明这 2 种方法提取的 RNA 质量较好, 反转录活性高, 均可用于后续分子生物学研究, 但 SDS 法优于改良的 CTAB 法。试剂盒法提取的 RNA 经 RT-PCR 反应后也扩增到 1 条 266 bp 的 DNA 片段, 但电泳条带较浅, 结果表明该方法提取的 RNA 样品的反转录活性较 SDS 法和改良 CTAB 法差。传统 CTAB 法提取的 RNA 样品经 RT-PCR 反应后未扩增到目的片段, 结果表明传统 CTAB 法提取的 RNA 质量较差, 反转录活性低, 不能满足 RT-PCR 等进一步分子生物学实验的要求。

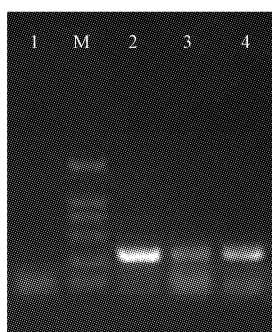


图 2 不同方法提取 RNA 的 *Actin* 基因 RT-PCR 电泳图

注: M; Maker (DL 2 000); 1. 传统 CTAB 法; 2. SDS 法; 3. 试剂盒法; 4. 改良 CTAB 法。

Fig. 2 The RT-PCR results of *Actin* using total RNA extracted by different methods

Note: M. Maker (DL 2 000); 1. CTAB method; 2. SDS method; 3. RNAout kit; 4. The improved CTAB method.

3 讨论

分离完整性好、纯度高的 RNA 是基因克隆和表达分析等研究的前提^[8-10]。但对于多年生木本植物而言, 其花粉细胞中蛋白质、多糖等组成成分较多, 使得 RNA 的提取相对于其它植物材料要困难许多。该研究中采用的 SDS 法经多次试验证明, 该法提取的 RNA 步骤简单、提取时间短、成本低、纯度高、完整性好, RNA 的质量显著高于其它方法。SDS 法不仅适用于小黑杨成熟花粉 RNA 的提取, 而且适用于吸水花粉、花粉管及小黑杨叶片等 RNA 的提取, 是一种普遍适用于小黑杨多种组织 RNA 提取的比较理想的方法。SDS 是强的蛋白质变性剂, 对 RNase 具有较强的抑制作用, 同时, 可避免高温水浴可能导致的 RNA 降解, 因此, 其成功率较 CATB 法有明显提高。SDS 法中在提取液中预先加入 Tris-酚、氯仿, 能更为有效地抑制 RNase 的活性。同时, 用酚、氯仿进行长时间的剧烈震荡抽提, 可以较彻底地变性 RNase, 并通过离心将之除去, 防止了可能存在的 RNase 再复性降解 RNA^[7]。LiCl 可以选择性沉淀 RNA, 同时将大多数多糖留在溶液中, 但有时会有 DNA 污染, 3 mol/L 的 NaAc 也可以选择性地沉淀 RNA, LiCl 与 NaAc 同时使用可以更有效的去除多糖和其它杂质, 纯化 RNA。通常提取 RNA 时所用的移液枪头、离心管等均需用 0.1% DEPC 处理, 避免外源 RNase 对 RNA 的降解作用。该研究经反复多次实践发现, 选择新开包装的移液枪头、离心管, 无需经过 0.1% 的 DEPC 处理, 直接使用并不影响 RNA 提取的质量, 该简化步骤省略了 DEPC 对移液枪头、离心管等耗材的繁琐处理, 同时也减少了与有害物质的接触。

参考文献

- [1] 张勇, 张守攻, 齐力旺, 等. 杨树-林木基因组学研究的模式物种[J]. 植物学通报, 2006, 23(3): 286-293.
- [2] 魏丽勤, 王台. 花粉发育的转录组研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24(3): 311-318.
- [3] 王大江, 冯建荣, 姜新, 等. 杏花粉总 RNA 的提取[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 445-448.
- [4] 黄雪梅, 张守涛, 杨超, 等. 玉米花粉总 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 河南农业科学, 2009(4): 34-36.
- [5] 郑杨, 陈学森, 赵春芝, 等. 中国櫻桃花粉总 RNA 的提取[J]. 落叶果树, 2008(2): 16-17.
- [6] 王玉成, 薄海侠, 杨传平, 胡杨. 桉柳总 RNA 提取方法的建立[J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(5): 99-100.
- [7] 王玉成. 桉柳抗逆分子机理研究与相关基因的克隆[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [8] 陈高, 单雷, 周丽侠, 等. 花生总 RNA 提取方法比较研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 214-218.
- [9] 王西成, 乔玉山, 欧春青, 等. 三种梨果皮总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(2): 91-93.
- [10] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; twenty-something years on[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 581.

外源激素对盐胁迫下草莓试管苗酶活性的影响

郑 平 生

(甘肃省果业管理办公室,甘肃 兰州 730030)

摘 要:以草莓“香菲”和“大将军”为试材,研究了一定浓度的细胞分裂素(6-BA)和生长素(IAA)协同处理对盐胁迫下草莓试管苗叶片酶活性的影响。结果表明:15 d后,0.5 mg/L的 IAA 和 6-BA 处理 0.3%盐胁迫下的试管苗生长趋于正常,体内丙二醛含量降低,保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)以及过氧化氢酶(CAT)活性增强,盐胁迫危害程度减轻。

关键词:草莓试管苗;盐胁迫;外源激素;缓解

中图分类号:S 668.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0116-03

植物体内的激素含量与其耐盐性有一定的关系。在盐分胁迫下用激素处理可以提高植物抗盐性,抵消盐分胁迫,促进植物生长^[1]。外源 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)能够增加大麦等植物体内细胞分裂素含量,缓解盐胁迫对植物正常生长的伤害^[2-4]。吲哚乙酸(IAA)能够增加盐胁迫下大豆幼苗干物质产量,提高光合效率,降低植物膜脂过氧化及膜的相对透性,促进盐胁迫下大豆幼苗的生长^[5]。用赤霉素(GA₃)处理盐胁迫下的菜豆,可促其生长,抵消盐分对菜豆的生长和光合及运输等的抑制作用;GA₃处理盐胁迫下的草莓试管苗,试管苗叶片叶

绿素含量增加,体内丙二醛含量降低,保护酶 SOD、POD、CAT 活性增强,生长抑制受到减弱^[6]。显然,植物体内各类激素的平衡与植物对盐碱的敏感性有关。现对盐胁迫下外源 6-BA 和 IAA 对草莓试管苗叶片酶活性的影响进行研究,以期探讨外源激素对盐胁迫下草莓生长机理,为草莓抗盐研究和栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试草莓品种为“香菲”和“大将军”,选择在 MS 培养基上生长健壮、大小一致的继代试管苗为试材。

1.2 试验方法

设处理 1:MS+0.3% NaCl、处理 2:MS+0.3% NaCl+0.5 mg/L 6-BA、处理 3:MS+0.3% NaCl+0.5 mg/L IAA 3 个处理,以培养基 MS 为对照,每处理 20 瓶,每瓶 3 株,

作者简介:郑平生(1975-),男,硕士,农艺师,研究方向为果树生物技术,现主要从事果树生物技术研究及示范推广等工作。

基金项目:甘肃省扶贫办资助项目(0070730)。

收稿日期:2012-11-12

Comparison and Analysis of Total RNA Extraction Methods from *Populus simonii* × *P. nigra* Pollen

YUAN Hong-mei^{1,2}, ZHAO Li-juan³, GUO Wen-dong⁴, WU Jian-zhong², ZHANG Li-guo², GUAN Feng-zhi²

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. Institute of Crop Breeding, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 4. Institute of Nature and Ecology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Taking the pollen of *Populus simonii* × *P. nigra* as material, four kinds of total RNA extraction methods (traditional CTAB method, RNAout kit, improved CTAB method and SDS method) were compared using agarose gel electrophoresis, spectrophotometry and RT-PCR method. The results showed that SDS method was suitable for total RNA with high purity and good integrity extraction from *Populus simonii* × *P. nigra* pollen. It had also the advantage of simplicity, less operation time and low cost. It was an ideal method for total RNA extraction from *Populus simonii* × *P. nigra* pollen.

Key words: *Populus simonii* × *P. nigra*; pollen; RNA extraction; RT-PCR