

# 一种高效提取植物不同组织 RNA 的方法

任 杰<sup>1</sup> 徐秀红<sup>1</sup> 张素丽<sup>2</sup> 冷 平<sup>2</sup>

(1. 农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 中国农业科学院 烟草研究所, 山东 青岛 266101;

2. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

**摘要:** 为了提高植物不同组织提取质量和效率, 降低成本, 在热硼酸法的基础上探索出一种适于植物不同组织总 RNA 提取方法。利用该方法从植物根、茎、叶、不同成熟期果实、不同成熟期种子和不同成熟期果柄中提取的总 RNA 经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析证明具有较高的纯度和完整性。所得 RNA 的  $A_{260}/A_{230}$  大于 2.3,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0, 并且 RNA 产量高, 可以满足 RT-PCR 和 Real time RT-PCR 的实验需要。该方法能够满足一般分子生物学下游操作的要求, 是一种理想的植物不同组织总 RNA 提取方法。

**关键词:** 植物组织; 总 RNA; 热硼酸法

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)增刊-0035-04

## A Method for Effective Isolation of Total RNA from Different Plant Tissues

REN Jie<sup>1</sup>, XU Xiu-hong<sup>1</sup>, ZHANG Su-li<sup>2</sup>, LENG Ping<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture, Tobacco Research

Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to improve the quality and efficiency, reduce the cost of total RNA isolation from different plant tissues, a method for effective isolation of total RNA from different plant tissues was invented based on hot borate method. The total RNA isolating from plant root, stem, leaf, fruits of different ripening stages, seeds of different ripening stages, pedicle of different ripening stages using this method had high purity and integrality detected by ultraviolet spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. The  $A_{260}/A_{230}$  of yielded total RNA was more than 2.3 while  $A_{260}/A_{280}$  ranged from 1.8 to 2.0. The RNA can be applied to RT-PCR and Real time RT-PCR. This method can meet with demands of down stream experiment of common molecular biology and is an ideal method of plant total RNA extraction.

**Key words:** Plant tissue; Total RNA; Hot Borate method

提取高质量植物不同组织 RNA 是对调控植物生长发育和代谢等相关基因进行分子生物学研究的基础。一般来说, 植物的某些组织如嫩叶细胞内成分简单, 较易提取纯度高的 RNA, 市面上也有试剂盒可用于提取此类材料。而有些组织如成熟叶、果实、种子等富含多糖、多酚等次生代谢物质, 这些物质在提取 RNA 时很难将其去除, 试剂盒往往无能为力, 所得的 RNA 往往纯度很低, 严重影响后续的操作。因此, 即使同种植物的不同组织其 RNA 提取方

法会有很大的差异<sup>[1]</sup>。

目前已经有多种植物总 RNA 的提取方法, 如胍盐法<sup>[2-3]</sup>、丙酮法<sup>[4]</sup>、CTAB 法<sup>[5]</sup>等, 但不同方法对材料的针对性和选择性较强, 多是针对某种特定植物或特定植物的特定组织<sup>[6-8]</sup>。因此不同的组织和材料, 其总 RNA 提取方法往往需要通过试验进行确定。如果研究涉及的组织材料种类较多, 则一种 RNA 提取方法往往不能满足要求, 增加了成本, 降低了效率。本研究在热硼酸法的基础上探索出一种适于植物不同组织总 RNA 提取的方法。利用该方

收稿日期: 2011-03-16

基金项目: 北京市科委重大科技项目(D0706002000091); 国家烟草专卖局科技重点项目(110201002017)

作者简介: 任 杰(1982-), 男, 山东青岛人, 博士, 主要从事植物生长发育研究。

法对番茄、黄瓜、草莓、烟草等草本植物以及甜樱桃、苹果、柿子、桃、葡萄等木本植物的根、茎、叶、花、果实、种子的总 RNA 进行了提取。检测结果表明,获得的总 RNA 完整性较好,纯度高,可用于下游 RT-PCR 和 Real time RT-PCR 的需要,且成本低、方法灵活。证明该方法是一种适用植物不同组织的总 RNA 提取方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 采集木本植物甜樱桃(*Prunus avium* L.) 等植物的根、茎、叶、不同成熟期的果实、种子、果柄,切成小块,液氮速冻后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 试剂及器材处理 RNA 提取缓冲液为 0.2 mol/L 四硼酸钠,30 mmol/L EGTA,1% (W/V) SDS,1% (W/V) 脱氧胆酸钠,10 mmol/L DTT,1% (W/V) NP-40,2% PVP-40。另外配制 10 mol/L LiCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),2 mol/L KAc (pH 6.0),2 mol/L KCl,无水乙醇,DEPC 处理水备用。所有研钵、玻璃制品  $180^{\circ}\text{C}$  干烤 8 h,在配制的溶液中加入 DEPC,使浓度为 0.1%, $37^{\circ}\text{C}$  处理 12 h,高压灭菌。

1.2.2 RNA 的提取 取 1.0 g 左右根、茎、叶、果实 0.5 g 左右种子(新鲜或液氮保存的)放入研钵中,液氮研磨后转入已预热到  $80^{\circ}\text{C}$  装有 3 mL 提取缓冲液(PVP、DTT、NP-40 现用现加)的 7 mL 离心管中,混匀,然后加入 40  $\mu\text{L}$  20 mg/mL 蛋白酶 K,混匀, $42^{\circ}\text{C}$  水浴 1.5 h。然后加入 261  $\mu\text{L}$  2 mol/L KCl (终浓度 160 mmol/L),混匀后冰浴 1 h, $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 30 min;将上清液转移到新的 7 mL 离心管中,再次加入 260  $\mu\text{L}$  2 mol/L KCl,混匀后冰浴 1 h, $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 20 min;将上清液转移到新的 7 mL 离心管中,加入 1/4 体积 10 mol/L LiCl (终浓度 2 mol/L), $4^{\circ}\text{C}$  过夜使 RNA 沉淀。 $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,往沉淀中加入 2 mL 2 mol/L LiCl,轻轻晃动,使沉淀均匀分散在溶剂中; $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,重复上一步。弃上清,往沉淀中加入 2 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),沉淀溶解(5 min 后仍然不溶的为不纯物)。加入 200  $\mu\text{L}$  2 mol/L KAc (pH 5.5),冰浴 15 min; $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 20 min,将上清液移入新的 7 mL 离心管中,加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, $-80^{\circ}\text{C}$  放置 2~3 h。 $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 20 min,弃上清,往沉淀中加入 2 mL 70% 乙醇,洗涤沉淀。 $4^{\circ}\text{C}$ ,10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,超净

台上风干沉淀,加入 100~200  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解 RNA。

1.2.3 紫外检测 取上述 RNA 溶液 1  $\mu\text{L}$ ,用美国 NanoDrop 公司 ND1000 紫外分光光度计检测其在 230、260、280 nm 波长吸光度  $A_{230}$ 、 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ ,并计算  $A_{260}/A_{230}$  和  $A_{260}/A_{280}$ 。

1.2.4 凝胶电泳 1  $\times$  TBE 缓冲液,1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 RT-PCR 及 Real time RT-PCR 反应 提取甜樱桃果实、种子、果柄、叶片和根总 RNA,采用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit (TaKaRa) 反转录成单链 cDNA,用 Corbett Research 公司 Rotor-Gene 3000 Two-filter Real-time Cycler 对  $\beta$ -actin 基因进行普通 PCR 和实时荧光定量 PCR。所用引物同参考文献 [9]。定量 PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> kit (TaKaRa)。反应体系包括:1  $\mu\text{L}$  primer mix (包括 5  $\mu\text{mol/L}$  上游和下游引物),2  $\mu\text{L}$  cDNA,12.5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2  $\times$ ) mix 和 9.5  $\mu\text{L}$  水。反应条件为: $95^{\circ}\text{C}$  30 s (1 个循环); $95^{\circ}\text{C}$  15 s, $58^{\circ}\text{C}$  20 s, $72^{\circ}\text{C}$  15 s (40 个循环)。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 产量和质量分析

为了验证本方法对植物不同组织总 RNA 提取的可行性,对木本植物甜樱桃根、茎、叶、果实、种子不同植物组织进行总 RNA 提取,结果表明,本方法可以有效提取甜樱桃根、茎、叶、不同成熟期果实、种子和果柄总 RNA,且产量较高,不同组织 RNA 产量不同,以种子最高(表 1)。为了检测所提取 RNA 的纯度,对特征波长吸收比值进行了计算,结果表明植物不同组织 RNA 的  $A_{260}/A_{230}$  均大于 2.3, $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0(表 1),这说明本方法可以有效地去除蛋白质和多糖,所提取总 RNA 纯度较高。为了进一步检测 RNA 的完整性,进行了 1% TBE 琼脂糖凝胶电泳检测,从电泳图上可以看出各组织 RNA 条带整齐,无拖尾,28 S rRNA 条带的亮度大约是 18 S rRNA 条带的 2 倍,这说明总 RNA 完整性较好,没有降解,并且没有 DNA 污染(图 1)。上述结果说明本方法可以高效地提取植物不同组织总 RNA。

### 2.2 RT-PCR 分析

为验证所提取的总 RNA 质量是否满足下游基因扩增的需要,利用所提取的总 RNA 进行 RT-PCR,利用  $\beta$ -actin 持家基因特异性引物,以本试验所提取的其中 12 个 RNA 样品的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,结果都得到了 185 bp 片段,电泳条带清晰一

致大小和β-actin 持家基因理论大小一致,说明本试验提取的 RNA 可以用于 RT-PCR。

表 1 不同组织提取 RNA 的产量和质量

提取材料 Material		RNA 产量/( μg/g) RNA yields	纯度 Purity	
			A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
根	Root	79.8	2.36	1.94
茎	Stem	75.3	2.38	1.92
叶	Leaf	83.9	2.36	1.92
幼果果肉	Pulp of immature green fruit	124.7	2.33	1.92
转色期果肉	Pulp of turning fruit	87.8	2.39	1.94
成熟果果肉	Pulp of mature fruit	97.8	2.39	1.93
幼果种子	Seed of immature green fruit	290.2	2.35	1.89
转色期种子	Seed of turning fruit	265.6	2.35	1.92
成熟果种子	Seed of mature fruit	274.5	2.36	1.96
幼果果柄	Pedicle of immature green fruit	62.7	2.35	1.92
转色期果柄	Pedicle of turning fruit	72.5	2.36	1.96
成熟果果柄	Pedicle of mature fruit	79.7	2.31	1.97

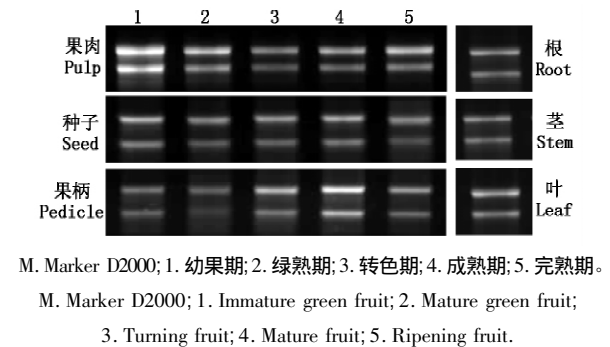


图 1 甜樱桃不同组织提取总 RNA 电泳结果  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from different tissues of sweet cherry

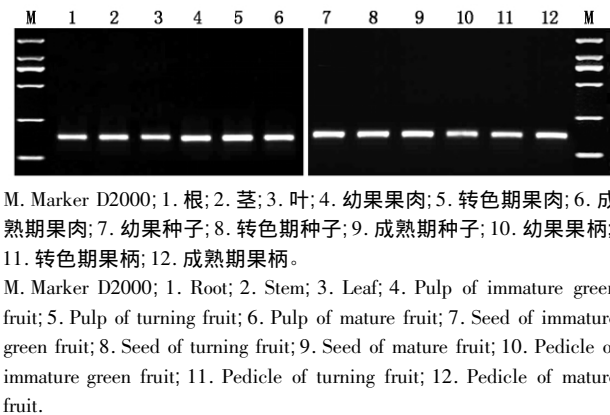


图 2 不同组织β-actin 基因 RT-PCR 扩增结果  
Fig.2 RT-PCR amplification of β-actin gene from different tissues

2.3 Real time RT-PCR 分析

实时荧光定量 RT-PCR 是定量检测基因表达的简便快捷方法之一,但是它对 RNA 的纯度和完整性都有很高要求,特别是要避免 DNA 污染。为了验证本方法提取的 RNA 的可用性,利用提取的 RNA 对β-actin 基因进行了 Real time RT-PCR 分析。从实时

扩增曲线可以看出,利用不同组织提取的 RNA 进行反转录后都能进行实时荧光定量 PCR 反应(图 3),从融解曲线图中可以看出,在基因扩增结束后的升温过程中,只出现一个峰值,这说明本 Real time RT-PCR 所用引物、体系合适,而且无 DNA 污染。因为如果存在 DNA 污染,则融解曲线会出现杂峰(图 4)。

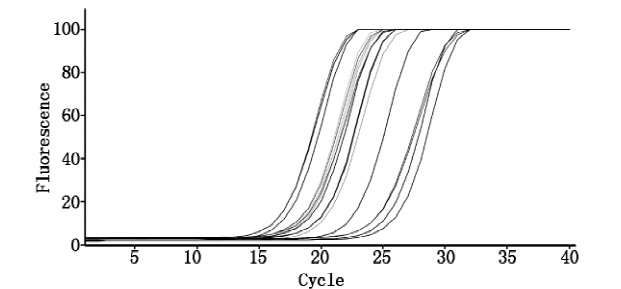


图 3 不同组织β-actin 基因 PCR 实时扩增曲线  
Fig.3 Real time PCR amplification curves of β-actin gene from different tissues

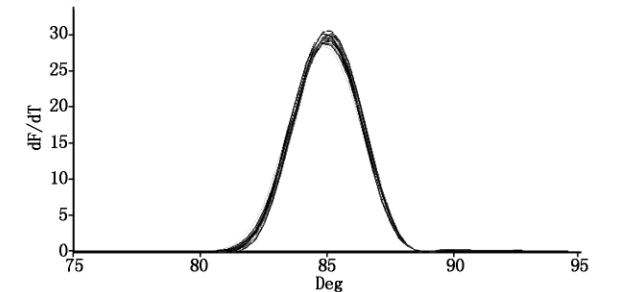


图 4 不同组织β-actin 基因融解曲线  
Fig.4 Melt curve of β-actin gene from different tissues

3 讨论

热硼酸法由于使用了蛋白酶 K,与其他方法相比成本稍高,尤其是在提取果实等组织的 RNA 时所用材料较多,体系较大(一般 50 mL)<sup>[7,10]</sup>,蛋白酶 K

用量也较大,造成提取成本较高。而本方法缩小了提取体系(7 mL),最多只用 1.0 g 材料,蛋白酶 K 用量大大降低,因而成本也较低。虽然缩小了提取体系,但 RNA 产量和质量完全可以满足后续研究的需要。除此之外,随着体系的缩小提取效率大大增加,一般用 50 mL 体系一次最多提 4~6 个样品,而用 7 mL 体系一次最多可提取 18 个样品。因此本方法在 RNA 提取方面缩小了体系,提高了效率,降低了成本。

在去除蛋白方面,本方法通过两次加入 KCl 进行,在第二次加入 KCl 后仍然有白色沉淀,但第三次加入后离心则无沉淀,这说明加 KCl 一次去除蛋白是不充分的,加两次 KCl 去除蛋白更彻底。RNA 很容易降解,但从笔者多年的提取经验来看,在 LiCl 洗涤之前因为有提取缓冲液的保护 RNA 一般不会降解。此外,RNA 沉淀风干后用 DEPC 水溶解即可,完全可以满足后续试验的需要。在用凝胶电泳检测 RNA 完整性时,采用  $1 \times$  TBE 缓冲液,1% 琼脂糖凝胶电泳即可,可以不用 MOPS 缓冲液,因为 MOPS 缓冲液见光容易变黄变黑,如果存放时间过长会影响电泳效果,影响对 RNA 完整性的判断。

此外,应用本方法还同样从番茄、黄瓜、草莓、烟草等草本植物以及苹果、梨、柿子、桃、葡萄等木本植物的根、茎、叶、花、果实、种子中提取到了高质量的总 RNA。这说明本方法适用于不同植物不同组织的 RNA 的提取。

总之,本方法在提高效率,降低成本的同时,还可以高效稳定的从根、茎、叶、花、不同成熟期果实、种子等植物不同组织中提取高质量 RNA,并能满足实时荧光定量 RT-PCR 等分子生物学实验要求,是一种理想的提取植物不同组织 RNA 的方法。

#### 参考文献:

- [1] Anisworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa*( Sorrel) [J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 198 - 203.
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156 - 159.
- [3] 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: 581 - 585.
- [4] Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91 - 95.
- [5] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113 - 116.
- [6] 符秀梅, 韩淑梅, 朱红林, 等. 一种有效的红树根部总 RNA 提取方法 [J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 13 - 15.
- [7] 姚玉新, 赵玲玲, 郝玉金, 等. 改良热硼酸法高效提取苹果果实 RNA [J]. 果树学报, 2005, 22(6): 737 - 740.
- [8] 张志刚, 李 桐, 官春云, 等. 改良提取水稻胚乳和拟南芥花柱中 DNA 和 RNA 的 SDS 法 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 493 - 495.
- [9] 任 杰, 吴洁芳, 冷 平, 等. 甜樱桃果实 *NCED* 基因的克隆及其表达 [J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 891 - 898.
- [10] 裴 东, 谷瑞生. 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.