

一种有效的红树根部总 RNA 提取方法

符秀梅², 韩淑梅², 朱红林², 周 秀², 李小靖², 吴 辉², 谢 俊², 陈银华^{1, 2}

(1 海南大学 教育部热带生物资源重点实验室 海南 海口 570228 2 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘要: 红树作为一种重要的耐盐植物, 为耐盐研究提供了重要的基因资源。本研究分别采用 SDS TRIZOL, CTAB 等 3 种不同的方法进行了红树 RNA 提取, 经电泳分析、紫外吸收检测、cDNA 合成等技术手段检测表明, 改进的 CTAB 法所提取的红树总 RNA 质量最好。

关键词: 红树; RNA 提取; CTAB 法

中图分类号: Q52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)增刊-0013-03

An Efficient Method for Preparation of the Total RNA from the Root of Mangrove

FU Xiulme², HAN Shumei², ZHU Honglin², ZHOU Xiu², LIXiaojing²,
WU hui², XIE Jun², CHEN Yin-hua^{1, 2}

(1. Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Haikou 570228 China

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228 China)

Abstract: The mangrove is an important salt tolerance plant. In this research, three methods for isolation of total RNA from the root of mangrove were done. The improved method of CTAB was verified to be the most efficient method through the way of the electrophoretic patterns of nucleic acids and absorbance at 230, 260 and 280 nm in a UV-Vis spectrophotometer.

Key words: Mangrove; Preparation of RNA; Method of CTAB

高质量的核糖核酸 (RNA) 是基因克隆、表达分析、功能鉴定的前提和基础。但由于不同植物、不同组织复合蛋白、多糖、多酚等次生代谢物质含量不一, 因此还没有一种能适用于所有植物所有组织的 RNA 提取方法。目前在分子生物学研究中, 主要应用的 RNA 提取方法有 SDS 法^[1], TRIZOL 试剂一步提取法^[2]、CTAB 法^[3]等。但针对具体植物采用什么方法需要具体摸索。

红树作物一种盐生植物, 在长期的进化中形成了高复合蛋白、高多糖、高多酚以及革质化严重的特点^[4]。这给核酸提取带来了很大的困难。而红树又为耐盐研究提供了重要的基因资源。因此, 建立一种合适的 RNA 提取方法是当务之急。

本研究分别采用 SDS TRIZOL、改进的 CTAB 等 3 种不同的方法进行红树 RNA 提取, 经电泳分析、紫外吸收峰检测、cDNA 合成等技术手段检测 3 种不同提取方法所获得 RNA 的质量, 结果表明, 本研

究所改进的 CTAB 法获得的 RNA 质量最好。

1 材料和方法

1.1 材料

供试红树植物为实验室栽培的秋茄 (Kandelia candel), 当幼苗长到三叶一心时取根。EDTA、CTAB、SDS、DEPC 等为 Amersco 公司产品, 琼脂糖为 OXOID 公司产品, TRIZOL 一步法提取试剂为 Invitrogen 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 提取方法

1.2.1 TRIZOL 试剂快速提取法 试验操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 SDS 提取法 SDS 法 RNA 提取缓冲液: 100 mmol/L Tris (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 5 mol/L KAc, 1% SDS。试验操作参照参考文献 [5]。

1.2.3 CTAB 提取法 参照裴东^[2]的方法进行改

收稿日期: 2009-10-02

基金项目: 教育部科技重点项目 (207092); 海南省自然科学基金 (80540 80612); 海南省重点学科建设项目

作者简介: 符秀梅 (1985-) 女, 江西人, 硕士, 主要从事抗逆植物资源利用研究。

通讯作者: 陈银华 (1976-) 男, 安徽安庆人, 副教授, 博士, 主要从事植物基因工程育种研究。

进。取出 100 mg根,置预冷的研钵中,加入液氮充分研磨,将其移至一离心管中;加 1 mL 65℃预热的 CTAB抽提液 (2% CTAB, 100 mmol/L Tris^o, Cl⁻ pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0, 2 mol/L NaCl, 2% PVP), 混匀; 65℃温育 30 min,再加等体积氯仿/异戊醇,混匀后于 4℃ 10 000 r/min离心 10 min,将上层水相移至新离心管中,加入 1/3 体积 8 mol/L LiCl-20℃沉淀 3~5 h, 4℃ 12 000 r/min离心 10 min,弃上清;沉淀用 70%乙醇漂洗 1~2 h,室温自然干燥,50 μL TE溶解,-20℃贮存备用。

1.3 RNA检测

取 2 μL RNA提取液于 1.5% 的甲醛变性琼脂糖胶上电泳,EB染色后于紫外灯下观测 RNA的纯度及完整性;取 RNA溶液 2 μL稀释至 400 μL,Unico公司 UV2100紫外分光光度计测定 230 260 280 nm下的吸光值,计算 A260/A280 A260/A230用于纯度分析。

1.4 cDNA合成

反转录和双链 cDNA PCR使用 Clontech公司的 SMARTTM cDNA Library Construction Kit(详见 www.Clonetech.com)。

2 结果与分析

2.1 RNA完整性分析

TRIzol法、SDS法是实验室常用的 RNA提取方法,对于含有较多多糖与多酚的红树材料,其 RNA分离提取效果很差(图 1)。而用改进的 CTAB法提取与 LC特异沉淀 RNA的特点相结合,所获得的 RNA效果好, RNA条带清晰,不拖尾;以 28 S和 18 S RNA条带为主,几乎看不到 5 S RNA条带,说明 RNA几乎无降解。

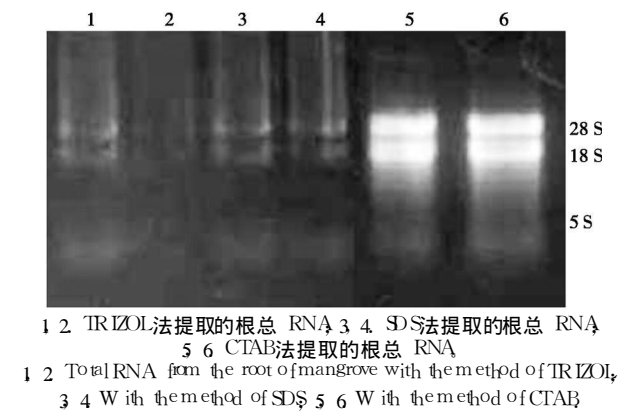


图 1 秋茄根部总 RNA
Fig 1 Total RNA from the root of mangrove

2.2 RNA纯度检测

用紫外分光光度计分别测量 3种不同方法提取

RNA的 A280 A260 A230值(表 1)。改进的 CTAB法提取的 RNA A260/A280比值为 1.94 说明 RNA纯度较高,几乎无蛋白质污染; A260/A230的值为 1.21 大于 1,说明改进的方法提取的 RNA几乎没有多糖和酚类的污染。而对于其他两种方法而言, A260/A280 A260/A230的值分别小于 1.8和 1.0 RNA纯度较差。从提取 RNA的产率来看,CTAB法的产率也明显高于其他方法。对等量的植物组织而言,3种方法中以 CTAB法 RNA提取量最大,约为其他 2种方法的 3~5倍。这一结果表明,3种方法中以改进的 CTAB法提取的 RNA质量最好、产率最高。

表 1 不同提取方法提取的红树根部总 RNA质量比较
Tab 1 The quality of total RNA from the root of mangrove with different method

	OD260/280	OD260/230	提取量/(μg/g)
SDS法	1.70	0.87	95
CTAB法	1.94	1.21	250
TRIzol	1.65	0.92	50

2.3 cDNA合成效果分析

为进一步检测,改进的 CTAB法提取的 RNA是否适合后续研究。我们采用 SMART技术进行双链 cDNA的合成研究,图 2所示为通过 21个循环进行 PCR扩增合成的双链 cDNA。可以看出该方法所获得的 RNA能很好的进行 cDNA合成,合成片段的大小为 300~3 000 bp符合后续试验的需要。

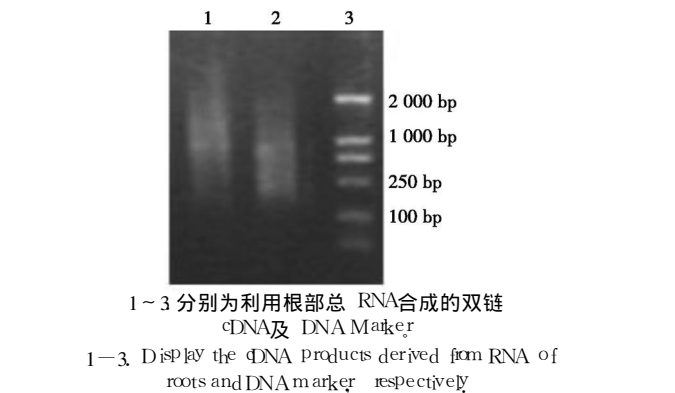


图 2 SMART cDNA合成
Fig 2 SMART cDNA synthesis

3 讨论

RNA样品中含有多糖,这不仅会降低沉淀的 RNA的溶解性,干扰 RNA的分光光度法定量测定,而且还会抑制以后的 RNA酶切反应和 mRNA纯化^[6]。因此,去除多糖是提取 RNA中的非常重要的环节。试验的 3种方法选用沉淀 RNA来分离多

糖类物质,但采用的沉淀试剂不同。CTAB法采用 8 mol/L 的 LiCl 沉淀 RNA 而 SDS 提取法和 TRIzol 法分别用醋酸和乙醇或异戊醇沉淀 RNA。由于多糖在 RNA 沉淀中或多或少会随 RNA 一起沉淀。因此,对含糖较多的木本植物应当选用对 RNA 选择性较好的沉淀试剂,并增加去除多糖的步骤,而改进的 CTAB 法则能做到这一点^[7,8]。

改良的 CTAB 法中,抽提液中加入 PVP 不但可有效吸附色素类物质,消除研磨过程中色素类物质的氧化干扰,而且样品和不溶性的 PVP 一起研磨,还可起到类似石英砂的作用,可增大样品研磨面积,使得样品粉碎得更完全。综合以上特点,本试验所采用的改进的 CTAB 法提取的 RNA 质量好、产量高,能有效的进行双链 cDNA 的合成,适合进一步分子生物学的需要。该方法是否适合其他高糖、高多酚含量植物的 RNA 提取值得进一步探究。

参考文献:

[1] 王文锋,肖月华,侯磊,等.棉花总 RNA 的快速提取

方法[J].河南农业大学学报,2002 36(3): 229—231.
[2] 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.
[3] 蒋建雄,张天真.利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA[J].棉花学报,2003 15(3): 166—167.
[4] 夏海武,吕柳新,陈桂信.羊蹄甲果荚中总 RNA 提取的新方法[J].分子植物育种,2006 4(1): 147—149.
[5] 夏兰芹,郭三堆.棉花 RNA 的快速提取方法[J].棉花学报,2000 12(4): 205—207.
[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning Laboratory Manual 2nd edn [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 4—5.
[7] Chang S J, Puryear J, Cane J A. A simple and efficient method for RNA isolating from pine trees[J]. Plant Molecular Biology Reporter 1993 11(2): 113.
[8] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae[J]. Anal Biochem 1988 174: 650—657.