

文章编号:1001-1498(2005)06-0769-04

孝顺竹 RNA 提取方法研究

杨卫东, 王敬文, 张金萍, 费学谦

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 孝顺竹; RNA; 提取; 改良 SDS 法

中图分类号: S795.9 文献标识码: A

A Study on Methods for RNA Isolation from Bamboos

YANG Wei-dong, WANG Jing-wen, ZHANG Jin-ping, FEI Xue-qian

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Isolation of high quality RNA from bamboos was complicated by high levels of polyphenols and polysaccharides which bind or co-precipitate with RNA. Using TRIzol, modified guanidine isothiocyanate, modified CTAB, modified hot borated and modified SDS method were investigated. Yield and quality were monitored by UV absorbance (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230}) and by native agarose gel, quality and yield of total RNA of five method extracted were compared. Result showed that RNA extraction using modified SDS method resulted in RNA of high quality from five methods investigated, ratio of A_{260}/A_{280} was over 1.9, and ratio of A_{260}/A_{230} was over 1.2, this method produced RNA at $560 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW) with no degradation. Modified SDS method is an efficient and effective procedure for the extraction of high quality and yield RNA from bamboos.

Key words: *Bambusa multiplex*; RNA; extract; modified SDS method

提取纯度高、完整性好、不含 DNA 或其它杂质的总 RNA 是进行 Northern 杂交、cDNA 合成、cDNA 文库构建、RT-PCR 及 mRNA 差异显示等分子生物学研究的基础。目前提取植物 RNA 方法有多种, 这些方法设计旨在 RNA 提取过程中清除多糖、多酚等杂质污染。在提取高质量 RNA 的过程中, 植物尤其木本植物通常含有大量的酚类、多糖和其他一些水溶性化合物与 RNA 共沉淀, 影响了 RNA 功能^[1]。目前应用较多和较广的有 5 种方法, 商业试剂盒 TRIzol, 以异硫氰酸胍为代表异硫氰酸胍法^[1, 2]、以阳离子去污剂 CTAB 代表 CTAB 法^[3, 4, 5]、热硼酸盐法^[6, 7], 和阴离子去污剂 SDS 为代表 SDS 法^[8~11]等。结合蛋白质、多糖和多酚去除, 以及 RNA 沉淀形成的这些方法, 往往要依据不同植物进行适当改

进。竹子是常绿木本植物, 一般是通过无性繁殖, 生长在外界环境中, 由于生长环境胁迫有着复杂的次生代谢, 积累了大量的次生代谢物质, 如多糖和多酚等物质^[13~15], 这些物质干扰 RNA 提取和纯化, 如果不清除, 会影响后续实验。在 RNA 提取过程中, 不溶性多聚聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 可有效防治多酚氧化, 增加研磨效率等作用^[11]。本文以竹类植物为试材, 对 5 种常规提取 RNA 方法进行适当改进, 目的是筛选和建立提取竹类植物 RNA 有效方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料和试剂

室外栽培孝顺竹 (*Bambusa multiplex* (Lour.) Raeuschel ex Schult. f.) 叶作为材料, 于 2004 年 7 月

收稿日期: 2005-01-18

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (M303374)

作者简介: 杨卫东 (1976—), 男, 山东菏泽人, 硕士, 自 2002 年以来, 主要从事竹子生理生化研究。

Tel: (0571) 63310074 E-mail: ywdheze@hotmail.com

采集幼梢嫩叶,采集的鲜叶速冻于液氮中,用前述5种常规方法提取总RNA,每种提取方法重复3次。在含有液氮的研钵中研磨时,均加入样叶(鲜)质量1/10的PVPP,研磨成细粉末状,约0.2 g于2 mL离心管中进行RNA提取。PVPP为Sigma产品,其他试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。提取过程中所需器具均用 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 焦碳酸二乙醇(DEPC)浸泡处理,再灭菌,所用试剂用DEPC水配制。提取RNA浓度计算:RNA浓度 = $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \times$ 稀释倍数 $\times A_{260}$ 。

1.1.1 TRIzol法 TRIzol试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司,0.2 g竹叶粉末加入1 mL TRIzol试剂,按说明书进行提取,再以体积分数为70%的乙醇洗涤沉淀2次,溶解于DEPC水。

1.1.2 改良异硫氰酸胍法 所用方法参考Tinney等^[1],略作改动。0.2 g孝顺竹叶粉末移入2 mL离心管中,加入1 mL提取液($4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异硫氰酸胍、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基肌氨酸钠,用前加入 β -巯基乙醇使最终质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),混匀,加入333 μL (1/3体积) $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠(pH值5.2)和等体积异丙醇, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀1 h; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,沉淀干燥5 min,用600 μL STEN缓冲液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH值8.0), $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH值8.0), $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS)重新溶解沉淀;加入等体积(1:1)饱和酚/氯仿, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,收集上清液,重复此步;再用等体积氯仿抽取一次, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 离心15 min;收集上清液,加入上清液1/10体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠(pH值5.2)和等体积异丙醇沉淀过夜; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,70%乙醇洗涤沉淀2次,干燥沉淀10 min,溶解于50 μL DEPC水中。

1.1.3 改良CTAB法 依据Asif等人^[3]方法,做适当修改。提取缓冲液为: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH值8.0) Tris-HCl、 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB、 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH值8.0) EDTA,使用前加入 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇;0.2 g孝顺竹叶粉末移入含1 mL预热提取缓冲液的2 mL离心管中, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育1 h,每隔15 min摇动几下;冷却到室温,加入等体积氯仿, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;收集水相,加入 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl使最终浓度为 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀过夜, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $13.1 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min;收集水相,加入1/30体积浓度为 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠(pH值

5.2)和0.1体积无水乙醇,冰上沉淀30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min;收集上清液,加 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠(pH值5.2)使最终浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,加入等体积异丙醇, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀3 h; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $13.1 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,收集沉淀,用70%乙醇洗涤沉淀2次,干燥沉淀并溶解于50 μL DEPC水中。

1.1.4 改良热硼酸盐法 据Smart等^[6]和Wu^[7]等报道RNA提取方法修改而成。0.2 g孝顺竹叶粉末移入含1 mL预热到 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 提取缓冲液的离心管中,提取缓冲液组成: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱水四硼酸钠(sodium borate decahydrate), $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧胆酸钠,另有 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NP-40, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT用前加入,加入60 μL 蛋白酶K ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 提取1.5 h;向离心管中加入30 μL KCl ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),混匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育1~1.5 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;收集上清液,加入1/3体积的 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置过夜; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,弃上清液;加入500 μL 预冷的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl洗涤沉淀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min去除上清液,重复洗涤2~3次;用500 μL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH值7.5)溶解沉淀,加入1/10体积 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钾(pH值5.5),冰上沉淀30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;将上清液转移至新离心管中,加入1/10体积 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠(pH值5.5)和2.5倍无水乙醇,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀2 h; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,70%乙醇洗涤沉淀2次,室温干燥20~30 min,用50 μL DEPC水溶解RNA。

1.1.5 改良SDS法 根据Liu等^[8]报道的方法适当修改而成,0.2 g孝顺竹叶粉末移入2 mL离心管中,加入1 mL提取缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH值7.4), $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH值8.0), $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS; $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP和 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇使用前加入),室温下摇动10 min;加入1/3体积 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钾(pH值6.0),冰上沉淀30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;上清液移到新离心管中,等体积酚/氯仿抽取, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,重复此步;再用等体积氯仿抽取水相, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $11.4 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;水相转移到新离心管中,加入等体积异丙醇, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀2 h; $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,DEPC水溶解沉淀;等体积的酚/氯仿、氯仿

抽取,用等体积异丙醇和 1/30 体积 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠 (pH 值 5.2) 于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12.7 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min; 收集沉淀,用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,沉淀溶解于 $50 \mu\text{L}$ DEPC 水。

1.2 RNA 纯度分析

对用不同方法提取的 RNA,用紫外分光光度计扫描 $200 \sim 300 \text{ nm}$ 波长,并测定 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 。

1.3 RNA 完整性分析

对用不同方法提取的 RNA,进行 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 非变性琼脂糖凝胶电泳,分析其完整性。

2 结果与讨论

2.1 不同方法提取总 RNA 的纯度比较

紫外吸光度比值结果 (表 1) 表明,TRIzol 法的

A_{260}/A_{280} 比值极低,表明用此方法提取的 RNA 有大量蛋白质污染,改良异硫氰酸胍法、改良 CTAB 法、改良 SDS 法的 A_{260}/A_{280} 值较高,其中改良 CTAB 法和改良 SDS 法的 A_{260}/A_{280} 值大于 1.8,表明改良 CTAB 法和改良 SDS 法使蛋白质污染得到有效控制。TRIzol、改良异硫氰酸胍法、改良 CTAB 法、改良热硼酸盐法 A_{260}/A_{230} 比值低于 1,改良 SDS 法的 A_{260}/A_{230} 比值大于 1.2,表明改良 SDS 法在除去多糖和多酚等污染方面优于其他方法。另外,改良 CTAB 法和改良 SDS 法所提取 RNA 产量较高,其中改良 SDS 法获得 RNA 产量最高。商业试剂盒 TRIzol 法提取的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 比值偏低,说明不适宜竹类植物 RNA 提取。

表 1 不同方法提取孝顺竹叶总 RNA 结果比较

提取方法	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	产量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
TRIzol 法	1.363 ± 0.013	0.255 ± 0.003	113.0 ± 0.4
改良异硫氰酸胍法	1.676 ± 0.029	0.873 ± 0.020	317.0 ± 1.7
改良 CTAB 法	1.843 ± 0.027	0.801 ± 0.024	464.0 ± 5.0
改良热硼酸盐法	1.510 ± 0.062	0.377 ± 0.010	194.0 ± 3.5
改良 SDS 法	1.900 ± 0.001	1.229 ± 0.060	560.0 ± 1.4

2.2 不同方法提取总 RNA 完整性分析

用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖非变性凝胶电泳分析,结果显示, rRNA 两条带 28S 和 18S 条带都清晰 (图 1),

说明在提取过程中,没有发生 RNA 降解。其中尤以改良 SDS 法的条带更为清晰,不但 28S 和 18S 明显,而且还有 rRNA 的其他条带也很清晰。

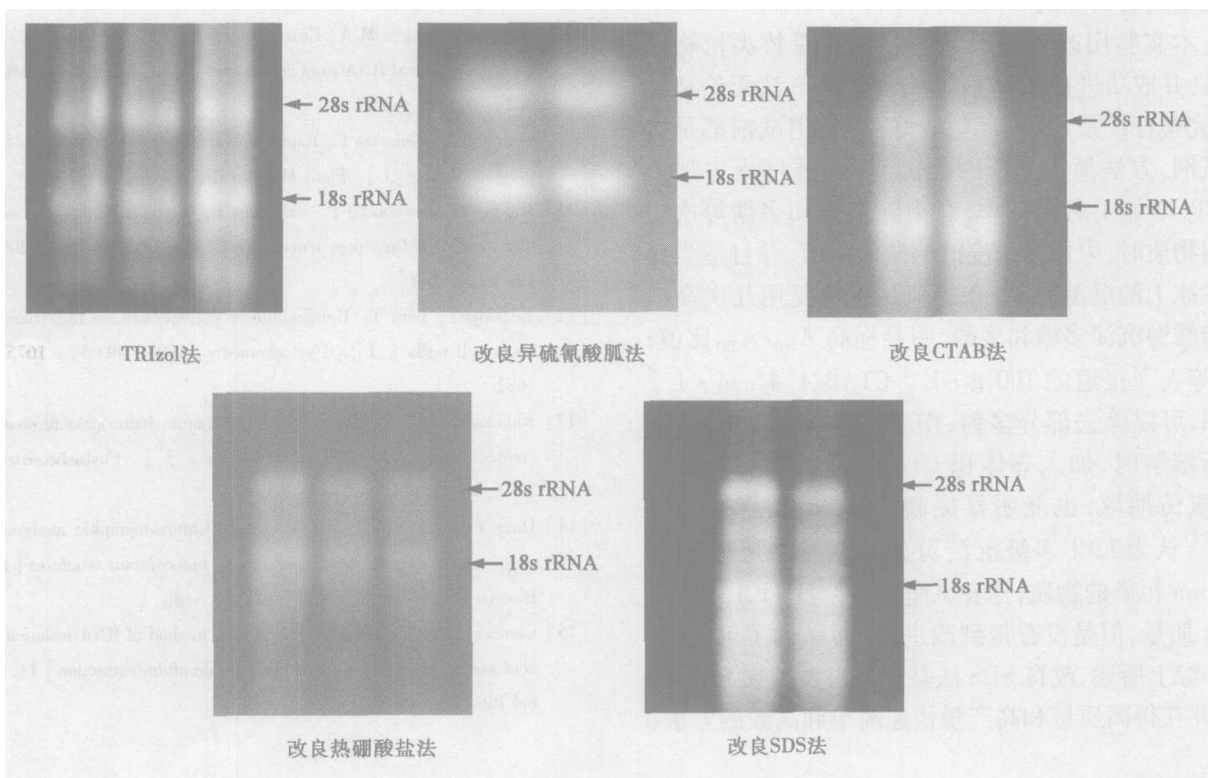


图 1 不同方法提取竹叶总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳

3 小结

有关植物 RNA 提取结合多糖和多酚等次生代谢去除以及 RNA 沉淀形成有许多种方法。许多公司开发的试剂盒 TRIzol 源于一步法^[15],该试剂由异硫氰酸胍和酚等组成的单相溶液,已成功提取许多生物 RNA,操作简单,耗时少,但价格贵,现在发现更适于动物,不适宜富含多酚和多糖植物的 RNA 提取,尤其是木本植物。异硫氰酸胍法也是源自一步法^[15],目前应用较多,在酸模 (*Rumex acetosa* Linn.)^[1]、葡萄 (*Vitis labrusca* L. cv. Concord) 和黄豆树 (*Albizia procera* Benth)^[2] 等植物中获得高质量 RNA。CTAB 法也已经成功从木本植物香蕉果 (*Musa acuminata* Colla)^[3]、细毛樟 (*Cinnamomum tenuipilum* Kosterm)^[4] 和一些果树^[5] 中分离出高质量的 RNA。热硼酸盐法被认为是提取难分离组织的有效方法^[6,7],在棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)、烟草 (*Nicotiana glauca* Granam) 总 RNA 提取中已成功应用,但是所用试剂昂贵,提取步骤多,所用成本较高。以上 4 种方法在提取竹类植物叶总 RNA 效果不佳。SDS 法已从香蕉果^[8]、仙人掌 (*Opuntia* sp.)^[9]、欧洲赤松 (*Pinus sylvestris* Linn.) 和海岸松 (*Pinus pinaster* Ait.)^[10]、梨 (*Pyrus communis* L.)^[11] 等植物中提取高质量具有功能的 RNA。

本实验用改良 SDS 法获得高质量竹类植物总 RNA,并成功进行 DDRT-PCR,改良 SDS 法无论从纯度、完整性还是产量,都是较好的,所用试剂都是常用试剂,方法简单,便于操作。在研磨过程中加入 PVPP,增加了研磨效率,在去除多酚和多糖等次生代谢物质时,采用高浓度的醋酸钾溶液,并且适当延长在冰上的沉淀时间,在提取过程反复用几次高浓度醋酸钾沉淀多糖和多酚,明显提高 A_{260}/A_{230} 比值;Hu 等人^[5] 报道的 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB/ $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,可以除去部分多糖,作者在第二次 RNA 沉淀重新溶解时,加入等体积 CTAB/NaCl,再结合饱和酚/氯仿抽取,也能明显提高 A_{260}/A_{230} 比值。Salzman^[2] 认为 LiCl 多级沉淀可以有效除去吸收峰在 230 nm 污染的物质,作者试图用高浓度 LiCl 来改善 RNA 质量,但是没有得到改进,反而降低了 RNA 产量。综上所述,改良 SDS 法是适宜竹类植物 RNA 提取,并获得高质量和高产量快速简单和高效的方法。

参考文献:

- [1] Tinney G W, Pritchard S C, Gonzalez R, et al. Elimination of oxalate contamination on RNA isolation from *Rumex obtusifolius* [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20: 309a ~ 309f
- [2] Salzman R A, Fujita T, Zhu-salzman K, et al. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1999, 17: 11 ~ 17
- [3] Asif M H, Dhawan P, Nath P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2000, 18: 109 ~ 115
- [4] Zheng Y, Yang T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20: 417a ~ 417e
- [5] Hu C G, Honda C, Kita M, et al. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20: 69a ~ 69g
- [6] Wu Y, Llewellyn D J, Dennis E S. A quick and easy method for isolating good quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20: 213 ~ 218
- [7] Smart L B, Nall N, Bennett A B. Isolation of RNA and protein from guard cells of *Nicotiana glauca* [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1999, 17: 371 ~ 383
- [8] Liu J, Goh C, Lou C, et al. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1998, 16: 1 ~ 6
- [9] Valderrama-Chairez M A, Cruz-herandez A, Paredes-lopez O. Isolation of functional RNA from cactus fruit [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20: 279 ~ 286
- [10] Claros M G, Canovas F. Rapid high quality RNA preparation from pine seedlings [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1998, 16: 9 ~ 18
- [11] Malnoy M, Reynoird J P, Mourgues F, et al. A method for isolating total RNA from pear leaves [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2001, 19: 69a ~ 69f
- [12] Edashige Y, Ishii T. Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49 (6): 1675 ~ 1682
- [13] Kaneko S, Ishii T, Matsunaga T. A boron-rhamnolacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44 (2): 243 ~ 248
- [14] Ding Y Q, Li Y, Chen C Y, et al. Chromatographic analysis of polysaccharides extracted from Chinese *Indocalamus tessellatus* [J]. *Biomed Chromatogr*, 1998, 12 (2): 86 ~ 88
- [15] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156 ~ 159