

张仕林,许玉超,帅 强,等. 洋葱不同组织 RNA 提取方法比较分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):95-97.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.022

洋葱不同组织 RNA 提取方法比较分析

张仕林^{1,2},许玉超¹,帅 强³,邓 鹏¹,王建军¹

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,江苏南京 210095;

2. 上海蔬菜研究所,上海 201899; 3. 南京新农科创投资有限责任公司,江苏南京 211134)

摘要:探讨洋葱不同组织总 RNA 提取的最优方法,以期为今后开展洋葱的分子生物学研究奠定基础。以洋葱品种 W470 发育旺盛时期的叶片、根、鳞茎为材料,比较 TaKaRa 试剂盒法、TIANGEN 试剂盒法、TRIzol 法、pBIOZOL 法等 4 种 RNA 提取方法提取洋葱 RNA 的效果。凝胶电泳结果显示,除了 TIANGEN 试剂盒法不能提取洋葱根的总 RNA,其他方法在洋葱不同组织中均可提取到不同质量的 RNA。对不同方法提取洋葱 RNA 浓度、纯度进行检测发现,TaKaRa 试剂盒法提取洋葱叶片的总 RNA 浓度为 342.31 $\mu\text{g/g}$,pBiolzol 法提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 浓度分别为 1 119.39、171.85 $\mu\text{g/mL}$ 。经 RT-PCR 验证,TaKaRa 试剂盒法提取的洋葱叶片总 RNA、pBiolzol 法提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 均成功扩出洋葱 β -actin 基因片段。由结果可知,TaKaRa 试剂盒适合提取洋葱叶片的总 RNA,pBIOZOL 法适合提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 且质量能够满足后续试验要求。

关键词:洋葱;总 RNA;RNA 提取;RT-PCR

中图分类号:S633.201

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2016)10-0095-03

洋葱(*Allium cepa* L.)为百合科葱属 2 年生蔬菜,在我国已广泛栽培,并作为主要的出口蔬菜品种之一^[1]。洋葱不仅可以作为蔬菜和调味品,而且因其糖类、硫化物含量丰富,从而具有降“三高”、降低和预防血栓形成风险以及预防心肌梗塞等功效。此外,洋葱还含有特殊的营养物质槲皮素,能抑制

癌细胞活性、阻止癌细胞生长、预防癌症^[2]。

RNA 是一种重要的遗传信息分子,提取高质量 RNA 是进行定量 PCR、RT-PCR、Northern 杂交和 cDNA 文库构建等相关研究的前提条件^[3-5]。目前有许多提取植物 RNA 的方法,例如 CTAB 法、SDS 法、Trizol 法等,但针对洋葱不同组织的 RNA 提取研究却鲜有报道。黄钰等对分蘖洋葱叶片 RNA 提取方法进行比较和分析^[3,6]。由于洋葱各种组织,尤其是叶片、鳞茎中含有丰富的多糖等次生代谢物,而且多糖会抑制酶的活性^[7],导致洋葱高质量 RNA 的提取受到制约。此外,由于洋葱不同组织内含物成分不尽相同,在具体操作过程中对 RNA 提取方法的要求也不一样。本试验通过对 TaKaRa

收稿日期:2015-09-11

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:200903018)。

作者简介:张仕林(1989—),男,四川广元人,硕士研究生,研究方向为洋葱遗传育种与分子生物学。E-mail:709744424@qq.com。

通信作者:王建军,硕士,副教授,主要从事洋葱遗传育种研究。

E-mail:wangjianjun@njau.edu.cn。

of the yellow sea[C]. Qingdao:Ocean Press,1994:81.

[8]赵哲霞,蒋 珊,王滨花,等. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性[J]. 南昌大学学报:理科版,2014,38(5):498-501.

[9]Yu H T,Lee Y J,Huang S W,et al. Genetic analysis of the populations of Japanese anchovy (*Engraulidae:Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA[J]. Marine Biotechnology,2002,4(5):471-479.

[10]何 琳,王 群. 基于 PCR 的 SSR 标记分离方法综述基因组学与应用生物学[J]. 遗传组学与应用生物学,2010,29(4):775-782.

[11]Ferriol M,Belén Picó M,Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2003,50(3):227-238.

[12]Lin X Y,Kaul S,Rounsley S,et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature,1999,402:761-768.

[13]冉 玮,张桂蓉,王卫民,等. 利用 SRAP 标记分析 3 个团头鲂群体的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5):601-

606.

[14]谢传晓,朱苏文,李培金,等. 玉米对生性状两个显性基因 SCAR 分子标记[J]. 高技术通讯,2002,12(8):38-41.

[15]张增艳,辛志勇,陈 孝,等. 源于 L1 的小麦抗黄矮病基因的特异 PCR 标记及辅助育种的研究[J]. 作物学报,2002,28(4):486-491.

[16]石金锋,贾建航,金德敏,等. 紫菜无性系特异 SCAR 标记的获得[J]. 海洋学报,2003,25(1):128-131.

[17]La Rosa R,Angiolillo A,Guerrero C,et al. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,106(7):1273-1282.

[18]丁炜东,曹丽萍,曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J]. 动物学报,2008,54(3):475-481.

[19]肖调义,张学文,章怀云,等. 洞庭湖四种黄颡鱼基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(3):84-89.

[20]丁言伟. 黄颡鱼属(硬骨鱼纲,鲶科)鱼类分子系统发育及种群遗传结构的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005:1-58.

试剂盒法、TIANGEN 试剂盒法、Trizol 法以及 pBIOZOL 法等 4 种 RNA 提取方法的比较研究,建立 1 套适于洋葱根、鳞茎、叶片材料的 RNA 提取方法,对于下一步开展洋葱相关功能基因组学和分子生物学研究具有一定意义,同时也为从葱属植物中提取高质量的 RNA 提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2015 年 3 月 25 日选取洋葱品种 W470 新鲜幼嫩的根、鳞茎、叶片,用蒸馏水冲洗干净后,用液氮速冻后带回实验室保存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。试验材料由南京农业大学洋葱课题组提供,样本取自南京农业大学江浦园艺站。

主要试剂:TaKaRa 试剂盒、反转录试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;TIANGEN 试剂盒,Tiangen Biotech 公司;TRIzol 试剂盒,Invitrogen 公司;pBIOZOL 试剂盒,Solarbio 公司。试验所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,其他生化试剂均为进口及国产分析纯产品。

1.2 RNA 提取方法

试验所需塑料制品如 Eppendorf 管、吸头、PCR 管等均于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用 0.1% DEPC 水处理 24 h 后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干后备用。玻璃器皿、研钵于 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干热灭菌 2 h。每种洋葱组织均使用以下 4 种方法提取总 RNA,并做 3 次重复。

1.2.1 TaKaRa 试剂盒法 称取 50 mg 洋葱组织,参照 TaKaRa 试剂盒使用手册中提取富含多糖类组织的方法提取 RNA。

1.2.2 TIANGEN 试剂盒法 称取 100 mg 洋葱组织,参照 TIANGEN 试剂盒使用手册中提取富含多糖类组织的方法提取 RNA。

1.2.3 TRIzol 法 称取各洋葱组织 100 mg,经液氮研磨后,参照试剂盒说明的方法提取并增加 2 次三氯甲烷-异戊醇(体积比 24:1)抽提,以去除蛋白质、多糖、多酚等大分子物质;用异丙醇沉淀 RNA,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 60 min。

1.2.4 pBIOZOL 法 具体方法如下:称取 100 mg 洋葱组织,液氮下迅速将其研磨成粉末,将粉末转入 1.5 mL 离心管中,加 1.3 mL 裂解液,短暂漩涡混匀,至样品完全重悬,室温放置 5 min(可将离心管水平放置,以增大裂解液与细胞接触的表面积,有助于细胞破壁)。室温下于 $12\ 000\text{ g}$ 离心 10 min,转移上层液体至新的 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 5 mol/L NaCl,混匀后加入 300 μL 三氯甲烷,剧烈振荡以充分混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ g}$ 离心 10 min,上层液全部转入 1.5 mL 离心管中,用水饱和酚-三氯甲烷(体积比 5:1)、三氯甲烷-异戊醇(体积比 24:1)分别抽提 1 次,直至中间层较干净,加入 2/3 体积异丙醇、1/3 体积高盐溶液,颠倒混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ g}$ 离心 10 min,弃上清,加入 1.0 mL 75% 乙醇,静置 3 min,其间颠倒洗涤, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ g}$ 离心 3 min,弃掉液体,吸干残留的乙醇,将沉淀置于超净工作台上吹干,用 30 μL RNase-free 水溶解 RNA 沉淀。

1.3 总 RNA 的完整性及质量检测

取 4 μL RNA 样品在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 120 V 稳压,待溴酚蓝到达胶面 1/2 位置时,用紫外凝胶呈像

系统拍照记录。

采用 Eppendorf 核酸蛋白测定仪对纯化好的 RNA 样品进行浓度及吸光度测定,分别记录 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值、RNA 浓度,并计算 RNA 产率。 $\text{RNA 产率}(\mu\text{g/g}) = \text{RNA 浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{体积}(\text{mL})/\text{样品质量}(\text{g})$ [8]。

1.4 RT-PCR 检测

取 1 μg RNA 用于反转录,具体方法参照 TaKaRa Primer Script™ First Stand cDNA Synthesis Kit 反转录说明书进行。以洋葱 β -actin 基因(引物为 5'-ACACGGCCTGGATAG-CAACAT-3'、5'-AGAGCAGTATTCCCAAGCATT-3')为内参基因 [8]。PCR 扩增反应体系(10 μL):5 μL Premix Taq 酶(TaKaRa),各 0.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物,0.5 μL 10 ng/ μL cDNA,3.5 μL ddH₂O。PCR 反应热循环程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,35 次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件保存。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,预期扩增产物大小为 337 bp。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的洋葱 RNA 的凝胶电泳分析

以洋葱根、鳞茎、叶片为试验材料提取总 RNA,由图 1 可见,经琼脂糖凝胶电泳检测,除了 TIANGEN 试剂盒不能提取洋葱根的总 RNA,其他方法在洋葱不同组织处均可提取到不同质量的 RNA。对于洋葱叶来说,用 TIANGEN 试剂盒法、Trizol 法、pBIOZOL 法所提取的 RNA 在 28S rRNA、18S rRNA 条带处较暗,2 条条带的亮度相当,且有拖尾,说明 RNA 有降解,存在蛋白质、多糖等杂质污染;TaKaRa 试剂盒所提总 RNA 较完整,且条带清晰。对于洋葱根来说,TRIzol 法、TaKaRa 试剂盒法所提取的 RNA 在 28S rRNA、18S rRNA 条带处较暗,pBIOZOL 法所提总 RNA 较完整,且条带清晰。对于洋葱鳞茎来说,TaKaRa 试剂盒与 TIANGEN 试剂盒所提取的 RNA 18S rRNA 比 28S rRNA 更亮,说明提取过程中发生降解和多糖污染;Trizol 法条带弱,浓度低;pBIOZOL 法无拖尾现象,RNA 完整性好,纯度高。通过对比得出,TaKaRa 试剂盒法适合洋葱叶片,pBIOZOL 法适合洋葱鳞茎和根总 RNA 的提取。

2.2 不同方法提取洋葱 RNA 质量浓度和纯度的检测

由表 1 可知,用 TaKaRa 试剂盒提取的洋葱叶、鳞茎、根总 RNA 质量浓度分别为 342.31、295.06、120.64 $\mu\text{g/mL}$, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均较大,表明有一定程度降解。TIANGEN 试剂盒法提取的洋葱叶、鳞茎、根总 RNA 质量浓度分别为 243.05、160.04、4.95 $\mu\text{g/mL}$,其中由于鳞茎、根总 RNA 的浓度太低,不能用于后续试验。在所有提取洋葱叶组织总 RNA 的方法中,TaKaRa 试剂盒法最高,为 342.31 $\mu\text{g/mL}$ 。pBIOZOL 法提取洋葱鳞茎、根组织总 RNA 的质量浓度分别为 1119.39、171.85 $\mu\text{g/mL}$ 。纯度高、完整性好的 RNA 是进行后续分子生物分析的基础 [9]。通过对各种参数进行比较后表明,TaKaRa 试剂盒最适合提取洋葱叶片总 RNA;pBIOZOL 法适合提取洋葱鳞茎、根的总 RNA。

2.3 RT-PCR 检测 mRNA 的质量

将 TaKaRa 试剂盒提取的洋葱叶组织 RNA、pBIOZOL 法提取的洋葱鳞茎和根总 RNA 经反转录后,进行 RT-PCR,以

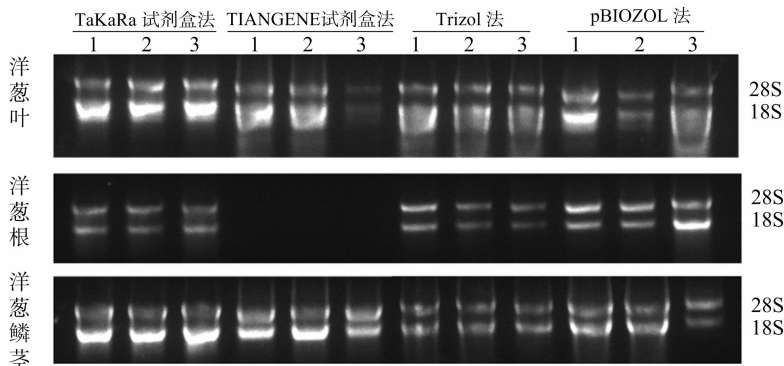


图1 不同提取方法对洋葱总 RNA 提取效果电泳检测结果

表 1 不同方法对提取的洋葱总 RNA 质量浓度和产率的影响

提取方法	叶			鳞茎			根		
	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	产率 ($\mu\text{g/g}$)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	产率 ($\mu\text{g/g}$)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	产率 ($\mu\text{g/g}$)
TaKaRa 试剂盒	2.135	342.31	410.77	2.162	295.06	413.08	2.066	120.64	168.9
TIANGEN 试剂盒	2.104	243.05	121.53	2.089	160.04	80.02	1.454	4.95	24.75
TRIzol	2.033	152.09	190.90	2.110	593.06	215.62	1.872	82.12	32.85
pBIOZOL	2.105	164.95	49.49	2.173	1119.39	335.82	2.059	171.85	51.56

验证所提 RNA 能否满足后续试验要求。PCR 产物电泳结果表明,2 种提取方法对于洋葱不同组织提取的 RNA 能够满足后续分子试验对样品品质的需求详见图 2。

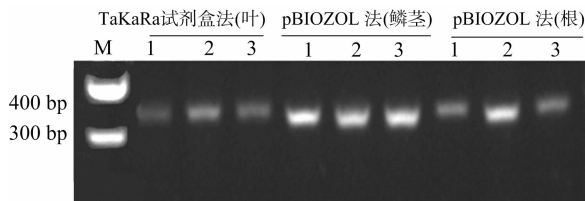


图2 不同方法提取的洋葱总 RNA 的 RT-PCR 检测结果

3 讨论与结论

不同的植物 RNA 提取方法各有优缺点,同一种提取方法在不同植物或同种植物不同组织上的可利用性也有差异^[10]。传统提取 RNA 的方法有 CATB 法、SDS 法等,这些方法对微生物和动物组织的 RNA 提取效果良好,但是操作较为繁琐且耗时长,同时对含有多糖类、酚类物质的高等植物效果不明显,因此本研究未予以考虑。洋葱各种组织,尤其是叶片、鳞茎中含有丰富的多糖及各类次生代谢物,由于相似的理化性质,很难将多糖与 RNA 分开,导致 RNA 质量差、易降解,最终会使反转录 PCR 反应受到抑制^[11-12]。因此,去除多糖、次生代谢物质对于洋葱总 RNA 提取至关重要。

本研究采用 4 种方法提取洋葱不同组织的总 RNA,结果表明:这 4 种 RNA 提取方法对仪器设备的要求相同,均较为简便,用时都约为 2 h。在 4 种提取方法中,就提取同样量 RNA 而言,TaKaRa 试剂盒提取法最昂贵,其次是 TIANGEN 试剂盒法,而 TRIzol、pBIOZOL 法则较为低廉。采用 TaKaRa 试剂盒能够快速高效地提取洋葱叶片的总 RNA, RNA 回收效率高;pBIOZOL 法适合提取洋葱鳞茎和根的总 RNA,并且 RNA 纯度较高,能有效去组织中的多糖。RT-PCR 检测结果表明,经试验筛选得到的最优方法所提取的洋葱各组织总 RNA 完全能够满足后续试验要求。本研究在结合相关研究

的基础上,筛选出适合洋葱叶片、鳞茎和根总 RNA 提取的最佳方法,为后续的分子生物学研究提供了方法借鉴,同时也为葱属其他植物提取 RNA 提供了一定参考。

参考文献:

[1] 陈沁滨,王建军,薛 萍,等. 洋葱种质资源与遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2008(1):37-42.

[2] 翟亚辉,马蓉丽,成 妍,等. 37 份洋葱遗传多样性的 RAPD 和 SSR 分析[J]. 华北农学报,2013,28(6):115-120.

[3] 黄 钰,李旭双,陈 典,等. 分蘖洋葱叶片 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 北方园艺,2011(14):111-113.

[4] 张彦苹,王 晨,于华平,等. 适于葡萄不同组织 RNA 提取方法的筛选[J]. 西北农业学报,2010,19(11):135-140.

[5] Wang Y C, Guo B H, Zhang F, et al. Molecular cloning and functional analysis of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase from hazel (*Corylus avellana* L. Gasaway). [J]. Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology, 2007, 40(6):861-869.

[6] 史公军,侯喜林,易金鑫. 白菜花药组织总 RNA 提取方法比较及其分析[J]. 西北农业学报,2004,13(3):97-99.

[7] 张 琰,安龙杰,史宝胜,等. 血虹鸡爪槭叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 中国农学通报,2011,27(2):7-11.

[8] 梁 毅,刘小义,张洪伟,等. 洋葱花青素合成相关基因 (*AcPAL1*) 的克隆和表达分析[J]. 农业生物技术学报,2014,22(1):47-54.

[9] 郝福玲,刘雅莉,王跃进. 百合花瓣总 RNA 提取方法的研究[J]. 西北植物学报,2005,25(6):1143-1147.

[10] 张今今,王跃进,王西平. 葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. 果树学报,2003,20(3):178-181.

[11] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae [J]. Analytical Biochemistry, 1988, 174(2):650-657.

[12] Wang C S, Vodkin O. Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12(2):132-145.