

狄建军,张庆波,孙颖飞,等. 蓖麻种子总 RNA 提取方法比较 [J]. 江苏农业科学,2013,41(5):33-34.

# 蓖麻种子总 RNA 提取方法比较

狄建军<sup>1,2</sup>, 张庆波<sup>1</sup>, 孙颖飞<sup>1</sup>, 闫娜<sup>1</sup>, 袁庆龙<sup>1</sup>, 魏永春<sup>1</sup>, 张继星<sup>1,2</sup>

(1. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心, 内蒙古通辽 028000)

**摘要:**以成熟蓖麻种子为材料,分别用 TRIquick Reagent 试剂提取法、TRIquick 醋酸钠改进法、TRIquick 高盐改进法提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳,采用紫外分光光度法测定总 RNA 纯度并进行 RT-PCR 检测。结果表明,采用高盐缓冲液改良法能提取出质量高、完整性好而且无胶状不溶物的 RNA,该方法简便快速,是一种经济高效的蓖麻种子总 RNA 提取方法。

**关键词:**蓖麻;总 RNA;TRIquick Reagent;高盐提取法

**中图分类号:**S565.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0033-02

蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 油料作物,蓖麻种子中的蓖麻油含有蓖麻油酸,是生产高品质润滑油的良好材料<sup>[1]</sup>。从植物组织中提取纯度高、完整性好的 RNA 是进行分子生物学试验的前提<sup>[2]</sup>。RT-PCR、cDNA 合成、RNA 序列分析、Northern 杂交、构建 cDNA 文库等分子生物学研究均需要质量高、纯度高且完整性好的 RNA<sup>[3]</sup>。关于从植物组织中提取 RNA 方法的研究很多,试剂盒也有多种。因此,设计针对某种植物或不同组织的适宜的 RNA 提取方法至关重要<sup>[4]</sup>。蓖麻种子含有大量脂肪、多糖、蛋白质化合物, RNA 提取过程中蛋白质、多糖、脂肪等去除不干净,往往造成污染。多糖能与 RNA 共沉淀形成难溶的胶状物<sup>[5]</sup>,还能抑制许多酶的活性<sup>[6]</sup>。笔者经过反复探索和比较,筛选出提取高质量蓖麻种子 RNA 的有效方法——高盐法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

通蓖 5 号成熟种子,去种皮,置于 -80℃ 冰箱中备用。试剂:Solarbio 的 TRIquick Reagent 总 RNA 提取试剂;高盐缓冲液:0.8 mol/L 柠檬酸钠溶液(高压灭菌);1.2 mol/L NaCl<sup>[7]</sup> 溶液(高压灭菌);5.0 mol/L 醋酸钠溶液;75% 乙醇溶液;0.5 mol/L NaOH 溶液;4℃ 预冷的氯仿、异丙醇。高盐缓冲液、5.0 mol/L 醋酸钠溶液、75% 乙醇溶液均需用 DEPC 水配制。仪器:Thermo Scientific (702) 超低温冰箱、生物安全柜(北京东联哈尔仪器)、CHK201 型 Hema 冷冻离心机、AL104 型 Mottler Toledo 电子天平、XHH150F 型 Hema 基因扩增仪、ZF-90 暗箱紫外投射仪、DYCP-31DN 型电泳槽、DYY-6C 型电泳仪、TU-1901 双光束紫外可见分光光度计等。

### 1.2 方法

参照 Solarbio 的 TRIquick Reagent 使用说明书预处理器

皿、容器。

#### 1.2.1 RNA 提取

1.2.1.1 TRIquick Reagent 试剂提取法 参照 Solarbio 的 TRIquick Reagent 使用说明书进行:(1)取 2 粒 -80℃ 预冻去皮的蓖麻种子置于 -80℃ 预冻研钵内迅速充分研磨;(2)取 0.2 g 粉末放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL TRIquick Reagent 试剂,剧烈振荡,涡旋混匀,室温放置 5 min;(3)4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清(最上层为大量油脂,应去除);(4)在上清中加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 5 min,使其自然分相;(5)4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上层水相转移至新管;(6)在上清中加入等体积氯仿,涡旋混匀,静置 5 min,11 000 r/min 离心 10 min;(7)取上清转移至新管,加入等体积冰冷的异丙醇,轻轻混匀,室温放置 15 min;(8)4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,去上清;(9)加入 1 mL 75% 乙醇,洗涤沉淀,4℃ 7 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复洗涤 1 次;(10)室温放置 1~2 min 晾干(或在生物安全柜中吹干),加入 30 μL RNase-free 水(也可按试验需要加入 30~100 μL RNase-free 水),充分溶解 RNA;(11)-80℃ 保存。

1.2.1.2 改良 TRIquick Reagent 试剂提取法——醋酸钠溶液法 此法在 TRIquick Reagent 试剂提取法基础上进行了改进,将第(2)步改为:取 0.2 g 粉末放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL TRIquick Reagent 试剂,同时加入 400 μL 醋酸钠溶液,剧烈振荡,涡旋混匀,室温放置 5 min。其余步骤均不变。

1.2.1.3 改良 TRIquick Reagent 试剂提取法——高盐缓冲液法 此法在 TRIquick Reagent 试剂提取法基础上进行了改进,将第(2)步改为:取 0.2 g 粉末放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL TRIquick Reagent 试剂,同时加入 200 μL 柠檬酸三钠溶液及 200 μL 氯化钠溶液,剧烈振荡,涡旋混匀,室温放置 5 min。其余步骤均不变。

1.2.2 总 RNA 浓度及纯度测定 参照 Solarbio 的 TRIquick Reagent 说明书检测 RNA 浓度及纯度。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 以 DEPC 水配制的 1×TAE 作为电泳缓冲液,用 0.5 mol/L NaOH 溶液浸泡电泳槽 6 h 以上,琼脂糖凝胶浓度为 0.8%,电压为 100 V。分别以总 RNA 原液的 5 倍、10 倍稀释液进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 RT-PCR 检测 分别用以上 3 种方法提取的 4 μL

收稿日期:2012-09-05

基金项目:内蒙古民族大学校级重大课题(编号:MDX2009022);内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心开放基金(编号:BMJ2010008)。

作者简介:狄建军(1979—),男,山西大同人,硕士,讲师,从事植物生物化学与分子生物学研究。E-mail:jianjun\_di@163.com。

总 RNA 为模板,用 TER010-2 试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)的溶液 A 1  $\mu$ L、B 1  $\mu$ L、D 4  $\mu$ L、E 1  $\mu$ L、G 9  $\mu$ L 经 RT-PCR 合成 cDNA 第一条链,取 3  $\mu$ L RT 产物作为 PCR 模板。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)包括 3  $\mu$ L RT 产物、上下游引物各 0.5  $\mu$ L、1  $\mu$ L TaKaRa LA *Taq* 酶。引物序列分别为:上游引物 pC1, AGCTTAAGAATGGGAGGTGGT;下游引物 pC2, CTTAAAGAAACAGGCTACATGAC。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 2 min;94  $^{\circ}$ C 45 s,59  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 浓度及纯度测定结果

将 3 种方法提取得到的总 RNA 分别溶解在 30  $\mu$ L DEPC 水中,发现利用 TRIquick Reagent 试剂提取法和 TRIquick 醋酸钠改进法提取得到的总 RNA 溶液中有不溶的胶状物。总 RNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.1 之间纯度较好,其中以 2.0 为最好。由表 1、表 2 可知,3 种方法提取的总 RNA 纯度都较好,其中 TRIquick 提取法  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值最接近 2.0。TRIquick Reagent 试剂提取法浓度最高。

表 1 3 种方法提取蓖麻成熟种子总 RNA 纯度(35 倍稀释)

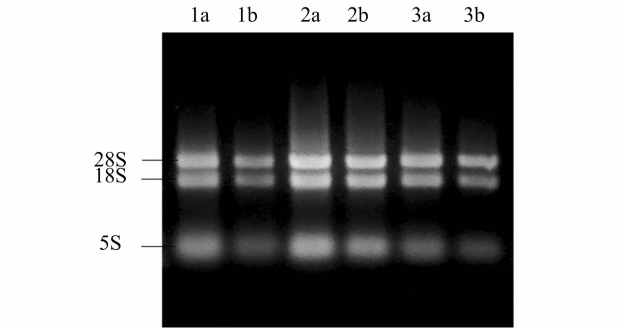
方法	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
TRIquick 提取法	0.891	0.440	2.025
高盐改良法	0.628	0.302	2.079
醋酸钠改良法	0.553	0.297	1.862

表 2 3 种方法提取蓖麻成熟种子总 RNA 浓度(35 倍稀释)

方法	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	最终浓度 (ng/ $\mu$ L)
TRIquick 提取法	0.711	0.351	2.029	1 247.4
高盐改良法	0.704	0.322	2.186	879.2
醋酸钠改良法	0.517	0.261	1.981	774.2

2.2 琼脂糖凝胶电泳结果

由图 1 可知,用 3 种不同方法提取总 RNA,在凝胶上可见 28S、18S、5S rRNA 的清晰条带,其中高盐改良法条带最亮。



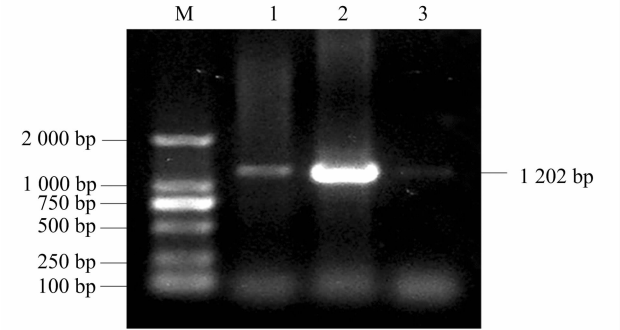
1a—醋酸钠改良法5倍稀释; 1b—醋酸钠改良法10倍稀释; 2a—高盐改良法5倍稀释; 2b—高盐改良法10倍稀释; 3a—TRIquick提取法5倍稀释; 3b—TRIquick提取法10倍稀释

图1 不同方法提取蓖麻种子总RNA琼脂糖凝胶电泳图谱

2.3 RT-PCR 检测

3 种方法提取到的总 RNA 经反转录及 PCR 扩增后,进行

琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2。由图 2 可知,高盐改良法提取的总 RNA 经扩增后条带最亮。



M—D2000 ladder marker; 1—醋酸钠改良法; 2—高盐改良法; 3—TRIquick提取法

图2 不同方法提取蓖麻种子RNA的RT-PCR检测结果

3 结论与讨论

本研究表明,3 种方法获得的 RNA 纯度和浓度都较好,虽然 TRIquick Reagent 试剂提取法浓度和纯度最高,但用 DEPC 水溶解时有不溶性的胶状物存在,经 RT-PCR 检测,扩增条带较弱,这可能是因为多糖、油脂或蛋白质等组分在某些方面影响了 RT-PCR,这也是该方法提取蓖麻总 RNA 需要进一步优化的原因。蓖麻总 RNA 提取过程中添加醋酸钠盐溶液,也未能有效去除胶状不溶物。经过高盐缓冲液处理的样品得到了透明的 RNA 溶液,经琼脂糖凝胶电泳显示条带最亮,通过 RT-PCR 得到的条带也最亮,效果理想,可用于后续分子生物学试验。RNA 分子稳定性远不如 DNA,提取步骤多、耗时长,大大影响提取 RNA 的回收率和质量。3 种方法可同步进行。同一植物不同组织有机物成分差别很大,RNA 提取方法也不一样。笔者采用高盐缓冲液法从多油多脂的蓖麻种子中成功提取到高质量的总 RNA,表明此方法具有一定适用性。

参考文献:

[1] Chan A P, Crabtree J, Zhao Q, et al. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis* [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(9): 951-956.

[2] 王芳, 张斌, 单雷, 等. 一种从花生种子中提取 RNA 的改进方法 [J]. *花生学报*, 2002, 31(4): 24-26.

[3] 丁勇, 刘英, 杨鸯鸯, 等. 油菜种子高质量总 RNA 提取的一种有效方法 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(5): 465-468.

[4] 任增凯, 禹山林, 杨庆利, 等. 花生种子总 RNA 提取的一种有效方法 [J]. *花生学报*, 2008, 37(3): 20-23.

[5] Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms [J]. *Plant Mol Biol Reprtr*, 1994, 12(1): 20-25.

[6] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(1): 52-55.

[7] 姚滢秋, 陈星, 王璞, 等. 高质量提取大豆叶片总 RNA 的改良方法 [J]. *生物技术通报*, 2008(1): 133-135.