

李小婷,戴国礼,李彦龙,等. 沙棘叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):33-34,137.

沙棘叶片总 RNA 提取方法的比较研究

李小婷¹, 戴国礼², 李彦龙², 曹有龙², 袁思安¹, 高 辉¹, 李根前¹

(1. 西南林业大学, 云南昆明 650224; 2. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏银川 750002)

摘要:沙棘叶片富含多糖、多酚、蛋白质、类黄酮等次生代谢物质,用普通方法提取沙棘叶片总 RNA 时很难将其去除。本试验以沙棘叶片为材料,比较研究了改良 Trizol 法、RNA simple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)、RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂以及 RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂改良法等 4 种方法对沙棘叶片总 RNA 的提取效果。结果表明, RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂改良法能从沙棘叶片中提取纯度较高的 RNA,凝胶电泳显示条带清晰完整,鲜叶平均得率为 298.1 $\mu\text{g/g}$, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.79,用该方法提取的沙棘叶片总 RNA 可以用于后续的分子生物学研究中。

关键词:沙棘叶片;总 RNA 提取;提取方法

中图分类号: S793.604 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0033-02

提取获得纯度高、质量好的 RNA 是进行 cDNA 第一链合成、RT-PCR、RACE-PCR、cDNA 全长克隆和 Northern 杂交等分子生物学研究的必要前提^[1-2]。沙棘(*Hippophae rhamnoides* Linn.), 又名醋柳、酸刺,是胡颓子科沙棘属(*Hippophae*)的灌木或小乔木。沙棘广泛分布于黄土高原、毛乌素沙地及其毗邻地区,在水土保持、防风固沙及治理砒砂岩等方面发挥着重要的生态作用^[3]。沙棘叶片中含有大量的多糖、多酚、粗蛋白、类黄酮等次生代谢物质^[4],加之 RNAase 的广泛存在,使获得纯度较高的沙棘叶片总 RNA 变得十分困难。传统提取 RNA 的方法有异硫氰酸胍法、苯酚法、SDS 法、CTAB 法、Tris-硼酸法及 Trizol 法等,这些方法可以有效地提取大部分动物组织 RNA,但高等植物组织内含有有一些多糖类和酚类物质,使用这些方法很难去除^[5]。本试验采用 4 种 RNA 提取试剂(盒)进行系统比较分析,以期筛选出提取高质量沙棘叶片总 RNA 的方法,为开展沙棘后续分子生物研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的沙棘叶片采自陕西省定边县西南林业大学实习基地,为移栽后 2 年的实生苗嫩叶,采后迅速放入液氮中带回实验室-80℃保存。

试验所用主要试剂有 Trizol (Invitrogen 公司产品)、RNA simple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)(天根公司产品)、RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂(天根公司产品)、DEPC (Sigma 公司),其他试剂均为 RNA 试验专用。

1.2 方法

1.2.1 改良 Trizol 法 按照 Invitrogen 公司试剂说明书进行,并加以改进:取 0.1 g 沙棘叶片液氮研磨成细粉后加

0.1 g PVP (聚乙烯吡咯烷酮)继续研磨,待液氮挥发后将混合粉末迅速加入已装好 Trizol 的 1.5 mL 无 RNAase 离心管中,摇匀前迅速加入 10 μL β -巯基乙醇;加入氯仿之前加 200 μL 5 mol/L NaCl 混匀;氯仿抽提,取上清后加入等体积酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1),重新抽提 1 次。

1.2.2 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型) 参照天根公司试剂盒说明书进行。

1.2.3 RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂法 参照天根公司试剂说明书进行。使用前按照 1:4 的体积比将 β -巯基乙醇与 RNAplant Plus reagent 混合。

1.2.4 RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂改良法 在加氯仿之前按 1:250 的体积比加入 DNA 酶 I,轻轻吹打混匀 1 min,然后参照天根公司试剂说明书进行。

1.2.5 总 RNA 的完整性检测 分别取 5 μL 总 RNA 样品,在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测,EB(溴化乙锭)中染色后,凝胶成像系统成像观察,记录结果。

1.2.6 总 RNA 的纯度检测 将用 4 种方法提取的总 RNA 分别取 2 μL ,用无 RNAase 的 DEPC 水稀释 50 倍,在核酸蛋白仪上测定 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值,分析其纯度。

得率($\mu\text{g/g}$) = $D_{260\text{ nm}} \times 40(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times \text{RNA 原液体积}(\text{mL}) / \text{所取样品质量}(\text{g})$ 。

2 结果与分析

2.1 沙棘叶片总 RNA 完整性分析

4 种不同方法提取的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1),结果表明,改良 Trizol 法和 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)的凝胶电泳未检测出 RNA;RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂法得到的沙棘总 RNA 电泳图谱可以看到亮度很高的 28S 和 18S 2 条带,且 28 条带与 18S 条带亮度比约为 2:1,但在 28S 上方可见明显的其他条带,表明有基因组 DNA 杂质;而 RNAplant Plus 总 RNA 提取试剂改良法在加入 DNA 酶 I 之后成功地去除了 DNA,并且对总 RNA 质量、浓度影响不大。

2.2 沙棘叶片总 RNA 纯度分析

用改良 Trizol 法、RNA simple 总 RNA 提取试剂盒(离心

收稿日期:2013-10-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070551)。

作者简介:李小婷(1986—),女,山西吕梁人,硕士研究生,主要从事森林培育学研究。E-mail: helen8813570@163.com。

通信作者:李根前,教授,博士生导师,主要从事森林培育学与森林生态学。Tel: (0871) 3863213。

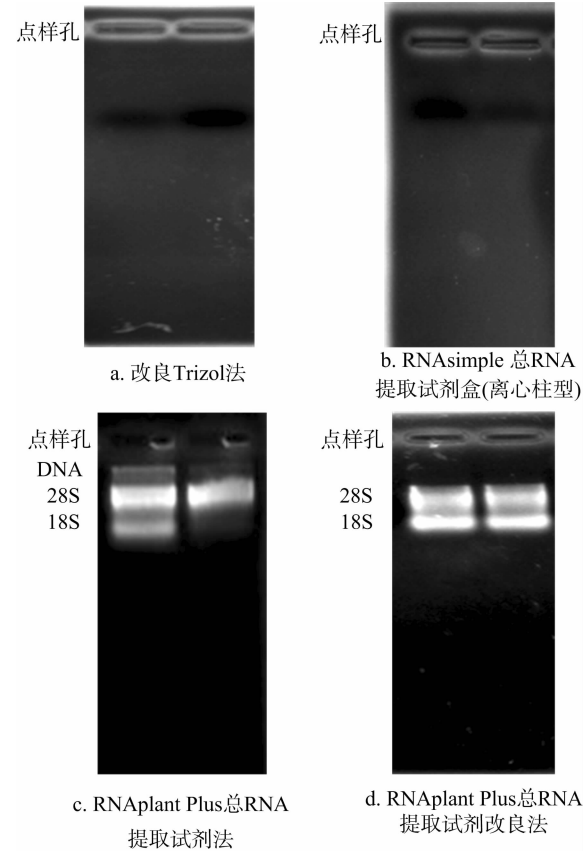


图1 沙棘叶片RNA凝胶电泳

柱型)、RNApant Plus 总 RNA 提取试剂法以及 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法 4 种方法提取沙棘叶片总 RNA,在核酸蛋白仪上进行分析,结果如表 1 所示。

表 1 4 种方法提取的沙棘叶片总 RNA 的产率及质量

提取方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	RNA 得率 ($\mu\text{g/g}$)	试验时间(h)
改良 Trizol 法	1.47	0.33	55.1	6.0
RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)	1.28	0.79	33.7	3.5
RNApant Plus 总 RNA 提取试剂法	1.71	1.72	433.4	3.0
RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法	1.79	2.07	298.1	3.0

3 结论与讨论

RNA 的纯度和完整性是分子生物学试验成功的关键性因素^[1-2]。在植物细胞中,多糖和酚类物质与核酸在空间上是相互分离的,但对组织进行研磨破碎后,它们会与 RNA 相互作用,从而影响 RNA 的提取及后续反应^[6]。多糖的理化性质与核酸极为相似,往往在去除多糖的同时造成 RNA 产量的下降^[7-8];而酚类物质残留在样品中会发生氧化产生深褐色的物质^[9],所以使用传统方法提取的 RNA 往往带有很深的铁锈色。而且 RNase 活性很强,整个试验过程中,微量的外源 RNase 或内源 RNase 都会使 RNA 发生降解,因此,在 RNA 提取过程中必须抑制 RNase 活性并克服这些次生代谢产物的干扰,从而得到质量较好、纯度较高的 RNA^[10-11]。

Trizol 内含异硫氰酸胍等变性剂,改良 Trizol 法在提取过程中加入 PVP、 β -巯基乙醇以及 NaCl 以去除多糖、多酚等杂

一般认为较纯净的 RNA 样品,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 应为 1.7~2.0, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 应大于 2.0。由表 1 可见,改良 Trizol 法和 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)提取的 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 分别为 1.47 和 1.28,均小于 1.7,表明这 2 种方法提取的 RNA 样品纯度较差,不能有效去除总 RNA 样品中蛋白质或酚类等有机物杂质。同时,这 2 种方法提取的总 RNA 样品的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 分别为 0.33 和 0.79,表明这 2 种方法也不能有效地去除其中的萜类化合物等次生代谢物。RNApant Plus 总 RNA 提取试剂法提取法的 RNA 样品 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 大于 1.7,表明这种方法可以去除蛋白质和酚类物质的干扰;但 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 小于 2.0,可能是受到基因组 DNA 的干扰。而 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法提取的 RNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.79, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 为 2.07,表明这种方法提取的 RNA 纯度高,不存在多糖、蛋白质及酚类物质等杂质。

改良 Trizol 法和 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)2 种方法获得的总 RNA 得率都很低,分别为 55.1、33.7 $\mu\text{g/g}$ (RNA/样品);而 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂法和 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法的总 RNA 得率都较高,但 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法的 RNA 产率为 298.1 $\mu\text{g/g}$,低于 RNApant Plus 总 RNA 提取试剂法的 433.4 $\mu\text{g/g}$ (表 1),可能是由于前者加入的 DNA 酶 I 对 RNA 也起到了一定的降解作用,造成了 RNA 产量有所下降,也可能是后者对 DNA 的去除不彻底,对 RNA 的得率有所影响。

从试验所需时间上来看,改良 Trizol 法所需时间最长,需 6.0 h;而其他 3 种方法所需时间相差不大,均为 3 h 左右(表 1)。

试验数据综合表明,RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法是提取沙棘叶片 RNA 的最佳方法。

质,孙德权等^[12]、苏丹等^[13]用改良 Trizol 法获得了富含多糖、多酚类次生代谢物质的香蕉叶片和辣椒组织的总 RNA。RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)使用了硅基质膜,以增强对 RNA 的吸附能力,朱永平等^[14]利用该方法成功获得了墨兰舌瓣的总 RNA。但可能是由于不同植物及同一植物的不同组织所含次生代谢物质的种类和含量有所差异,而这些次生代谢物质往往是影响 RNA 提取效果的关键因素之一^[15],用这 2 种方法提取的沙棘叶片总 RNA 并不理想,因此这 2 种方法并不适用于沙棘叶片 RNA 的提取。

RNApant Plus 总 RNA 提取试剂改良法在加入 DNA 酶 I 后,虽对 RNA 得率有所影响,但有效地去除了 RNA 中的基因组 DNA 的干扰,同时对 RNA 的质量影响不大。而且这种方法提取 RNA 所需时间较短,操作简单,是目前提取沙棘叶片总 RNA 的理想方法。

表 6 不同绿地类型典型样地琼花长势情况

调查点	绿地类型	株数 (m)	株高 (m)	冠幅大小 (m×m)	分枝数 (个)	长势	栽植方式
荷花池公园	公共绿地	28	3.0~4.5	3.0×2~4.5×3.5	4~12	良	丛植/孤植
文昌西路绿化带	道路绿地	150~180	2.5~3.7	2.5×2~3.7×3	5~12	良/差	丛植/列植
瘦西湖新苑	居住区绿地	310~330	2.3~3.5	2.3×2~3.5×3	5~10	良/差	丛植/对植
原维扬区政府	专用绿地	27	3.5~4.5	3.5×3~4.5×3.5	9~15	良	丛植/孤植

表 7 古树琼花及琼花变种木绣球现状分布信息

种名	分布地点	树龄(年)	长势
琼花	扬州八怪纪念馆	90	良好
	西园大酒店名人居旁	90	良好
	大明寺平远楼南	310	良好
	汪氏小苑	110	良好
	观巷 29 号(观巷幼儿园)	90	良好
	淮海路扬州中学	140	良好
木绣球	何园玉绣楼前	140	良好
	西园大酒店西南草坪	100	良好

上报园林绿化管理部门或采取有效保护措施。(4)缺少琼花专类园。扬州市虽然是国家级园林城市,但在园林绿化树种选择和应用上仍存在特色不明显的问题。琼花在扬州有其深厚的历史文化沉淀,作为扬州市花,已成为城市名片出现在扬州各种媒体和标识上,深入市民心中。然而,扬州至今还没有琼花主题的专类园,琼花在市区绿化中也仅作为点缀或配景,缺少作为主景的琼花植物景观。

5 建议

(1)合理栽植。在绿化施工种植琼花时,需对定植后的琼花进行修剪整枝处理,以确保翌年的旺盛生长。如确需保留树形进行全冠移栽,可采取全株摘除叶片措施,以减少叶片水分蒸腾,并加强定植后水分供应,提高成活率。在琼花植株定植时应预留足够的生长空间(株距大于 5 m),以利于后期

(上接第 34 页)

参考文献:

[1]张君堂,陶承光,王志刚,等. Trizol-A⁺ 试剂法提取百合总 RNA [J]. 江苏农业科学,2009(2):35-36.

[2]徐秋红,章 镇,佟兆国,等. 山梨醇对李果肉组织总 RNA 提取的影响[J]. 江苏农业学报,2010,26(2):390-394.

[3]徐德兵,赵粉侠,李根前,等. 中国沙棘种群稳定性维持机制的探讨[J]. 沙棘,2009,22(1):28-32.

[4]阮成江,郑 清. 盐城滩涂沙棘叶营养成分年动态研究[J]. 西北植物学报,2006,26(1):143-149.

[5]阮成江,谢庆良. 盐胁迫下沙棘的渗透调节效应[J]. 植物资源与环境学报,2002,11(2):45-47.

[6]葛晓萍,石琰璟. 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法 [J]. 青岛科技大学学报:自然科学版,2007,28(1):6-8.

[7]Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms[J]. Plant Molecular Biology

树冠伸展。如需密植,可在密植种群生长数年后,当树冠相互接近时疏掉部分植株。此外,应注意避免与乔木靠近栽植,以免受到乔木树荫的影响而长势不良。

(2)加强养护管理。对于琼花管理不善地区,可由城市绿化养护部门指导所在地权属单位或物业,修剪树形,并及时清理周围杂树,做好定期管护工作。对琼花植株进行挂牌标识,让周围居民认识琼花,提高保护意识。

(3)体现琼花特色景观。琼花作为扬州的历史名花,不仅具有很高的观赏价值,而且具有较高的社会价值和人文价值。城市绿地建设要充分反映地方历史文化与景观特色,因此可营造琼花特色植物景观,如建立琼花专类园或琼花大道等,对于发掘地方特色资源的价值内涵、展现地方特色植物景观具有重要意义。

参考文献:

[1]Winkworth R C, Donoghue M J. *Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: implications for taxonomy and biogeography [J]. American Journal of Botany,2005,92(4):653-666.

[2]Jin B, Wang L, Wang J, et al. The structure and roles of sterile flowers in *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*(Adoxaceae) [J]. Plant Biology,2010,12(6):853-862.

[3]金 飏,何小弟. 扬州琼花及其在城市林业中的应用[J]. 中国城市林业,2004,2(6):56-59.

[4]苏倩云. 以“人”为本规划城市绿地系统——论中国城市园林绿地建设[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2000(6):90-94.

[5]Reporter,1994,12(1):20-25.

[8]李 宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报,1999,15(1):36-39.

[9]蒋向辉,余朝文,郝博飞,等. 杉木总 RNA 3 种提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2009(6):81-82.

[10]赵双宜,吴耀荣,夏光敏. 介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法[J]. 遗传,2002,24(3):337-338.

[11]谭丽丽,燕正民,徐亚英,等. 番茄叶片总 RNA 提取方法的比较 [J]. 东北农业大学学报,2010,41(4):29-32.

[12]孙德权,郭启高,胡玉林,等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学,2009(5):162-164.

[13]苏 丹,耿广东,张素勤,等. 辣椒不同组织总 RNA 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2010(2):21-22.

[14]朱永平,田 璐,武芸芸,等. 墨兰舌瓣总 RNA 提取方法比较研究 [J]. 现代农业科技,2010(14):25-28.

[15]蔡斌华,张计育,高志红,等. 一种改良的提取草莓属叶片总 RNA 的方法[J]. 江苏农业学报,2008,24(6):875-877.