



制备棉花幼蕾高质量总 RNA 的方法比较

宋 洋¹, 吴巧雯^{1,2}, 郭三堆^{1*}

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; 2. 北京人民警察学院, 北京 102202)

摘要:以棉花和烟草的叶片及幼蕾为材料, 分别用 Trizol 法和热硼酸/蛋白酶 K 法提取总 RNA, 对获得总 RNA 的量和纯度测定。结果表明, 热硼酸/蛋白酶 K 法提取棉花幼蕾总 RNA 效果最好, 得到的 RNA 具有质量高、完整性好等优点。

关键词:棉花幼蕾; RNA; 热硼酸/蛋白酶 K 法; Trizol 法

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2008)03-0231-04

Method Comparison of Total RNA Isolation for Young Cotton Buds

SONG Yang¹, WU Qiao-wen^{1,2}, GUO San-dui^{1*}

(1. *Biotechnology Research Institute, the Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081;*

2. *Beijing People's Police College, Beijing 102202, China*)

Abstract: RNA extraction efficiencies of leaves and young buds from cotton and tobacco were investigated by using hot borate /protease K method and Trizol method, respectively. The result indicated that RNA extracted by hot borate method showed better quality and integrity.

Key words: cotton young bud; RNA extraction; hot borate /Protease K method; Trizol method

随着分子生物学技术的迅速发展和广泛应用, 植物花粉发育的分子生物学已经成为植物分子生物学研究中的热点领域。花粉的发育情况对植物的育性起了决定性作用, 花粉的败育将导致植物雄性不育的产生。经研究发现, 棉花花粉败育主要发生在花粉发育的减数 I 期^[1], 即 3-5 d 的幼蕾时期。因此, 以棉花幼蕾为材料对棉花雄性不育机理进行研究具有重要意义。

纯度高、完整性好的 RNA 是 Northern 杂交分析、构建 cDNA 文库、RT-PCR 及基因表达分析等分子生物学研究的基础。对于棉花幼蕾而言, 由于棉酚等次生代谢物质较多, 致使难以从棉花幼蕾提取出高质量、完整性好的 RNA。因此, 能否有效去除棉酚、多糖、次生代谢物质以及内源 RNase, 是提取高质量棉花幼蕾 RNA 的关键。本研究针对棉花幼蕾的组织特异性, 通过比较得到了一种提取棉花幼蕾总 RNA 效果较好的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

田间生长的棉花叶片和幼蕾, 温室生长的烟草叶片。

1.2 方法

1.2.1 仪器、试剂的处理。研钵及研棒(锡箔包裹)、药匙等仪器在 180~200℃ 烘 6 h 左右。玻璃器皿和塑料制品使用前必须于 180℃ 烤 8 h(玻璃器皿)或用氯仿冲洗(塑料制品)。

用烤过的药匙称取试剂。溶液用 0.1% DEPC 于 37℃ 至少处理 12 h, 在 151 bf · h⁻¹ (1.034 × 10⁵ Pa) 的高压下蒸气灭菌 15 min。

RNA 操作过程中, 都应戴一次性手套, 并且应勤换手套。

1.2.2 Trizol 法。按 Trizol 试剂上写的方法进行(总 RNA 提取试剂, TIANGEN)。1) 取不多于 0.1 g 冷冻研磨过的植物组织, 加 0.5 mL 提取试

剂(4℃),振荡至彻底混匀。2)室温放置 5 min。注意:平放离心管,使表面积最大。3)4℃ 12000 r · min⁻¹离心 2 min,上清转入新的无 RNase 离心管。4)加 0.1 mL 5 mol · L⁻¹ NaCl,温和混匀。再加 0.3 mL 氯仿,上下颠倒混匀。5)4℃ 12000 r · min⁻¹离心 10 min,取上层水相转入新的无 RNase 离心管。6)加与所得水相等体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min。7)4℃ 12000 r · min⁻¹离心 10 min。弃上清,注意不要倒出沉淀。加 1 mL 75%乙醇。8)4℃ 12000 r · min⁻¹离心 1 min。倒出液体,注意不要倒出沉淀。剩余的少量液体可再次离心收集,然后用枪头吸出。9)加 10~30 μL 无 RNase 水,吹吸几次以溶解 RNA。如有絮状物,可在室温条件下 12000 r · min⁻¹离心 1 min,取上清转入新的无 RNase 离心管中。-70℃保存。

1.2.3 热硼酸/蛋白酶 K 法。参见文献[2],并进行了部分修改。整个流程为:1)将 0.2 g 冷冻的叶片或幼蕾放入预冷的研钵中,研磨成粉状,倒入 1.5 mL 微量离心管中,加入 1 mL 预热至 80℃的基本提取液[200 mmol · L⁻¹ 硼酸钠 · 10H₂O、30 mmol · L⁻¹ EGTA、1% (w/v) SDS、1% 脱氧胆酸钠、2% (w/v) PVP、0.5% Nonidet-40、pH9.0]、10 μL DTT 贮备液和 25 μL 蛋白酶 K 贮备液混匀;2)42℃ 100 r · min⁻¹温和摇动 1.5 h;3)每管加入 8 μL 2 mol · L⁻¹ KCl 溶液,调整 KCl 终浓度至 160 mmol · L⁻¹,冰浴 1 h;4)12000 r · min⁻¹离心 20 min,将上清移入一个新管中,加入 1/3 体积 8 mol · L⁻¹ LiCl,混匀,冰上过夜沉

淀;5)12000 r · min⁻¹离心 20 min,弃上清,将沉淀用 2 mol · L⁻¹ LiCl(冰预冷)洗 2~3 次,直到上清近乎无色;6)重悬 LiCl-RNA 于 400 μL 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl(pH7.5)中,12000 r · min⁻¹离心 10 min,转移上清至新离心管中;7)加入 1/10 体积的 2 mol · L⁻¹ KAc(pH5.5),混匀,冰浴 15 min 沉淀;8)离心除去盐不溶物质(上清中含有 RNA);9)用 2.5 倍体积的无水乙醇-20℃沉淀过夜或-70℃沉淀 2~3 h;10)用 70%冷乙醇洗涤 RNA 沉淀,真空快速干燥,溶于 DEPC 水中或 TE 缓冲液(10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl,1 mmol · L⁻¹ EDTA,pH8.0);11)根据分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值计算 RNA 产率与质量。

1.2.4 电泳检测。取 1 μL 样品,在 1.5%~2.0%的琼脂糖胶(含有溴化乙锭)上快速电泳,观察 RNA 的完整性。

1.2.5 分光光度计定量测定和纯度分析。将 RNA 样品稀释 200 倍,置于石英比色杯中,用 BECKMAN DU 800 紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度。

2 结果与分析

在 BECKMAN DU 800 型紫外分光光度计上分别测定棉花不同组织部位和烟草叶片的总 RNA OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 并计算 OD_{260/280}、RNA 浓度和产率,每个样品分别测定 3 次,取其平均值,结果见表 1。

表 1 Trizol 法和热硼酸/蛋白酶 K 法所提烟草和棉花不同组织 RNA 质量及其得率比较

Table 1 Comparison of quality and yield of RNA extracted from different tissues by two extraction methods
Trizol method and hot borate method

提取方法	植物组织	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	RNA 浓度/(mg · L ⁻¹)	总 RNA 产量/(μg · g ⁻¹)	提取时间
Trizol 法	烟草叶片	1.9124	7380	738	4~5 h
	棉花叶片	1.8871	5320	532	4~5 h
	棉花幼蕾	2.1807	2840	284	4~5 h
热硼酸/蛋白酶 K 法	烟草叶片	1.7447	5060	506	2~3 d
	棉花叶片	1.9172	8150	815	2~3 d
	棉花幼蕾	1.9737	9240	924	2~3 d

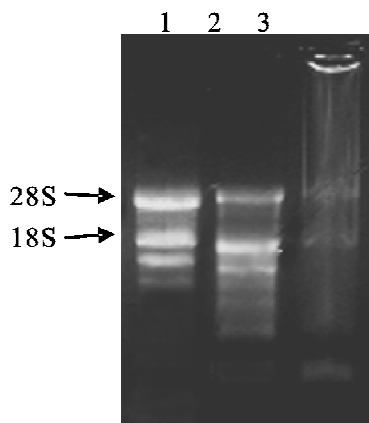
注:RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值在 1.7~2.0 之间说明 RNA 质量较高、完整性较好。

由表 1 可见,Trizol 法通常 4~5 h 即可完成提取过程,此法耗时较短。采用此方法提取烟草叶片 RNA 效率较高,每 1 g 鲜重的叶片可以获得 738 μg 总 RNA。Trizol 法提取棉花叶片总 RNA

量一般为 532 μg 每 1 g 鲜重的叶片。用 Trizol 法提取棉花幼蕾总 RNA,经过紫外分光光度法和电泳分析表明,采用此法提取棉花幼蕾总 RNA 质量较差,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀大于 2.0,说明 RNA 中

含有较多杂质;电泳结果显示 RNA 降解并且在点样孔中有很多杂质(图 1),不能用于下一步实验。以上结果表明应用 Trizol 法受物种的限制,并且此法成本相对较高。

采用热硼酸/蛋白酶 K 法提取总 RNA 时间较长,通常为 2~3 d。提取的烟草叶片 RNA 有降解现象,提取质量不高,不能满足进一步实验的要求。但是对于棉花材料而言,获得的 RNA 质量较高、完整性较好。紫外分光光度法分析结果



1. 烟草叶片 2. 棉花叶片 3. 棉花幼蕾
图 1 Trizol 法提取不同组织 RNA 电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis profile of total RNA isolation by Trizol method

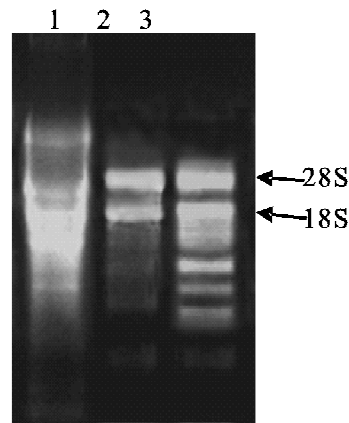
上述实验结果表明,热硼酸/蛋白酶 K 法是棉花幼蕾总 RNA 提取的最适方法。

3 结论和讨论

棉花富含多酚、多糖、单宁等次生代谢产物,导致目前大多数提取植物 RNA 的方法都不适合于棉花 RNA 的提取。Wan 等^[2]应用热硼酸/蛋白酶 K 法分别成功应用于棉花根、茎和叶中;武耀廷等^[3]用此法提取棉花纤维、胚珠、花、种子等 RNA 也得到了极好的效果,但对于棉花幼蕾 RNA 的提取方法尚未见报道。本文参照以上已有的结果采用 Trizol 法和改进的热硼酸/蛋白酶 K 法提取棉花幼蕾总 RNA,通过比较得出结论:热硼酸/蛋白酶 K 法提取棉花幼蕾总 RNA 完整性较好,能够满足 Northern 杂交分析、构建 cDNA 文库、RT-PCR 及基因表达分析等分子生物学研究的要求。

虽然 Trizol 法耗时较短,国内实验室大多采用此法提取不同植物组织的总 RNA,但 Trizol 法提取棉花幼蕾 RNA 时,未能获得质量较高的 RNA,可能由于棉花幼蕾中的单宁、棉酚等物质

表明, OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.9134 和 1.9737 接近 2.0。根据 OD 值计算得,每 1 g 的棉花叶片、幼蕾可分别获得 815 μg 和 924 μg 总 RNA。经 DNase 消化后,电泳分析可见,RNA 条带清晰(图 2)。而且提取的幼蕾 RNA 除 28S、18S 外,还出现了很多小 RNA 条带,这可能与幼蕾的特殊结构有关。以上说明获得的 RNA 质量高,数量大,可以用于分离 mRNA、合成 cDNA、RT-PCR 等进一步的实验。



1. 烟草叶片 2. 棉花叶片 3. 棉花幼蕾
图 2 热硼酸/蛋白酶 K 法提取不同组织 RNA 电泳图谱
Fig. 2 Electrophoresis profile of total RNA isolation by hot borate method

极易氧化,其后与核酸不可逆结合^[4],导致难于分离出核糖核酸,最终引起核酸降解^[5],且蛋白质含量很高。所以,此法不适合于棉花幼蕾 RNA 的提取和制备。

改进的热硼酸/蛋白酶 K 法与提取棉花其它组织(如叶片^[6]、花^[6]、根^[7]等)酚法相比较,其成功的关键在于其基本提取液中加入了 DTT 和 NP-40,提供了一个还原环境,阻止了二硫键的形成,有效抑制了核糖核酸酶的活性^[8],之后加入蛋白酶 K 可降解去除核糖核酸酶。同时,还原环境还可以阻止酚类物质氧化,从而抑制酚类物质与 RNA 结合^[9]。提取液中的硼酸盐也可以保护 RNA 免受多酚的干扰^[8]。另外,提取液中的 PVP 可以以氢键方式与多酚、萜类或单宁类物质结合,阻止这些物质与 RNA 的作用^[2,10],蛋白酶 K 可以降解酚类和次生物质氧化酶^[5]。热硼酸/蛋白酶 K 法中用 LiCl 沉淀 RNA,用醋酸钾沉淀多糖,将 RNA 和多糖分别沉淀,可以避免 RNA 中多糖的污染。采用沉淀 RNA 的方法也避免了用苯酚、氯仿抽提时 RNA 的丢失^[4]。相比而言,此法更适合提取棉花幼蕾 RNA。

但是热硼酸/蛋白酶 K 法提取烟草叶片 RNA 过程中,可能由于提取时间过长而使其 RNA 发生了降解,提取的质量不能满足进一步实验的要求。而从棉花不同器官总 RNA 的提取情况看,热硼酸/蛋白酶 K 法提取的棉花幼蕾总 RNA 质量较高,完整性较好,而且在主要条带之下还出现了很多分子量较小的 RNA 条带。这说明可能在幼蕾的发育过程中,启动了大量的基因进行转录表达,来完成生殖生长这一重要的生命延续过程。

据报道,热硼酸/蛋白酶 K 法广泛应用于木本植物的 RNA 的提取^[11-12]。本实验的结果表明对于提取含酚类、多糖、次生代谢物含量较高的作物如棉花中的 RNA,采用该方法也可获得较好的结果。

参考文献:

- [1] 张天真. 陆地棉 1355A 和 104-7A 不育系的细胞学研究[J]. 棉花学报, 1995, 7(2): 73-75.
- [2] WAN C Y, Wilkin T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Anal Biochem, 1994, 223: 7-12.
- [3] 武耀廷, 刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总 RNA 的热硼酸改良法[J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 67-71.
- [4] SCHNEIDERBAUER A, Sandermann H, Jr, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91-95.
- [5] GRAHAM G C. A method for extraction of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers[J]. Plant Mol Biol Reprtr, 1993, 11: 32-37.
- [6] 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.
- [7] 王友华, 卢孟柱, 段留生. 棉花幼苗根总 RNA 提取的改进热酚法[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 723-726.
- [8] 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.
- [9] SU X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae[J]. Anal Biochem, 1998, 174: 650-657.
- [10] LEVI A, Galau G A, Wetzstein H Y. A rapid procedure for the isolation of RNA from high-phenolic-containing tissues of pecan[J]. HortSci, 1992, 27: 1316-1318.
- [11] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/酸酚法提取棉花组织总 RNA[J]. 棉花学报, 2003, 15(3): 166-167.
- [12] 李继刚, 郭三堆. 棉花高质量 RNA 的提取及 MADS-box 基因保守区段的克隆[J]. 棉花学报, 2004, 16(1): 3-7. ●