

牡丹根系 RNA 提取方法的比较研究

吴 静,李永华,何松林*

(河南农业大学 林学院,河南 郑州 450002)

摘 要:【目的】探索牡丹根系 RNA 提取的最佳方法。【方法】以牡丹(*Paeonia suffruticosa*)‘凤丹’5 a 生实生苗的根系为材料,首次比较研究了改良 Trizol 法、改良 CTAB 法、改良异硫氰酸胍法及 Column Plant RNAout 试剂盒法提取 RNA 的效果。【结果】改良 Trizol 法及改良异硫氰酸胍法均不能从牡丹根系中提取出高质量 RNA。而改良 CTAB 法及试剂盒法提取 RNA 的电泳结果可见清晰完整的 28S rRNA、18S rRNA 及 5S rRNA 条带,其中 28S rRNA 与 18S rRNA 的亮度比约为 2 : 1;浓度及纯度检测表明这 2 种方法提取的 RNA 纯度较高,且改良 CTAB 法提取的 RNA 浓度($269.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)是试剂盒法($82.14\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)的 3 倍。【结论】结合 RNA 的提取质量和成本,改良 CTAB 法更适宜于牡丹根系 RNA 的提取。

关键词:牡丹;根系;RNA;提取;改良 CTAB 法

中图分类号:S685.11 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2010)05-0060-04

Comparative Study of Extraction Methods for Total RNA from the Roots of *Paeonia suffruticosa*

WU Jing, LI Yong-hua, HE Song-lin*

(College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The roots five-year-old seedlings of *Paeonia suffruticosa* ‘Fengdan’ were used to extract total RNA. Four methods were compared to select optimal one: Trizol method, modified guanidinium thiocyanate method, modified CTAB method, and Column Plant RNAout kit method. The results showed that modified Trizol method and modified guanidinium thiocyanate method were not suitable for extracting the high-quality RNA from the root of *P. suffruticosa*. The complete 28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA bands could be seen clearly on the electrophoretogram of total root RNA extracted by modified CTAB method and Column Plant RNAout kit method, the brightness ratio of 28S rRNA and 18S rRNA were about 2 : 1; detection for concentration and purity showed that total RNA extracted by these two methods were purer. But the concentration of total RNA extracted by the modified CTAB method was as three times as that of the kit method. Considering total RNA purity and reagents cost, the modified CTAB method was more suitable for extracting total RNA from the root of *P. suffruticosa*.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; root, RNA; extraction, modified CTAB method

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为中国十大传统名花之首,具有较高的观赏价值。国内外牡丹的组织培养技术已经有了一定的基础,但由于组培苗生根困难,移栽成活率低等原因,尚未形成一个完善的组培技术体系,不能实现牡丹的工厂化育苗。因此研

究牡丹组培苗的生根机制就成为至关重要的问题,而提取纯度高、完整性好的 RNA 则是进行生根分子机理试验的前提。高双成^[1]等、周琳^[2]等、黄鑫^[3]用 CTAB 法分别从牡丹花瓣、花芽中成功分离出了总 RNA,后者并用此成功构建了差减 cDNA 文库。

收稿日期:2010-01-04 修回日期:2010-02-04
基金项目:河南省高校创新人才培养工程(豫教高[2005]126号)。
作者简介:吴静,女,在读硕士,研究方向:园林植物生物技术。E-mail:dd928@163.com
* 通讯作者:何松林,男,教授,博士,博士生导师,研究方向:园林植物生物技术。E-mail:hsl213@163.com

而提取牡丹根系 RNA 的研究尚未见报道。

试验以牡丹品种‘凤丹’5 a 生实生苗根系为材料,采用改良 Trizol 法、改良 CTAB 法、改良异硫氰酸胍法及 Column Plant RNAout 试剂盒 4 种方法提取 RNA,并对其提取质量进行比较研究,以期找到一种快速、高效的牡丹根系 RNA 提取方法,为牡丹生根生理及生根分子机制的研究提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为河南省中牟县北方园艺公司种植基地的牡丹品种‘凤丹’5 a 生实生苗。于 2009 年 9 月取其当年生幼根,用超纯水冲洗干净后液氮速冻,−70 ℃超低温冰箱中保存待用。

1.2 RNA 提取

1.2.1 改良 Trizol 法 (1)取 0.1 g 材料及 0.2 g PVP(聚乙烯吡咯烷酮)置液氮中迅速研磨成粉末,将其移入装有 1 mL Trizol 试剂的 1.5 mL 离心管中,充分混匀。(2)加入约 1/5 体积的氯仿后,涡旋混匀,室温静置 5 min;4 ℃、12 000 r · min^{−1} 离心 15 min。(3)转移上清液至另一新的 1.5 mL 离心管中,并加入等体积的无水乙醇,轻轻颠倒混匀;−20 ℃沉淀 1 h。(4)4 ℃、12 000 r · min^{−1} 离心 10 min。(5)吸去上清液,保留沉淀,并加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀。(6)短暂离心后倒掉乙醇,室温干燥 3~5 min 后加入 20 μL RNase-Free 水,充分溶解后,−70 ℃低温保存。

1.2.2 改良异硫氰酸胍法 参见李志能^[4]等的方法。

1.2.3 改良 CTAB 法 参见孟丽^[5]等的方法,其中 CTAB 提取缓冲液中采用高浓度 NaCl(2.0 mol · L^{−1})取代低浓度 NaCl(0.1 mol · L^{−1}),并加入 1 g · L^{−1}的亚精氨。

1.2.4 试剂盒法 Column Plant RNAout 试剂盒

购自北京天恩泽基因科技有限公司,按其说明书操作。

1.3 RNA 中基因组 DNA 的酶解

上述方法提取的总 RNA 均有 DNA 污染,需要对其进行 DNA 酶解,方法参照 TaKaRa DNase I 说明书。

1.4 RNA 纯度及浓度检测

取 1 μL RNA 样品,用 Thermo 公司的 Nano Drop ND-1000 型紫外可见分光光度计测定 RNA 样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 和 A₂₆₀/A₂₃₀ 的比值及 RNA 的浓度。

1.5 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

取 4 μL RNA 溶液,加入 1 μL 溴酚兰上样缓冲液,点样于 1.0%琼脂糖凝胶(每 40 mL 凝胶中加入 1.3 μL EB(10 mg · mL^{−1}))上,120 V 恒压电泳 20 min 后,置于 AlphaImager PE 凝胶成像系统中拍照,检测 RNA 的完整性。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度及浓度的检测

本试验采用 4 种方法对牡丹根系进行 RNA 提取,将各种方法提取的根系 RNA 用 DNaseI 进行处理后,测其浓度及纯度。由表 1 可以看出,改良 Trizol 法提取的 RNA,浓度虽然为 379.38 μg · g^{−1},但其 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.32, A₂₆₀/A₂₃₀ 为 0.55,说明样品中含有蛋白质污染及提取液残留, RNA 提取纯度较低。改良异硫氰酸胍法提取 RNA 时,无水乙醇沉淀提取的 RNA 浓度为异丙醇沉淀的 2 倍,但从 A₂₆₀/A₂₈₀ 及 A₂₆₀/A₂₃₀ 来看,其 RNA 纯度较低。而改良 CTAB 法及试剂盒法提取的 RNA,其 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.9~2.1 之间, A₂₆₀/A₂₃₀ 均大于 2.0,说明 RNA 纯度较好,无污染,无降解。而改良 CTAB 法提取的 RNA 浓度是试剂盒法的 3 倍。

表 1 4 种方法提取牡丹根系 RNA 的浓度与纯度比较

Table 1 Comparison of total RNA purity and concentration from the roots of *P. suffruticosa* extracted by four methods

项 目	改良 Trizol 法	改良异硫氰酸胍法		改良 CTAB 法	试剂盒法
		异丙醇沉淀	无水乙醇沉淀		
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.32	1.42	1.42	2.01	1.97
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	0.55	0.65	1.18	2.34	2.08
浓度/(μg · g ^{−1})	379.38	124.25	228.00	269.50	82.14

2.2 RNA 完整性分析

改良 Trizol 法提取的总 RNA,在非变性琼脂糖凝胶中可以分辨出 28S rRNA 及 18S rRNA 2 条谱带,但条带模糊,亮度相当,且 DNA 含量较高(图 1,

A)。改良异硫氰酸胍法,无论是用异丙醇还是用无水乙醇沉淀,均不能从牡丹根系中提取出可检测到的 28S rRNA 及 18S rRNA 条带(图 1,B)。而改良 CTAB 法及 Column Plant RNAout 试剂盒法均

能很好的从牡丹根系中提取出 RNA,这 2 种方法提取的 RNA 的 28S rRNA 及 18S rRNA 条带清晰且完整,无可见拖尾和污染,且比例接近 2 : 1,说明这

2 种方法提取的 RNA 完整性较好(图 1,C;图 1,D)。

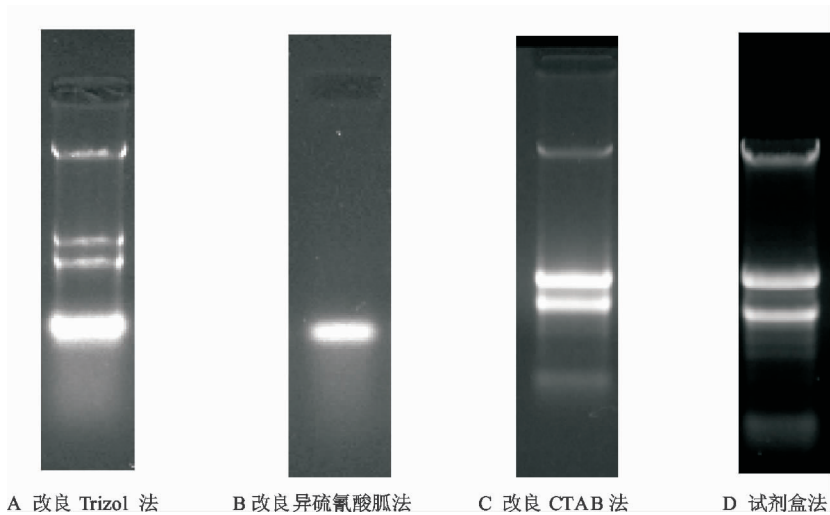


图 1 4 种方法提取牡丹根系 RNA 的凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of total RNA from the root of *P. Suffruticosa* extracted by four methods

3 结论与讨论

牡丹为多年生木本花卉,而木本植物的细胞,除了木质素、纤维素、半纤维素、果胶等物质组成的细胞壁,还具有大量的蛋白质、多糖、多酚化合物等物质,这在一定程度上使从牡丹根系中提取高质量 RNA 较为困难^[6]。如何经济而快捷地从牡丹根系中获得高纯度、高浓度 RNA 便成为其分子研究不得不首先解决的问题^[7]。

传统的 Trizol 法比较简单方便,耗时也较短,但是可能由于步骤比较简单,对杂质的去除不够彻底^[8-9],改良 Trizol 法虽然选用无水乙醇沉淀从根系中提取出了 RNA,但 DNA 含量较高,同时有大量蛋白质及试剂残留。

改良异硫氰酸胍法历时较长,无论是用异丙醇还是用无水乙醇沉淀,均会出现大量絮状沉淀,离心后为褐色沉淀,RNase-Free 水无法将其溶解。这可能与牡丹根系中含有大量多糖有关,因多糖的许多理化性质和 RNA 相似,会与 RNA 共沉淀形成难溶的胶状物,导致 RNA 很难从中分离出来^[10]。

CTAB 法对于木本植物 RNA 的提取有较好的效果。在前人的研究中,用 CTAB 法或经过改良的 CTAB 法可以从内含物丰富的植物材料,如苹果属植物、甜杨、银杏、月季花瓣、甘薯块根、茶苗幼根中提取到较高质量 RNA^[11-16]。本试验中改良 CTAB 法采用较高浓度的 CTAB,不仅对植物细胞具有较

好的裂解作用,而且还能有效地分离核蛋白与核酸的复合物,同时和 β -巯基乙醇联合作用变性蛋白、抑制 RNA 酶的活性。缓冲液中添加 $2\text{ molL} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,浓度高于普通 CTAB-PVP 提取缓冲液中的 $0.7\text{ molL} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,高浓度 NaCl 能有效去除多糖,并溶解 CTAB-RNA 复合体,使多糖及 CTAB 在氯仿/异戊醇(24 : 1)萃取过程中被充分去除^[17]。利用 LiCl 沉淀 RNA 是制备中常用的方法,其优点是制备的 RNA 纯度高,无多糖等生物大分子的共沉淀。Column Plant RNAout 试剂盒法虽然提取的 RNA 质量与改良 CTAB 法相当,但从浓度上看,改良 CTAB 法是其 3 倍,虽然试剂盒法费时较短,且为常温操作,但其费用较高,不适合进行大量材料的提取。结合 RNA 提取质量与试验成本,改良 CTAB 法的性价比较高,能够快速完整的从牡丹根系中提取高质量 RNA,以满足后续研究需要。

参考文献:

[1] 高双成,施江,王世华,等.一种牡丹花瓣总 RNA 的提取方法[J].河南农业科学,2007(10):93-94.
[2] 周琳,董丽.牡丹 ACC 氧化酶基因 cDNA 克隆及全序列分析[J].园艺学报,2008,35(6):891-894.
ZHOU L,DONG L. Cloning and sequence analysis of l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene cDNA from tree peony[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(6):891-894. (in Chinese)
[3] 黄鑫.牡丹花芽内休眠解除相关基因的分离与功能分析[D].北京:北京林业大学,2008.

HUANG X. Cloning and analysis of genes associated with the release of dormant floral buds in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2008. (in Chinese)

[4] 李志能, 黄文俊, 张佳琪, 等. 异硫氰酸胍法快速提取二球悬铃木组织总 RNA 的研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 266-269.

LI Z N, HUANG W J, ZHANG J Q, *et al.* Guanidine thiocyanate method of total RNA isolation in *Platanus acerifolia* [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2007, 25(3): 266-269.

[5] 孟丽, 周琳, 张明姝, 等. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法[J]. 生物技术, 2006, 16(1): 38-40.

MENG L, ZHOU L, ZHANG M S, *et al.* An efficient and economic method for preparation total RNA of petals [J]. Biotechnology, 2006, 16(1): 38-40. (in Chinese)

[6] 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 1-4.

WANG Y C, YANG C P, JIANG J. The main point and principle of isolating total RNA from ligneous plant tissues [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2002, 30(2): 1-4. (in Chinese)

[7] 严晓丹, 王天祥, 刘挨枝, 等. 胡杨根、茎、叶、愈伤组织总 RNA 提取的研究[J]. 河北林果研究, 2008, 23(2): 118-122.

YAN X D, WANG T X, LIU A Z, *et al.* Extraction of total RNA from roots, stems, leaves and calli of *Populus euphratica* Oliv [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 2008, 23(2): 118-122. (in Chinese)

[8] 赖茵, 余迪求. 4 种榕树总 RNA 提取方法的比较[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(6): 636-640.

LAI H, YU Q Q. Comparison of different total RNA isolation methods for four *Ficus* species [J]. Journal of Yunnan University: Natural Science Edition, 2008, 30(6): 636-640. (in Chinese)

[9] 印华, 周兆德, 吴志祥. 2 种荔枝 RNA 提取方法的比较[J]. 热带农业工程, 2009, 33(2): 1-4.

YIN H, ZHOU Z D, WU Z X. Comparison of two methods for extracting RNA from litchi [J]. Tropical Agricultural Engineering, 2009, 33(2): 1-4. (in Chinese)

[10] LOGEMANN J, SCHELL J, WILLMITTIZER L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues [J]. Anal Biochem, 1987, 163: 16-20.

[11] 曹秋芬, 孟玉平, 孙毅. 苹果属植物总 RNA 有效、快速提取方法[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(4): 428-429.

CAO Q F, MENG Y P, SUI Y. An effective quick method for total RNA extraction in *malus* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(4): 428-429. (in Chinese)

[12] LIN Y Z, LIN S Z, ZHANG Z, *et al.* One rapid and efficient method for isolation of total RNA from shoots regenerated in vitro of *Populus suaveolens* [J]. Forestry Studies in China, 2004, 6(1): 18-21.

[13] 杨谷良, 刘世旺, 詹火元, 等. 不同方法提取银杏叶片总 RNA 及 RT-PCR [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(12): 3482-3496.

YANG G L, LIU S W, ZHAN H Y, *et al.* Comparison of RNA extraction from *Ginkgo biloba* L. leaf and RT-PCR [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2007, 35(12): 3482-3496. (in Chinese)

[14] 谢吉容, 程再全, 黄兴奇, 等. 月季花瓣的 RNA 提取方法[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(4): 480-484.

XIE J R, CHENG Z Q, HUANG X Q, *et al.* Methods of extracting total RNA from *rosa hybrida* corolla tissue [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2007, 22(4): 480-484. (in Chinese)

[15] 侯夫云, 赵兵, 赵宝杰, 等. 利用改良的 CTAB-LiCl 法提取甘薯块根 RNA [J]. 山东农业科学, 2008(9): 90-92.

HOU F Y, ZHAO B, ZHAO B J, *et al.* Improved CTAB-LiCl system for total RNA isolation from tuberous roots of sweet potato [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2008(9): 90-92. (in Chinese)

[16] 史成颖, 宛晓春, 江昌俊, 等. 提取高质量茶树总 RNA 的方法研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 360-363.

SHI C Y, WAN X C, JIANG C J, *et al.* Method for high-quality total RNA isolation from tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2007, 34(3): 360-363. (in Chinese)

[17] 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(1): 36-39.

LI H, WANG X L. The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies [J]. Biotechnology Information, 1999(1): 36-39. (in Chinese)