

技术主题

Technology Feature

大豆总 RNA 提取方法比较及其在基因克隆和表达分析中的应用

郭彬^{1,2} 侯思宇¹ 黄可盛^{1,2} 路阳¹ 韩渊怀¹ 王玉国^{2*}

1 山西农业大学生物工程研究所, 太谷, 030801; 2 山西农业大学农学院, 太谷, 030801

* 通讯作者, tgwygn@126.com

摘要 为确立大豆叶、花组织提取总 RNA 的最佳方法, 比较了植物总 RNA 提取试剂盒法、改良的 CTAB-LiCl 法和改良的热硼酸法的提取效果。通过 RNA 产量、纯度、凝胶电泳及后续的基因克隆和荧光定量 PCR 等分析, 结果表明: 热硼酸法所提取的叶、花总 RNA 含量约为其他两种方法的 6 倍; 总 RNA OD_{260}/OD_{280} 值介于 1.98~2.1; 电泳条带完整清晰; 应用获得的总 RNA 所克隆 ZAT9-like 基因, 经测序获得 885 bp 的核酸序列与 ZAT9-like (登录号: XM_003517371.1) 基因同源率达 99%; 荧光定量分析 *Histone H3* 基因的扩增曲线与融解曲线峰型良好。说明该方法能够满足一般分子生物学下游实验的要求, 是一种理想的针对大豆叶、花总 RNA 的提取方法。

关键词 大豆, 总 RNA, 热硼酸法

Different Methods for Extracting Total RNA and Their Application in Gene Cloning and Gene Expression Analysis in Soybean (*Glycine max*)

Guo Bin^{1,2} Hou Siyu¹ Huang Kesheng^{1,2} Lu Yang¹ Han Yuanhuai¹ Wang Yuguo^{2*}

1 Institute of Agricultural Bioengineering, Taigu, 030801; 2 School of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, 030801

* Corresponding author, tgwygn@126.com

DOI: 10.3969/mpb.011.000255

Abstract In order to find out the optimal method for extracting total RNA from leaves and flowers in soybean (*Glycine max*), extracting efficiency was compared among three methods of RNA extraction, RNApure plant kit, modified CTAB and hot borate. The yield and purity of total RNA were determined by nucleic acid and protein detector; integrity and quality of total RNA were analyzed by agarose gel electrophoresis, gene cloning and real-time PCR. The results showed that the yield of total RNA by using hot borate was six times that by the other methods (RNApure plant kit and modified CTAB). The value of OD_{260}/OD_{280} was between 1.98 to 2.01; The electrophoresis result of RNA showed satisfactory bands with sharpness and integrity. ZAT9-like gene was obtained by cloning from the total RNA, sequenced to the nucleic acid sequence of 885 bp, showing up to 99% homology to ZAT9-like gene. In real-time PCR amplification, curve peak type and the melting curve peak type were better with RNA extracted with hot borate than the other methods. The quality of the RNA by hot borate was of high quality for gene cloning, real-time PCR and the other downstream application in molecular biology.

Keywords *Glycine max*, RNA extraction, Hot borate method

提取植物组织中总 RNA 是对植物分子生物学方面进行研究的必要手段。高质量的总 RNA 可进行 RT-PCR、Northern 杂交分析、基因克隆、cDNA 文库的建立以及转录组测序等后续试验。植物组织中所含有的 RNase、多糖、未知的次级代谢物、酚类化合物以及蛋白在细胞破碎前互不影响, 在破碎后则与

收稿日期 2012-11-09

接受日期 2012-12-04

网络出版日期 2013-01-09

URL: <http://5th.sophiapublisher.com/abstract-1181-mpbopa>

基金项目 本研究由山西省青年科技研究基金(2011021032-3)、山西省青年科技研究基金(2011021032-1)、山西农业大学创新基金(2010028)和山西省科技攻关项目(20120311005-3)共同资助

RNA 相互作用导致 RNA 降解、丢失或抑制后续酶促反应(李宏和王新力, 1999)。不同植物组织中的蛋白质、多糖、酚类和脂类等成分的含量有较大差异(张洋等, 2010) 因此从不同材料中提取总 RNA 难度不同, 适宜的总 RNA 提取方法也不尽相同。

大豆叶片和花总 RNA 提取难度相对较大, 相关研究报道较少。付畅等(2004)对大豆不同器官总 RNA 提取进行了比较, 结果表明应用异硫氰酸胍法和改良异硫氰酸胍法对大豆根、茎等器官总 RNA 提取效果较好, 但对叶片总 RNA 提取效果不佳。刘易科等(2006)利用改良 TRIzol 法用于大豆根、茎、叶及生长点总 RNA 的提取, 取得了较好的实验效果, 而改良异硫氰酸胍法则无法用于大豆叶片总 RNA 提取。目前针对大豆花器官总 RNA 提取方法还未见报道。

本研究比较了植物总 RNA 提取试剂盒法、改良 CTAB 法和改良热硼酸法对大豆叶片和花总 RNA 提取效果, 从中筛选出适合大豆叶片和花两种器官总 RNA 提取最佳方法。将提取获得的总 RNA 应用于基因克隆及荧光定量 PCR 等实验, 以验证该方法所提取的总 RNA 能否满足下游分子生物学实验, 为大豆基因工程研究奠定实践基础。

1 结果与分析

1.1 大豆叶和花总 RNA 提取

采用 3 种方法分别对大豆叶和花器官进行总 RNA 提取, 分别为植物总 RNA 提取试剂盒法、改良 CTAB 法和改良热硼酸法。结果表明 3 种方法均可提取出大豆叶和花总 RNA, 但提取总 RNA 的含量

不同。其中改良热硼酸法提取的总 RNA 含量最高(表 1), 叶片中总 RNA 含量为 869.5 $\mu\text{g/g}$, 花中总 RNA 含量为 124.16 $\mu\text{g/g}$, 该方法所获得的总 RNA 含量约为其他两种方法的 6 倍。3 种方法提取的总 RNA 在 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值均在 1.98~2.1 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值在 0.12~2.37 之间。尽管植物总 RNA 提取试剂盒法所提取的总 RNA 的 18S、28S rRNA 条带清楚, 但含量较低且有 DNA 残留(图 1A)。改良 CTAB-LiCl 法提取的总 RNA 出现拖尾情况, 不能够清晰的分辨出 18S、28S rRNA 条带, 所得总 RNA 完整性较差, 有明显的降解(图 1B)。改良热硼酸法所提

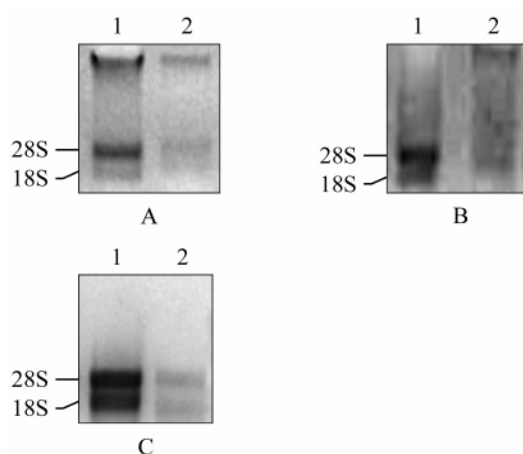


图 1 两种器官提取总 RNA 电泳结果

注: A: 植物 RNA 提取试剂盒法; B: 改良 CTAB-LiCl 法; C: 改良热硼酸法; 1: 叶; 2: 花

Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis of total RNA extracted from leaves and flowers in soybean

Note: A: RNAPure plant kit (with DNase); B: Modified CTAB method; C: Modified hot borate method; 1: Leaves; 2: Flowers

表 1 不同方法提取大豆两器官总 RNA 的含量及质量

Table 1 Quality and concentration analysis of extracted total RNA from leaves and flowers in soybean

RNA 提取方法	提取部位	总 RNA 产量($\mu\text{g/g}$)	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$
RNA extraction methods	Sample of tissues	Total RNA concentration ($\mu\text{g/g}$)		
改良的 CTAB 法 Modified CTAB method	叶	164.28	0.34	2.09
	花	41.60	0.27	1.98
	Flowers			
植物 RNA 提取试剂盒法 RNAPure plant kit (with DNase)	叶	83.61	0.33	2.02
	花	29.46	0.12	2.10
	Flowers			
热硼酸法 Modified hot borate method	叶	869.50	2.35	2.04
	花	124.16	2.37	2.01
	Flowers			

取总 RNA 无拖尾现象,且 28S rRNA 条带亮度约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍(图 1C)。

1.2 *GmZAT9-like* 基因克隆及分析

为确定改良热硼酸法提取大豆叶、花两种器官的总 RNA 能否满足下游分子生物学实验。以该法提取总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增 *GmZAT9-like* 基因片段,结果成功扩增出约 1 000 bp 左右的特异片段(图 2)。经测序,获得 885 bp 的核酸序列,与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中所登录的 Glycine max zinc finger protein ZAT9-like (登录号: XM_003517371.1) 基因核酸序列同源性达 99%(表 2),序列比对结果表明该基因在第 158 碱基处有一个位点发生变异(T→C)(图 3)。

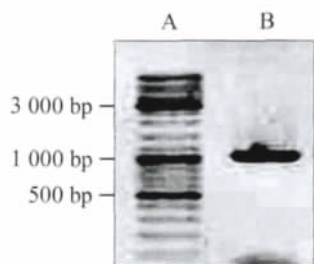


图 2 *GmZAT9-like* 基因的克隆

注: A: DNA marker; B: 目的基因片段

Figure 2 The results of *GmZAT9-like* gene cloning

Note: A: DNA marker; B: Target gene fragment

1.3 *H3* 基因实时荧光定量 PCR 分析

实时荧光定量 PCR 技术对总 RNA 的纯度有很高的要求,为进一步确认所提取的总 RNA 的质量,我们利用实时荧光定量 PCR 对 *H3* 基因进行了表达分析。结果表明,基因扩增的融解曲线图(图 4),出现了一个明显的峰值,同时扩增曲线具有明显的 3 个阶段,说明该荧光定量 PCR 实验所用引物、体系以及模板合适。

表 2 *GmZAT9-like* 基因序列 BLAST 比对结果

Table 2 The BLASTn results of *GmZAT9-like* gene sequence

基因序列号	同源基因名称	物种	得分	E 值	同源率(%)
Gene ID	Similar gene name	Species	Score	E value	Max ident (%)
XM_003517371.1	锌指蛋白	大豆	1 591	0	99
	Zinc finger protein ZAT9-like	<i>Glycine max</i>			
XM_003538690.1	锌指蛋白	大豆	1 153	0	88
	Zinc finger protein ZAT9-like	<i>Glycine max</i>			
BT141069.1	未知	日本莲	479	2e-131	71
	Unknown	<i>Lotus japonicus</i>			

2 讨论

大豆叶中富含大量多糖、蛋白和酚类化合物,花中含有大量色素类物质。这些杂质及其它次级代谢物等,严重干扰大豆叶及花总 RNA 提取(Louime et al., 2008)。由于这些物质与 RNA 共沉后形成难溶物,很难从总 RNA 中再次分离出来,降低了总 RNA 在水中溶解度,不溶物或杂质干扰 RNA 的紫外吸收值,并可抑制后续的各种酶促反应(夏海武等, 2006; Schneiderbauer et al., 1991)。因此有效去除多糖、蛋白和酚类化合物及干扰 RNA 提取的其它代谢产物就能够提高对大豆叶、花总 RNA 的提取质量。

植物总 RNA 提取试剂盒法,具有操作简单、提取时间短的优点。但针对本研究中大豆叶和花的总 RNA 提取效果不理想,可能因为试剂盒中的提取液对大豆叶片和花的组织裂解不够彻底,没有有效的去除多糖、蛋白和酚类化合物,从而导致了总 RNA 的得率降低。且在纯化柱上消化 DNA 时不够彻底,导致 DNA 的残留,因此无法进行后续分子生物学实验。而改良 CTAB 法中前期加入 β -巯基乙醇,可有效的改善酚类物质的氧化,降低对 RNA 提取的干扰。但此法需要高温振荡下辅助裂解,高温使总 RNA 不稳定,出现轻微降解现象(任杰等, 2011)。改良热硼酸法相对属于一种温和的裂解方法,且在使用 DTT 和蛋白酶 K 后能够有效地抑制多糖、酚类以及其他影响 RNA 的次级代谢产物,将大豆叶和花的细胞内含物对总 RNA 提取影响降到最低。

由于大豆为油料作物,其叶和花中不但含有色素类物质,同时还有大量的油脂蛋白。针对材料的特殊性,利用改良热硼酸法的温和裂解特性,保证了总 RNA 的产量。且通过两次氯仿抽提,将叶绿素、花青素等色素类物质去除,同时氯仿进一步降低了蛋白的含量,减少蛋白及色素类物质对 RNA 的干扰,提高了总 RNA 的质量。

总之,与前两种提取大豆叶和花的总 RNA 方法


```

1 : A-----TGGAGCGGTACAAAT
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
2 : -----T : 1
3 : A-----TGGAGCGGCACAAAT : 16
4 : A-----TGGAGCGGTACAAAT : 16
5 : GGAAAAACAAAACAAAACAAAACACAAGCATTTCTTTCTTCCATTGTGCCTCTCTTCTCTTCTCTCTGGTTCCAACCCAAATGGAGAGGTACAAAT : 100

1 : GCAAGCTCTGCTCCAGAACATTCTCCAATGGCAGAGCCCTCGGTGGCCACATGAAGGCTCACTTAGCCACCCTCCCTCTTCCCCCCCAGAACCAACAACC
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
2 : GCAAGCTCTGCTCCAGAACATTCTCCAATGGCAGAGCCCTCGGTGGCCACATGAAGGTTCACTTAGCCACCCTCCCTCTTCCCCCCCAGAACCAACAACC : 101
3 : GCAAGCTCTGCTCCAGAACATTCTCCAATGGCAGAGCCCTCGGTGGCCACATGAAGGCTCACTTAGCCACCCTCCCTCTTCCCCCCCAGAACCAACAACC : 116
4 : GCAAGCTCTGCTCCAGAACATTCTCCAATGGCAGAGCCCTCGGTGGCCACATGAAGGCTCACTTAGCCACCCTCCCTCTTCCCCCAG-----CC : 107
5 : GCAAGCTTTGCTCCAGAAAATTCATCAATGGCAAGCACTAGGTGGTCACATGAAGGCTCACTTAGCCACCCTTCCCTCTCTCCAAG-----CC : 191

1 : ---ACCACCTTTCTCCCTCT-----GCTGCTGCTTCCTTCTCTT-----CTAATTCCTCTTCAGAGAAGAACAAGCCACACACGATGAAAAGTCTCTG
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
2 : ---ACCACCTTTCTCCCTCT-----GCTGCTGCTTCCTTCTCTT-----CTAATTCCTCTTCAGAACAGAACAAGCCACACACGATGAAAAGTCCCTG : 186
3 : ---ACCACCTTTCTCCCTCT-----GCTGCTGCTTCCTTCTCTT-----CTAATTCCTCTTCAGAACAGAACAAGCCACACACGATGAAAAGTCCCTG : 201
4 : ---ACCACCTTTCTCCCTCT-----GCTGCT-----TCCTTCTCTT-----CTAATTCCTCTTCAGAGAAGCC-----ACACACGATGAAAAGTCTCTG : 183
5 : TCAACCACTCTCTGGCCATAACCACTGCA---TCCTTCTCATTTCACTTCTTCTCTGGAAGAAGAA-----GAGGCAGAGAAAAGCCTCTG : 282

1 : ATTTATGGGTTAAGAGAGAATCCCAAGAAATGCTTCAGGCTCGCAGATCCCAGATTGACACGGGCTCTGTGTTCAAGACAGGGAGAGCGAGACCGAGT
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
2 : ATTTATGGGTTAAGAGAGAATCCCAAGAAATGCTTCAGGCTCGCAGATCCCAGATTGACACGGGCTCTGTGTTCAAGACAGGGAGAGCGAGACCGAGT : 286
3 : ATTTATGGGTTAAGAGAGAATCCCAAGAAATGCTTCAGGCTCGCAGATCCCAGATTGACACGGGCTCTGTGTTCAAGACAGGGAGAGCGAGACCGAGT : 301
4 : ATTTATGGGTTAAGAGAGAATCCCAAGAAATGCTTCGACTCGCAGATCCCAGATTACATGGCCTCTGTGTTCAAGACAGGGAAAGCGAGACCGAGT : 283
5 : ATTTATGGGTTGAGAGAAA---CCCAAAAAGTTTCAGACTTTCGGATCTGAGT-----CTGTTGTGCAAGACAGAGAGAGCGGAGACTGAGT : 369

1 : CAAAGAACCCAACCTCGCCGACGATCCAAGCGAACCCGAAGGCCCGT---GAATTTGAACTAAAAAAGCCCAAACCTGAGTTTCATGGAGTCGCCTGAGCC
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
2 : CAAAGAACCCAACCTCGCCGACGATCCAAGCGAACCCGAAGGCCCGT---GAATTTGAACTAAAAAAGCCCAAACCTGAGTTTCATGGAGTCGCCTGAGCC : 383
3 : CAAAGAACCCAACCTCGCCGACGATCCAAGCGAACCCGAAGGCCCGT---GAATTTGAACTAAAAAAGCCCAAACCTGAGTTTCATGGAGTCGCCTGAGCC : 398
4 : CAAAGAACCCAACCTCGCCGACGATCCGAGCGGACCCGAAGAACCGT---GAATTCGAACTAAAAAAGCCCAAACCTGAGTTTCATGGAGTCGCAGAGCC : 380
5 : CAAAGAACCCAACCTCGGAGACGATCCAACGAAACGAAAACCTCTTCAGAACTCTAAACTGA-----TGAGCTTCATGGATTACACGAGGCC : 457

1 : CGTGAGTTCGTCTCCGACACTTCCCCGAGGAAGATGTGCGCATGTGTCTCATGATGTTGTCGAGAGACCGATGGAGTAAGAACAACAACATCAACGTT
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
2 : CGTGAGTTCGGTCTCCGACACTTCCCCGAGGAAGATGTGCGCATGTGTCTCATGATGTTGTCGAGAGACCGATGGAGTAAGAACAACAACATCAACGTT : 483
3 : CGTGAGTTCGGTCTCCGACACTTCCCCGAGGAAGATGTGCGCATGTGTCTCATGATGTTGTCGAGAGACCGATGGAGTAAGAACAACAACATCAACGTT : 498
4 : CGTGAGCTCTGTCTCCGACACTTCTCCGAGGAAGATGTGCGCATGTGTCTCATGATGTTGTCGAGAGACCGATGGAGTAAACAACAACAACA----- : 476
5 : TGTGAGCTCTGTTTCTGATACTTCCCTGACGAAGATGTTGCCATGTGCTCATGATGCTCTCCAGAGACAGTTGGAGAAATCAGCAACAATGTTGA---- : 553

1 : GITA-----TGTTAATGATGATGATGTTGTCGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAGAGGAGGAGGGTGGGAGATCAGTAC
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
2 : GITA-----TGTTAATGATGAGGATGTTGTCGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAGAGGAGGAGGGTGGGAGATCAGTAC : 562
3 : GITA-----TGTTAATGATGAGGATGTTGTCGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAGAGGAGGAGGGTGGGAGATCAGTAC : 577
4 : -----CATCATCATCATTAAACAACGTTGTTAGTAAATGATGATGTTGTCG-----AAGAAGAAGAAGAGG-----GTGGGAGATCAGTA-- : 549
5 : -----TGTTAACGTTGTTGTTGTTGTC-----AAGAAGAAGAAGAAAT-----GAATCAGAGGGGTTTCT-- : 611

1 : TAGAGATAAGTTGAGGAGAGTTCCGCGGAAGCACCAGTGTGACAGCTGCGGGAAGACGTTTCGATCTTCACGCGCATTGGGCAGTACAGAAAGCATTTG
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
2 : TAGAGATAAGTTGAGGAGAGTTCCGCGGAAGCACCAGTGTGACAGCTGCGGGAAGACGTTTCGATCTTCACGCGCATTGGGCAGTACAGAAAGCATTTG : 662
3 : TAGAGATAAGTTGAGGAGAGTTCCGCGGAAGCACCAGTGTGACAGCTGCGGGAAGACGTTTCGATCTTCACGCGCATTGGGCAGTACAGAAAGCATTTG : 677
4 : --GAGATCAAGTTGAGGAGAGTTCCGCGGAAGCACAAGTGTGACAGCTGCGGGAAGACGTTTCGATCTTCACGCGCATTGGGCAGTACAGAAAGCATTTG : 647
5 : --GAGATCAACTTCAGGAAGGTTCTGTTGGGAGCACCAGTGTGAAACTGTGGGAAGAAGTTTCGATCTTCAGGCAITGGGAGTACAAAAGCATTTG : 709

1 : CGAAGGTTCCGGT-----AACGATAGTAAATCTTCCAATGCCCTTTTGTTCGAAGGTGTTGGGTCTGGTCAAGCACTTGGTGGCCACAAGAGA
   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
   | 810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
2 : CGAAGGTTCCGGT-----AACGATAGTAAATCTTCCAATGCCCTTTTGTTCGAAGGTGTTGGGTCTGGTCAAGCACTTGGTGGCCACAAGAGA : 753
3 : CGAAGGTTCCGGT-----AACGATAGTAAATCTTCCAATGCCCTTTTGTTCGAAGGTGTTGGGTCTGGTCAAGCACTTGGTGGCCACAAGAGA : 768
4 : CGAAGGTTCCAGT-----AACGATAGTAAACCTTCCAATGCCCTTTTGTTCGAAGGTGTTGGGTCTGGTCAAGCACTCGGTGGCCACAAGAGA : 738
5 : TGTGATGATGATGAAGAAGTGAAGTGAATAAAATCTTCCAATGCCCTTTTGTGGAAGGTTTGGGTCTGGTCAAGCACTTGGTGGCCACAAGAGA : 809

```

```

1 : TCTCACCTCATGCCTTCTTCTTCAACCGCTAATAATGATTCTGTTAGATTGAAAGAGAGCTTCATAGATCTCAACTTGCCAGCT---CCGCCGAAG
   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
   | 910      | 920      | 930      | 940      | 950      | 960      | 970      | 980      | 990      | 1000
2 : TCTCACCTCATGCCTTCTTCTTCCACAACCGCTAATAATGATTCTGTTAGATTGAAAGAGAGCTTCATAGATCTCAACTTGCCAGCT---CCGCCGAAG : 850
3 : TCTCACCTCATGCCTTCTTCTTCCACAACCGCTAATAATGATTCTGTTAGATTGAAAGAGAGCTTCATAGATCTCAACTTGCCAGCT---CCGCCGAAG : 865
4 : TCTCACCTCATGCCTTCTTCTTCCACAACCGCTAATAATGATTCTTITAGATTGAAAGAGAGCTTCATAGATCTCAACTTGCCAGCT---CCGCCGAAG : 835
5 : TCTCACCTTACCGCTTTCATCTTCAACTGCTAG-----TGGGTTCAAACAGACCTTCTTCGATCTCAACTTGCCAGCTTACCAGAAGAAG : 897

1 : ATGACGACCTTAGTGTTGTTTCTGATGCCTGATAATT-----AXTXXTXXTXIXTXCXXCAAIT
   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
   | 1010     | 1020     | 1030     | 1040     | 1050     | 1060     | 1070     | 1080     | 1090     | 1100
2 : ATGACGACCTTAGTGTTGTTTCTGATGCCTGATAA----- : 885
3 : ATGACGACCTTAGTGTTGTTTCTGATGCCTGATAAATT-----ACTTGTCTTCTCTGCAGCAAIT : 925
4 : ATGACGACCTTAGTGTTGTTTCTGATGCTT----- : 865
5 : ATGATGACCTCAGTGTTGTTTCTGATGCCTGATGATTGGCTTCATTCAITTAGCTTCATTGATCTGGTTAATGATGATTAITAGTTGTTTCTTCAAIT : 997

```

图 3 GmZAT9-like 基因序列比对结果

注: 1: Majority; 2: zfpl.seq; 3: XM_003517371.1.seq; 4: XM_003538690.1.seq; 5: BT141069.1.seq

Figure 3 The BLASTn results of GmZAT9-like gene sequence

Note: 1: Majority; 2: zfpl.seq; 3: XM_003517371.1.seq; 4: XM_003538690.1.seq; 5: BT141069.1.seq

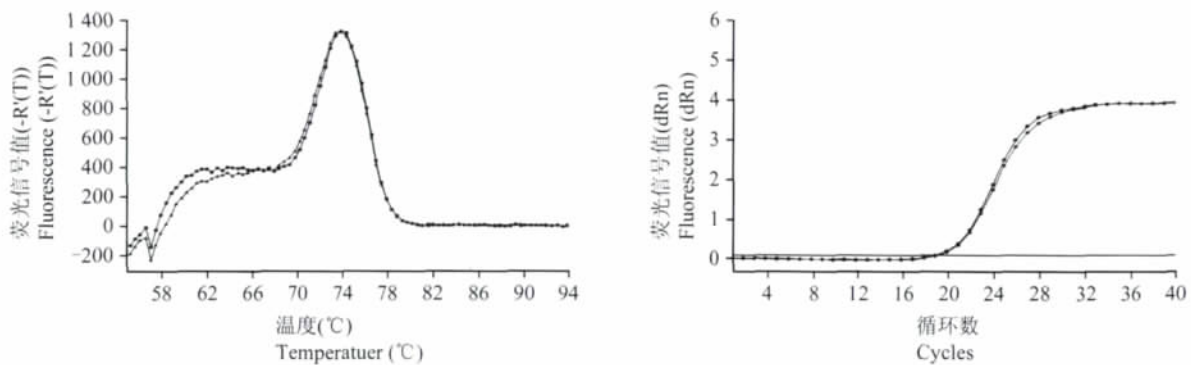


图 4 实时荧光定量 PCR 检测 Histone 3 基因的融解曲线及扩增曲线

Figure 4 The melting and amplification curves of Histone 3 gene were detected by real time PCR

相比,改良热硼酸法能够在保证产量及质量的同时,提高效率 and 降低成本,并能够满足 RT-PCR、基因克隆及 Real time RT-PCR 等分子生物学实验的要求。这种提取方法及应用为大豆基因工程研究奠定了技术基础。

3 材料和方法

3.1 材料及试剂

实验材料为栽培大豆品种‘晋大 74’(产地:山西),由山西农业大学农学院李贵全老师惠赠。2012 年 5 月种植于山西农业大学农作站试验田。大豆盛花期时,取顶端幼嫩叶片和花器官,经液氮速冻后置于 -70°C 的超低温冰箱中保存备用。所有无 RNase 试剂均购置于北京天恩泽公司。离心管等用品使用 0.1% DEPC 水处理并高温灭菌。

3.2 大豆叶片总 RNA 提取方法

3.2.1 试剂盒法提取植物总 RNA

采用康为世纪公司生产的植物 RNA 提取试剂

盒(Cat. No.: CW0559),具体详细操作步骤请参见该产品说明书。

3.2.2 改良 CTAB 法提取植物总 RNA

提取液的成分:2% CTAB(W/V),4 PVP(W/V),100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),25 mmol/L EDTA (pH 8.0),2 mol/L NaCl 混匀灭菌 120°C,15 min (胡根海和喻树迅,2007)。

(1)称取 100 mg 的叶片组织,迅速放入液氮研磨呈粉末状,转入 2 mL 离心管内,加入预热 65°C 的提取液 700 μ L 和 300 μ L 的 β -巯基乙醇,65°C 温浴并震荡 20 min。

(2)加入等体积的氯仿:异丙醇(24:1)混匀,4°C,10 000 r/min 离心 10 min。

(3)吸上清装入新的离心管里,加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 混匀后,4°C 冰箱过夜沉淀。

(4)4°C,12 000 r/min 离心 10 min 倒掉上清液沉淀晾干,加入 100 μ L 无 RNA 酶水溶解。

(5)加入无 RNase 的 DNase 于 37°C 恒温培养

箱中消化 RNA 30 min。

(6)加入等体积的氯仿抽提一次 4°C ,13 000 r/min 离心 10 min。

(7)取适量上清液, -70°C 超低温冰箱保存或直接进行后续试验。

3.2.3 改良热硼酸法

提取液成分所含 200 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 25 mmol/L EDTA ,1% (W/V)SDS ,1% (W/V)脱氧胆酸钠 ,2% (W/V)PVP(MW 40 000) ,0.5% Nonidet-40 (NP-40, pH 9.0)。

(1)将 0.1 g 叶片组织放入预冷的研钵中 ,液氮研磨 ,将粉状的组织放入 DEPC 预处理过的 1.5 mL 离心管中 ,加入 1 mL 预热至 80°C 的基本提取液 ,同时加入 10 μL DTT (亚精胺, 1 mol/L)贮备液和 40 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL)贮备液。

(2)放置于 42°C 摇床中 100 r/min 温和混匀 1.5 h。将混匀后的离心管中加入 80 μL KCl (2 mol) ,冰上放置 1 h。

(3) 12 000 r/min 离心 20 min , 取 900 μL 上清液 ,尽量取上清 ,可以减少体积 ,加入 1/3 上清体积的 10 mol/L LiCl ,将离心管上下颠倒几次 ,放置于 4°C 冰箱过夜(至少 8 h)。

(4) 12 000 r/min 离心 20 min ,弃掉上清 ,沉淀用 2 mol/L LiCl (4°C 预冷)洗 2~3 次 ,直到上清液为无色。

(5)加入 400 μL 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 悬浮沉淀 ,将沉淀完全溶解 ,加入等体积的氯仿 ,混匀后 12 000 r/min 离心 10 min ,将上清液转移到另外一只新的离心管中。

(6)加入 1/10 体积的 2 mol/L KAC (pH 5.5) 颠倒混匀 ,放置于冰上 ,冷却至 0°C 。

(7) 15 000 r/min 离心 10 min ,转移 300 μL 上清液 ,注意不要吸上管底杂质。

(8)加入 750 μL 冰冷的无水乙醇 , -70°C 冷冻 1 h。15 000 r/min 离心 10 min。

(9)用 70%预冷的乙醇洗涤 RNA 沉淀 ,再加入无水乙醇洗涤 RNA 沉淀 ,12 000 r/min 离心 5 min 后 ,弃掉液体。

(10)放置于超净台中自然风干 5 min ,用无 RNA 酶水溶解 RNA 沉淀。

(11)加入无 RNase 的 DNase 于 37°C 恒温培养箱中消化 RNA 30 min。

(12)加入等体积的氯仿 ,混匀后 12 000 r/min 离心 10 min。

(13) 取适量上清液, -70°C 超低温冰箱保存或直

接进行后续试验。

3.3 大豆叶片总 RNA 完整性及纯度检测

RNA 完整性采用 1%非变性琼脂糖凝胶电泳检测(上样量为 5 μL) ,紫外凝胶成像系统观察并拍照 ; 纯度及含量则采用 e-spect 蛋白核酸分析仪检测(上样量为 1.5 μL) (肖旭峰等, 2011)。

3.4 基因克隆

以质量较好的大豆叶片和花总 RNA 为模板 ,使用 Prime Script[®] RT Master Mix (TaKaRa, Code: DRR-036S)试剂盒反转录成 cDNA 第一链。根据 NCBI 数据库中已报道的大豆 *GmZA T9-like* (GenBank 登录号: XM_003517371)基因序列设计特异引物(上游引物序列: ATGGAGCGGTACAAATGCA; 下游引物序列: AGTAATTATCAGGCATCAGAAAC) ,RT-PCR 反应体系建立 :1 μL cDNA 为模板 ,2 μL $10\times Ex Taq$ Buffer (Mg²⁺ Plus) ,1.6 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,补足纯水至总体积 20 μL 。特异目的条带经切胶回收纯化后 ,克隆到 pMD18-T 载体上 ,转化大肠杆菌 ,鉴定阳性克隆送上海生工生物公司测序。

3.5 Real-time PCR 检测内参基因表达

用 Stratagene 公司的 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪对 *Histone 3* 基因(GenBank 登录号: U38425.1)进行实时荧光定量 PCR 分析。上游引物序列 :CAGAC-TGATCTGCGTTTCCA ;下游引物序列 :GTCCTCAA-AGAGCCCAACAA。UltraSYBR Mixture 检测试剂购置于北京康为世纪生物科技有限公司(CW0956A)。反应体系包括 :10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 0.25 μL ,2 μL cDNA ,10 μL UltraSYBR Mixture (2 \times)和 7.5 μL 超纯水。反应条件为 : 95°C 10 min (1 个循环) ; 95°C 15 s ; 55°C 30 s ; 72°C 30 s (40 个循环)。

作者贡献

郭彬和侯思宇是本研究的实验设计、实验研究和论文初稿的写作执行人 ,在本文中同等贡献 ,为共同第一作者 ,路阳及黄可盛完成数据分析 ,韩渊怀负责文章摘要部分的英文编辑 ;通讯作者王玉国是项目的构思者及负责人。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由山西省青年科技研究基金(201102-

1032-3)、山西省青年科技研究基金(2011021032-1)、山西农业大学创新基金(2010028)和山西省科技攻关项目(20120311005-3)共同资助。

参考文献

- Fu C., Wang Y.Y., and Dai H.J., 2004, Analysis of RNA lation from different soybean srgas, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 23(4): 281-284 (付畅, 王豫颖, 代红杰, 2004, 大豆不同器官中的 RNA 的提取分析, *大豆科学*, 23(4): 281-284)
- Hu G.H., and Yu S.X., 2007, Extraction of high-quality Total RNA in cotton leaf with improved CTAB mthod, *Mianhua Xuebao (Cotton Science)*, 19(1): 69-70 (胡根海, 喻树迅, 2007, 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA, *棉花学报*, 19(1): 69-70)
- Li H., and Wang X.L., 1999, The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Information)*, (1): 36-39 (李宏, 王新力, 1999, 植物组织 RNA 提取的难点及对策, *生物技术通报*, (1): 36-39)
- Liu E.K., Sun H.B., Jian B., Huo P., Gao X.W., and Hou W.S., 2006, and Hou W.S., 2006, Two efficient improved methods for isolation of high quality total RNA from soybean, *Xibei Nonglin Keji Daxue Xuebao (Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition))*, 34(12): 83-86 (刘易科, 孙洪波, 简波, 胡珀, 高小伟, 侯文胜, 2006, 2 种大豆总 RNA 提取方法的改良, *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 34(12): 83-86)
- Louime C., Vasanthaiah H.K.N., Jittayasothorn Y., Lu J., and Basha S.M., Thipyapong P., and Boonkerd N., 2008, A simple and efficient protocol for high quality RNA extraction and cloning of chalcone synthase partial cds from muscadine grape cultivars (*Vitis Rotundifolia Michx.*), *European Journal of Scientific Research*, 22(2): 232-240
- Ren J., Xu X.H., Zhang S.L., and Leng P., 2011, A method for effective isolation of total RNA from different plant tissues, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 26(S): 35-38 (任杰, 徐秀红, 张素丽, 冷平, 2011, 一种高效提取植物不同组织 RNA 的方法, *华北农学报*, 26(S): 35-38)
- Schneiderbauer A., Sandermann H., and Ernst D., 1991, Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds, *Anal. Biochem.*, 197(1): 91-95
- Xia H.W., Lv L.X., and Cheng G.X., 2006, New method for total RNA extraction in legume of *Bauhinia Variegata*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(1): 147-149 (夏海武, 吕柳新, 陈桂信, 2006, 羊蹄甲果荚中总 RNA 提取的新方法, *分子植物育种*, 4(1): 147-149)
- Xiao X.F., Jiang W.X., Wu C.J., and Fan S.Y., 2011, Comparison of diferent methods for total RNA extraction from pueraia earhnut, *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis)*, 33(1): 147-150 (肖旭峰, 姜文轩, 吴才君, 范淑英, 2011, 野葛块根总 RNA 的不同提取方法比较研究, *江西农业大学学报*, 33(1): 147-150)
- Zhang Y., Wang P.W., Yao D., and Zhang Z., 2010, Effects of extraction RNA from soybean root under different developmental stages, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 38(17): 8908-8909, 8912 (张洋, 王丕武, 姚丹, 张卓, 2010, 不同栽培及发育期对大豆根系 RNA 提取效果的影响, *安徽农业科学*, 38(17): 8908-8909, 8912)