

技术改进

Upgraded Technology

高羊茅 RNA 提取方法的比较研究

王康¹, 李恩杰¹, 董洁², 周禾^{1*}

1 中国农业大学动物科技学院草业科学系, 北京, 100193

2 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京, 100193

✉ 通讯作者: zhouhe@cau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010 年, 第 8 卷, 第 7 篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0007

收稿日期: 2010 年 8 月 15 日

接受日期: 2010 年 9 月 14 日

发表日期: 2010 年 10 月 28 日

这是一篇开放获取的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

建议的引用格式如下:

王康等, 2010, 高羊茅 RNA 提取方法的比较研究, 分子植物育种 Vol.8 No.7 (DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0007)

摘要 高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.)是一种重要的牧草和草坪兼用型草种, 在国内外农牧业和草坪业中占据重要的地位。高质量 RNA 的提取是高羊茅分子生物学的必要前提。本实验以高羊茅叶片为材料, 采用常用的 2 种方法对其总 RNA 进行提取, 同时对前人的 RNA 提取方法进行改良, 寻求最佳的高羊茅总 RNA 提取方法。通过比较发现, Trizol 法价格昂贵不适合大量植物组织提取, 传统的异硫氰酸胍法所提取的总 RNA 有蛋白质污染且 RNA 有所降解, 改良后的异硫氰酸胍法所获得的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 可清晰的看到 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带, 且 28S rRNA 的亮度大于 18S rRNA 的亮度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值介于 1.8~2.0 之间, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值大于 2.0, 表明该方法提取的 RNA 完整性好, 纯度高。通过 cDNA-AFLP 分析方法的检测, 可得到条带清晰、多态性丰富的图谱, 说明该方法提取的总 RNA 可直接用于后续分子生物学研究中, 为进一步的高羊茅分子生物学研究打下良好基础。

关键词 高羊茅; 总 RNA 提取; 改进的异硫氰酸胍法

Comparison and improvement of high-quality RNA extraction methods from Tall fescue

Wang Kang¹, Li En-jie¹, Dong Jie², Zhou He^{1*}

1 Department of Grassland Science, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing, 100193

2 Institute of animal science, CAAS, Beijing, 100193

✉ Corresponding author, zhouhe@cau.edu.cn; ✉ Authors

This article was first published in Molecular Plant Breeding, and was distributed in Chinese under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Abstract Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), an important lawn and pasture grass in agriculture, occupy an important position in animal husbandry and lawn industry. The isolation of high quality RNA was a precondition of Molecular biology research. In this experiment, we adopt two common approaches as well as the improved isothiocyanate method for total RNA extraction by using the leaves of tall fescue as the material in order to seek the optimum total RNA extraction method of tall fescue. The results showed that, Trizol method with high reliability was the simplest approach, but it's costly. And there was protein significantly pollution and degradation of the RNA by the isothiocyanate method. By employing improved isothiocyanate method, we found that there were three bright bands in agarose gel electrophoresis, 28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA. The band of 28S rRNA was brighter than that of 18S rRNA, and the value of OD₂₆₀/OD₂₈₀ was 1.8 to 2.0. Clear bands and high polymorphisms have been got by cDNA-AFLP analysis. These results indicated that the RNA isolated by improved isothiocyanate method had a good integrity and high purity, and could be used for the later molecular researches.

Keywords Tall fescue; RNA extraction; Improved isothiocyanate method

研究背景

高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.)为禾本科

羊茅属植物, 多年生草本, 丛生型, 须根发达, 适应性广, 并具有耐寒、耐践踏、抗病性强、竞争力

强等特征, 是一种重要的牧草和草坪兼用型草种, 在国内外农牧业和草坪业中占据重要的地位(黄新等, 2008)。获取高质量的 RNA 是进行高羊茅分子生物学研究的必要前提和关键技术, 如目的基因的克隆、cDNA 文库的构建、RT-PCR 分析、印迹杂交分析等都需要高质量的 RNA(赵军胜, 2007)。尽管 RNA 的提取已经成为很成熟的技术, 但在实际研究中经常很难做到顺利获得高质量的 RNA(何庆元等, 2009)。对许多植物而言, 由于缺乏有效的高质量 RNA 提取方法, 使其分子生物学研究受到限制(Bahloul and Burkard, 1993)。由于植物体内含有多种次生代谢产物以及蛋白质和多糖等大分子物质, 影响 RNA 的提取效率, 干扰之后的逆转录、酶切等试验, 此外不同植物的代谢产物差异非常显著, 加之植物组织本身的特异性, 所以很难有一种方法适合于所有植物总 RNA 的提取(Ainsworth, 1994)。

目前, 国内关于植物组织总 RNA 提取方法的报道很多, 绝大多数常规的植物组织总 RNA 提取方法均存在有比较费时的缺点(李聪等, 2008)。由于 RNA 易降解, 所以在操作过程中时间越短, 降解的可能性才会越小。Trizol 试剂盒是一个省时的方法, 但价钱较为昂贵。异硫氰酸胍法是利用异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇、十二烷基肌氨酸钠等使 RNase 变性, 并使 RNA 在酸性条件下游离进入水相, 而变性的 RNase 和其他的蛋白连同基因组 DNA 进入有机相。经反复的酚氯仿抽提后的水相用异丙醇沉淀可得高质量的 RNA。其优点在于步骤简单, 省时快速, 能同时处理多个样品(Gasic et al., 2004)。我们

通过对常用的异硫氰酸胍法进行改进, 旨在建立一种简单快速并适于高羊茅总 RNA 的提取方法, 为进行后续分子生物学研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 不同方法提取高羊茅总 RNA 完整性检测

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示 Trizol 法能够从成熟的高羊茅叶片中提取出总 RNA, 28S rRNA 与 18S rRNA 条带亮度接近于 2: 1, 说明 RNA 未被降解(见图 1A)。Trizol 法虽然有快速高效的特点, 但其价格昂贵, 不适用于大量植物组织提取。

异硫氰酸胍法提取高羊茅总 RNA 的电泳检测显示(图 1B): 28S rRNA 与 18S rRNA 条带均有拖尾现象, 5S rRNA 条带较亮, 说明总 RNA 有部分降解, 且存在 DNA 污染。同时点样孔有亮带, 说明蛋白质污染严重。

实验对异硫氰酸胍法进行改进后, 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示(图 1C), 点样孔中没有亮带, 证明没有蛋白质的污染, 图中 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带非常清晰, 并且这两条带的亮度接近 2: 1, 同时 5S rRNA 条带很弱, 证明总 RNA 中没有 DNA 污染, 且纯度高、完整性好, 没有明显的降解。

1.2 不同方法提取高羊茅总 RNA 纯度及浓度检测

吸光度比值大小直接反映多糖、多酚和蛋白质的污染程度。由表 1 可知, 采用改良后的异硫氰酸胍法和 Trizol 法提取的总 RNA 其 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 表明 RNA 完整性很好, 可以用于

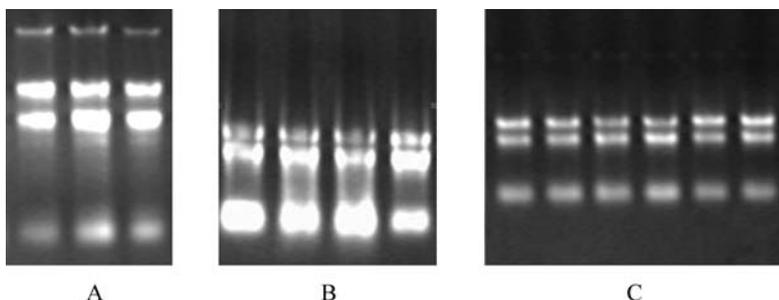


图 1 不同方法提取高羊茅叶片总 RNA 的检测结果

注: A: Trizol 法; B: 异硫氰酸胍法; C: 改良的异硫氰酸胍法

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA by different methods

Note: A: Trizol method, B: Isothiocyanate method, C: Improved isothiocyanate method

表 1 高羊茅总 RNA 纯度及浓度分析

Table 1 The quality of RNA sample by different extraction methods

方法 Methods	RNA 产率($\mu\text{g/g}$) RNA yield ($\mu\text{g/g}$)	吸光值 Absorbance	
		$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$
异硫氰酸胍法 Isothiocyanate method	98.10	2.291	1.706
Trizol 法 Trizol method	118.60	1.831	2.198
改良的异硫氰酸胍法 Improved isothiocyanate method	224.40	1.871	2.118

进一步的分子生物学研究, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值在 2.0~2.5 之间, 表明这两种方法得到的 RNA 纯度高; 异硫氰酸胍法提取的 RNA 样品 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值较小, 说明有蛋白或苯酚存在, 其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值小于 2.0, 表明其中有大量的小分子或盐存在, 所得的 RNA 有待进一步纯化。

1.3 高羊茅总 RNA 的 cDNA-AFLP 分析

cDNA-AFLP 实验最为关键的步骤是获得高质量的 cDNA 模板并对其进行充分彻底酶切, 而提取高质量的总 RNA 是合成高质量 cDNA 模板的前提。为了进一步验证改良的异硫氰酸胍法所提的总 RNA 质量, 通过合成 cDNA 双链然后进行 cDNA-AFLP 分析, 结果表明异硫氰酸胍法经过改良后所提取的总 RNA 质量高、无污染, 经反转录、酶切后可获得清晰的 AFLP 图谱(见图 2), 完全可用于后续的 cDNA-AFLP 分析。

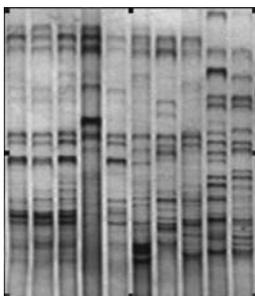


图 2 改良的异硫氰酸胍法提取高羊茅叶片总 RNA 的 cDNA-AFLP 分析

Figure 2 cDNA-AFLP analysis of total RNA by modified AGPC protocol

2 讨论

高质量的 RNA 是进行基因克隆、基因表达研究等的前提。目前常见的提取方法有异硫氢酸胍法、CTAB 法、热硼酸法、苯酚法、阴离子去污剂法、LiCl-尿素法、TRIZOL 试剂快速提取法、Gomez 法、CsCl 超离提取法等多种, 但由于植物种类的不同以及同一植物的不同部位都有其各自的生理结构特点, 且所含的内源物质存在差异, 因此需要根据各种方法自身的特点, 对其进行筛选和改进, 才能获得适合于不同植物 RNA 提取的最佳方法(印华等, 2009)。此外, 由于 RNA 极易被微量的 RNase 所降解, 同时植物组织中含有大量的次级代谢产物, 对总 RNA 的提取干扰很大, 这样使得植物组织总 RNA 的提取相对较难(李晓颖等, 2010; Lewinsohn et al., 1994)。Trizol 法因其操作简单快捷的优点, 是目前提取 RNA 常用的首选方法之一, 实验表明 Trizol 法最简单, 也最省时间, 仅需要 2 h 左右, 并且获得的高羊茅总 RNA 完整性和纯度都较好。但是其费用相对较高, 不适合大量植物组织 RNA 的提取。异硫氰酸胍法是目前实验室提取植物总 RNA 常用的方法之一, 其主要是利用异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠与巯基乙醇共同作用使蛋白质变性, 从而抑制 RNase 活性, 同时在酸性条件下 DNA 可与蛋白质一起变性被离心下来, RNA 则被分离, 溶于上清液中。其成本较为低廉, 时间上需要 3~4 h, 但是所获得的高羊茅总 RNA 的质量较差, RNA 有一定的降解, 且有蛋白质污染。RNA 的降解可能是由于研磨时间较长, RNase 活性未被抑制,

导致内源 RNase 释放降解 RNA。此外由于植物材料研磨不充分,造成多糖及蛋白质沉淀不完全,影响总 RNA 的纯度(贾永红等,2008;赵锦等,2009)。

实验通过对异硫氰酸胍法进行一些细节的改良,在研磨后先加入变性液与巯基乙醇,通过进一步研磨然后再进行分装,由于液氮的冰冻作用,可以减少巯基乙醇的挥发。在液氮冻融过程中,变性液与巯基乙醇可以更好的发挥对 RNase 活性的抑制作用,继续研磨更有利于其与植物细胞的混匀,提高 RNA 的提取效率。此外加大巯基乙醇的量,可以在短时间内更好的抑制 RNA 酶的活性,减少其对 RNA 的降解,从而得到了高质量的总 RNA。特别是在大量提取总 RNA 时,改良的异硫氰酸胍法更能突显它的优势,缩短实验时间,减少 RNase 污染机会。利用该体系获得的高羊茅 RNA,不但纯度高、完整性好,完全可以满足进一步分子生物学实验的要求,为高羊茅分子标记辅助育种、基因定位与克隆、高密度基因图谱的绘制和基因功能的研究奠定了一定基础,同时也可作为其他禾本科草坪草总 RNA 的提取提供借鉴和参考。

3 材料与方 法

3.1 材料

以田间栽培的高羊茅为材料,采集幼嫩叶片,经液氮处理后,迅速放置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

3.2 无 RNase 环境的创建

RNA 提取必须创造无 RNase 的环境,所有离心枪头都要用 0.1%~0.2%的 DEPC 溶液处理,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 12h 以上,然后高压灭菌,灭活 DEPC;研钵、研棒、药匙、玻璃器皿等需在 160 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 8 h 以上;溶液都需用经 DEPC 处理过的水配制;电泳槽、胶板及梳子等也用 DEPC 处理过夜或是用洗涤灵清洗干净后用 0.5%的 SDS(Sodium dodecyl sulfate,抑制 RNase 的活性)浸泡过夜,然后用 ddH₂O 冲洗干净晾干备用(尹慧等,2008;Malnoy et al.,2001)。

利用细叶桉(P₂) DNA 进行 EST-SSR 引物的 PCR 条件优化,主要针对 PCR 体系的 Mg²⁺浓度和 PCR 程序的退火温度。PCR 优化后,选择 PCR 产

物长度不同的 32 个 EST-SSR 进行测序实验,引物序列和 PCR 产物大小见表 1。PCR 体系和 PCR 程序参考张晓红等(2009),退火温度均为 56 $^{\circ}\text{C}$,但 10 \times Buffer 中 Mg²⁺浓度改为 15 或 20 mmol/L。

3.3 RNA 的提取

异硫氰酸胍法:参照 Chomczynski and Sacchi (1987)和 Chao 等(2009)的方法进行总 RNA 的提取。

Trizol法:Trizol试剂购于上海生工生物工程有 限公司,参照试剂盒说明书进行总 RNA 的提取。

改良的异硫氰酸胍法:在传统方法中,植物材料经过研磨分装后再加入变性液与 β -巯基乙醇,现在改为研磨后,先加入变性液与 β -巯基乙醇,待完全融化,研磨均匀后再进行分装;同时加大 β -巯基乙醇的用量,由原来的 3.0 μL 变为 5.0 μL 。

3.4 总 RNA 检测及纯度分析

1%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,用 BioRad 凝胶成像系统拍照记录。

取 5 μL 总 RNA 溶液,加 0.1%DEPC 水至 500 μL ,在紫外分光光度计上扫描,测定 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长下的光密度值(D),并用 D₂₆₀/D₂₈₀ 及 D₂₆₀/D₂₃₀ 的比值计算纯度。

RNA产率($\mu\text{g/g}$)= $\text{OD}_{260} \times \text{N}$ (样品稀释倍数) $\times 40$ ($\mu\text{g/mL}$) $\times \text{V}$ (体积)/样品重(g)(赵锦等,2009)

3.5 cDNA-AFLP 分析

取 2 μg 所提取的高羊茅总 RNA,采用 TaKaRa 公司的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成双链 cDNA,纯化后稀释 20~50 倍,之后用 EcoR I 和 Mse I 酶切,然后进行人工接头连接作为预扩增的模板。预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增,扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染检测(王天奎等,2009)。

作者贡献

王康、李恩杰是本研究的实验设计和实验研究的执行人;王康、李恩杰完成数据分析,论文初稿的写作;董洁参与实验设计,试验结果分析;周禾是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究得到国家重点基础研究发展计划(973项目)课题(2007CB108902)资助。

参考文献

- Ainsworth C., 1994, Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel), *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3):198-203
- Bahloul M., and Burkard G., 1993, An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues, *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(3): 212-215
- Chao Y.H., Kang J.M., Sun Y., Yang Q.C., Wang P.Q., Wu M.S., Li Y., Long R.C., and Qin Z.H., 2009, Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding zinc finger protein from *Medicago sativa* L., *Mol. Biol. Rep.*, 36(8): 2315-2321
- Chomczynski P., and Sacchi N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162(1): 156-159
- Gasic K., Hernandez A., and Korban S.S., 2004, RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4): 437-438
- He Q.Y., Wu P., Li Z.P., Zhang X.H., and Hu Q., 2009, Comparative study on of extraction methods of total RNA from *Medicago sativa*, *Zhongguo Caodi Xuebao (Chinese Journal of Grassland)*, 31(1): 116-120 (何庆元, 吴萍, 李正鹏, 张晓红, 胡琴, 2009, 苜蓿总 RNA 提取方法比较研究, *中国草地学报*, 31(1): 116-120)
- Huang X., Ye H.X., Shu X.L. and Wu D.X., 2008, Application of biotechnology in genetics and breeding of tall fescue, *Henong xuebao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences)*, 22(6): 806-810 (黄新, 叶红霞, 舒小丽, 吴殿星, 2008, 生物技术在高羊茅育种研究中的应用, *核农学报*, 22(6): 806-810)
- Jia Y.H., Sun Y.X., and Ma X.L., 2008, Optimization method of total RNA extraction from *Lotus japonicus*, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 36(24): 10351-10353 (贾永红, 孙艳香, 马小磊, 2008, 百脉根总 RNA 提取方法的优化, *安徽农业科学*, 36(24): 10351-10353)
- Lewinsohn E., Steele C.L., and Croteau R., 1994, Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms, *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1): 20-25
- Li C., Zeng H.M. and Han L.B., Comparative analyzing of every total RNA extract method in turfgrass, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, supp.: 219-223 (李聪, 曾会明, 韩烈保, 2008, 草坪草总 RNA 几种提取方法的比较, *生物技术通报*, 增刊: 219-223)
- Li X.Y., Cao X., Fang J.G., and Zhang Z., 2010, Study on methods for RNA extraction from apricot leaf and fruit, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 26(2): 152-156 (李晓颖, 曹雪, 房经贵, 章镇, 2010, 杏叶片与果实总 RNA 提取方法研究, *中国农学通报*, 26(2): 152-156)
- Malnoy M., Reynoird J.P., Mourgues F., Chevreau E., and Simoneau P., 2001, A method for isolating total RNA from pear leaves, *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(1): 69
- Wang T.K., Shang Z.Z., Zou Z.R., Wang X.X., and Du Y.C., 2009, One modified method for isolating total RNA from tomato fruits for cDNA-AFLP analysis, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica)*, 18(5): 290-293 (王天奎, 尚增振, 邹志荣, 王孝宣, 杜永臣, 2009, 一种从番茄果实中提取总 RNA 用于 cDNA-AFLP 分析的方法, *西北农业学报*, 18(5): 290-293)
- Yin H., Chen L., Li X.Y., Chen Q.M. and Yi M.F., 2008, Analysis and improvement of high-quality RNA extraction in leaves of lily, *Zhongguo Nongye Daxue Xuebao (Journal of China Agricultural University)*, 13(4): 41-45 (尹慧, 陈莉, 李晓艳, 陈秋明, 义鸣放, 2008, 百合叶片总 RNA 提取方法比较及优化, *中国农业大学学报*, 13(4): 41-45)
- Yin H., Zhou Z.D., and Wu Z.X., 2009, Comparison of two methods for extracting RNA from Litchi, *Redai Nongye Gongcheng (Tropical Agricultural Engineering)*, 32(2): 1-3 (印华, 周兆德, 吴志祥, 2009, 2 种荔枝 RNA 提取方法的比较, *热带农业工程*, 32(2): 1-3)
- Zhao J., Liu Z.C., Dai L., and Liu M.J., 2009, Isolation of total RNA for different organs and tissues of *Ziziphus jujube* Mill., *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 10(1): 111-117 (赵锦, 刘中成, 代丽, 刘孟军, 2009, 枣不同器官和组织 RNA 提取方法的研究, *植物遗传资源学报*, 10(1): 111-117)
- Zhao J.S., 2007, Salt-tolerance breeding of tall fescue via gene engineering as well as cloning, expressing and functional analysis of stress relative genes of NHX/TaPOD/TaPOX in salt-tolerance plants, Dissertation for Ph.D., Shandong University, Supervisor: Xia G.M., pp.10 (赵军胜, 2007, 高羊茅耐盐基因工程育种及耐盐植物胁迫相关基因 NHX/TaPOD/TaPOX 的克隆、表达及功能分析, 博士学位论文, 山东大学, 导师: 夏光敏, pp.10)