

技术主题

Upgraded Feature

盐胁迫处理的杨树 RNA 提取方法研究

周祥明[✉], 宋建[✉], 王姝[✉], 郝志愚[✉]

天津市农业生物技术研究中心, 天津, 300384

✉ 通讯作者: mittonzhou@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 30 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0030

收稿日期: 2012 年 04 月 24 日

接受日期: 2012 年 05 月 04 日

发表日期: 2012 年 06 月 18 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周祥明等, 2012, 盐胁迫处理的杨树 RNA 提取方法研究, 分子植物育种(online) Vol.10 No.30 pp.1214-1217 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0030)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Study on the Extraction Methods of Total RNA from Salt Stressed Poplar, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.30 pp.1214-1217(doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0030)

摘要 本研究以盐胁迫下的 107 杨叶片和根为材料, 利用紫外分光光度计和凝胶电泳比较改良 SDS 法、柱式植物 RNAout 和 RNaplant plus Reagent 试剂盒提取总 RNA 的质量。结果表明: 不同提取方法对实验结果影响很大, 其中改良 SDS 法提取的 RNA 质量和产率均较理想, 叶和根总 RNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值分别为 2.06 和 1.83, OD_{260nm}/OD_{230nm} 比值均大于 2.0; 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 无降解; 产率分别为 81.9 $\mu\text{g/g}$ 和 30.3 $\mu\text{g/g}$ 。RT-PCR 可特异扩增出目标片段, 说明改良 SDS 法提取的总 RNA 可直接用于后续分子生物学试验。

关键词 盐胁迫; RNA 提取; 杨树; RT-PCR

Study on the Extraction Methods of Total RNA from Salt Stressed Poplar

Zhou Xiangming[✉], Song Jian[✉], Wang Shu[✉], Hao Zhiyu[✉]

Tianjin Research Center for Agricultural Biotechnology, Tianjin, 300384

✉ Corresponding author, mittonzhou@163.com; ✉ Authors

Abstract Modified SDS method, Column Plant RNAout and RNaplant plus Reagent kits were compared in extracting total RNA from salt stressed poplar 107 with gel electrophoresis and UV-Spectrometer. The results showed that different RNA extraction methods greatly affected the experimental results. Desirable yield and quality RNA can be isolated with modified SDS method, and the OD_{260}/OD_{280} ratios of the RNA from leaf and root are 2.06 and 1.83 respectively. Moreover, the OD_{260nm}/OD_{230nm} ratios of both are above 2.0. The bands of 28S rRNA and 18S rRNA are clear and did not degrade, and the yields of RNA from leaf and root are 81.9 $\mu\text{g/g}$ FW and 30.3 $\mu\text{g/g}$ FW respectively. The specific target fragments were amplified with RT-PCR method. This demonstrates that RNA isolated by this method could be used for further study on related molecular biological experiments.

Keywords Salt stress; RNA extraction; Poplar; RT-PCR

研究背景

高质量的 RNA 提取成功与否是进行分子生物学研究的前提和基础。目前, 许多分子生物学研究, 如基因表达分析、基因克隆、cDNA 文库构建及转录组测序等都需要高质量的 RNA。杨树具有基因组小、遗传多样性丰富、遗传转化系统简单且无性繁殖容易等优点, 已成为林木基因组研究的模式植物(程强等, 2009)。杨树在盐胁迫条件下产生大量的多糖及次生代谢物, 严重影响了 RNA 提取的质量和得率。目前已报道多种成功提取植物 RNA 的方法(林清芳等, 2011; 张倩茜等, 2011; 余发新等, 2010; 赵百慧等, 2010; 林莎等, 2008), 但由于不同植物及

相同植物的不同生理时期的物质组成千差万别, 因此, RNA 提取方法也不尽相同。本研究以盐胁迫处理后的杨树叶片和根为材料, 通过对天泽植物 RNAout 试剂盒、天根 RNaplant plus Reagent 试剂盒和改良的 SDS 法提取总 RNA, 通过 RNA 纯度、凝胶电泳及反转录分析等途径确定适于盐胁迫后的杨树总 RNA 提取方法, 为后续的基因表达研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 3 种提取 RNA 方法的比较

采用凝胶电泳手段对所获得的植物总 RNA 进

行分析是判断 RNA 质量的一种重要方法, 通过对 18S 和 28S 条带的完整性可判断 RNA 有无降解及降解程度(王英等, 2009)。从 RNA 琼脂糖凝胶电泳图可见, 利用天根的 RNAplant plus Reagent 试剂盒未能提取盐胁迫处理后的 107 杨叶片组织总 RNA (图 1A), 提取根组织的 RNA 也已大部分降解(图 1B); 采用天泽柱式植物 RNAout 在叶和根组织中都提取获得了总 RNA, 但 RNA 浓度较低, 需提取大量组织材料方可用于后续实验; 改良的 SDS 方法提取效率和质量最佳, 28S 与 18S 条带亮度约为 1.5:1。这 3 种提取 RNA 方法都存在 DNA 污染, 因此, 后续实验中需 DNA 酶进行处理解决。

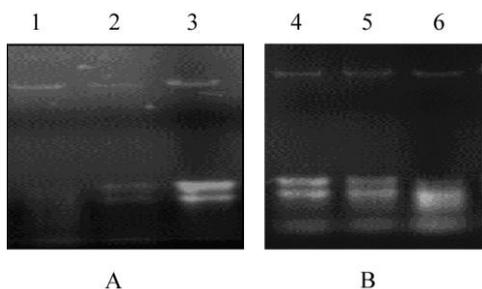


图 1 不同方法提取 107 杨叶片和根总 RNA 电泳图谱
注: 1, 6: RNAplant plus Reagent 提取叶和根总 RNA; 2, 5: 柱式植物 RNAout; 3, 4: 改良 SDS 法分别提取叶和根总 RNA
Figure 1 Agarose electrophoresis of total RNA extracted from leaf and root of poplar 107 by using different methods
Note: 1, 6: Total RNA extracted from leaf and root of poplar 107 by using modified RNAplant plus Reagent method; 2, 5: Total RNA extracted from the same above by using column RNAout method; 3, 4: Total RNA extracted from the same above by using modified SDS method

1.2 RNA 纯度和浓度

RNA 溶液在 230 nm、260 nm、280 nm 的光密度分别代表杂质(多肽, 酚, 糖等)和蛋白等有机物的吸收值。纯 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.1 之间, 小于 1.8 表明蛋白或其他有机物污染, 大于 2.1 表明 RNA 已经降解; OD_{260}/OD_{230} 值 < 2.0 , 表明溶液中有残存的盐和小分子杂质, 如核苷酸、氨基酸、酚等。利用 NanoDrop ND-1000 微量紫外可见分光光度计测量 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 比值(表 1), 采用改良 SDS 法和柱式植物 RNAout 试剂盒得到的 OD_{260}/OD_{280} 和比值为 1.8~2.1, 符合标准的比值, 纯度较高。

1.3 RNA 样品的 cDNA 合成及质量检测

利用 3 种方法提取的 RNA 作为模板进行反转

录, 将合成的 cDNA 进行 PCR 扩增, 以检测 RNA 的质量。RT-PCR 电泳结果如图 2 所示, 改良 SDS 法所提取的 RNA 经反转录后, 可扩增出目的条带; 柱式 RNAout 法提取根 RNA 可扩增出目的条带, 但条带微弱; RNAplant plus Reagent 法所提取的 RNA 未能扩增出条带, 与其所提的 RNA 质量有关。

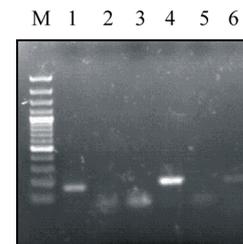


图 2 杨树 UBQ 基因的 RT-PCR 产物
注: 1~3: 分别为改良 SDS 法, 天根 RNAplant plus Reagent 试剂盒和天泽柱式植物 RNAout 提取叶片总 RNA 的反转录产物; 4~6: 分别为改良 SDS 法, 天根 RNAplant plus Reagent 试剂盒和天泽柱式植物 RNAout 提取根总 RNA 的反转录产物

Figure 2 RT-PCR products of poplar UBQ gene
Note: 1~3: RT-PCR products of total RNA from leaf isolated with modified SDS method, RNAplant plus Reagent and column RNAout; 4~6: RT-PCR products of total RNA from root isolated with modified SDS method, RNAplant plus Reagent and column RNAout

2 讨论

目前, 对于木本植物不同种、不同部位 RNA 的提取, 研究人员已总结出不同的方法, 但在实际操作过程中, 用同一套提取方法不能保证获得同样的效果。如柱式 RNAout 法提取叶片和根中 RNA, 将所获得的 RNA 反转录后进行 PCR, 在叶中不能扩增出目的条带, 而在根中扩增出了微弱条带。

杨树受盐胁迫后, 会产生大量的次生代谢物, 当细胞裂解后就会释放出来, 并与多酚氧化酶反应成褐色, 其氧化生成多元酚类物质与 RNA 发生不可逆结合, 导致 RNA 降解、丢失、难溶解(郭丽霞等, 2007; 肖洁凝等, 2003)。在提取液中加入高浓度的 β -巯基乙醇可以防止酚类物质被氧化及其与 RNA 结合。本试验在提取缓冲液中加入 5% 的 β -巯基乙醇防止酚类物质氧化。

植物在短时间内受盐胁迫后, 会产生大量的多糖, 而多糖的存在则是 RNA 提取一大障碍, 因为多糖的结构与 RNA 相似, 去除多糖的过程中, RNA 也将同时被去除, 减少 RNA 产量; 另外, 含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水, 而且多糖可抑制酶活,

表 1 不同方法提取总 RNA 纯度检测

Table 1 Yield and purity of RNA isolated from different organ in populus with different methods

提取方法 Method	植物器官 Organ	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)
天根				
RNAlant plus Reagent 试剂盒	叶片 Leaf	1.67	1.42	139.7
RNAlant plus Reagent 天泽柱式植物 RNAout Column RNAout	叶片 Leaf	2.08	2.03	211.3
改良 SDS 法 Modified SDS method	叶片 Leaf	2.01	2.04	403.5
天根				
RNAlant plus Reagent 试剂盒	根 Root	1.26	1.18	263.4
RNAlant plus Reagent 天泽柱式植物 RNAout Column RNAout	根 Root	1.83	2.24	311.6
改良 SDS 法 Modified SDS method	根 Root	1.91	1.83	372.5

因此含有多糖的 RNA 无法用于分子生物学研究 (Fang et al., 1992)。本研究中进行了部分改良, 采用 LiCl 沉淀剂选择性沉淀 RNA 来减少多糖; 另外, 选择短时间沉淀(如 3 min)以减少非 RNA 沉淀。但是, RNA 样品中仍然存在基因组 DNA, 需进行无 RNase 的 DNase 处理, 再进行其他试验。

本试验经琼脂糖凝胶电泳和 RT-PCR 检测分析, 证明了改良 SDS 法完全适用于盐胁迫下杨树总 RNA 提取, 为后续分子生物学研究奠定了基础。

3 材料与方 法

3.1 材料

将 1 年生 107 杨截成长约 15 cm 的茎段, 置于盛有蒸馏水的塑料容器中, 不定期更换蒸馏水, 以防茎段分泌出的粘液影响生根。待根长至 5 cm 左右时, 将茎段转移至含有 0.6% NaCl 的 Hoagland 营养液中胁迫 6 h, 用去离子水冲洗根部, 然后用滤纸吸干根表面水分, 迅速剪取叶片和根, 用液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱保存。

柱式植物 RNAout 购自天泽公司, RNAlant plus Reagent 试剂盒购自天根公司, 改良 SDS 法药品均为自己配制, 反转录试剂盒购自 Promega 公司, 引物由北京鼎国公司合成。所需试剂(除含 Tris 试剂外)用 0.1% DEPC 于 37℃ 烘箱处理 24 h 后进行高压灭菌。所需的研钵等玻璃制品于 180℃ 干热处理 12 h, 以避免 RNA 酶污染。无 DNase 和 RNase 移液器枪

头和 Eppendorf 管购自 Axygen 公司。

改良 SDS 提取液: 100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 2.0% SDS, 100 mmol/L DTT, 5% 2-β 巯基乙醇, pH=7.5 (其中巯基乙醇在使用前加入提取液中至终浓度 5%)。

3.2 总 RNA 提取方法

3.2.1 柱式植物 RNAout 方法

称 100 mg 的叶片和根, 经液氮研磨后, 按试剂盒操作步骤说明进行 RNA 提取。

3.2.2 RNAlant plus Reagent 试剂盒方法

称取 100 mg 的叶片和根, 经液氮研磨后, 按试剂盒操作步骤说明的方法提取。

3.2.3 改良 SDS 法

取 100 mg 叶片和根置液氮冷冻研磨成粉, 迅速置入盛有 350 μL 水饱和酚、350 μL 氯仿和 700 μL SDS 提取液的 Eppendorf 管中, 涡旋震荡 5 min 后于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; 上清转入盛有 700 μL 氯仿的新 Eppendorf 管, 震荡混匀, 于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; 上清转入盛有 1/4 体积的 8 mol/L LiCl 溶液, 常温沉淀 5 min; 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 用 75% 乙醇洗沉淀 2 次, 最后短暂离心吸出多余液体, 置于真空浓缩仪干燥, 加入 DEPC 处理过的 H₂O 中溶解 RNA, 于 -80℃ 保存, 备用。

3.3 RNA 质量与浓度检测

取 1 μL 所提取的总 RNA, 用 ND-1000 核酸蛋白定量仪检测浓度及纯度。取 2 μL 含有 $6\times$ Loading Buffer RNA 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。

3.4 RT-PCR 检测

按照 Promega 公司 M-MLV 反转录酶操作手册进行。以杨树 *UBQ* 基因(BU879229)序列进行引物设计, 5'引物 P1: 5'-GTTGATTTTTGCTGGGAAGC-3' 和 3'引物 P2: 5'-GATCTTGGCC TTCACGTTGT-3' (北京鼎国公司合成)。扩增条件为 94°C 5 min; 94°C 20 s \rightarrow 58°C 20 s \rightarrow 72°C 20 s, 35 个循环; 72°C 2 min。取 5 μL RT-PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

作者贡献

周祥明是项目的构思者及负责人, 同时指导实验设计, 数据分析, 论文初稿的写作与修改; 宋建负责材料的水培、处理、取样、RNA 提取检测及论文修改工作; 郝志愚完成数据分析; 王姝进行试验结果分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由天津市应用基础及前沿技术研究计划(10JCYBJC09500)、国际科技合作项目(2011DFA30990)和北京林业大学林木育种国家工程实验室开放课题项目(FOP2010-13)资助; 作者感谢天津市农业科学院中心实验室王永、兰青阔在 RNA 检测方面给予的帮助, 《天津农业科学》编辑部梁凤莲在论文撰写中给予的宝贵建议。

参考文献

Cheng Q., Pan H.X., Xu L.A., Zhu G.Q., Wang M.X., and Huang M.R., 2009, The poplar genome project and progress in poplar molecular biology studies, *Nanjing Linye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition))*, 33(1): 131-135 (程强, 潘惠新, 徐立安, 诸葛强, 王明麻, 黄敏仁, 2009, 杨树基因组计划及其分子生物学研究进展, *南京林业大学学报(自然科学版)*, 33(1): 131-135)

Fang G., Hammar S., and Grumet R., 1992, A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA, *Biotechniques*, 13(1): 52-54, 56 PMID:1503775

Guo L.X., Ning D.J., Ma J., Ding M.Q., Hou P.C., and Shen X., 2007, An efficient RNA isolation method for poplar materials, *Jilin Linye Keji (Jilin Forestry Science and Technology)*, 36(2): 5-7 (郭丽霞, 宁德娟, 马群, 丁明全,

侯佩臣, 沈昕, 2007, 一种适合杨树 RNA 提取的方法, *吉林林业科技*, 36(2): 5-7)

- Lin Q.F., Wang C.F., Zhao F.F., Liu J.J., and Wang M.Y., 2011, Methods for total RNA extraction and mRNA isolation from *Ammopiptanthus mongolicus*, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 12(3): 460-463 (林清芳, 王存芳, 赵欢欢, 刘佳杰, 王茅雁, 2011, 蒙古沙冬青总 RNA 提取与 mRNA 分离方法的研究, *植物遗传资源学报*, 12(3): 460-463)
- Lin S., Luo S.Y., Lin Y., Wang Z.T., Niu B., Qin X.B., Li Y.Q., Xu Y., and Chen F., 2008, A simple method for extracting total RNAs from endosperm of *Jatropha curcas* L., *Yingyong Yu Huanjing Shringwu Xuebao (Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)*, 14(5): 692-694 (林莎, 罗绍银, 林颖, 王治涛, 牛蓓, 秦小波, 李月琴, 徐莺, 陈放, 2008, 从麻疯树胚乳中提取总 RNA 的快速方法, *应用与环境生物学报*, 14(5): 692-694)
- Wang Y., Yang Y.H., Qiu H.Y., Shang K., Wen X., and Zhuang N.S., 2009, Study on extraction methods of sugarcane total RNA, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 25(24): 68-72 (王英, 羊玉花, 邱海燕, 尚珂, 文稀, 庄南生, 2009, 甘蔗种质总 RNA 提取方法的研究, *中国农学通报*, 25(24): 68-72)
- Xiao J.N., Huang X.L., Li Y., Huang Y., and Li X.J., 2003, RNA extraction from cotyledon of mango with high levels of secondary substances and carbohydrates, *Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi (China Biotechnology)*, 23(11): 83-86 (肖洁凝, 黄学林, 黎茵, 黄霞, 李筱菊, 2003, 富含多糖和次生物质的芒果子叶总 RNA 的提取, *中国生物工程杂志*, 23(11): 83-86)
- Yu F.X., Sun X.Y., Xu L.A., Huang M.R., and Meng W.W., 2010, Comparison with methods for total RNA extracting from roots of woody plants, *Linye Keji Kaifa (China Forestry Science and Technology)*, 24(4): 90-95 (余发新, 孙小艳, 徐立安, 黄敏仁, 孟伟伟, 2010, 木本植物根系总 RNA 提取方法的比较和分析, *林业科技开发*, 24(4): 90-95)
- Zhang Q.Q., Zhang W.L., Liu F.M., Xu X.H., and Pang D.D., 2011, Extraction methods of total RNA from *Stylosanthes guianensis*, *Caoye Kexue (Acta Prataculturae Sinica)*, 28(7): 1326-1330 (张倩茜, 张伟丽, 刘凤民, 许修宏, 庞丹丹, 2011, 柱花草总 RNA 提取方法比较, *草业科学*, 28(7): 1326-1330)
- Zhao B.H., Zheng C.X., XU L.L., Zhao N., and Xu G.J., 2010, Extraction method of RNA from *Pinus tabulaeform* is carr mature embryo, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 38(6): 2812-2814 (赵百慧, 郑彩霞, 徐利利, 赵楠, 徐桂娟, 2010, 油松成熟胚总 RNA 的提取方法, *安徽农业科学*, 38(6): 2812-2814)