

甘蓝型油菜籽粒 RNA 提取方法的探讨

许本波, 谢伶俐, 严寒, 何勇, 田志宏
(长江大学生命科学学院, 荆州 434025)

摘要: 用 CTAB 法、SDS 法、上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒分别提取甘蓝型油菜花后 40 d 的籽粒 RNA。用电泳法和 A260/A280 与 A260/A230 的比值比较提取 RNA 的质量。结果发现: 用 SDS 法、上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒都没有成功提取 RNA, 只有 CTAB 法成功地提取出了完整的甘蓝型油菜籽粒 RNA。用 CTAB 法提取的总 RNA 的 A260/A230 与 A260/A280 的值分别为 2.06 和 1.94, 说明采用该方法提取的 RNA 污染小, 纯度较高, 获得的 RNA 产量也较高。通过逆转录实验和基因片段的克隆也证明获得的 RNA 质量比较高, 可以直接满足一般的分子实验。

关键词: 甘蓝型油菜; RNA 提取方法; CTAB

中图分类号: S 565.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)05-0018-03

Research on the Methods of Isolation of RNA from Oilseeds(*Brassica napus*. L)

XU Ben bo, XIE Ling li, YAN Han, HE Yong, TIAN Zhi hong
(Life Science College, Yangtze University, Jingzhou 434025)

Abstract: Based on the methods of CTAB, SDS and Plant (Leaves) Total RNA Isolation Kit, total RNA was isolated from seeds of 40 days of flower from *Brassica napus*. L. The total RNA was compared by gel electrophoresis and the ratio of A260/A280 and A260/A230. RNA only was separated successfully from the seeds by the methods of CTAB. The sharpness of 28S bands was twice than 18S of bands and the ratio of A260/A280 and A260/A230 of RNA was 1.94 and 2.06, respectively. It indicated the quality of RNA was high, reverse transcription proved the quality of RNA was fine enough for ecumenical experimentation.

Key words: *Brassica napus* L.; RNA extraction method; CTAB

植物细胞壁较厚且成分复杂, 细胞内富含色素、单宁、多酚等次生代谢产物以及蛋白质、多糖等生物大分子, 这些物质不但影响 RNA 得率, 而且干扰之后的逆转录, 酶切实验操作^[1]。甘蓝型油菜种子(特别是成熟的种子)中蛋白质等含量高, 而且 RNA 含量低^[2], 而且由于甘蓝型油菜为多倍体植物, 在进化过程中有相对于拟南芥的三倍化现象, 很多基因在甘蓝型油菜中为多基因家族, 一般有 6 个左右的成员^[3]。因此提取纯度高、代表性强、完整性好的籽粒 RNA 是进行种皮发育相关基因克隆、表达分析和功能验证的前提^[4]。由于甘蓝型油菜籽粒中富含油菜

种子属脂肪质种子, 含有大量的脂质、蛋白质、多糖、矿物质、维生素、色素、植物固醇、酶类及多酚和植酸等, 它们容易与 RNA 共沉淀, 对总 RNA 的完整性、产率和质量均有影响^[5]。虽然目前有很多种提取植物 RNA 的方法, 这些方法的主要目的在于抑制 RNA 提取过程 RNase 的活性, 清除蛋白、多糖、多酚等杂质污染。但由于成熟的甘蓝型油菜的籽粒中蛋白质含量高, RNA 含量低, 所以很难得到高质量的甘蓝型油菜籽粒 RNA。本文以甘蓝型油菜品种中油 821 开花后 40 d 以上的种子为材料, 用 SDS 法、CTAB 法和上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒

收稿日期: 2006-09-30
基金项目: 长江大学博士启动基金项
第一作者简介: 许本波(1977-), 男, 湖北安陆人, 博士, 讲师, 主要从事基因工程研究。Tel: 0716-8066812; E-mail: benboxu@yangtzedu.edu.cn.

分别提取甘蓝型油菜籽粒 RNA, 探讨适合甘蓝型油菜籽粒 RNA 提取的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为双低优质甘蓝型油菜冬性品种中油 821。田间采集花后 40 d 的种子, 立即冰冻于液氮中待用。

1.2 试剂及器材

总 RNA 抽提 Buffer: 用 0.1% DEPC (diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯) 溶液配制 2% (w/v) CTAB、2% PVP、25 mmol · L⁻¹ EDTA、2.0 mol · L⁻¹ NaCl 的溶液, 于 37℃ 过夜后灭菌, 再用 DEPC 处理过的水配制的 1 mol · L⁻¹ Tris - HCl (pH 8.0) 稀释至终体积并使 Tris - HCl 终浓度为 100 mmol · L⁻¹, 然后溶入亚精胺(spermidine)至终浓度为 0.5 g · L⁻¹, 4℃ 短期保存, -20℃ 长期保存。用前加入 β- 巯基乙醇至终浓度为 2%。

玻璃器皿 180℃ 烘 3 h, 塑料制品用 0.1% DEPC 37℃ 浸泡过夜, 高压灭菌后使用或在通风厨中用氯仿处理 0.5 h 后晾干; 枪头等塑料器材用 0.1% DEPC 37℃ 处理 12 h, 高压灭菌 2 次, 80℃ 烘干备用。

1.3 RNA 提取操作程序

1.3.1 CTAB 法 A) 在一个 10 mL DEPC 处理过的离心管中加入 5 mL CTAB 法植物总 RNA 抽提 Buffer, 并加入 100 μL β- 巯基乙醇, 混匀并预热至 65℃^[6]; B) 0.5 g 材料放入用液氮预冷的研钵中, 倒入液氮, 研成粉末; C) 迅速加入已预热的抽提液中, 迅速振荡 1 min; D) 65℃ 水浴 30 min, 每 1~2 min 猛烈混匀 1 次; E) 加入等体积氯仿, 猛烈振荡 10 min 乳化溶液, 18℃, 10 000 g 离心 10 min; F) 取上清于一个 DEPC 处理过的 10 mL 离心管中, 重复一次 E 的操作; G) 取上清于一个 DEPC 处理过的 10 mL 离心管中, 加入 1/4 体积的 LiCl (10 mol · L⁻¹), 4℃ 过夜; H) 4℃, 10 000 g 离心 15 min, 收集沉淀; I) 加入 300 μL 0.1% DEPC 水用于溶解沉淀, 然后再加入 120 μL 5 mol · L⁻¹ NaCl 和 250 μL 异丙醇, 充分混匀, 于 4℃ 下 12 000 g 离心 10 min; J) 弃上清, 500 μL DEPC 处理过的水溶解沉淀, 并转入一 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中; K) 加入等体积氯仿, 如 E 抽提 2 次; L) 加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 冷冻 2 h; M) 10 000 g, 4℃, 离心 15 min; 晾干沉淀 10 min; N) 视需要用 100~500 μL DEPC 处理过的水溶解沉淀, -70℃ 保存; O) 取 1 μL 进行 1% 的琼脂糖/L×TAE 电泳, 并作紫外检测; 同时取样稀释 50 倍用 Genespect I 测量 RNA

浓度; 结合电泳结果综合评价 RNA 的质量。

1.3.2 SDS 法 本实验参照 LI 等^[7]。

1.3.3 上海华瞬的植物叶 RNA 抽提试剂盒法参照试剂盒说明书。

2 结果与分析

2.1 RNA 样品质量检测

采用 CTAB 法, SDS 法, 上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒分别提取甘蓝型油菜花 40 d 的籽粒的 RNA。结果发现用 SDS 法, 上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒均没有成功地提取出 RNA, 只有 CTAB 法成功地提取出了完整的甘蓝型油菜籽粒 RNA。

将提取的 RNA 在 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 发现 28S 和 18S 两条带带型清楚, 且 28S rRNA 在亮度上为 18S rRNA 的二倍, 两条带之间无明显弥散现象(见图 1), 说明 RNA 在提取过程中基本没有发生降解, 结构比较完整, 基本排除了 RNase 的污染。但同时发现具有一条分子量比较大的亮带, 分析表明应该为提取过程中混杂的 DNA。

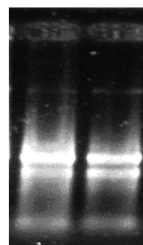


图 1 甘蓝型油菜花后 40d 的籽粒的 RNA

2.2 RNA 样品纯度

取 1 μL RNA 样品用 DEPC 水稀释到 50 μL 后, 用 Genespect I 检测 RNA 浓度, 测得 RNA 紫外光吸收值, 每个波长重复测定 3 次取平均值。用 CTAB 法提取的总 RNA 的 A260/A230 与 A260/A280 的值分别为 2.06 和 1.94, 印证了上面电泳图片中混有 DNA 现象。但同时说明采用该方法提取的 RNA 基本排除了色素、多糖、多酚和蛋白质等物质的污染, 纯度较高, 获得的 RNA 产量也较高。

2.3 RACE 逆转录和 RT-PCR 扩增结果

以 CTAB 法提取的总 RNA 的反转录产物为模板, 参照 GENE RACER 试剂盒的说明书合成引物进行逆转录实验, 结果表明所得的 cDNA 的重心在 500 bp~12 kb 之间, 符合实验要求(见图 2), 说明用 CTAB 法提取的籽粒 RNA 适合一般的实验要求。根据 Genbank 中多个物种甘油-3 磷酸转酰酶(GPAT)基因序列进行多重比对设计供保守区引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离鉴定, 回收目的 DNA 片段, 与载体 pMD-

18T 连接、转化筛选,对筛出的阳性克隆进行测序,Genbank 中 Blast,结果发现与已报道的 GPAT 序列有较高的同源性,说明已经正确分离到甘蓝型油菜 GPAT 基因片断。进一步说明该方法提取的 RNA 质量较高,可以满足在分子水平上开展的进一步研究。

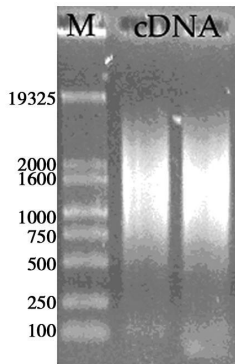


图 2 RACE 反转录得到的 cDNA

3 讨论

制备完整的、高纯度的 RNA 是合成高质量 cDNA 的前提。因此总 RNA 的提取是基因表达研究, RACE 克隆, cDNA 文库等实验顺利开展的基础。已报道的植物 RNA 提取方法众多,如异硫氰酸胍一步法、苯法、Trizol 法、SDS 法及 CTAB 法等。但不同植物,即使同一植物的不同品种,甚至同一植物的不同部位,往往因种质的差异、各器官组分和含量有很大的不同,因而对不同植物,不同器官采用不同 RNA 提取方法^[8-9]。无论使用哪种方法,都要设法抑制 RNase 的活性,尽可能减少 RNA 的降解,以提取高质量的 RNA。

实验采用 SDS 法,上海华瞬植物叶 RNA 抽提试剂盒都没有成功提取出 RNA,只有 CTAB 法成功提取出了完整的甘蓝型油菜籽粒 RNA,这可能是因为甘蓝型油菜籽粒中富含花色苷物质、大量的蛋白质、次生代谢物质和 RNA 含量比较低有关^[10]。这些物质可与 RNA 相互作用,形成不溶于水相的复杂混合物,在抽提过程中 RNA 可与这些物质共聚合而损耗,从而影响 RNA 提取的数量和质量。可见尽可能早地去除色素、蛋白质等物质的干扰是提取甘蓝型油菜籽粒总 RNA 的关键。本实验采用的 CTAB 法先用氯仿处理,然后 LiCl 4℃过夜选择性沉淀 RNA,这时色素分子、次生代谢物质基本被去除,降低了其对 RNA 的干扰,同时也去除了部分多糖、蛋白质,并且实验发现过量的 CTAB buffer 是实验能否成功的一个重要影响因素;然后利用异

丙醇在 -20℃下短时间内沉淀 RNA,成功地将多糖分子与 RNA 完全分离,最后用乙醇沉淀,去掉盐离子,最终获得的 RNA 纯度和完整性都较高。在瓜叶菊、车矢菊等花卉植物上有类似的两步法的沉淀报道。另外,为防止酚类氧化,在提取过程中加入抗氧化剂,β-巯基乙醇和聚乙烯吡咯烷酮(PVP),β-巯基乙醇是强的还原剂,它提供还原条件使得多酚类物质不易氧化,PVP 作为多酚化合物的螯合剂具有很强的结合酚的能力,有效地抑制了细胞破碎时酚类物质的氧化。

通过液氮迅速冰冻材料及氯仿,CTAB 等试剂的使用是防止细胞内外 RNase 对 RNA 降解的有效手段。氯仿的反复抽提和剧烈振荡的使用是有效去除蛋白、脂类、DNA 等杂质,保证 RNA 纯度的强有力措施,从而能够使提取的 RNA OD260/OD280 比值介于 1.9~2.0。由于种子含有较多的脂类及蛋白质,在抽提时发现操作中出现较多的白色沉淀物质(特别是发育较成熟的种子,主要是蛋白质),在 RNA 的提取过程中,它易包裹 RNA 导致 RNA 得率低,或者去蛋白不完全而导致 RNA 纯度降低。

参考文献:

[1] 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,1999,15(1):36-39.

[2] 陈德富,陈喜文,张俊.油菜种子发育过程中总 RNA 量及线粒体 nad6 基因转录水平的变化[J].中国油料作物学报,1999,21(2):14.

[3] Lagercrantz U. Comparative mapping between Arabidopsis thaliana and Brassica nigra indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements[J]. Genetics, 1998, 150: 1217-1228.

[4] 陈晖,何海福.植物组织总 RNA 提取方法的进展研究[J].甘肃农业,2006(8):226-228.

[5] 杨卫东,王敬文,张金萍.孝顺竹 RNA 提取方法研究[J].林业科学研究,2005,18(6):769-772.

[6] LI Yu Ying, WANG Zhuan Hua, ZHANG Zheng. An effective method for extracting total RNA from Fagopyrum esculentum[J]. Biotechnology, 2004, 14(3):23-24.

[7] Jaakola L, Pirttilä A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (Vaccinium myrtillus L.) fruit[J]. Mol Biotechnol, 2001, 19: 201-3.

[8] 张玉进,孟祥春,潘瑞焱等.非洲菊花瓣总 RNA 提取方法的改进[J].植物学通报,2001,18(6):722-726.

[9] 夏海武,吕柳新,陈桂信.羊蹄甲果荚中总 RNA 提取的新方法[J].分子植物育种,2006,4(1):147-149.

[10] 孟丽,周琳,张明妹,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.