

大白菜总 RNA 快速有效的提取方法

贾云鹤

(黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要:采用改良的 TE-3D 法提取大白菜根、茎、叶的 RNA, 用 phenol-TE-3D 溶液裂解细胞, 用体积比 24 : 1 的氯仿/异戊醇溶液萃取 RNA, $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂沉淀 RNA。提取的 RNA 完整、无降解, 成功地进行了反转录和 PCR 扩增试验。

关键词:大白菜; RNA 提取; 方法

中图分类号: S634.03.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)04-0001-02

植物细胞壁不仅厚实且成分复杂, 细胞内富含单宁、萜烯、色素、酚等次生代谢物以及蛋白质、多糖等生物大分子, 这些物质不但影响提取 RNA 的效率, 而且干扰其逆转录、PCR 扩增、酶切等试验操作^[1]。不同植物、不同组织或不同生理状态下的植物材料细胞与组织的成分各不相同, 因此, 必须针对不同植物组织的特点, 对 RNA 的提取方法进行优化选择^[2]。该试验采用改良的 TE-3D 法提取了大白菜根茎叶的 RNA, 并成功进行了反转录和 PCR 扩增。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料是东北农业大学育成的东白二号。

试验用的溶液均用 DEPC- H_2O 来配制。DEPC- H_2O : 浓度为 1%, 用 dd H_2O 配制, 于 37℃ 温育过夜, 灭菌 2 次。TE-3D: 用 95 mL H_2O 、48.4 g Tris、14.8 g Na_2EDTA 、20 g NonidetP-40(诺纳德 P-40)、30 g LDS(十二烷基硫酸锂盐)、20 g Sodium deoxycholate(脱氧胆酸钠, Aldrich), 加水至 200 mL, 该溶液在室温下十分稳定, 可长期保存。其它药品有饱和酚水, $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (Amresco) (湿热灭菌), $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂 (Sigma) (湿热灭菌), 2-巯基乙醇(2-Mercaptoethano), 体积比为 24 : 1 的氯仿/异戊醇。

提取 RNA 所用的枪头、离心管等用品都采用 Rnase Free 产品, 或将普通枪头、离心管用 1% DEPC- H_2O 于 37℃ 温育过夜, 晾干后灭菌。整个试验在超净工作台中进行, 严格使用无菌口罩、头套和手套。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 以 Trizol 提取大白菜 RNA 为对照, TE-3D 法提取大白菜根、茎、叶的总 RNA。

(1) 配制 phenol-TE-3D 溶液: 将 1 份 TE-3D 与 2 份饱和酚水溶液混合, 加 2-巯基乙醇(V/V, 1%), 备用。使用 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织样品。

(2) 取 400~500 mg 的叶片组织, 于研钵中用液氮研磨成细粉, 转入含 500 μL phenol-TE-3D 溶液的 2 mL 离心管中, 迅速混匀, 涡旋。融化后, 轻轻摇晃 5~10 min。

(3) 加 500 μL 氯仿/异戊醇(24 : 1), 100 μL 醋酸铵, 置于冰上轻摇混合 15 min。

(4) 4℃ 11 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液转到新的 2 mL 管中。

(5) 加入等体积的预冷氯仿/异戊醇(24 : 1), 摇匀, 4℃ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液转到 1.5 mL 离心管中。

(6) 加等体积预冷的 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂, 混匀, 于 -20℃ 沉淀 20 min。

(7) 4℃, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。

(8) 75% 乙醇清洗沉淀 2 次, 4℃, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。

(9) 超净工作台风干 RNA 沉淀, 加入 20~50 μL DEPC- H_2O 溶解, 于 -70℃ 保存备用。

(10) 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性: 用 RNA 专用槽, 凝胶浓度 1.5%, 电压 130 V。

RNA 反转录(cDNA 的合成): 采用 invitrogen super script III 反转录试剂盒。

1.2.2 RT-PCR 反应 选用大白菜看家基因(house-keeping gene)60s 核糖体蛋白基因, 根据它的 cDNA 序列设计引物, 其序列为, 上游引物: 5'-CTT CAC CGG AGA TTT CAG AGG-3'; 下游引物: 5'-AGC TCA AGA CGA GAC CAG CTT AG-3'。50 μL 体系: 10 × PCR Buffer

收稿日期: 2010-01-15

作者简介: 贾云鹤(1980-), 女, 黑龙江省伊春市人, 硕士, 研究实习员, 从事西瓜育种研究。Email: 800530jyh@163.com。

5 μL , MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 μL , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mix 1 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , Taq DNA polymerase (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 38.5 μL 。循环参数: 94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s) 30 个循环, 72℃ 10 min, 18℃ 至结束。

2 结果与分析

2.1 RNA 的质量检测

利用 TE-3D 法分别提取了大白菜根、茎、叶的 RNA, 通过紫外分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 的值, 检测 RNA 的质量, 其中 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值均在 2.0 左右, 证明 RNA 纯度较高。利用 Trizol 提取的 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右, 纯度达标。

从电泳图片可以看出, TE-3D 法提取的 RNA 拥有完整的 28S 和 18S 条带, 且 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 亮度的 2 倍, 两条主带清晰明亮, 无降解, 可以用于下一步的 RT-PCR 试验。而 Trizol 提取的 RNA 也拥有 28S 和 18S 条带, 但条带模糊, 不如 TE-3D 法提取的 RNA 清晰明亮, 有少许降解, 而且根的 RNA 量很少, 但 TE-3D 法提取的大白菜根 RNA 量充足、无降解 (见图 1)。

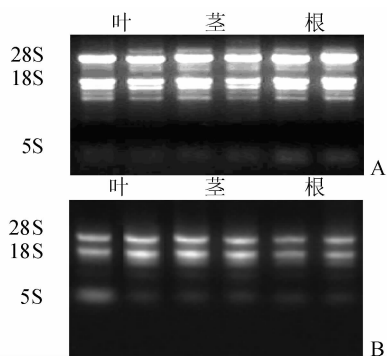


图 1 大白菜根、茎、叶的 RNA
A: TE3D 法提取; B: Trizol 法提取

2.2 大白菜 RNA 的 RT-PCR

由图 2 可以看出, 2 种方法提取 RNA 的 RT-

PCR 电泳都有条带产生, 说明 2 种方法提取的 RNA 都达到了试验标准, 都能进行反转录和 PCR 扩增反应。TE-3D 法提取的 RNA RT-PCR 电泳条带清晰明亮, Trizol 提取 RNA 的 RT-PCR 电泳条带稍暗, 说明 TE-3D 法提取出的 RNA 量更多、质量更好。

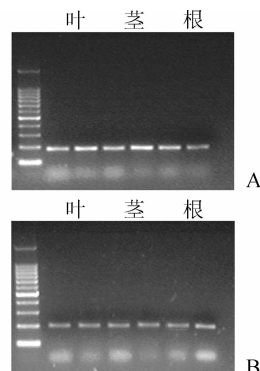


图 2 60S 核糖体蛋白基因的 RT-PCR
A: TE3D 法提取的 RNA 的 RT-PCR; B: Trizol 提取的 RNA 的 RT-PCR

3 讨论

该方法的操作步骤与常规的 TE-3D 提取法基本相同, 不同之处在于: 减少了第 2 次提取液抽提的过程, 只用一次氯仿/异戊醇萃取 RNA [第 (5) 步], 降低了 RNA 降解的机会和 RNA 的损失。在 RNA 提取的过程中, 保证 RNA 质量的前提下, 步骤越简单, 各种有害因素对核酸的破坏机会也就越少, 成功的概率就越高^[3]。该试验的成功还在于严格创造了无 RNase 的环境, 大部分操作在超净工作台上进行, 枪头、离心管严格避免 RNase 污染, 使在人员较多、环境较差的开放实验室成功地提取 RNA 成为可能, 为其它植物的 RNA 提取提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 李宏. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999(1): 38-41.
- [2] 张战凤, 张鲁刚, 王绮. 大白菜花蕾总 RNA 有效、快速提取的方法[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(1): 145-146.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.

One Rapid and Efficient Method for Isolation of Total RNA from Chinese Cabbage

JIA Yun-he

(Horticultural Branch Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: Isolate total RNA of Chinese Cabbage use improved TE-3D method. Dissociated cell with phenol-TE-3D solution, and extraction RNA with Chloroform/Iso-amyl alcohol, extraction RNA with 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl. RNA isolated with this method is integrated, no degradation, and could be used in RT-PCR.

Key words: chinese cabbage; isolation of RNA; method