

蓝莓果实总 RNA 提取方法比较

孙莹,侯智霞

(北京林业大学 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室,北京 100083)

摘要:为了在蓝莓果实中提取出高质量 RNA,比较了改良 CTAB 法、TRIzol 法、试剂盒法和 SDS 法 4 种方法。结果表明:改良 CTAB 大量法能有效地去除果实中的多糖和酚类物质,获得的总 RNA 质量较好,纯度较高。28s:18s 的亮度约为 2:1, OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0, OD_{260}/OD_{230} 的比值都大于 2.0,且得率也较高,幼果期为 $23.978 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,完熟期为 $30.817 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。完全能适用于 RT-PCR、转录组测序等分子生物学实验。

关键词:蓝莓;总 RNA;提取方法

中图分类号:S663.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)10-0114-04

蓝莓作为一种新兴的水果,栽培历史只有 100 多年,由于其具有极高的营养价值而受到人们的青睐。根据 FAO(联合国粮农组织)统计 1996~2008 年间世界蓝莓栽培面积和总产量分别增加 107.9% 和 255.3%,2002~2009 年中国蓝莓栽培面积和产量分别增加 56 倍和 485 倍^[1]。由于其日益增长的经济上的重要性,为了解决其生产中的困难以及新品种的选育,用分子生物学进行蓝莓的生理特性研究已经必不可少。而能否从植物组织中提取出纯度高、完整性好的 RNA 是进行测序、RT-PCR 等分子生物学研究的关键所在^[2]。蓝莓的果实中含有丰富的多糖多酚,这些物质易于 RNA 产生共沉淀,RNA 提取困难^[3]。因此,从对于不同时期的蓝莓果实高质量 RNA 提取方法的研究是必需的。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为高丛蓝莓蓝丰,未转色和完熟的蓝莓果实取自青岛沃林农业基地。

供试试剂为焦碳酸二乙酯(DEPC)、SDS、EDTA、Tris-HCl 为北京全新拓达公司产品,反转录酶为 Promega 产品,植物总 RNA 抽提试剂盒、水饱和酚、引物均为上海生工产品,亚精胺、 β -

巯基乙醇为 Sigema 产品,其余试剂为国产分析纯。一次性塑料耗材和各种试剂均用 1% 的 DEPC 水处理,并高压灭菌去除 DEPC。玻璃器皿于 180℃ 烘干 12 h。

CTAB 提取液(2% CTAB, 2% PVP, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 为 8, 2 mol·L⁻¹ NaCl, 3.44 mmol·L⁻¹ 亚精胺, 25 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 为 8, 用前加 2% β -巯基乙醇)。SSTE buffer(0.5% SDS, 1 mol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 为 8, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 为 8)。SDS 提取液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 为 7.5, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ EDTA, 1.5% SDS, pH 为 8, 2% PVP, 用前加 0.7% β -巯基乙醇)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 RNA 的提取采取 4 种方法。

(1)改良 CTAB 法:50 mL 离心管中加入 10 mL CTAB 提取液,65℃ 预热。取 1 g 果实液氮研磨至粉末后加入离心管,震荡混匀,65℃ 反应 10 min。加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次,震荡混匀,4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液移至 1.5 mL 离心管中,加入 1/4 体积 10 mol·L⁻¹ LiCl, 4℃ 沉淀过夜。4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,小心倒掉上清液,75% 酒精洗至无色。加入 500 mL SSTE buffer 和等体积的氯仿:异戊醇(24:1),震荡混匀,4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清加 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 2 h。4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,小心倒掉上清液,75% 酒精清洗 2 次。吸干上清,沉淀自然干燥后,溶于适量 DEPC-ddH₂O。

收稿日期:2012-07-17

基金项目:林业公益性行业科研专项资助项目(200904014);北京林业大学森林培育科技创新平台开放基金资助项目(000-1108008)

第一作者简介:孙莹(1987-),女,山东省莱芜市人,在读硕士,从事果实发育研究。E-mail: xiaoyingzi555@163.com。

通讯作者:侯智霞(1973-),女,河北省石家庄市人,博士,副教授,从事花果发育及品质调控研究。E-mail: hzxn2004@163.com。

(2) TRIzol 法:按 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂盒说明书操作进行。

(3) 试剂盒法:按照上海生工植物总 RNA 抽提试剂盒的说明书进行操作。

(4) SDS 法:50 mL 离心管中加入 10 mL SDS 提取液,加入 1 g 液氮研磨的果实粉末,震荡混匀,室温反应 10 min。 4°C 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清加入 1/3 体积预冷的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc,混匀,冰浴 30 min。 4°C 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),震荡混匀。 4°C 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,小心移取上清至 1.5 mL 离心管中,加入 3 倍体积的无水乙醇, -80°C 放置 30 min。 4°C 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,小心倒掉上清,75% 乙醇清洗 2 次。吸干上清,沉淀自然干燥后,溶于适量 DEPC-ddH₂O。

1.2.2 RNA 纯度及完整性检测 提取的 RNA 经 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测后,用紫外凝胶成像系统观察其完整性。

取 5 μL RNA 用 DEPC-ddH₂O 稀释到 50 μL ,在紫外分光光度计中测量在 230、260 和 280 nm 处的紫外吸光值,计算 RNA 总产量:RNA 得率=RNA 浓度(即 $40\times\text{OD}_{260}\times$ 稀释倍数) \times 样品体积(mL)/样品质量(g)^[4]。

1.2.3 总 RNA 中 DNA 的去除 每 20 μL 反应体系加入总 RNA 14 μL ,RQ1 RNase-free DNase 5 μL ,10 \times Buffer 2 μL ,RNase Inhibitor 1 μL ,短

暂离心混匀。 37°C 30 min,加入 1 μL RQ1 DNase Stop Solution, 65°C 反应 10 min。

1.2.4 合成 cDNA 并进行 PCR 反应 按 Promega 公司的反转录试剂盒说明书进行反转录(11 μL 去 DNA 的总 RNA + 1 μL Oligo dT 20 + 2 μL dNTP + 4 μL 5 \times Buffer + 1 μL RNase 抑制剂 + 1 μL Rever Tra Ace),得到 20 μL cDNA。取 0.5 μL cDNA 进行 PCR 扩增(20 μL 反应体系):PCR 扩增基因为蓝莓果实 F3'5'H 基因片段(Genebank 登录号 JK664585,片段大小为 324 bp)。cDNA 模板经 94°C 变性 4 min,按 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s 程序扩增 35 个循环,最后 72°C 继续延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 蓝莓总 RNA 提取

利用 4 种方法从蓝莓果实中提取 RNA,结果发现,SDS 法提取的 RNA 呈现粘稠状,不易溶解。电泳结果表明(见图 1),TRIzol 法没有条带呈现,无法提取到 RNA;试剂盒法提取的幼果期 RNA 无完整的条带,完熟期 28s:18s 亮度约为 2:1,但得率太低;SDS 大量法提取的总 RNA 条带弥散,有拖尾现象;只有改良 CTAB 大量法提取的蓝莓 2 个时期果实 RNA 条带较清晰完整,且 28s:18s 的亮度接近 2:1。

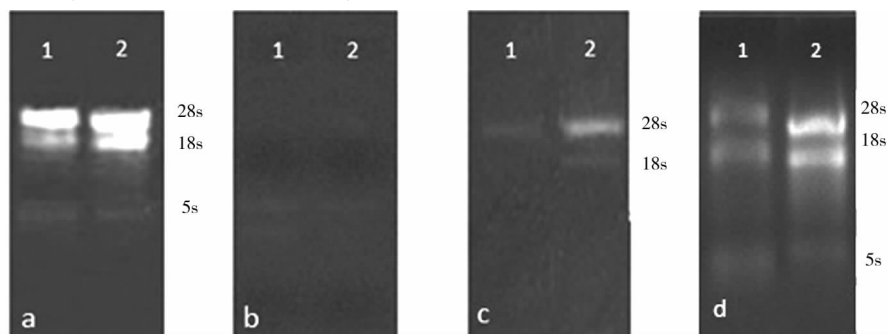


图 1 不同方法提取蓝莓果实总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of extracting total RNA of blueberry by different methods

a 为改良 CTAB 大量法;b 为 TRIzol 法;c 为试剂盒法;d 为 SDS 大量法;泳道 1 为幼果期果实;泳道 2 为完熟期果实

a is modified CTAB method; b is TRIzol Kit method; c is Detection Kit method; d is SDS method; lane 1 is fruit at young fruit stage; lane 2 is fruit at full maturity stage

根据电泳结果,分别取改良 CTAB 大量法、试剂盒法和 SDS 大量法提取的总 RNA 检测吸光度(见表 1)。改良 CTAB 大量法提取的 2 个时期

的 RNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 2.0 左右, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 的比值都大于 2.0,得率均大于 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;虽然 SDS 大量法提取的成熟期果实 RNA 得率也较高,但

OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值过低,说明存在多糖等杂质的污染。因此将改良 CTAB 大量法提取的 2 个时期果实总 RNA 继续进行 PCR 的检测。

表 1 不同方法提取蓝莓果实总 RNA 紫外吸收结果

| 方法 Method | 果实时期 Fruit stage | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ | 得率/μg·g ⁻¹ Yield |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 改良 CTAB 法 Modified CTAB method | 幼果期 | 2.05 | 2.14 | 23.978 |
| | 成熟期 | 1.97 | 2.21 | 30.817 |
| 试剂盒法 Detection Kit method | 幼果期 | — | — | — |
| | 成熟期 | 1.27 | 1.69 | 10.1 |
| SDS 法 SDS method | 幼果期 | 1.35 | 0.95 | 7.4 |
| | 成熟期 | 1.85 | 1.54 | 14.995 |

2.2 PCR 检测结果

以改良 CTAB 大量法反转录的 cDNA 为模板,对蓝莓果实 *F3'5'H* 基因片段进行扩增,结果表明 2 个时期均能扩增出片段,经 PCR 产物凝胶电泳分析,所扩增片段大小与预期片段的大小一致(见图 2),表明改进的 CTAB 大量法提取的 RNA 并反转录成的 cDNA 样品,可用于基因的克隆、表达等分子生物学研究。

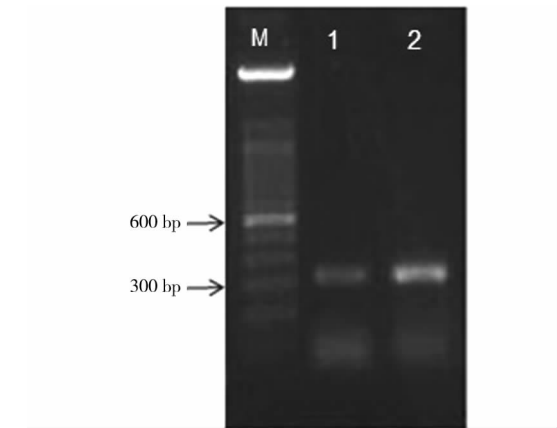


图 2 PCR 产物电泳检测结果
Fig. 2 Electrophoresis result of PCR product
泳道 1 为幼果期果实,泳道 2 为完熟期果实
lane 1 is fruit at young fruit stage; lane 2 is fruit at full maturity stage

3 结论与讨论

目前关于多糖多酚的植物组织提取 RNA 方法的报道很多^[5-9],但不同植物或同一植物的不同品种或同种植物的不同组织器官往往因种属组织部位及发育成熟度的差异其内含物组分及含量都

存在一定差异,加之不同的 RNA 提取方法亦各有优缺点^[10],故针对蓝莓果实中富含大量的糖类和酚类等次级代谢产物的特点,对不同提取方法进行了比较。

对植物果实来说,提取高质量 RNA 的关键就是去除多糖多酚等杂质的影响。近年来比较流行的 TRIzol 试剂具有操作简单,提取纯度高,所需样品量少等优点受到大家欢迎,但由于 TRIzol 试剂含酚和异硫脲酸胍等组分缓冲能力较差,因而在提取果实总 RNA 时效果不好^[6,9,11]。且在该研究中加入异丙醇后管底出现白色不溶沉淀,在山核桃^[12]和树莓^[6]的研究中也出现过这样的现象,刘丹等人认为不溶沉淀的产生以及去除多糖和酚类等杂质同时造成的 RNA 损失是导致 TRIzol 法 RNA 电泳检测未见条带的原因。SDS 法也是提取果实总 RNA 常用的方法,虽然该研究中使用了高浓度的醋酸钠沉淀和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,但仍然无法去除多糖的污染。只有改良 CTAB 大量法中提取的总 RNA 质量较好,由于在提取过程中用多个步骤去除多糖多酚,因此杂质较少。首先在提取液中加入亚精胺,在提取过程中有效地抑制了核糖核酸酶的活性。其次为了阻止果实中的酚类物质氧化为多醌与 RNA 共结合,使用 2% 的 PVP 和 2% 的 β-巯基乙醇协同作用^[13],PVP 作为多酚化合物的螯合剂与酚结合,β-巯基乙醇作为强还原剂使多酚不易被氧化,还可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活^[14],二者协同作用有效抑制了酚类物质对 RNA 提取的影响。而单独加入 PVP 或 β-巯基乙

醇都无法有效抑制多酚类物质的影响^[15-16]。再通过后续氯仿异戊醇抽提和 Li^+ 沉淀将已经与 PVP 结合和未被氧化的酚类物质除去。再次,在高浓度 Na^+ 存在条件下通过氯仿异戊醇的抽提去除一部分多糖后,又通过 LiCl 沉淀 RNA 而将多糖留在溶液中,极大地降低了多糖的污染。另外,在改良的 CTAB 法中还采用 65°C 反应 10 min 使样品彻底裂解和 LiCl 沉淀后 75% 的酒精清洗沉淀至无色以除去色素等的步骤提高 RNA 的提取质量。经过此方法提取的蓝莓果实总 RNA 可以满足后续的分子实验操作,为蓝莓分子生物学研究奠定了基础,同时也为其它植物材料 RNA 的提取提供参考。

参考文献:

- [1] 李丽敏,赵春雷,郝庆升,等. 中外蓝莓产业比较研究[J]. 中国农学通报,2010,26(23):354-359.
- [2] 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(1):36-39.
- [3] Kalt W, Dufour D. Healthy functionality of blueberries[J]. Hort. Technology, 1997, 7: 216-221.
- [4] Wang Donghong, Wang Bochu, Li Biao, et al. Extraction of total RNA from Chrysanthemum containing high levels of phenolic and carbohydrates[J]. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 2004, 36(2): 111-114.
- [5] 周向红,易乐飞,王萍. 桑椹总 RNA 抽提方法的比较[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 209-212.
- [6] 刘丹,高庆玉,张丙秀,等. 树莓果实总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 北方园艺, 2011(1): 136-138.
- [7] 周波,张旸,李玉花,等. 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(1): 48-50.
- [8] 田伟,田义轲,王彩虹,等. 苹果组织总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 青岛农业大学学报, 2010, 27(2): 122-125.
- [9] 邵毅,罗云波,张京声,等. 李果实高质量 RNA 提取方法的比较和优化[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(1): 57-62.
- [10] 徐昌杰,陈昆松,张波,等. 柑橘组织 RNA 的提取方法研究[J]. 果树学报, 2004, 21(2): 110-114.
- [11] 袁晓丽,王蔚,孙光明,等. 菠萝果实不同部位总 RNA 提取方法比较[J]. 广东农业科学, 2011, 38(10): 132-134.
- [12] 周秦,黄有军,曾燕如,等. 山核桃胚和胚乳总 RNA 的提取与 cDNA 的合成[J]. 浙江林业科技, 2009(1): 36-39.
- [13] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. Meth Enzymol, 1974, 31: 528-545.
- [14] Chang S, Puryear J, Caimey J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Reptr, 1993, 11: 113-116.
- [15] 江吕俊,王朝霞,李叶云. 茶树中提纯总 RNA 的研究[J]. 茶树科学, 2000, 20(1): 27-29.
- [16] Lakhvir L, Rashmita S, Rajesh K G, et al. RNA isolation from high phenolic tea leaves and apical bud[J]. Plant Mol Biol Reptr, 2001, 19: 181-185.

Comparison of Methods for Total RNA Extraction from Blueberry

SUN Ying, HOU Zhi-xia

(The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 10083)

Abstract: In order to extract high quality RNA from blueberry, modified CTAB, modified SDS, Trizol Kit and total RNA extraction kit were used to extract total RNA from blueberry fruits of different development stage. The results showed that modified CTAB was considered to be the most favorable methods for RNA isolation from blueberry, RNA with high yield and quality. Following this efficient procedure, we routinely obtained $23.978 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ total RNA from young fruit stage and $30.817 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ total RNA from full maturity stage, the brightness of 28S:18S was about 2:1, the ratios of $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8 \sim 2.0$ and $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} > 2.0$. The RNA was suitable for some biotechnological researchers, such as RT-PCR and transcription sequencing.

Key words: blueberry; total RNA; extraction methods