

改良 CTAB 法提取油用向日葵成熟叶片的总 RNA

周 菲

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为从植物中提取纯度高、完整性好的 RNA, 采用改良过的 CTAB 法提取油用向日葵改 HA89 开花后 12 d 成熟叶片的总 RNA, 并对其进行了紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明: 得到的 RNA 完整性好, 纯度和浓度均较高, 可用于后续的 RT-PCR、Northern 杂交和 cDNA 文库的构建等分子生物学实验研究。

关键词:油用向日葵; 成熟叶片; 总 RNA 提取

中图分类号: S565.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)07-0008-02

向日葵是世界上重要的油料作物之一, 在我国已经有几十年的大面积栽培历史。向日葵的成熟叶片中含有较多的多糖、酚类和一些次级代谢产物, 这些物质的存在严重影响 RNA 的提取, 去除不净会影响反转录等后续的操作。目前关于向日葵 RNA 提取方面的研究较少, 马西豹等^[1]改进 Onate-Sanchez 等^[2]的 SDS 法提取出航天诱变向日葵种子总 RNA。高质量 RNA 的获得是开展分子生物学研究的必要前提, 由于 RNA 不稳定、易降解, 提取的 RNA 质量不好, 在反转录时往往无法合成 cDNA 或是合成的 cDNA 链长短不一, 给研究带来很多的不便。因此从植物组织中提取纯度高、完整性好的 RNA 尤为重要。该研究利用改良的 CTAB 法提取油用向日葵成熟叶片的总 RNA, 得到的总 RNA 不仅纯度高, 完整性好, 且浓度较高, 可用于 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 文库的构建等后续试验。

1 材料与方法

1.1 材料

选取油用向日葵保持系改 HA89 开花后 12 d 的新鲜成熟叶片, 放入液氮中速冻后置于 -80℃ 超低温冰箱中贮存待用。

1.2 方法

所有试剂均用 0.1% 的 DEPC 水配制, 高压蒸汽灭菌(121℃, 0.105 MPa) 20 min 3 次。玻璃器皿用锡纸将口包好后放入烘箱中, 180℃ 干热灭活 RNA 酶 10 h, 用 0.1% DEPC 水室温处理 12 h 以上, 20 min 蒸汽灭菌 3 次备用。将离心管、枪

头等塑料器皿先用 0.1% DEPC 摇动浸泡 12 h 以上, 再 20 min 蒸汽灭菌 3 次备用。

1.2.1 总 RNA 的提取 (1) 向 1.5 mL 离心管中加 700 μL 无水乙醇及 60 μL β -巯基乙醇, 混匀后置于冰上。(2) 取 0.5 g 材料于预冷的研钵中充分研磨后装于离心管中, 振荡 1 min, 冰浴 10 min, 4℃, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 弃上清。(3) 加 CTAB(20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CTAB, 0.012 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的四硼酸钠, 1.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠) 提取液 700 μL , β -巯基乙醇 1 滴, 振荡 1 min, 65℃ 水浴 5 min(其间摇动几次) 后, 迅速置于冰上。(4) Tris 饱和酚/氯仿(1:1) 700 μL , 振荡 3 min, 4℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清。(5) 加入等量的氯仿 700 μL , 振荡 3 min 后, 4℃ 下离心 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 10 min。(6) 取上清, 加入 1/2 体积的无水乙醇和 4/5 倍体积的 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl, 混匀后冰浴 15 min。(7) 4℃, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 室温干燥 5 min, 用 20 μL RNase Free 去离子水溶解沉淀。

1.2.2 总 RNA 的纯化 (1) 于无 RNase 的 EP 管中加入总 RNA 20 μg , 10 \times reaction buffer 和 MgCl_2 5 μL , DNase I(1 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 5 μL , RNase Free 去离子水补足到 50 μL , 37℃ 保温 30 min。(2) 加 1 μL 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 65℃ 保温 10 min。(3) 用 RNase Free 去离子水补足至 300 μL 。(4) 加入等量的氯仿, 振荡 3 min, 4℃ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。(5) 取上清, 加入 1/2 体积的无水乙醇和 4/5 倍体积的 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl, 混匀后冰浴 15 min。(6) 4℃, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 室温干燥 5 min, 用 20 μL RNase Free 去离子水溶解沉淀。

1.2.3 RNA 浓度及完整性检测 取 2 μL RNA

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 国家向日葵现代产业技术体系资助项目(CARS-16)

作者简介: 周菲(1984-), 女, 辽宁省丹东市人, 硕士, 研究实习员, 从事向日葵研究。E-mail: zhoufei66666@163.com。

样品于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分析,电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$ 取 $1 \mu\text{L}$ RNA 于紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 波长下的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的电泳分析

从总 RNA 的电泳结果可以看出,未经 DNA 酶消化的总 RNA 可见清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带,亮度比为 2:1,完整性较好,但是明显存在 DNA 污染(见图 1-1),经 DNA 酶消化后的总 RNA 纯度很高,已没有 DNA 污染,且质量较好(见图 1-2)。

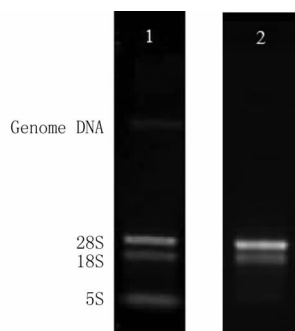


图 1 改良 CTAB 法提取的改 HA89 开花后 12 d 叶片总 RNA

Fig. 1 The total RNA of leaves from Modified HA89 after flowering 12 days extracted by improved CTAB method

1. 未经 DNase I 消化的总 RNA; 2. 经 DNase I 消化后的总 RNA

1. The total RNA not digested by DNase I; 2. The total RNA digested by DNase I

2.2 总 RNA 的紫外分光光度计分析

经 DNase 消化后得到的总 RNA 用紫外分光光度计检测 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 约为 1.94,说明纯度较好,没有蛋白质污染, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 约为 2.04,说明没有高盐和酚等杂质的污染。RNA 产量达到 $0.6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,浓度较高。

3 结论与讨论

向日葵成熟叶片富含水溶性的次级代谢产物、酚类化合物、多糖。次级代谢产物很容易与 RNA 结合并与 RNA 共同被抽提出来而阻碍具有生物活性的 RNA 的分离。在植物材料匀浆时,酚类物质会释放出来,氧化后使匀浆液变为褐色,并随氧化程度的增加而加深,即褐化效应^[3]。被氧化的酚类化合物能与 RNA 稳定地结合,从而影响 RNA 的分离纯化。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似,因此很难将它们分开,在去除多糖的同时 RNA 也被裹挟走了,造成 RNA 产量低,而在沉淀 RNA 时,也产生多糖的凝胶状沉

淀,这种含多糖的 RNA 沉淀难溶于水,或溶解后产生粘稠状的溶液,多糖可以抑制许多酶的活性^[4],因此污染了多糖的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。

该研究将研磨好的材料先加入到无水乙醇和 β -巯基乙醇混合液中,无水乙醇可去除多糖等次级代谢产物,Lewinsohn 等在从裸子植物的木质茎中提取 RNA 时,在匀浆上清液中加入乙醇至终浓度 10% 以沉淀多糖^[5],同时无水乙醇具有使蛋白质变性的作用,一定程度上抑制了内源 RNase 的活性^[6];无水乙醇和 β -巯基乙醇的混合液中 β -巯基乙醇防止酚类物质的氧化,而在 CTAB 提取液液中加入 β -巯基乙醇也是防止酚类物质被氧化^[7];通过 LiCl 和无水乙醇沉淀 RNA 的方法可以将未被氧化的酚类化合物去除,也可将部分多糖留在上清中^[3],而且使得到的 RNA 大片段损失很少,产量高;在 CTAB 提取液中加入高浓度的 NaCl 有助于去除多糖^[4];蛋白质也是污染 RNA 样品的又一重要因素,CTAB 作为离子型表面活性剂,能溶解细胞膜和核膜蛋白,使核蛋白解聚,从而使 RNA 得以游离出来,再用苯酚、氯仿抽提除去蛋白质。

综上所述,该研究所利用的改良 CTAB 法提取油用向日葵成熟叶片的总 RNA 纯度较高且浓度达到 $0.6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,完整性较好,可用于后续的 RT-PCR, Northern 杂交, cDNA 文库的构建等分子生物学实验研究。

参考文献:

- [1] 马西豹,杨军,张思楠,等. 提取航天诱变向日葵种子总 RNA 的一种有效方法[J]. 生物技术通讯,2011(1):89-92.
- [2] Onate-Sanchez L, Vicente-Carbajosa J. DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques[J]. BMC Research Notes,2008,1:93.
- [3] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae [J]. Analytical Biochemistry, 1988, 174: 650-657.
- [4] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio. Techniques,1992,13:52-56.
- [5] Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1994,12:20-25.
- [6] 陈肃,刘雪梅,李发兵. 一种快捷有效的提取树木 RNA 方法[J]. 辽宁林业科技,2008(5):25-27.
- [7] Bahloul M, Burkard G. An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1993,11(3):212-215.