

2种大豆总RNA提取方法的改良^{*}

刘易科^{1,2}, 孙洪波², 简波², 胡珀², 高小伟², 侯文胜^{1,2}

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

[摘 要] 对大豆总RNA的提取方法Trizol法和异硫氰酸胍法进行了改良, 比较了改良前后2种方法的提取效果。结果表明, 2种改良方法提取的大豆总RNA质量较高、完整性较好, 完全可以满足后续研究要求, RNA产率均超过220 $\mu\text{g/g}$ 。改良Trizol法适用于大豆根、茎、叶及生长点总RNA的提取, 而改良异硫氰酸胍法适用于大豆根、茎及生长点总RNA的提取。

[关键词] 大豆; RNA提取; 改良异硫氰酸胍法; 改良Trizol法

[中图分类号] S565.1; Q781

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0083-04

植物组织中总RNA的提取是植物分子生物学研究的基本技术之一, 高质量RNA的获得是进行RT-PCR、Northern blot、cDNA文库构建等分子生物学研究的前提条件。真核生物总RNA的提取已有许多较为成熟的方法^[1], 但对于不同的植物或同种植物的不同器官或组织, 由于其自身组分差异较大, 影响RNA提取的因素也存在较大差异, 常规提取方法往往不能取得理想效果^[2]。目前, 专门针对大豆或大豆不同器官总RNA提取的有效方法报道较少, 这在很大程度上制约了相关研究的深入开展。

植物组织总RNA的提取方法主要有热酚法^[3]、CTAB法^[4-5]、异硫氰酸胍法^[1,6]和Trizol法等。其中异硫氰酸胍法是从真核生物细胞中提取总RNA的通用方法之一, 付畅等^[7]应用该方法从大豆不同器官中提取总RNA, 已经获得了较为理想的效果, 但对大豆主要器官——叶片的提取效果不佳, 且提取的根、茎、胚芽总RNA中存在一定的酚类、多糖、胍盐污染。本研究对异硫氰酸胍法和Trizol法进行了改良, 并采用2种改良方法分别提取大豆根、茎、叶及生长点的总RNA, 比较了改进前后2种方法的提取效果, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

大豆品种自贡冬豆(*Glycine max* [L.] Merr.

cv. Zigongdongdou)的根、茎、叶及生长点。

Trizol试剂购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 反转录试剂盒及PCR用品购自TaKaRa公司, 其他试剂均为国产分析纯。试剂(除EDTA外)均用0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水配制, 塑料耗材用0.1% DEPC水处理24 h后高温灭菌; 研钵等器皿在180 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤6 h以上, 以避免RNA酶污染。

1.2 大豆总RNA的提取

1.2.1 异硫氰酸胍法(GT) 参见文献[6]。

1.2.2 Trizol法(T) 参见Trizol试剂使用说明。

1.2.3 改良异硫氰酸胍法(IGT) (1) 将100 mg经液氮充分研磨的大豆组织放入预冷的2 mL EP管中, 加入0.6 mL提取缓冲液(4 mol/L异硫氰酸胍, 25 mmol/L柠檬酸钠, 5 g/L月桂基硫酸钠, 0.1 mol/L β -巯基乙醇(即用即加)), 涡旋振荡10 min; 加60 μL 2 mol/L NaAC (pH 4.8), 涡旋振荡5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 500 r/min离心10 min, 取上清备用。

(2) 向上清液中加入15 μL 蛋白酶K (20 mg/mL), 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min后加入0.5 mL水饱和酚, 涡旋振荡10 min, 再加入体积比1:1酚-氯仿0.5 mL, 涡旋振荡5 min, 然后4 $^{\circ}\text{C}$, 13 500 r/min离心10 min, 取上清。

(3) 向上清液中加入0.6 mL氯仿, 涡旋振荡10 min后4 $^{\circ}\text{C}$, 13 500 r/min离心10 min, 取上清(可重复1次), 加2倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2 h; 4

^{*} [收稿日期] 2005-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471054)

[作者简介] 刘易科(1978-), 男, 河南南阳人, 在读硕士, 主要从事大豆发育分子生物学研究。

[通讯作者] 侯文胜(1969-), 男, 北京房山人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

℃、12 000 r/min 离心 10 min, 用 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。

(4) 4℃、7 000 r/min 离心 8 min, 弃乙醇, 超净台内风干沉淀, 加 25 μL DEPC 水溶解, - 70℃保存。

1.2.4 改良 Trizol 法(Ⅱ) (1) 将 100 mg 经液氮充分研磨的大豆组织放入预冷的 2 mL EP 管中, 加入 1 mL Trizol 试剂, 涡旋振荡 15 min, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 取上清。向上清中加入 15 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 55℃水浴 10 min。加入 0.2 mL 氯仿, 再涡旋振荡 10 min, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 取上层水相, 重复 1 次。

(2) 向水相中加入 0.25 mL 异丙醇, 0.25 mL 高盐缓冲液(0.8 mol/L 柠檬酸钠, 1.2 mol/L NaCl), 振荡混匀 2 min, 置冰上 10 min; 4℃、10 000 g 离心 10 min, 用 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。

(3) 4℃、7 000 g 离心 8 min, 弃乙醇, 超净台内风干沉淀, 加入 25 μL DEPC 水溶解, - 70℃保存。

1.3 总RNA 纯度和产量的测定

取 1 μL RNA 样品稀释至 50 μL, 用 Eppendorf 生物分光光度计法^[8]分析其纯度和产量。

1.4 RNA 的完整性分析

1.4.1 电泳分析 取 1 μL RNA 溶液于 10 g/L 非

变性琼脂糖上, 进行凝胶电泳分析。
1.4.2 RT-PCR 检测 验证基因选用大豆内源 *ACTIN* 基因^[9], 其特异性 PCR 检测引物为:
5'-GGT GAT GGT GTG AGT CAC ACT GTA CC-3' 和 5'-GTG GAC AAT GGA TGG GCC A GA CTC-3', 退火温度为 60℃, 25 个循环^[10]。同时设阴性对照, 模板为水。

2 结果与分析

2.1 大豆不同器官总RNA 的分光光度计法检测结果

用生物分光光度计法检测了改良前后 2 种方法所提取大豆总 RNA 的产量和纯度, 结果见表 1。由表 1 可知, 2 种改良方法(除改良异硫氰酸胍法提取叶的总 RNA 外), 提取的大豆总 RNA A_{260}/A_{280} 值均大于 1.80, 说明 2 种改良方法所提取的大豆总 RNA 样品中蛋白质污染基本被去除; A_{260}/A_{230} 为 1.03~2.05, 可见 2 种改良方法对酚类和多糖的去除效果优于付畅等^[7]的异硫氰酸胍法($A_{260}/A_{230} < 0.80$)。2 种改良方法提取不同器官 RNA 的产率均大于 220 μg/g。改良异硫氰酸胍法对大豆叶总 RNA 的提取效果相对较差, 可能是由于大豆叶片相对于其他器官来说, 含有更多的蛋白质和多糖类物质。

表1 大豆不同器官提取的总RNA 产量和纯度检测结果

Table 1 Quantity and purity of RNA from different organs of soybean isolated by the two improved methods

器官 Organ	A_{260}/A_{280}				A_{260}/A_{230}				RNA 产率/(μg·g ⁻¹) RNA productivity			
	T	GT	Ⅱ	IGT	T	GT	Ⅱ	IGT	T	GT	Ⅱ	IGT
根 Root	-	-	1.88	1.82	-	-	1.96	1.59	-	-	250	234
茎 Stem	-	-	1.97	1.82	-	-	1.47	1.88	-	-	307	224
叶 Leaf	1.53	1.39	1.93	1.45	1.29	0.96	2.05	1.05	354	241	411	228
生长点 SAM	1.61	1.56	2.04	1.87	1.56	0.56	2.01	1.03	215	350	317	273

注: T. Trizol 法; GT. 异硫氰酸胍法; Ⅱ. 改良 Trizol 法; IGT. 改良异硫氰酸胍法。
Note: T. Trizol method; GT. Guanidinium Thiocyanate method; Ⅱ. Improved Trizol method; IGT. Improved Guanidinium Thiocyanate method

2.2 大豆不同器官总RNA 琼脂糖凝胶电泳分析

改良前后 2 种方法提取的大豆总 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1~3。由图 1 可以看出, 改良前 2 种方法提取的大豆总 RNA 完整性虽然较好, 但明显存在蛋白污染。由图 2, 图 3 可以看出, 改良后 2 种方法提取的大豆总 RNA 的 25 S 和 18 S 条带均清晰完整, 且 25 S 的亮度大约是 18 S 的 2 倍, 说明 RNA 的完整性较好, 且无蛋白污染。

2.3 RT-PCR 检测结果

对 2 种改良方法所提取的大豆不同器官总 RNA 进行 RT-PCR 检测, 结果见图 4。图 4 表明, 所有目的条带清晰, 位置正确, 说明 2 种改良方法所提取 RNA 的质量和完整都较高, 完全可以满足后续分子生物学实验要求。

综合分析凝胶电泳和 RT-PCR 检测结果可知, 改良 Trizol 法适用于大豆根、茎、叶及生长点总

RNA 的提取, 而改良异硫氰酸胍法适用于大豆根

茎及生长点总RNA 的提取。

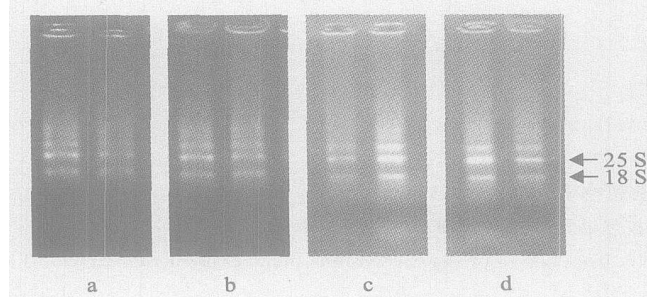


图1 Trizol 法和异硫氰酸胍法提取大豆总RNA 的电泳结果

a, b 和 c, d 分别为Trizol 和GT 法提取的叶、生长点结果

Fig 1 Electrophoresis detection of RNA isolated by Trizol method and Guanidinium Thiocyanate method
a, b and c, d Isolated by Trizol and Guanidinium Thiocyanate method

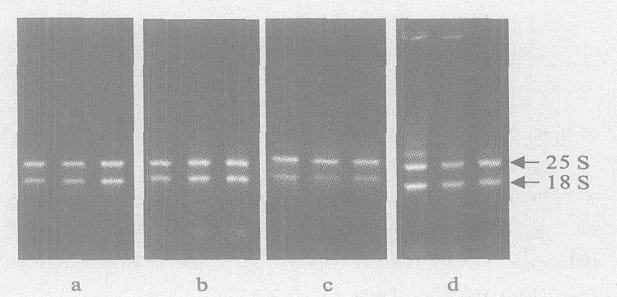


图2 改良Trizol 法提取大豆不同器官总RNA 的电泳结果

a 根; b 茎; c 叶; d 生长点

Fig 2 Electrophoresis detection of RNA isolated by improved Trizol method from different organs
a Root; b Stem; c Leaf; d SAM

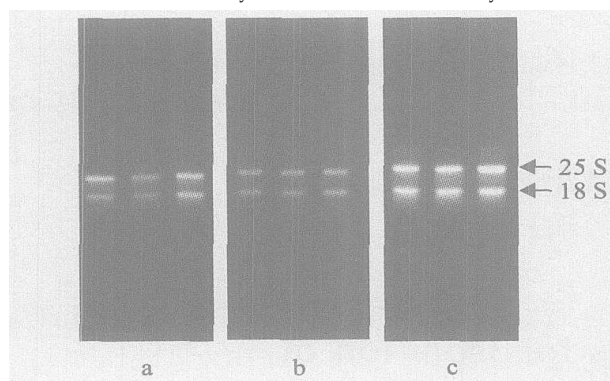


图3 改良异硫氰酸胍法提取大豆不同器官总RNA 的电泳结果

a 根; b 茎; c 生长点

Fig 3 Electrophoresis detection of RNA isolated by improved Guanidinium Thiocyanate method from different organs
a Root; b Stem; c SAM

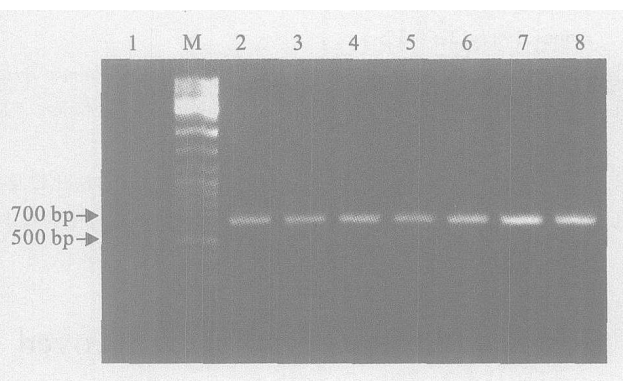


图4 2种改良方法提取大豆不同器官总RNA 的RT-PCR 检测结果

M. DNA Marker; 1. 阴性对照; 2~4, 5~8 模板分别为 IGT 法提取的根、茎、生长点和 IT 法提取的根、茎、叶、生长点RNA

Fig 4 Electrophoresis detection of RT-PCR from different organs RNA isolated with the two improved methods
M. M marker; 1. Negative CK; 2 Root (IGT); 3 Stem (IGT); 4 SAM (IGT); 5 Root (IT); 6 Stem (IT); 7 Leaf (IT); 8 SAM (IT)

3 讨论

不同植物或同种植物不同组织所含化学物质的成分有很大差别, 因此其RNA 提取的方法也不尽相同^[11-12]。相对于其他植物来说, 大豆组织内含有较多的蛋白质, 因而2种改良方法均在原方法的基础上增加了蛋白酶K 消化的步骤。通过比较分析发现, 加入蛋白酶K 后可使 A_{260}/A_{280} 平均提高0.2左右。蛋白酶K 的加入不仅对消除蛋白质污染有重要作用, 而且通过酶解还可以在一定程度上去除R_{nas}e 和酚类氧化酶^[13]。为了尽可能使蛋白质等杂质抽提干净, 2种改良方法都采取了较长时间的涡旋振荡, 结果表明取得了较好的效果。

在高浓度Na⁺ 离子存在条件下, 通过苯酚、氯仿

抽提可以除去一些多糖^[14], 改良异硫氰酸胍法在加入异硫氰酸胍提取液并经充分涡旋振荡后, 加入NaAC (pH 为4~8), 对去除多糖起到了很好的效果。用异丙醇沉淀RNA 时, 高浓度盐的存在可以使大量多糖留存于上清液中从而将其去除^[10]。因此, 在改良Trizol 法中, 将单纯异丙醇沉淀RNA 改为利用异丙醇和高盐混合液沉淀RNA, 从而降低了多糖等的污染。同时为防止盐影响后续实验, 采用体积分数75% 乙醇多次洗涤RNA 沉淀使其脱盐。

2种改良方法各有优缺点。改良Trizol 法方便省时, 同时RNA 产出率也较高, 但成本高; 改良异硫氰酸胍法较费时, RNA 产出率相对较低, 同时对叶片的提取效果不很理想, 但价格相对便宜。因此, 在材料比较充足(叶除外)、样品提取量较大时, 可以考

虑用改良异硫氰酸胍法,其他情况则可优先考虑用 改良 Trizol 法。

[参考文献]

- [1] 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, 2001: 136-149
- [2] 王 芳, 张 斌 一种从花生种子中提取RNA 的改进方法[J]. 花生学报, 2002, 31(4): 24-26
- [3] 王友华, 卢孟柱, 段留生 棉花幼苗根总RNA 提取的改进热酚法[J]. 西北植物学报, 2005, 5(4): 723-726
- [4] 刘 志, 杨永华 CTAB 法提取中草药材滇紫草细胞的总RNA [J]. 生物技术通报, 2004(4): 372-373
- [5] Bekesiova I, Nap J, Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *D. rosera rotundifolia* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 269-277.
- [6] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159
- [7] 付 畅, 王豫颖, 代红杰 大豆不同器官中RNA 的提取分析[J]. 大豆科学, 2004, 23(4): 282-284
- [8] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 343-361.
- [9] Meisel L, Fonseca B, González S, et al A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses [J]. *Biol Res*, 2005, 38: 83-88
- [10] 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
- [11] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, 12: 198-203
- [12] Jones C S, Iannetta P M, Woodhead M, et al The isolation of RNA from raspberry (*Rubus idaeus*) fruit [J]. *Mol Biol tech*, 1997, 8: 219-221.
- [13] 史公军, 侯喜林, 易金鑫 白菜花药组织总RNA 提取方法比较及其分析[J]. 西北农业学报, 2004, 13(3): 97-99
- [14] 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

Two efficient improved methods for isolation of high quality total RNA from soybean

L IU Y i-ke^{1,2}, SUN Hong-bo², J IAN Bo², HU Po², GAO X iao-w ei², HOU W en-sheng^{1,2}

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Crop Science Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Two methods of isolating RNA were improved in this paper. The effects of extracting total soybean RNA with the improved methods were compared with those original ones. The result shows the improved Trizol method fits for extracting RNA from soybean root, stem, leaf and shoot apical meristem, whereas the improved Guanidinium Thiocyanate method fits for root, stem and shoot apical meristem (SAM). More than 22 μ g RNA was obtained from each 100 mg plant tissue with high purity and integrity. Therefore, these methods deserve further studies.

Key words: soybean; RNA isolation; improved Guanidinium Thiocyanate method; improved Trizol method