

小麦不同器官总RNA含量及提取方法的比较研究^{*}

于秀梅^a, 康振生^b, 崔素萍^a, 赵杰^b

(西北农林科技大学 a 植物保护学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用4种方法分别对小麦幼叶、幼茎、幼根及乳熟期籽粒的总RNA进行了提取和分析。结果表明, 4种方法所提取的总RNA均能满足一般的下游操作, 其中TRIzol法提取的总RNA产量最高, 用该法提取的小麦叶片总RNA产量为其他方法的2~4倍; 天为时代试剂盒提取时间短, 可在常温下操作; 而醋酸钠/乙醇沉淀法具有提取步骤少、操作时间短、可用于大量样品提取且价格便宜等优点, 适于小麦不同器官的总RNA提取; 经紫外分光光度计检测, 各样品总RNA的 A_{260}/A_{280} 均在1.88~2.09, 表明所提取的总RNA中没有蛋白质及其他有机溶剂的污染, 且 A_{260}/A_{230} 在1.89~2.41, 表明盐类小分子的污染也较少, 所提取的总RNA质量较高。除了细胞质rRNA外, 小麦中还存在叶绿体rRNA, 且叶绿体rRNA占总rRNA的比例较高, 在甲醛变性琼脂糖凝胶电泳时, 幼叶、幼茎比幼根明显多出2条带。

[关键词] 小麦; 总RNA含量; 提取方法

[中图分类号] S512.101; Q522.03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)10-0029-04

近年来, 随着人类和各种模式生物基因组测序的完成^[1], 以及遗传图谱、物理图谱、转录图谱的成功构建, 人们逐渐将研究重点转移到基因组较大的生物上。由于小麦在人类生产和生活中占有重要地位, 人们已经开始对其基因组进行研究。但由于小麦的基因组相对较大(约是人类基因组的5倍), 故对其基因组进行研究工作量巨大。而在庞大的基因组中, 实际编码基因只占2%~3%, 因此从转录水平(即mRNA水平)着手开展研究则相对经济快捷得多^[2]。从mRNA水平开展研究, 首先面临的的就是总RNA提取问题。目前, 总RNA的提取技术已经比较成熟, 有多种方法可供选择, 如胍盐法^[3,4]、SDS法^[5]、CTAB法^[6]、苯酚法^[7]和LiCl沉淀法^[8]等, 每种方法各有其优缺点, 各实验室可根据试验材料及下游操作的需要选择相应的方法。

为了寻找适合小麦总RNA提取的方法, 本研究以小麦的幼叶、幼茎、幼根和乳熟期籽粒为试验材料, 选用4种不同的方法进行了小麦总RNA的提取, 同时, 为探明小麦不同部位组织中rRNA的差异情况, 还对不同器官rRNA的组成进行了比较分析。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以小麦品种辉县红的幼叶、幼茎、幼根和乳熟期籽粒为试验材料。辉县红幼苗置于温室内, 每日光照16 h, 取第一片叶展平时的叶片、茎、根及乳熟期的籽粒在液氮中迅速冷冻后, 保存于-80℃的冰箱中待用。

1.2 试验方法

采用4种方法分别对各材料的总RNA进行提取。4种方法依次为: (1)RNApure植物总RNA提取试剂盒(简称天为时代kit), 由天为时代公司生产; (2)TRIzol法, 试剂盒购自Invitrogen公司; (3)LiCl沉淀法: 参照于翠等^[9]的方法进行; (4)NaAC/乙醇沉淀法: 用3 mol/L NaAC和无水乙醇沉淀总RNA 20 min (-80℃), NaAC和无水乙醇的用量分别为抽提液体积的0.1和2.5倍, 其他操作与LiCl沉淀法相同。

1.3 总RNA中基因组DNA的去除

用RNase-free的DNase I (Promega公司产品)去除混杂在总RNA中的基因组DNA, 具体操作按

^{*} [收稿日期] 2005-03-07

[基金项目] 教育部高校科技创新工程重大项目培养资金

[作者简介] 于秀梅(1976-), 女, 黑龙江肇源人, 在读博士, 主要从事生化与分子生物学研究。

[通讯作者] 康振生(1957-), 男, 四川安岳人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: kangzh@nwsuaf.edu.cn

照说明书进行。

1.4 总RNA 浓度及其完整性检测

用紫外分光光度计(Eppendorf 公司生产)测定总RNA 的浓度及纯度,以12 g/kg 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测总RNA 的完整性,电泳条件为:电压5 V/cm,时间1 h。

2 结果与分析

2.1 4 种方法提取的小麦总RNA 浓度及其纯度检测

将各种方法提取的不同器官的总RNA 用DNase I 处理后,分别测定其浓度与纯度,结果见表1。由表1 可以看出,各样品总RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在1.88~2.09,表明所提取的总RNA 中没有蛋白质及

其他有机溶剂的污染; A_{260}/A_{230} 在1.89~2.41,表明盐类小分子的污染也较少,故所提取的总RNA 均能满足一般下游操作的要求。由表1 还可看出,不同提取方法所获得的总RNA 产量差异较大,其中TR Izo1 法对小麦4 种器官提取的总RNA 量最多,用该法提取的小麦叶片总RNA 产量是其他提取方法的2~4 倍;不同提取方法对幼根的总RNA 产量影响最大,TR Izo1 法提取的总RNA 量最多,达到8 473 $\mu\text{g/g}$,而LiCl 沉淀法提取的量最少,仅为0 587 $\mu\text{g/g}$,说明LiCl 沉淀法不适于小麦幼根总RNA 提取。从小麦的不同部位来看,乳熟期籽粒中的总RNA 含量最高,用TR Izo1 法提取的总RNA 量可达21.925 $\mu\text{g/g}$ 。

表1 不同方法提取小麦不同器官的总RNA 的产量与纯度比较

Table 1 Comparison of total RNA purity and quantity among different organs by different methods				
方法 Methods	组织 Organs	总RNA 产量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) RNA product	纯度 Purity	
			A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
天为时代kit 法 Tianweishidai kit	幼叶 Young leaf	1.482	2.00	2.20
	幼茎 Young stem	2.647	2.02	2.24
	幼根 Radicle	1.938	2.00	2.15
	籽粒 Immature seed	6.933	1.96	2.20
TR Izo1 法 TR Izo1	幼叶 Young leaf	6.729	2.00	2.20
	幼茎 Young stem	7.243	1.97	2.21
	幼根 Radicle	8.473	1.90	2.10
	籽粒 Immature seed	21.925	1.88	1.89
LiCl 沉淀法 LiCl precipitation	幼叶 Young leaf	3.009	2.06	2.23
	幼茎 Young stem	1.864	2.09	2.41
	幼根 Radicle	0.587	1.98	2.05
	籽粒 Immature seed	7.042	1.99	2.16
NaAC/乙醇沉淀法 NaAC/ethanol precipitation	幼叶 Young leaf	3.273	2.05	2.16
	幼茎 Young stem	7.483	2.02	2.32
	幼根 Radicle	1.387	1.93	2.19
	籽粒 Immature seed	14.423	2.00	2.24

2.2 4 种方法提取的小麦不同器官总RNA 完整性检测

将提取的各器官的总RNA 样品进行12 g/kg 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,结果见图1和图2。由图1和图2 可以看出,除了最下面的由5 S,5.8 S 和其他小分子量的rRNA 组成的混合条带外,小麦幼叶和幼茎提取的总RNA 明显可见4 条带,幼根的总RNA 只有2 条带,乳熟期籽粒中除典型的2 条带外,在18 S 前面还存在一条模糊的条带。幼叶和幼茎的总RNA 除了25 S 和18 S 2 条带外,在18 S 前面还存在2 条边缘清晰的条带,且这2 条带在叶片中的亮度

要明显高于茎中的亮度。商鸿生等^[10]报道,小麦中胞质的25 S rRNA 和叶绿体中的23 S rRNA 难以分离,而胞质18 S rRNA 和叶绿体16 S rRNA 分离较好,此外还存在9 S rRNA 的弱带。由此可见,小麦的rRNA 组成比较复杂,共有6 大类rRNA。由于叶片中叶绿素的含量高于茎中,即叶绿体16 S rRNA 含量较高,所以16 S rRNA 条带较茎中的亮。在乳熟期籽粒中,也模糊可见16 S rRNA 条带,而根中由于不含有叶绿体,因此只存在胞质的25 S,18 S 和5 S rRNA 3 条带。

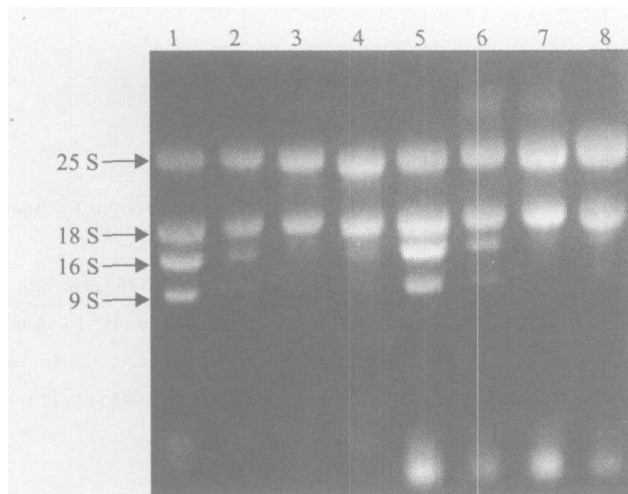


图1 天为时代kit 和TR Izol 法提取小麦不同器官总RNA 完整性的电泳检测结果

1~ 4 分别为天为时代kit 提取的小麦幼叶、幼茎、幼根、乳熟期籽粒的总RNA; 5~ 8 分别为TR Izol 示提取的小麦幼叶、幼茎、幼根、乳熟期籽粒的总RNA

Fig 1 Result of total RNA integrity using Tianweishidai kit and TR Izol

1- 4 Total RNA extracted from young leaf, young stem, radicle and immature seed by Tianweishidai kit;
5- 8 Total RNA extracted from young leaf, young stem, radicle and immature seed by TR Izol

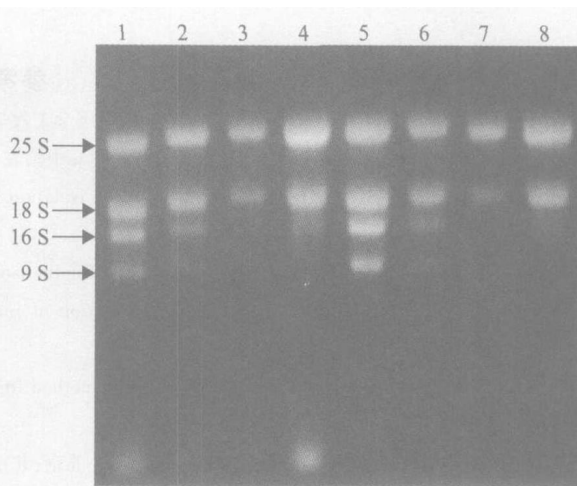


图2 LiCl 沉淀法和NaAC/乙醇沉淀法提取小麦不同器官总RNA 完整性的电泳检测结果

1~ 4 分别为LiCl 沉淀法提取的小麦幼叶、幼茎、幼根、乳熟期籽粒的总RNA; 5~ 8 分别为NaAC/乙醇沉淀法提取的小麦幼叶、幼茎、幼根、乳熟期籽粒的总RNA

Fig 2 Result of total RNA integrity using LiCl and NaAC/ethanol

1- 4 Total RNA extracted from young leaf, young stem, radicle and immature seed by LiCl precipitation;
5- 8 Total RNA extracted from young leaf, young stem, radicle and immature seed by NaAC/ethanol precipitation

3 讨 论

本试验采用了4种方法提取小麦不同器官的总RNA, 由试验结果可知, 天为时代公司生产的试剂盒可在常温下操作, 方法简便, 花费时间短, 价格比进口试剂便宜, 且从提取质量看, 也能够满足大部分下游操作的要求, 但提取的总RNA 产量较其他几种方法偏低; TR Izol 试剂是 Invitrogen 公司的产品, 其主要成分为酚和异硫氰酸胍, 该方法的优点是提取的RNA 产量高, 约相当于其他方法的2~ 4倍, 操作步骤也不烦琐, 试验结果稳定, 但试剂的价格相对偏高; LiCl 沉淀法和NaAC/乙醇沉淀法提取小麦总RNA 效果也较好, NaAC/乙醇沉淀法与LiCl 沉淀法相比, 具有沉淀时间短、总RNA 产量高的优点, 2种方法所用试剂均可自己配制, 方法灵活, 且价格适宜。

从不同器官提取的总RNA 的产量看, 小麦乳熟期籽粒中总RNA 的含量最高, 说明在种子成熟过程中启动了大量的基因进行转录表达, 从而完成了这

一重要的生命延续过程

小麦是禾谷类作物中基因组最大的粮食作物, 其基因组大小为 16.55×10^9 bp。小麦不但基因组大, 而且其 rRNA 的组成也很复杂, 由于叶绿体16 S rRNA 和9 S rRNA 的大量存在, 使得小麦的总RNA 比动物及菌类多出2条带。本研究中发现, 小麦幼叶的25 S rRNA 和23 S rRNA 的总亮度与18 S rRNA 的亮度基本相等, 而用同样方法所提取小麦幼根的25 S rRNA 的亮度却能达到18 S rRNA 的1.5~ 2倍, 说明小麦幼叶和幼茎总RNA 完整性评定方法与传统方法存在一定差异, 至于是否还有其他提取方法能够使小麦幼叶和幼茎25 S rRNA 亮度是18 S rRNA 的2倍, 还有待于进一步研究。

姚红艳等^[11]用尿素/LiCl 沉淀法提取小麦叶片及不同发育时期种子的总RNA, 效果较好, 但该方法步骤烦琐, 增加了总RNA 被RNase 降解的机会, 而本试验所选用的NaAC/乙醇沉淀法具有提取步骤少、操作时间短、总RNA 产量高等特点, 因此是小麦各种器官总RNA 提取较为理想的方法。

[参考文献]

- [1] 景志忠, 才学鹏. 模式生物基因组学研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(3): 506- 511.
- [2] 骆 蒙, 贾继增. 国际麦类基因组EST 计划研究进展[J]. 中国农业科学, 2000, 33(6): 110- 112.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156- 159.
- [4] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J]. Anal Biochem, 1987, 163: 16- 20.
- [5] Schneiderbauer A, Sandemann H Jr, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91- 95.
- [6] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113- 116.
- [7] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 77- 83.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [9] 于 翠, 胡东维, 董家红. 烟草花叶病毒和番茄花叶病毒在含N 基因烟草上的症状差异是由运动蛋白基因决定的[J]. 中国科学(C 辑, 生命科学), 2004, 34(3): 210- 215.
- [10] 商鸿生, 张 慧, 李振歧. 条锈菌侵染早期小麦叶片RNA 和rRNA 的合成[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 215- 220.
- [11] 姚红艳, 赵双宜, 夏光敏. 改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总RNA [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 86- 88.

Comparison of total RNA content in different organs of wheat by different methods

YU Xiu-mei^a, KANG Zhen-sheng^b, CUI Su-ping^a, ZHAO Jie^b

(a College of Plant Protection, b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Total RNA was extracted from young leaf, young stem, radicle, and immature seed of wheat by four different methods respectively. The results showed that all of the purified total RNA were up to standard and general downstream applications through purity and quantity analysis. Among these methods, TRIzol could get the highest production of total RNA, which was as much as 2- 4 times that of other methods. Tianweishidai kit needed less time, and could operate at room temperature. Due to fewer steps, less time, lower price and suitable for large quantity samples, NAC/ethanol was a desirable method to extract total RNA from different organs in wheat. Detected by Ultraviolet spectrophotometer, A_{260}/A_{280} was 1.88- 2.09 and A_{260}/A_{230} was 1.89- 2.41, which showed the purity of total RNA was better. Analyzed by formaldehyde denaturalized gel electrophoresis, total wheat RNA contained large percentage of chloroplast rRNA other than cytoplasm rRNA, which resulted in two more rRNA bands in young leaf and young stem than those in radicle.

Key words: wheat; total RNA content; extraction methods