

槟榔黄化病组织 RNA 提取方法的比较

周亚奎^{1,2} 杨云^{1,2} 隋春³ 甘炳春^{1,2} 魏建和³⁽¹⁾ 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 万宁 571533;⁽²⁾ 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 万宁 571533;⁽³⁾ 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘 要: 为了从发生黄化病的槟榔茎、叶、花中提取到完整的 RNA, 采用了 CTAB 法、Trizol 法和异硫氰酸胍法提取槟榔黄化病组织 RNA。从 RNA 的完整性、产率和纯度方面对这几种方法进行了比较, 结果表明, 异硫氰酸胍法所得 RNA 完整性较好, 条带清晰无明显降解, OD_{260}/OD_{280} 介于 1.8~2.0 之间, RNA 得率较高, 为 120 $\mu\text{g/g}$ 以上, 并能成功进行反转录制备 cDNA, 表明该 RNA 可以进行后续分子生物学操作。

关键词: 槟榔 黄化病 RNA 提取 异硫氰酸胍法

Comparison of Methods for Extracting Total RNA from Yellow Leaf Disease Tissue of *Areca catechu* L.Zhou Yakui^{1,2} Yang Yun^{1,2} Sui Chun³ Gan Bingchun^{1,2} Wei Jianhe³⁽¹⁾ Hainan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Wanning 571533;⁽²⁾ Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Wanning 571533;⁽³⁾ Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Abstract: In order to extract pure and integrate RNA from stem, leaf and flower of *Areca catechu* L., the CTAB, Trizol and guanidine isothiocyanate method were compared. According to the integrity, productivity and purity of extracted RNA, the guanidine isothiocyanate method was the most appropriate method of RNA extraction for *Areca catechu* L. With this method, the RNA bands were clear without degradation, the ratio of OD_{260}/OD_{280} were 1.8~2.0, and yield of total RNA 120 $\mu\text{g/g}$. The RNA was suitable for RT-PCR and cDNA synthesis, and can be used for the following-up molecular biology operations.

Key words: *Areca catechu* L. Yellow leaf disease RNA extraction Guanidine isothiocyanate method

槟榔 *Areca catechu* L. 属棕榈科, 多年生药用植物, 是海南省第二大经济作物。而黄化病是严重危害槟榔生产的一种毁灭性病害, 对其发病原因及致病因子至今没有一个明确的结论。传统植物病害检测方法已不能解决这一问题, 从基因组 RNA 入手是可以帮助了解更多关于槟榔黄化病的信息, 开启新的思路。

提取高质量的 RNA 是进行分子生物学研究的基础, 关于植物 RNA 提取的方法很多, 常用的有 CTAB 法、Trizol 法、异硫氰酸胍法等, 这些方法已经在很多植物上应用并成功提取出 RNA, 但由于植物

化学组份的差异, 没有一种特定的方法适合于所有植物的 RNA 提取^[1]。目前还没有关于槟榔组织 RNA 提取的相关报道, 为了得到高质量的 RNA 对其进行后续研究, 本研究分别采用 CTAB 法、Trizol 法、异硫氰酸胍法提取槟榔黄化病组织 RNA; 对 3 种方法进行比较, 并通过反转录及 cDNA 的合成对提取的 RNA 的质量进行检验。

1 材料与方法

1.1 材料

槟榔黄化病组织取自海南省万宁市槟榔园,

收稿日期: 2010-01-13

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2007BAI27B03)

作者简介: 周亚奎, 男, 硕士, 研究方向: 植物病理学; E-mail: zhouyakui163@163.com

通讯作者: 魏建和, 男, 研究员, 博士, 研究方向: 药用植物分子育种和栽培; E-mail: jhwei@implad.ac.cn

分别取茎、叶、花为 RNA 提取材料。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;异硫氰酸胍、DEPC 和 CTAB 购自北京鼎国生物公司;反转录试剂盒购自 Clontech 公司;引物由上海生工生物有限公司合成;其他各种试剂均为 RNA 试验专用。试验所用的玻璃、金属等制品均在 180℃ 下烘 4 h 以上。塑料制品均用 0.1% DEPC 水溶液中浸泡过夜并经高压灭菌处理。其它仪器设备和试剂均保证干净且无 RNAase 污染。

1.2 RNA 提取方法

1.2.1 CTAB 法 参考 Bekesiova 等^[2]的方法稍作修改。液氮研磨 0.1 g 新鲜的槟榔组织,快速转移样品至盛有预热 CTAB 提取液[2% CTAB(W/V), 2% PVP(W/V), 25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-Cl pH8.0, 2 mol/L NaCl, 3.4 mmol/L Spermidine(亚精胺), 2%(V/V)巯基乙醇]的离心管中,立即涡旋 30 s, 65℃ 水浴 30 min, 期间小心混匀 2~3 次。加入 1 mL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)并充分混匀, 4℃, 10 000 r/min, 离心 15 min。将上清液转移至一新的 2 mL 离心管中,重复抽提 1 次。在上清液中加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 使 LiCl 的终浓度为 2 mol/L, -20℃ 沉淀过夜。4℃, 10 000 r/min, 离心 20 min, 弃上清, 用 70% 乙醇小心洗涤沉淀 2 次, 室温下风干。用 500 μ L DEPC 水溶解沉淀, 转移至 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 充分混匀, 4℃, 10 000 r/min, 离心 15 min。加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2), 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 2 h。4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 用 70% 乙醇小心洗沉淀 2 次, 室温干燥后用 50~100 μ L DEPC 水溶解, 待测。

1.2.2 异硫氰酸胍法 参考 Gehrig 等^[3,4]的方法稍作修改。取 0.1 g 新鲜组织置于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成均匀的粉末。将粉末移入预冷的 2 mL 离心管中, 并向其中加入 0.75 mL 异硫氰酸胍变性液[4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mol/L 柠檬酸钠(pH7.0), 25 mmol/L 十二烷基肌氨酸钠, 1%(V/V)巯基乙醇], 轻轻摇动离心管使混合均匀。按顺序加入 1/4 体积 2 mol/L NaAc(pH4.0)、1 mL 水饱和酚/氯仿/异戊醇, 每加入一种试剂都轻轻摇动离心管混合均匀, 最后将离心管盖紧, 倒转几

次混合均匀, 室温放置 10 min。4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 将上层水相转移至另一新离心管, 并加入等体积的异丙醇, 混匀后置于 -20℃ 沉淀 2 h。4℃, 10 000 r/min, 离心 15 min, 小心去除上清液, 沉淀溶解于 0.75 mL 异硫氰酸胍变性液中, 加入等体积氯仿/异戊醇。4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min。小心转移上清液, 加入等体积的异丙醇, 混匀后置于 -20℃ 沉淀 2 h。4℃, 10 000 r/min, 离心 15 min, 小心去除上清液。沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 晾干后溶于 50~100 μ L DEPC 水中, 置于 -70℃ 低温条件下保存。

1.2.3 改良的 Trizol 试剂法 参考王昆等^[5]方法。取 0.1 g 新鲜组织置于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成均匀的粉末, 加入 1 mL Trizol 试剂、1% β -巯基乙醇、1% PVP, 迅速混匀置冰上静置 5 min。加入 50 μ L 2 mol/L NaAc(pH4.2), 200 μ L 氯仿/异戊醇(24:1)震荡混匀, 再缓慢加入 150 μ L 无水乙醇和 100 μ L 5 mol/L KAc(pH4.8), 充分混匀, 冰上静置 10 min。4℃, 12 000 r/min, 离心 20 min, 取上层水相, 加入等体积的 Tris 饱和酚/氯仿(25:24), 轻摇 5 min。4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 将上清液转移到新管中, 用氯仿/异戊醇(24:1)重复抽提至界面澄清。向上清液中加入 2/3 体积的异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2), -20℃ 沉淀 3 h。4℃, 12 000 r/min, 离心 20 min, 沉淀经 75% 乙醇洗涤两次, 风干, 50 μ L DEPC 水溶解。加入 150 μ L 0.3 mol/L NaCl, 混匀, 室温离心 20 min, 吸取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇和 3 mol/L NaAc(pH5.2), -20℃ 沉淀 30 min。4℃, 12 000 r/min, 离心 20 min, 沉淀经 75% 乙醇洗涤 2 次, 风干, 50 μ L DEPC 水溶解。

1.3 RNA 的纯度、完整性及质量检测

1.3.1 RNA 的纯度及完整性 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V, 25 min, 检测 RNA 的完整性。用紫外可见分光光度计测定 RNA 的 OD 值和浓度(μ g/ μ L), 根据数值分析 RNA 的纯度。

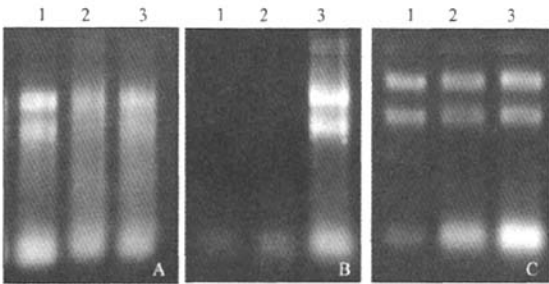
1.3.2 cDNA 双链合成 对不同方法提取的 RNA 分别进行反转录及双链合成, 按 Clontech 公司的说明书进行操作。反转录第一条 cDNA 的合成使用随机引物 5'-GTTTCCCAGTAGGTCTCNNNNNNN-3',

第二链扩增使用引物 5'-CGCCGTTTCCCAGTAG-GTCTC-3',取 1 μ L 第一链产物作为模板,95℃ 预变性 1 min,先进行 5 个循环(95℃ 变性 5 s,25℃ 退火 5 s,68℃ 延伸 6 min),再扩增 25 个循环(95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 5 s,68℃ 延伸 6 min),最后再延伸 5 min。反应完成后,取 5 μ L 电泳检测结果。

2 结果

2.1 RNA 完整性分析

电泳结果(图 1)显示,改良的 Trizol 法可以从茎、叶、花中提取到 RNA,但是降解严重。CTAB 法只能提取出花中的 RNA,且也存在降解现象。只有改良的异硫氰酸胍法从槟榔的茎、叶、花组织中提取出总 RNA,带型清晰,28S rRNA 和 18S rRNA 的条带比例合适,没有降解。经紫外分光光度计测定 230 nm、260 nm、280 nm 的 OD 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.8 - 2.0 之间,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 大于 2.0,表明所提的 RNA 纯度较高,而且 RNA 的产率也明显比前两种方法提取的产率高,达到 120 - 200 μ g/g 之间。每种方法均通过 3 次以上试验,具有可重复性。

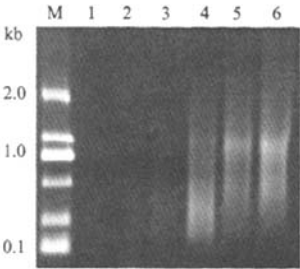


A. 改良的 Trizol 试剂法;B. CTAB 法;C. 异硫氰酸胍法;
1. 茎;2. 叶;3. 花

图 1 不同提取方法提取槟榔黄化病组织 RNA 电泳图

2.2 RT-PCR

为了进一步证明 3 种方法提取的总 RNA 的纯度和完整性,分别以 3 种总 RNA 为模板,使用 Super SMART PCR cDNA Synthesis 试剂盒进行 cDNA 合成。从扩增结果(图 2)可以看出,异硫氰酸胍法扩增得到的双链 cDNA 片段大小主要分布在 0.2 - 2.0 kb 之间,表明提取的总 RNA 质量较好,基本无降解。CTAB 法扩增没有得到任何片段(图略)。



M. DL 2000 DNA Maker ;1 - 3. 分别为改良的 Trizol 法提取的茎、叶、花;4 - 6. 分别为异硫氰酸胍法提取的茎、叶、花

图 2 改良的 Trizol 法和异硫氰酸胍法总 RNA 进行 RT-PCR 电泳图

3 讨论

提取完整的植物总 RNA,选择合适的材料是关键,要尽可能的有代表性,所以选取槟榔 3 个不同组织进行提取 RNA。

槟榔组织中含有大量的多糖和酚类物质,在氧化条件下,酚类物质会产生褐化效应^[6,7],被氧化成多醌后不可逆地结合到核酸上并与 RNA 共沉淀,导致提取得到的 RNA 质量较差。笔者在采用改进异硫氰酸胍法提取 RNA 时发现,提取过程中加入巯基乙醇能明显改善褐化现象,并提高 RNA 的质量,而且巯基乙醇作为强还原剂能防止多酚氧化,还可以打断多酚氧化酶的二硫键而使之失活。异硫氰酸胍是已知的作用最强的蛋白变性剂,它在裂解细胞的同时能迅速使 RNA 酶失活,很好的抑制了 RNA 酶的活性。十二烷基肌氨酸钠是强的蛋白变性剂,和酚一起对蛋白起作用,同时也可抑制 RNA 酶的活性。在提取过程中加入 NaAc 以及偏酸性的苯酚,也有助于除去 DNA 的干扰。该方法具有提取快速,所需操作时间短等特点,减少了 RNase 污染的几率。

不同的植物材料内含物质组分及含量有很大不同,需要有针对性地选择不同的 RNA 提取方法。本研究针对槟榔组织的特点,在采用改进的异硫氰酸胍法提取到较高质量的 RNA,并在此基础上成功进行了双链 cDNA 的合成,为后续研究打下了良好的基础,也为其他类似植物的 RNA 制备提供了理论参考。

参考文献

- [1] 徐昌杰,陈坤松,张波,等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究. 果树学报, 2004, 21(2):136-140.
- [2] Bekesiova I, Nap JP, Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Anal Biochem*, 1987, 163:16-20.
- [3] Gehrig HH, Winter K, Cushman J, et al. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18:369-376.
- [4] 袁贞,沈文涛,周鹏. 番木瓜果实总 RNA 提取方法比较. 广东农业科学, 2008(10):76-79.
- [5] 王昆,王颖,鲍永利,等. 提取高质量人参 RNA 的方法研究. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(1):95-99.
- [6] Clark MS. *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual* [M]. New York:Spring Verlag Berlin Herdelberg, 1997:152-158.
- [7] SU X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae. *Anal Biochem*, 1988, 174(3):650-657.
- ~~~~~
- (上接第 144 页)
- [5] Baum JA, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotech*, 2007, 25:1322-1326.
- [6] Isabel V, Ary H, Mallik M, et al. Identification of aphid species (Homiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene. *Australian Journal of Entomology*, 2007, 46(4):305-312.
- [7] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4):279-289.
- [8] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23):13959-13964.
- ~~~~~
- (上接第 149 页)
- [16] Trolinder NL, Goodin JR. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*): II. Requirements for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1988, 12:43-53.
- [17] Finer JJ. *Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton, Gossypium hirsutum L.* *Plant Cell Rep*, 1988, 7:399-402.
- [18] Gawel NJ, Robacker CD. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1990, 23:201-204.
- [19] Voo KS, Rugh CL, Kamalay JC. Indirect somatic embryogenesis and plant recovery from cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1991, 27:117-124.
- [20] 张献龙,孙济中,刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生. 遗传学报, 1991, 18(5):461-467.
- [21] Firoozabady E, DeBoer DL. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *In Vitro Cell Dev*, 1993, 29(4):166-173.