

## 血红鸡爪槭叶片总 RNA 提取方法的比较研究

张琰<sup>1</sup>, 安龙杰<sup>2</sup>, 史宝胜<sup>2</sup>, 卓丽环<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>上海农林职业技术学院, 上海松江 201600; <sup>2</sup>河北农业大学, 河北保定 071000)

**摘要:** 血红鸡爪槭叶片中富含多糖、多酚物质, 严重影响了 RNA 提取纯度和质量。为了获得适宜血红鸡爪槭叶片总 RNA 提取的方法, 采用柱式植物 RNAout 法、TRIZOL 法和改良 CTAB 法 3 种提取方法对其叶片总 RNA 提取效果进行比较分析。结果显示, 采用柱子法提取获得的总 RNA 产率最高, 但是有 DNA 污染; TRIZOL 法提取的总 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.65, 可能有多糖和酚类物质的污染, 并且产率最低; 改良 CTAB 法提取的总 RNA 纯度很高, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 平均值在 2.0 左右, 产率在上述 2 种方法之间, 电泳图清晰, 而且改良 CTAB 法提取的总 RNA, 经 RT-PCR 获得了清晰的特异性条带。表明改良 CTAB 法提取的总 RNA 纯度和产率高, 完全可以满足进一步分子生物学研究的需要, 是血红鸡爪槭叶片总 RNA 提取的适宜方法。

**关键词:** 血红鸡爪槭; 总 RNA 提取; RT-PCR

中图分类号: S687.9, S792.35

文献标志码: A

论文编号: 2010-1622

### Comparison of Total RNA Isolation from the Leaf of *Acer palmatum*

Zhang Yan<sup>1</sup>, An Longjie<sup>2</sup>, Shi Baosheng<sup>2</sup>, Zhuo Lihuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Vocational Technical College of Agriculture & Forestry, Songjiang Shanghai 201600;

<sup>2</sup>Hebei Agriculture University, Baoding Hebei 071000)

**Abstract:** The polysaccharides and polyphenols in *Acer palmatum* leaves have seriously affected the purity and quality of RNA extraction. In order to obtain the appropriate method of total RNA extraction, three methods of column plant RNAout, TRIzol reagent and improved CTAB were chosen for comparison analysis of total RNA extraction from *Acer palmatum*. Total RNA extracted by column plant RNAout method had the highest yield, but the worst quality due to the pollution of DNA. The worst quality of total RNA by TRIzol method was due to the lowest yield and the pollution of carbohydrate and phenols. By use of the improved CTAB method, the ration value of OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> of total extracted RNA was 2.0, as well its clear electrophoresis pattern showing the good quality, high purity and higher yield. So the improved CTAB method was suitable for the total RNA isolation from the leaf of maple. The total RNA was used for RT-PCR and the specific band could be observed in agarose gel. The results demonstrated that the quality and purity of the RNA obtained by the improved CTAB method could meet the demands of molecular biology experiment. The improved CTAB method was the appropriate method of extraction the total RNA in *Acer palmatum* leaves.

**Key words:** *Acer palmatum* 'Bloodgood'; extraction of total RNA; RT-PCR

### 0 引言

血红鸡爪槭(*Acer palmatum* 'Bloodgood')为槭树科鸡爪槭的变种, 是种非常美丽的观叶树种, 其叶形优

美, 红色鲜艳持久, 枝序整齐, 层次分明, 错落有致, 树姿美观, 宜布置在草坪中央, 高大建筑物前后、角隅等地, 红叶绿树相映成趣; 也可盆栽做成露根、倚石、悬

**基金项目:** 上海市教育发展基金会晨光计划项目(2007CGB17); 河北农业大学“鸡爪槭差减文库构建”横向课题。

**第一作者简介:** 张琰, 女, 1981 年出生, 硕士, 讲师, 主要从事园林植物及应用方面的研究。通信地址: 201600 上海市松江区中山二路 658 号 上海农林职业技术学院园艺园林系, E-mail: zhangyan8108@163.com。

**收稿日期:** 2010-05-25, **修回日期:** 2010-10-25。

崖、枯干等样式,风雅别致。

近几年来,关于血红鸡爪槭的研究报道较多,内容主要涉及植物生理和组织培养等方面;但有关其分子生物学的研究报道较少,从植物组织中提取高质量的总RNA是开展各项植物分子生物学的前提和基础,是研究基因表达的重要环节。目前,已有许多关于植物组织RNA提取的研究<sup>[1-5]</sup>,最常用的有异硫氰酸胍法<sup>[6]</sup>、CTAB法<sup>[7]</sup>、SDS-苯酚法<sup>[8]</sup>及各种试剂盒法等。目前这些方法都已成功运用到植物组织RNA提取过程中,但由于血红鸡爪槭为彩色叶植物,含有较多的多糖和多酚,尤其是多酚物质对核酸的提取产生很大的困难,从而影响下一步的分子生物学研究。为此,笔者采用植物柱子法、TRIZOL法和改良CTAB法<sup>[9]</sup>提取血红鸡爪槭叶片总RNA。通过RNA纯度、电泳图谱、得率等分析并确立了适于血红鸡爪槭叶片总RNA提取的方法,为深入进行血红鸡爪槭的分子生物学研究奠定了基础,为其他彩色叶树种的总RNA提取也有借鉴意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

血红鸡爪槭叶片选自大田生长良好的植株。

柱式植物RNAOUT购自TIANDZ公司,TRIZOL试剂盒购自Invitrogen公司,改良CTAB法药品均是自己配制,反转录试剂盒购自TaKaRa公司,引物由上海生工设计。

供试试剂(除含Tris者)和塑料耗材预先用0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)37℃处理24 h以上,然后湿热灭菌;研钵等玻璃制品均180℃高温干热灭菌12 h以上以避免RNA酶的污染<sup>[10]</sup>。

### 1.2 总RNA提取方法

1.2.1 柱式植物RNAOUT方法 称取100 mg的血红鸡爪槭叶片,经液氮研磨后,参照试剂盒说明的方法提取。

1.2.2 TRIZOL法 称取100 mg血红鸡爪槭叶片,经液氮研磨后,参照试剂盒说明的方法提取。

### 1.2.3 改良CTAB法

(1)取100 mg血红鸡爪槭叶片置液氮种冷冻,研磨成粉,迅速置入盛有1 mL RNA提取缓冲液1(含100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol/L EDTA(pH 8.0)、1.4 mol/L NaCl)的离心管中,再加入1%  $\beta$ -巯基乙醇,颠倒混匀,置于冰浴中30 min,其间不断混匀,防止样品结冻凝固于管底。

(2)于4℃下以12000 r/min离心1 min,弃上清,加

入700  $\mu$ L 65℃预热的RNA提取缓冲液2(含20 g/L CTAB、20 g/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、25 mmol/L EDTA与2 mol/L NaCl),加1%  $\beta$ -巯基乙醇,震荡混匀,于65℃水浴20 min,离心10 min。

(3)吸取上清液于新离心管中,每管加入等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻轻颠倒混匀,冰上放置10 min,4℃条件下12000 r/min,离心10 min。

(4)吸取上清于新离心管中,每管加入1/20体积4 mol/L KAc(pH 5.5)、1/10体积-20℃预冷的无水乙醇,轻轻颠倒混匀,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀,冰上放置10 min。

(5)4℃条件下12000 r/min,离心10 min。

(6)取上清于新离心管中进行RNA的沉淀。上清液中加入1/3体积的LiCl(8 mol/L)<sup>[8]</sup>,使LiCl终浓度为2 mol/L,再加入1%  $\beta$ -巯基乙醇。4℃过夜沉淀。

(7)4℃条件下12000 r/min,离心15 min;弃上清,用75%乙醇漂洗沉淀,然后再12000 r/min,离心5 min。

(8)沉淀微干后加入500  $\mu$ L SSTE(含0.5% SDS、10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)、1.0 mol/L NaCl)缓冲液溶解沉淀,加入等体积氯仿:异戊醇抽提2次。

(9)转移上清后加入0.25倍体积的异丙醇和0.25倍的RNA沉淀剂(高盐溶液),充分混匀后,于室温放置10 min。

(10)4℃12000 r/min,离心10 min,收集沉淀;用75%乙醇漂洗2次,重复上述离心。

(11)用一次性枪头吸尽残存的乙醇;将打开管盖的离心管放在实验台上几分钟,使残存的乙醇挥发掉,不要让RNA干透。

(12)加50  $\mu$ L DEPC处理过的水,将RNA存储于-80℃备用。

### 1.3 RNA质量与浓度检测

取1  $\mu$ L RNA样品,用ND-1000核酸蛋白检测仪进行含量以及纯度的测定。取5  $\mu$ L RNA加1  $\mu$ L 6 $\times$  Loading Buffer,然后在1.0%琼脂糖凝胶和1 $\times$ TAE缓冲液下,10 V/cm稳压压条件下电泳15 min,对RNA纯度和完整性进行电泳检测。

### 1.4 RT-PCR验证

以提取的总RNA为模板进行反转录,合成cDNA第一条链。具体方法参照PrimeScript Reverse Transcriptase试剂盒说明书进行的。PCR扩增的引物按照花青素合成酶ANS序列设计(P51:

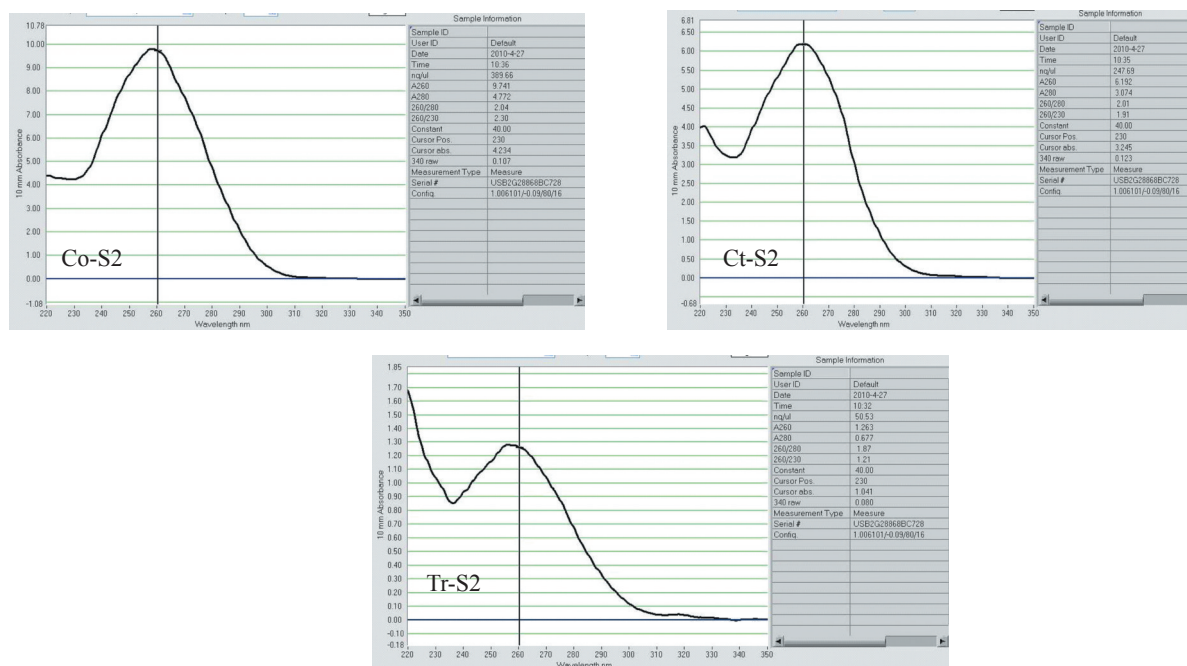


图1 血红鸡爪槭叶片总 RNA 含量测定图谱

表1 总 RNA 的质量与产率

提取方法	样品	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	产率/(μg/g)
植物柱子法	Co-S1	2.04	2.30	194.830
	Co-S2	2.04	2.31	201.635
改良 CTAB 法	Ct-S1	2.01	1.91	123.845
	Ct-S2	1.94	2.02	132.446
TRIZOL 法	Tr-S1	1.71	1.33	8.799
	Tr-S2	1.65	1.21	25.265

5'-CCAGCGATCCCAAAAGAGT-3'; P31: 5'-TGGGCG GCTCACAGAAAAC-3')。扩增反应体系为 50 μL, 依次加入模板 cDNA 2 μL, 引物 P51 和 P31 各 2 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 34.5 μL, Taq 酶 0.5 μL。

反应扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s; 30 次循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的质量与产率

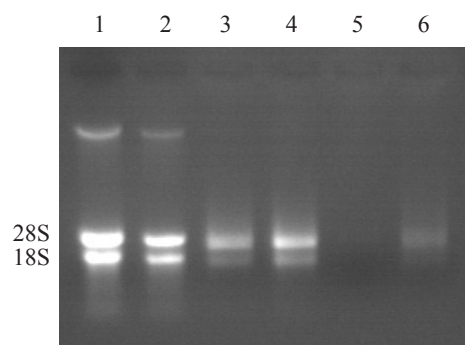
利用 ND-1000 核酸蛋白检测仪测定 3 种提取方法所获得的血红鸡爪槭叶片 RNA 含量(如图 1), 总 RNA 纯度及产率的计算结果见表 1。

一般而言, 通过 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 作为参考值来检测 RNA 纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.9~2.1 之间, 可以认为 RNA 的纯度较好。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值小于 1.8, 则表明蛋白、多糖和酚类物质较多。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值大于 2.2, 则表明

RNA 已经降解。OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 值应大于 2.0, 若小于 2.0, 则表明裂解液中有酚类物质和 β-巯基乙醇残留。3 种方法经核酸分析仪检测后, 发现植物柱子法产率最高, 但是有严重的 DNA 污染; TRIZOL 法不仅产率低, 并且 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 仅为 1.65, 可能有酚类物质的污染, 这与胡晓静等<sup>[1]</sup>报道的基本一致。改良 CTAB 法纯度很高, 并且产率也较高。

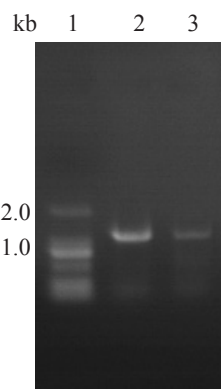
### 2.2 血红鸡爪槭叶片总 RNA 样品的电泳检测

RNA 样品的凝胶电泳分析是判断 RNA 质量的一种重要手段, 从电泳胶上 18S 和 28S rRNA 的完整性可以判断 RNA 有无降解及降解程度, 也可以判断有无 DNA 污染。如图 2 所示, 柱式植物 RNAout 法提取得到的总 RNA, 18S 和 28S 条带清晰, 并且 28S 亮度是 18S 的 2 倍左右, 也没有降解的迹象, 但是有明显的 DNA 污染, TRIZOL 法提取的总 RNA, 18S 和 28S 条带不清晰, 亮度过弱, 有降解的迹象, 改良 CTAB 法提取的总 RNA, 18S 和 28S 条带清晰, 28S 亮度是 18S 的 2 倍



1~2: 柱式植物RNAout法; 3~4: 改良CTAB法; 5~6: TRIZOL法

图2 血红鸡爪槭叶片RNA琼脂糖凝胶电泳图



1: DL 2000 marker; 2~3: 特异性PCR产物

图3 RT-PCR特异性扩增产物电泳图

左右,没有降解迹象,也未发现DNA的污染。

### 2.3 血红鸡爪槭叶片RNA样品的cDNA的合成及质量检测

用改良的CTAB方法提取的RNA作为模板进行反转录,将合成的cDNA进行特异性扩增DNA,以检测RNA的质量。RT-PCR电泳结果如图3所示,以cDNA为模板进行特异性扩增得到一条清晰的特异性条带,说明了反转录合成的cDNA质量很好,这进一步说明用改良CTAB法提取的RNA具有较高的质量,可供分子生物学实验使用。

### 3 讨论

大多数植物,尤其是彩叶植物都含有多糖和酚类物质,血红鸡爪槭跟其他彩叶植物比较,其植株体内多糖和酚类物质的含量更高,这2种物质严重影响RNA提取的质量和产率,所以有效去除多糖和酚类物质是成功提取高质量RNA的关键。多糖的许多理化性质与RNA很相似,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产量的减少;而在沉淀RNA时,也产生多糖的凝胶状沉淀,这种含有多糖的RNA沉淀难溶于水,或溶解后产生粘稠状的溶液<sup>[10]</sup>。由于多糖可以抑制许多酶的活性,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。笔者建立的改良CTAB法与前人研究<sup>[9]</sup>不同的是在利用CTAB提取液2裂解细胞之前,先进行提取缓冲液1抽提,去除细胞内部分可溶性糖、蛋白、色素等物质,在酚:氯仿:异戊醇抽提时分层界限清晰,上清液粘度大大降低,易于吸取,因此这一步显著降低了糖、蛋白的含量,对多糖含量高的植物RNA提取是关键步骤之一。

在进行植物材料研磨和匀浆时,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,这一现象被称为褐化效应(browning effect)。被氧化的酚类化合物(如醌类)能与RNA稳定地结合,从而影响RNA的分离纯化<sup>[11]</sup>。酚类物质的去除,关键的是防止酚类氧化。 $\beta$ -巯基乙醇能够抑制多酚氧化酶的活性,进而抑制多酚氧化,宋蓓等<sup>[9]</sup>采用改良CTAB-LiCl法提取枣总RNA时在提取缓冲液2中加入了1%的 $\beta$ -巯基乙醇就达到理想的效果,但对于多酚含量高的血红鸡爪槭来说,仅此一步远远不够,提出的总RNA颜色微红,难以溶解。因此经过多次探究,分别在提取缓冲液1、2中加入了1%的 $\beta$ -巯基乙醇。除此之外,LiCl沉淀这一步也必须加入1%的 $\beta$ -巯基乙醇,才能达到理想的去除效果。

### 4 结论

在前人的研究基础上,比较了柱式植物RNAout法、TRIZOL法和改良CTAB法提取血红鸡爪槭总RNA的提取效果,主要结论如下:

(1)建立了一套适合于血红鸡爪槭总RNA提取的改良CTAB法,也为多糖多酚含量高的其他彩叶植物总RNA提取提供借鉴。

(2)改良的CTAB法获得高质量的总RNA,可进行Northern杂交分析,mRNA纯化以用于体外翻译或建立cDNA文库,RT-PCR或基因差异显示分析等分子生物学研究。

(3)改良的CTAB法用时较短,可操作性强,药品廉价,试验成本低。

### 参考文献

- [1] 胡晓静,何培民.条斑紫菜丝状体总RNA提取方法比较[J].生物技术通讯,2007,18(4):604-607.
- [2] 徐昌杰,陈昆松,张波,等.柑橘组织RNA提取方法研究[J].果树学报,2004,21(2):136-140.
- [3] 董占强,翟晓巧,范围强,等.泡桐叶片RNA提取方法的研究[J].河

- 南农业大学学报,2009,43(1):40-43.
- [4] 侯义龙,张开春,吴禄平,等.果树组织中总 RNA 提取的新方法[J].沈阳农业大学学报,2002,33(2):122.
- [5] 王玉成,杨传平,姜静.木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J].东北林业大学学报,2002,30(2):1-4.
- [6] CHOMCZYNSKIP, SACCHIN. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanale- phenol- chloroform extraction [J]. Analytical Biochemistry,1987,162:156-159.
- [7] CHANG S J, JEFF P, JOHN C. A Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J].Plant Molecular Biology Reporter, 1993,11(2):113-116.
- [8] VANDRIESSCHE E S, BECCKMANSS, DEJAEGERE R, et al. The antioxidant of choice for the urification of protein from phenol-rich tissues[J]. Anal. Biochem,1984,141:184-188.
- [9] 宋蓓,赵锦,刘孟军,等.改良 CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立[J].中国农学通报,2007,23(7):79-83.
- [10] 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.
- [11] 肖洁凝,黄学林,黎茵,等.富含多糖和次生物质的果叶总 RNA 的提取[J].中国生物工程杂志,2003(11):83-86.