

文章编号:1674-7054(2010)03-0202-04

一种适合香蕉根系总 RNA 提取的方法

王甲水^{1,2}, 张建斌¹, 贾彩虹¹, 刘菊华¹, 金志强¹

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101;
2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘要: 利用改良 SDS 法、改良 CTAB 法、SDS 法和 QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取法分别提取香蕉幼根和老根的总 RNA, 并对提取的总 RNA 的完整性、纯度等进行比较。结果表明: 改良的 SDS 法提取的总 RNA 在清晰度、纯度、完整性和回收率上均高于其他 3 种方法所提取的。

关键词: 香蕉根系; 改良 SDS 法; 植物总 RNA; 提取

中图分类号: Q 782 **文献标志码:** A

香蕉为大型多年生的草本果树, 属于单子叶纲芭蕉属植物, 是热带、亚热带地区最重要的水果之一, 也是仅次于水稻、小麦、玉米的世界第四大作物^[1]。香蕉易受霜害、风害、旱害、热害、盐渍、涝害以及病虫害的影响。其中, 旱害、盐渍、涝害、香蕉枯萎病^[2]以及根结线虫病^[3]等病害都是通过对根部侵害继而影响整个植株。香蕉根 RNA 的分离提纯是香蕉根分子生物学研究的前提。高质量、高纯度、完整性好的 RNA 是 cDNA 文库构建、筛选相关基因的重要条件。国内已有高质量香蕉果实总 RNA 提取方法的报道^[4-6], 但提取香蕉根 RNA 的相关报道很少。目前, 植物材料总 RNA 提取的常用方法有异硫氰酸胍法、苯酚法、SDS 法、CTAB 法及 Trizol 试剂盒法等^[7], 香蕉果实总 RNA 提取法多为改良 CTAB 法^[4-6]。不同种植物或同种植物的不同组织, 甚至同一组织在不同生长发育时期, 用同种方法提取的 RNA 质量都可能存在差异^[8]。香蕉组织不仅具有坚硬的细胞壁, 而且富含大量的脂质、蛋白质、多糖和酚类物质等多种次生代谢物^[9]。这些次生代谢物对香蕉总 RNA 的分离和纯化有严重干扰, 同时影响 RNA 提取量。已有文献报道香蕉根中某些成分对其 RNA 的提取影响最为严重^[10]。本实验参考其他植物根部总 RNA 提取方法^[11-14], 并根据香蕉根的特点进行优化改进, 建立了一种能有效分离并获得高质量的香蕉根部总 RNA 的提取方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料及预处理 香蕉老根采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所实验基地中组培苗移栽后 6 个月的植株。香蕉幼根来自中国热带农业科学院热带生物技术研究所香蕉组培中的五叶一心的组培苗。用 $\varphi = 0.1\%$ 的 DEPC 处理过的无菌水洗净根部的泥土和异物, 用无菌纸快速吸干根部残留的水滴, 立即用液氮冷冻备用。

1.2 试剂和提取缓冲液 实验所用主要试剂有 QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取总 RNA (胍盐法)。所有试剂 (Tris 试剂例外) 和塑料耗材均需预先用 $\varphi = 0.15\%$ 的 DEPC 处理 24 h 以上, 然后 121 °C 高温灭菌 40 min, 70 °C 烘干; 研钵、玻璃器皿等物品则经 200 °C 高温烘烤 8 h 以上, 以避免 RNase 的污染。

收稿日期: 2010-05-03

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-029); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nyeytx-33)

作者简介: 王甲水(1982-), 男, 山东日照人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 金志强(1962-), 男, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所研究员. E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com

改良 SDS 提取液: $w = 3\%$ 的十二烷基硫酸钠 (SDS), $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH7.4), $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $w = 0.5\%$ 皂土。

改良 CTAB 提取液: $w = 2\%$ 的 CTAB, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH8.0), $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0), $w = 5\%$ 的 PVP。

1.3 方法

1.3.1 改良 SDS 法 称取 2 g 新鲜香蕉根用液氮迅速研磨至粉末状,将香蕉粉末转入装有 0.6 mL 改良 SDS 提取缓冲液(含有 $100 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇)的离心管中,将离心管置于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 20 min,再于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷却 20 min 后,进行 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。然后加入等体积的 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAc (pH4.8),温和混匀,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 15 min,然后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。然后加入 2 倍体积的 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 无水乙醇,置于冰上 3 h,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取沉淀物。将沉淀物溶于适量 RNase-free 水中,加入 $600 \mu\text{L}$ 水平衡酚后剧烈涡旋震荡 2 min,于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,抽提 2 次,取上清液。在上清液中加入 $600 \mu\text{L}$ 氯仿后剧烈震荡 30 s,于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液。在上清液中加入 2 倍体积的 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 无水乙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH5.2),于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下沉淀 1 h,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取沉淀物。沉淀物用 $\varphi = 75\%$ 的乙醇洗涤 2 次,干燥后,用适量 RNase-free 水充分溶解,加入等体积的 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜,再在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。沉淀用 $\varphi = 75\%$ 酒精洗涤 2 次,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集沉淀。用适量 RNase-free 水完全溶解沉淀,于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

1.3.2 改良 CTAB 法 香蕉根用液氮研磨至粉末状,将香蕉的粉末转入 0.6 mL 改良 CTAB 提取缓冲液(含有 $100 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇)中混匀后,置于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液。在上清液中加入等体积的 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAc (pH4.8),温和混匀,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 15 min,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。在上清液中加入 2 倍体积的 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 无水乙醇,置于冰上 3 h,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取沉淀物。将沉淀物溶于 RNase-free 水中,加入等体积的 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取沉淀物;将沉淀物溶于 RNase-free 水,分别用水饱和酚及氯仿各抽提 1 遍,取上清液。在上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH5.2),于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀 30 min,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 收集沉淀,并用 $\varphi = 75\%$ 的酒精洗沉淀 3 次,最后溶于 RNase-free 水中。

1.3.3 SDS 方法 SDS 方法参考 Bugos 法^[15]。

1.3.4 QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取总 RNA(胍盐法) QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取总 RNA(胍盐法),依据试剂盒说明进行。

1.4 RNA 完整性和纯度分析

1.4.1 电泳分析 RNA 完整性 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳在 $1 \times \text{TAE}$ 中进行,琼脂糖为 $w = 1\%$ 琼脂糖。 $1 \mu\text{L}$ 上样量,80 V 恒压 30 min,然后在紫外凝胶成像系统中观察所提取 RNA 的完整性。

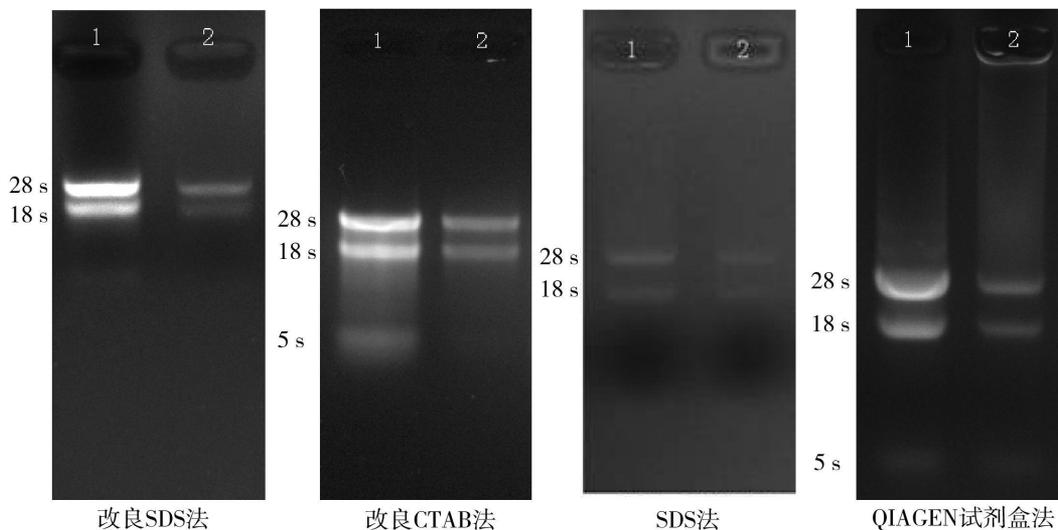
1.4.2 RNA 纯度鉴定 取 $1 \mu\text{L}$ 样品,稀释 50 倍,在紫外分光光度计下测量其在 230 nm,260 nm 和 280 nm 处的紫外吸光值(A)。计算 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的吸光度比值,用于纯度分析,依据以下公式计算 RNA 回收率。

$$\text{RNA 回收率}(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = (\text{A}_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} \times \text{原液体积}) / \text{提取样品质量}(\text{g})$$

1.4.3 PCR 分析 用 Fermentas 的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第一链。RT-PCR 以香蕉看家基因 Ma-actin1 (基因登录号 AF285176) 为内参,同样在非保守区设计 1 对引物,扩增长度为 379 bp,其中 ACTIN5' 为上游引物,ACTIN3' 为下游引物。ACTIN5':5' - CGAGGCTCAATCAAAGA - 3'; ACTIN3':5' - ACCAGCAAGGTCCAAAC - 3'。反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^\circ\text{C}$,30 s;55 $^\circ\text{C}$,40 s;72 $^\circ\text{C}$,50 s 30 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。扩增结束后,取 $4 \mu\text{L}$ 进行电泳检测,模板的浓度为 RNA 反转录的 cDNA 稀释 50 倍。

2 结果

2.1 香蕉根总 RNA 的电泳分析 从图 1 可以看出,改良 SDS 法、改良 CTAB 法、SDS 法和 QIAGEN 试剂盒法均可提取香蕉根总 RNA,没有基因组污染,但相比而言改良 SDS 法对香蕉根提取效果较好。在改良 SDS 法中,无论是香蕉组培苗幼根还是香蕉老根,所提取的 RNA 基本没有发生降解和 DNA 污染,28 s 的亮度几乎是 18 s 亮度的 2 倍。改良 CTAB 法的提取效果也不错,但出现 RNA 的降解情况。SDS 法出现拖尾现象,说明 RNA 中可能含有蛋白质或其他杂质,上样量是其他 3 种方法的 10 倍。QIAGEN 试剂盒法提取 RNA 出现拖尾现象,同时在点样空中有明显亮带,说明 RNA 中残留较多的蛋白质和其他杂质。可见,改良 SDS 法提取的总 RNA 完整性好、质量高,改良 CTAB 法次之。



1. 香蕉组培苗幼根; 2. 香蕉老根

图 1 4 种提取法提取的香蕉根总 RNA 电泳图比较

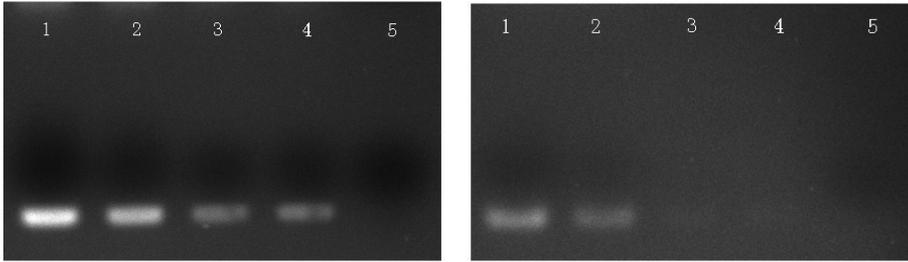
2.2 不同方法提取香蕉根总 RNA 的纯度和产量的比较分析 由表 1 可知,改良 SDS 法分离的香蕉根总 RNA 的纯度和产量明显优于其他 3 种方法所分离的。4 种方法的 A260 nm/A280 nm 比值均大于 2.0,但改良 SDS 法的 A260 nm/A280 nm 高于 2.20,这说明改良 SDS 法得到的 RNA 质量较高。改良 SDS 法的香蕉幼根总 RNA 回收率可达 $590 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上,但香蕉老根的总 RNA 回收率只有 $220 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。改良 CTAB 法分离的香蕉根总 RNA 的质量也较好,香蕉幼根总 RNA 的纯度较高,但产量略低于改良 SDS 法,香蕉老根回收率也较高,但 A260 nm/A230 nm 低于 1.80,这表明有多糖、酚、蛋白等次生代谢物的污染。

表 1 不同方法提取香蕉根总 RNA 的纯度和产量的比较

方法	根	吸光度比值		RNA 回收率/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
		A260 nm/A230 nm	A260 nm/A280 nm	
改良 SDS 法	幼根	2.03	2.35	590.36
	老根	1.95	2.20	220.32
改良 CTAB 法	幼根	1.85	2.03	452.03
	老根	1.78	2.02	270.10
SDS 法	幼根	1.82	2.10	0.66
	老根	1.80	2.06	0.32
QIAGEN 试剂盒法	幼根	1.70	2.03	310.32
	老根	1.32	2.05	25.36

2.3 RT-PCR 分析 从图 2 可见,4 种提取法提取的香蕉幼根总 RNA 经反转录后均能够用特异引物扩增出特异条带,其中,改良 SDS 法的特异条带具有清晰度高,亮度高,背景干扰小的特点。从图 3 可以看出,只有改良的 SDS 法和改良的 CTAB 法提取的香蕉老根总 RNA 经反转录后能够用特异引物扩增出特异

条带,其中,改良的 SDS 法的特异条带具有清晰度高,背景干扰小的特点,但亮度不高。在香蕉老根 RT-PCR 扩增结果中,SDS 法的上样量为 20 μL ,其他方法的上样量均为 4 μL ,这说明改良的 SDS 法更适合提取香蕉老根总 RNA。以上实验结果表明,改良的 SDS 法提取的总 RNA 具较高的反转录活性,这与 RNA 的完整性和纯度相关。



1. 改良的 SDS 法;2. 改良 CTAB 法;3. SDS 法;4. QIAGEN 试剂盒法;5. 负对照

图 2 香蕉幼根总 RNA RT-PCR 扩增结果

图 3 香蕉老根总 RNA RT-PCR 扩增结果

3 讨论

笔者参考了各种根系 RNA 提取的方法,并结合各种可能影响香蕉根 RNA 提取的因素,探索出了适合于提取完整性好、纯度高的香蕉根系总 RNA 的方法。相对于改良 CTAB 法,SDS 法和 QIAGEN 试剂盒法,改良 SDS 法提取香蕉幼根的总 RNA 具有较好的完整性、纯度高、回收率高和较高的转录活性的优点。改良的 SDS 法适当增加了细胞裂解时间,促进总 RNA 成分的释放; β -巯基乙醇和皂土的加入,不仅防止了根的褐化和 RNase 对 RNA 的影响,同时可减少实验中酚和氯仿的使用次数,减少提取中 RNA 的损失,这是改良 SDS 法提取获得较好的完整性、纯度高和产量高的香蕉幼根总 RNA 的重要步骤。

改良 SDS 法提取香蕉成熟根的总 RNA 的回收率相对较低,特别在提取腐烂和其他胁迫下的根系总 RNA 的效率会更低。这可能是由于这些根中总 RNA 含量低,也可能是腐烂的根系中含有一些物质严重影响 RNA 的提取。利用 QIAGEN 试剂盒法和改良 CTAB 法相结合,可以提高这些根系的总 RNA 的提取率。

参考文献:

- [1] PENARRUBIA L, KIM R, GIOVANNONI J, et al. Production of the sweet protein monellin intransgenic plants[J]. *Bio/Technol*, 1992, 19:561 - 564.
- [2] 赵丽华. 香蕉主要病虫害防治措施[J]. *现代农业科技*, 2008(15):164 - 165.
- [3] 吴发红, 黄东益, 黄小龙. 香蕉根结线虫病的生物防治研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(24):11614 - 11616.
- [4] 李燕强. 香蕉果实 RNA 提取方法的改进和比较[J]. *福建热作科技*, 2005, 30(2):37 - 39, 43.
- [5] 陈弟, 殷晓敏, 张荣意. 一种适合于提取香蕉果实总 RNA 的简便方法[J]. *广西热带农业*, 2008(2):3 - 5.
- [6] 刘海, 林德球, 徐杰, 等. 一种适合于富含多糖和酚类物质的香蕉果实 RNA 提取方法[J]. *果树学报*, 2006(1):136 - 137.
- [7] 王尉, 梁国鲁, 谢江辉. 香蕉不同组织中总 RNA 提取方法的研究[J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2007, (1):62 - 67.
- [8] INSWORTH C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (snrrcl) [J]. *Plant Mol Biol Repr*, 1994, 12:198 - 203.
- [9] 吴坤林. 香蕉的生物学特性及其组织培养技术[J]. *生物学通报*, 2006(10):5 - 8.
- [10] 李宏, 王新力, 彭学贤, 等. 香蕉不同组织中总 RNA 的有效分离[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(5):384 - 388.
- [11] 伍国强, 席杰军, 周向睿, 等. 一种改进的多浆旱生植物霸王叶和根总 RNA 提取方法[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1):197 - 200.
- [12] 张俊, 孙鹏, 周丽莉, 等. 麦冬根中总 RNA 的快速提取[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(2):255 - 257.
- [13] 贾永红, 孙艳香, 马小磊. 百脉根总 RNA 提取方法的优化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(24):10351 - 10353.
- [14] 杨元军, 王玉萍, 翟红, 等. 甘薯块根总 RNA 的高效快速提取方法[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1):193 - 196.
- [15] BUGOS R C, CHIANG V L, ZHANG X, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine [J]. *Biotechniques*, 1995, 19:734 - 737.

- [3] 徐锋, 武晓丽. 简易快速高效制备 T 载体[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (2):460 - 461.
- [4] HARRISON J, MOLLOY P L, CLARK S J. Direct cloning of polymerase chain reaction products in an *Xcm* I T-vector[J]. Anal Biochem, 1994, 216 (1):235 - 236.
- [5] SCHUTTE B C, RANADE K, PRUESSNER J, et al. Optimized conditions for cloning PCR products into an *Xcm* I T-vector [J]. Biotechniques, 1997, 22 (1):40 - 42, 44.
- [6] ARASHI-HEESE N, MIWA M, SHIBATA H. *Xcm* I site-containing vector for direct cloning and in vitro transcription of PCR product[J]. Mol Biotechnol, 1999, 12 (3):281 - 283.
- [7] ARANISHI F, OKIMOTO T. Engineered *Xcm* I cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses[J]. J Genet, 2004, 83 (1):33 - 34.
- [8] PARK H K, ZENG C. Construction of an *Xcm* I -generated T vector bearing green fluorescent protein marker for direct cloning of PCR products[J]. Anal Biochem, 2007, 360 (1):144 - 145.
- [9] 冯辉, 赵斌, 何正国. 一个通用策略用于构建新型 T 载体及其应用[J]. 湖北农业科学, 2007, 46 (5):671 - 673.

Construction of T Vector Using Restriction Endonuclease *Xcm* I

XIA Zhi-hui, DONG Jun-mei, LUO Yue-hua
(College of Agriculture, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: In our report, rice variety Nipponbare genome were used as template, a pair of primers which were added a *Xcm* I site at each 5' end were used to amplify, and a 627bp fragments were obtained, which was ligated into pGEM-T Easy to develop a recombinant vector, T-xia. Self-made T vector was obtained when T-xia was digested by *Xcm* I, and the results of the ligation with other PCR products indicated that 80% recombination clones contained target fragments.

Key words: T vector; PCR; *Xcm* I

(上接第 205 页)

A Protocol for Total RNA Extraction from the Roots of Banana

WANG Jia-shui^{1,2}, Jia Cai-Hong¹, LIU Ju-hua¹, Zhang Jian-bing¹, JIN Zhi-qiang¹

(1. Key Laboratory of Topical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;
2. Department of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The method of improved CTAB, SDS and QIAGEN RNeasy Plant Mini kit were used to isolate total RNA from juvenile and senescence banana roots respectively, and the quality, quantity and purity of total RNA were compared. The results showed that the quality, quantity and purity of total RNA isolated by improved SDS were superior to that by other methods.

Key words: banana roots; improved SDS method; total RNA; extraction