

文章编号: 1674-7054(2015)01-0087-04

适合于高通量测序的槟榔总 RNA 的提取方法

范玉龙 姜 达 李明容 黄 惜 夏志辉

(海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘 要: 为了获得能满足高通量测序要求的槟榔叶片总 RNA, 采用通用植物总 RNA 提取试剂盒和异硫氰酸胍-苯酚法提取槟榔叶片的总 RNA。结果表明: 异硫氰酸胍-苯酚法提取的总 RNA 完整性好、纯度高, 通用植物总 RNA 提取试剂盒不能从槟榔叶片中提取完整的总 RNA; 70 °C, 10 min 的热处理会导致槟榔总 RNA 的降解, 苯酚/氯仿抽提能得到高纯度、完整性好的总 RNA; 总 RNA 质量浓度达到 $979 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $OD_{260}/OD_{280} = 1.98$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.31$, 能满足转录组高通量测序的要求。

关键词: 槟榔; RNA 提取; 高通量测序; 异硫氰酸胍-苯酚法

中图分类号: S 667.9

文献标志码: A

槟榔(*Areca catechu* L.) 是海南省第 2 大经济作物^[1-3]。由于槟榔树参考的基因序列与分子标记数量非常少, 槟榔研究在分子生物学与分子育种方面迟迟未取得重大进展。基于 RNA 的高通量转录组测序能快速为同行提供大规模的基因序列与可利用的分子标记^[4-5], 从而方便槟榔树的基因克隆与分子育种, 加快槟榔的整体研究进程。高通量转录组测序能否成功实施的关键在于高浓度、高质量的 RNA 的提取, 如华大基因公司进行高通量转录组测序的 RNA 质量要求为: 总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 $1.8 \sim 2.2$, OD_{260}/OD_{230} 值 ≥ 2.0 , 总 RNA 的浓度 $\geq 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总量 $\geq 20 \text{ } \mu\text{g}$, 样品需要去蛋白及用 DNase I 处理。周亚奎等曾用不同的提取方法对黄化的槟榔不同组织的 RNA 提取进行比较, 但提取的 RNA 最终只运用于后期的 RT-PCR 实验^[6], 直接用于高通量测序的槟榔 RNA 的提取方法未见报道。本实验采用通用植物总 RNA 提取试剂盒和异硫氰酸胍-苯酚法提取槟榔叶片的总 RNA, 旨在优化一套适合高通量测序的槟榔总 RNA 提取方法, 为槟榔后续分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料 采集健康的槟榔叶片, 立即剪成小片段, 装入 50 mL 离心管中, 置于液氮中保存; 用胶刀从橡胶树上采集树皮后, 装入 50 mL 离心管中, 置于液氮中保存。

1.2 主要试剂 通用植物总 RNA 提取试剂盒(简称试剂盒)由北京百泰克生物技术有限公司提供, 该试剂盒能有效的提取橡胶树皮、胶乳的总 RNA。异硫氰酸胍-苯酚法提取试剂的配制: 称取 9.45 g 异硫氰酸胍、3.04 g 异硫氰酸铵、1.36 g 三水醋酸钠, 用 30 ~ 50 mL DEPC(Diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理后的水溶解, 再依次加入 5 mL 甘油、38 mL 水饱和苯酚, 最后用 DEPC 处理水定容至 100 mL。DNAase I 由北京全式金生物技术有限公司提供。

1.3 总 RNA 的提取方法 试剂盒的提取方法参照北京百泰克生物技术有限公司提供的标准操作程序进行, 异硫氰酸胍-苯酚法的提取方法: (1) 将样品置于液氮预冷的研磨中, 加入液氮进行充分研磨, 将 100 mg 样品装入 1.5 mL 离心管中, 迅速加入 1 mL 提取液, 室温放置 5 min。(2) 加入 200 μL 氯仿(-20 °C

收稿日期: 2014-12-17

基金项目: 教育部热带作物新品种选育工程中心与作物学重点学科联合资助项目(lhxm-2012-3); 海南大学中西部计划学科重点领域建设项目(ZXBHJH-XK001)

作者简介: 范玉龙(1988-) 男, 海南大学农学院 2012 级硕士研究生. E-mail: fanyulong2012@126.com

通信作者: 夏志辉(1978-) 男, 副研究员, 博士, 硕导. 研究方向: 分子育种. E-mail: zhxia-111@163.com

预冷) 反复剧烈颠倒离心管,使之充分混匀,冰上放置 5 min 后 4°C $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。(3) 将上清转移到新的离心管中,加入等体积的异丙醇(-20°C 预冷) 轻轻颠倒离心管,使之混合均匀,冰上放置 10 min。(4) 4°C $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后弃上清,75% 的乙醇洗涤 2 次,晾干。(5) 加入 100 μL 的 DEPC 处理水,充分溶解沉淀。(6) 利用琼脂糖凝胶电泳与分光光度计进行 RNA 完整性与浓度鉴定。

1.4 DNase I 处理后总 RNA 中的 DNase I 的失活与去除方法 将上述 RNA 样品,利用 DNase I 进行处理,去除 RNA 中的 DNA,具体操作参照试剂公司提供的标准程序进行。经 DNase I 处理后,采用 2 种方法失活或去除样品中的 DNase I。A. 热处理:加入 2.5 μL 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA 混匀, 70°C 加热处理 10 min,进行电泳检测。B. 苯酚/氯仿抽提:(1) 用 50 μL DEPC treated water 定容至 100 μL 后加入等体积的苯酚/氯仿(等体积)混匀。(2) 室温 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清。(3) 加入等体积的氯仿混匀。(4) 室温 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清。(5) 加入等体积的异丙醇,冰上静置 10 min。(6) 4°C $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后弃上清,75% 乙醇洗涤 2 次,晾干。(7) 加入 50 μL DEPC 处理水,将沉淀充分溶解。(8) 利用琼脂糖凝胶电泳与分光光度计进行 RNA 完整性与浓度鉴定。

2 结果与分析

2.1 槟榔叶片总 RNA 提取方法的比较 试剂盒与异硫氰酸胍-苯酚法提取的槟榔叶片总 RNA 电泳检测结果见图 1。从图 1 可知,试剂盒提取的橡胶树皮(XJ)总 RNA 28 S, 18 S 5 S 条带完整且清晰,说明试剂盒正常有效;而试剂盒提取的槟榔叶(BL)总 RNA 只有 5 S 条带区附近有条带,28 S, 18 S 条带区无可见条带,说明该试剂盒不适用提取槟榔叶总 RNA;从图 2 可知,异硫氰酸胍-苯酚法提取的槟榔叶的总 RNA 的 28 S, 18 S 5 S 电泳条带都完整且清晰。分光光度计检测结果表明,所提槟榔叶片 RNA 的 $OD_{260}/OD_{280} = 1.95$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.28$,总 RNA 质量浓度为 $702\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;提取样品达到上述生物公司要求的 RNA 测序质量标准,寄交高通量测序公司进一步检测后并建库开展高通量测序,最终获得 10 G 的数据量,说明异硫氰酸胍-苯酚法提取的槟榔叶总 RNA 完整性好,杂质少且浓度高,是提取槟榔叶总 RNA 的有效方法。

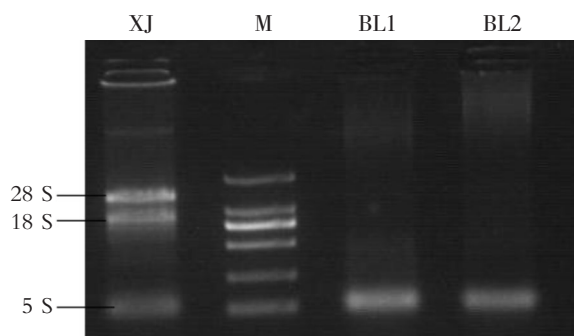


图 1 试剂盒法提取槟榔总 RNA
M:DL2000 Marker;XJ: 橡胶树皮 RNA;BL1,BL2: 槟榔叶片 RNA

Fig.1 The extraction protocol for Areca total RNA with plant total RNA extraction kit

M: DL2000 Marker; XJ: rubber tree bark RNA; BL1, BL2: Areca leaf RNA

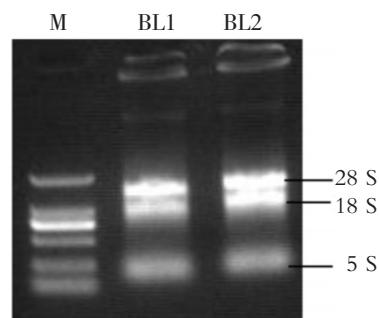


图 2 异硫氰酸胍-苯酚法提取槟榔 RNA
M:DL2000 Marker;BL1,BL2: 槟榔叶片 RNA
Fig.2 The extraction protocol for Areca total RNA with guanidine isothiocyanate - phenol method M: DL2000 Marker; BL1, BL2: Areca leaf RNA

2.2 DNase I 失活与去除方法的确定 热处理与苯酚/氯仿法处理后的槟榔叶片总 RNA 电泳检测结果见图 3。从图 3 可知,提取的槟榔叶片总 RNA 经热处理后都会降解。从图 4 可知,经苯酚/氯仿抽提后,总 RNA 的 28 S, 18 S 5 S 电泳条带都完整且清晰,经分光光度计进行检测后发现,槟榔叶片所提 RNA 的 $OD_{260}/OD_{280} = 1.98$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.31$,总 RNA 质量浓度为 $979\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

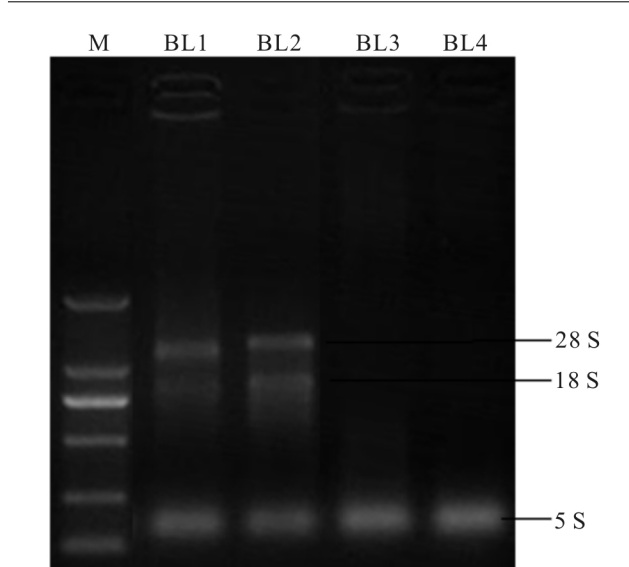


图 3 热处理法失活与去除 DNaseI
M:DL2 000 Marker; BL1,BL2: 未经热处理的槟榔叶片 RNA;BL3,BL4:经热处理的槟榔叶片 RNA
Fig.3 The DNase I inactivation and removing with heat treatment method
M:DL2 000 Marker;BL1,BL2: Areca leaf RNA without heat treatment; BL3, BL4: heat treated Areca leaf RNA

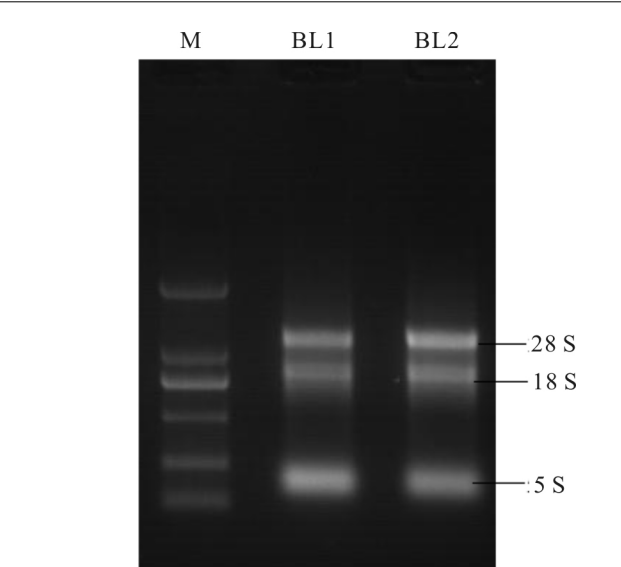


图 4 苯酚/氯仿抽提法失活与去除 DNaseI
M:DL2 000 Marker;BL1,BL2: 苯酚/氯仿抽提后槟榔叶片 RNA;
Fig.4 The DNase I inactivation and removing with phenol/chloroform extraction method
M: DL2 000Marker; BL1, BL2: Areca leaf RNA after phenol/chloroform extraction

2.3 高通量测序结果 从表 1 可知 送检的 2 个槟榔 RNA 样品的 Q20 的比例分别达到 98.81% 和 97.01% , Q30% 的比例达到 94.97% 和 90.64% ,说明测序过程中测序错误率较低 ,同时低质量 reads(LowQ) 的比例分别为 0.36% 和 1.19% ,说明测序过程中 ,低质量的 reads 比例也较少。此外 ,测序过程中无法确定的碱基信息大于 10% 的 reads 比例(Ns) 分别为 0 和 0.01% ,说明测序中很少或没有无法确定碱基信息的 reads。综上所述 ,此次高通量测序的结果真实可靠 ,准确率高 ,适合后续的分子生物学实验及生物信息学分析使用。

表 1 高通量测序结果质量分析
Tab.1 Quality analysis of high-throughput sequencing results

样品 Simple	读数 Reads	读数长度 Read length	GC 碱基含量 /% GC	Q20 / %	Q30 / %	LowQ (<5) / %	Ns / %
BL1	61329518	100	43	98.81	94.97	0.36	0.00
BL2	61329518	100	44	97.01	90.64	1.19	0.01

注: Reads: 由测序得到的原始图像数据经 base calling 转化而来的原始序列 reads ,Read Length: 测序 reads 长度 ,总测序量 = Reads × Read Length ,GC: G + C 的数量占总的碱基数目的比例 ,Q20: 测序 base 质量 > 20 的比例 ,即错误率 < 1% (Q20: 表示测序错误率为 1%) ,Q30: 测序 base 质量 > 30 的比例 ,即错误率 < 0.1% (Q30: 表示测序错误率为 0.1%) ,Ns (%) : 表示 N 的比例大于 10% 的 reads(N 表示无法确定碱基信息) ,LowQ(<5) : 表示低质量 reads(质量值 sQ < = 5 的碱基数占整个 reads 的 50% 以上的 reads)

Note: Reads: The original sequence reads transformed by base calling from the original image data obtained from sequencing; Read length: The length of sequencing reads; Total amount of sequencing = Reads × Read length; GC content: proportion of the G + C among nucleotides; Q20: proportion of nucleotides with quality value > or = 20% ,i. e. there is less than a 1 in 100 chance that the base call is incorrect (Q20: sequencing error rate of 1%) ; Q30: proportion of sequencing base quality > or = 30 ,indicating sequencing error rate of 0.1% ; Ns(%) : reads with unknown nucleotides larger than 10% in clean reads (N is unknown nucleotide) ; LowQ(<5) : low quality of reads (the reads with the nucleotides of quality value sQ < or = 5 being more than 50% of the whole reads)

3 讨 论

无论是 RT-PCR 实验 还是高通量测序等分子生物学实验 ,获得高质量的总 RNA 是实验的基础和前

提^[7]。槟榔组织中含有大量的多糖类物质和酚类物质,在氧化条件下,酚类物质会产生褐化反应,被氧化成多醌化合物后不可逆的结合到核酸上并与 RNA 共沉淀,导致提取的 RNA 质量比较差^[6,8]。众所周知,异硫氰酸胍是已知的最强的蛋白变性剂,它在裂解细胞的同时可以迅速地使 RNA 酶失活,很好地抑制了 RNA 酶的活性。偏酸性的苯酚,可以很好地排除 DNA 的干扰。对于实验中提取的总 RNA,一般有少量 DNA 的干扰,所以使用 DNase I 酶解 DNA。为了不影响 RNA 的质量,酶解后大多采用热处理方式失活 DNase I。在本研究中笔者发现,通常使用的加热使酶失活的方法会导致槟榔总 RNA 的降解,而使用苯酚/氯仿抽提的方法能有效失活并去除 DNase I,且不影响总 RNA 的完整性。本研究利用异硫氰酸胍-苯酚法获得了高效提取槟榔叶片总 RNA 的方法,并且利用苯酚/氯仿抽提的方法可以有效失活并去除 DNase I 且不影响总 RNA 的质量,提取的 RNA 完全符合高通量测序的要求,为今后提取或纯化槟榔 RNA 提供了标准操作程序。

参考文献:

- [1] 杜道林,甘炳春,王有生,等. 槟榔种质初步评价研究[J]. 中国种业,2005(7): 37-38.
- [2] 杜道林,甘炳春,王有生,等. 槟榔规范化种植与保护抚育标准操作规程的研究[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(3): 18-21.
- [3] NAYER R, SELISKAR C E. Mycoplasma like organisms associated with yellow leaf disease of *Areca catechu* L[J]. European J. Forest Path, 1978(8): 125-128.
- [4] LI Dejun, XIA Zhihui, DENG Zhi, et al. Development and characterization of intron-flanking EST-PCR markers in *Hevea brasiliensis* [J]. Molecular Biotechnology, 2011, 51(2), 148-159.
- [5] XIA Zhihui, XU Huimin, ZHAI Jinling, et al. RNA-Seq analysis and de novo transcriptome assembly of *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 77: 299-308.
- [6] 周亚奎,杨云,隋春,等. 槟榔黄化病组织 RNA 提取方法的比较[J]. 生物技术通报, 2010(8): 153-156.
- [7] 熊毅,郭彦萃,张志. 木耳总 RNA 提取方法研究[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(2): 456-460.
- [8] SU X, GIBOR A. A method for RNA isolation from marine macro-algae[J]. Analytical biochemistry, 1988, 174(3): 650-657.

Efficient Isolation of Total RNA from *Areca* Leaf for High-throughput Sequencing

FAN Yulong, JIANG Da, LI Mingrong, HUANG Xi, XIA Zhihui
(College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Total RNA of leaves of *Areca* nut (*Areca catechu* L) were extracted by using universal plant total RNA extraction kit and the guanidine isothiocyanate-phenol method to develop an optimum total RNA extraction protocol for *Areca* leaves for high-throughput sequencing. A better quality of *Areca* leaf total RNA was extracted by the guanidine isothiocyanate-phenol than the universal plant total RNA extraction kit. Furthermore, two methods, heat treatment and phenol-chloroform extraction, were tried to inactivate DNAase I after total RNA was digested by this enzyme. It was found that the total leaf RNA was degraded when heat treated at 70 °C for 10min, whereas high-purity and high concentration of total leaf RNA was obtained through phenol-chloroform extraction. The quality of total RNA with $OD_{260}/OD_{280} = 1.98$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.31$ and concentration more than $979 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, met the standard requirements for high-throughput RNA sequencing.

Key words: *Areca catechu* L; RNA extraction; high-throughput sequencing; guanidine isothiocyanate-phenol method