

富含多糖葡萄风信子花瓣总 RNA 提取方法研究*

郭翠英,王跃进,刘雅丽*,贺明阳

(西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 在普通 CTAB 法与 SDS 法提取 RNA 的基础上,从去除多糖和 DNA 污染两个方面进行优化,筛选出适于富含多糖类葡萄风信子花瓣 RNA 提取的方法,经检测 OD_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间,电泳 28S 条带和 18SrRNA 条带都很清亮,比值约 1.5。对改进的 CTAB 法提取的总 RNA 进行 RT-PCR 能扩增出所需目的条带。有效去除多糖类物质污染对于富含多糖类花瓣组织 RNA 提取很重要。

关键词: 葡萄风信子;多糖;改良 CTAB 法;改良 SDS 法;总 RNA 提取

中图分类号:Q784;S682.2+9 文献标识码:A 文章编号:1004-1389(2007)03-0188-04

Research of Total RNA Extraction Methods from Polysaccharide-riched Petals of Common Grape Hyacinth

GUO Cui-ying, WANG Yue-jin, LIU Ya-li* and HE Ming-yang

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Extracting high-quality RNA from common grape hyacinth flowers using common methods is difficult because of high levels of polysaccharide in flowers. Total RNA was isolated from common grape hyacinth with modified CTAB method and SDS method. UV-Spectroscopic analysis showed that A(260)/A(280)= 1.8~2.0, 28S, 18SrRNA were all clear in electrophoresis picture. Target gene was amplified from isolated total RNA by RT-PCR which testified high quality could be isolated from petals with modified methods. In conclusion, it is pretty important to reduce polysaccharide for obtaining high quality total RNA from polysaccharide-riched flower petals.

Key words: Common grape hyacinth; Polysaccharide; Modified CTAB method; Modified SDS method; Total RNA extraction

葡萄风信子为百合科多年生球根花卉,花瓣为天蓝色,从其花瓣中提取纯度高、完整性好的总 RNA 是后续 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 文库构建等分子生物学研究的基础。各种植物因其自身的特点,总 RNA 的提取方法也有一定的差异。普通的 CTAB 法和 SDS 法提取葡萄风信子 RNA, LiCl 沉淀后亦会有不溶性的多糖物质存在。本研究主要是在这两种方法的基础上,围绕去除多糖和 DNA 污染两方面进行了步骤方法优化,为深入开展相关研究奠定基础,并为提取其他富含多糖类植物 RNA 提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为葡萄风信子花蕾期,开花初期,开花盛期花瓣的混样,从正在生长的植株上剪下立即转入液氮, -80℃ 冰箱冻存。

1.2 方法

1.2.1 普通的 CTAB 法 未加特异的除多糖步骤,具体步骤参照文献[1]。

1.2.2 普通 SDS 法 具体步骤参照文献[2]。

1.2.3 优化的 CTAB 法 具体步骤:第一次氯

* 收稿日期:2006-11-22 修回日期:2006-12-05
作者简介:郭翠英(1979—),女,新疆玛纳斯县人,在读硕士,研究方向:园林植物与观赏园艺。
万方数据
* 通讯作者:刘雅丽。

仿:异戊醇抽提后,取上清加入 1/10 体积 5 mol/L KAC (pH4.8),1/10 体积的无水乙醇,等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,4℃,12 000 r/min 离心 15 min。取上清,可重复此步骤。移上清至新离心管,加入 1/3 体积的预冷 LiCl,-20℃ 冰浴 2~3 h。4℃,12 000 r/min,离心 15 min,弃上清,用 75%乙醇洗涤沉淀两次,室温干燥。沉淀溶于 100 μL DEPC 水中,再加入 100 μL 经 65℃水浴 10 min 的 PS Erasol(天泽基因的除多糖试剂)。振荡器上充分振荡 1 min。加入 100 μL 氯仿:异戊醇(24:1),振荡器上充分振荡 1 min。4℃,12 000 r/min 状态下,离心 5 min,移上清至新离心管,加入 1/10 体积的 3 mol/LNaAC (pH5.2),2 倍体积的无水乙醇沉淀。4℃,12 000 r/min 状态下,离心 10 min,收集沉淀,用 75%乙醇洗涤两次,室温干燥。沉淀溶于 30 μL DEPC 水中。

1.2.4 优化的 SDS 法 具体步骤:第一次氯仿:异戊醇抽提后,取上清至离心管,加入 1/3 体积的 5 mol/L KAC(pH4.8),充分震荡混匀,冰浴 10 min。12 000 r/min 离心 15 min,弃沉淀。氯仿:异戊醇(24:1)再抽提一次。之后步骤与优化后的 CTAB 法相同。

1.3 总 RNA 中 DNA 的去除

总 RNA 中 DNA 的去除参照 Promega 公司 RNase free 的 DNase I 使用说明略有改动,具体为:建立 120 μL 的酶解体系(3 μg 总 RNA,6 μL 的 RQase,10μL 的 10×buffer,4 μL 的 RNasin 用 DEPC 水补齐至 120 μL),混匀,37℃水浴 20 min;水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提一次,移上清至离心管加 1/10 体积 3 mol·L NaAC(pH5.2)和 2.5 倍体积无水乙醇,-20℃放置 2 h;4℃,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,75%乙醇清洗沉淀 2 次,室温下干燥;沉淀溶于 30 μL DEPC 水中,-40℃冻存。

1.4 总 RNA 的检测

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳法 取 5 μL 总 RNA 溶液在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳后,EB 染色,紫外灯下观察照相。

1.4.2 测 OD 值 参照奥斯伯等的方法,取经 DNA 酶解的总 RNA 溶液 2 μL,采用 Beckman 公司的 DU800 型紫外分光光度仪测在 260 nm 和 280 nm 处的光吸收值。

1.4.3 反转录及 PCR 扩增 反转录反应参照 MMLV 反转录酶(Promega,M1701)使用说明进行。PCR 扩增引物根据 Genbank 上登录的目的基因的保守区设计。

PrimerF 5' ATCCGCCAAGTGGTCGTCG CCTC 3'

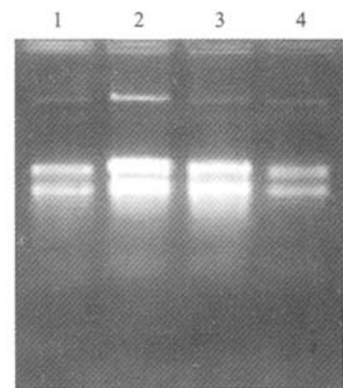
PrimerR 5' CTCGCCCGATGGCCCATAT GTTGAC 3'

反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃延伸 10 min。4℃保存。



1. 普通的 CTAB 法,Common CTAB method;
2. 普通的 SDS 法,Common SDS method

图 1 普通 CTAB 法和 SDS 法提取总 RNA 电泳结果
Fig. 1 Result of total RNA integrity using common CTAB method and SDS method



1,2 优化的 CTAB 法,Modified CTAB method;
3,4 优化的 SDS 法,Modified SDS method

图 2 优化的 CTAB 法和 SDS 法提取总 RNA 电泳结果
Fig. 2 Result of total RNA integrity using modified CTAB method and SDS method

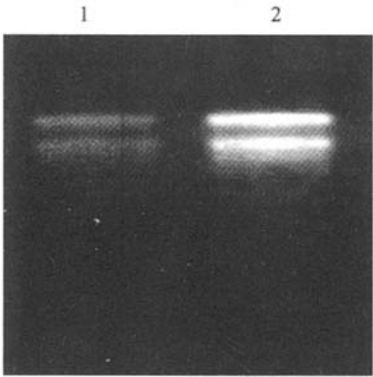
2 结果与分析

2.1 总 RNA 的电泳检测

普通的未加除多糖的提取 RNA 的方法用 DEPC 水溶解时会发现有不容性的黏性物质存

在,电泳加样时有飘样现象,经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,EtBr 染色,紫外光检测结果显示电泳结果见图 1,点样孔不清亮,且提取的 RNA 条带不够整齐,呈现弥散状。

优化的 CTAB 法和优化的 SDS 法提取的 RNA 电泳结果见图 2,图 2 中 2 为在普通 CTAB 法基础上仅加了 1/10 体积 KAC(5 mol/L)和 1/10 体积无水乙醇除多糖的电泳图片,3 为在普通 SDS 法基础上加了 1/3 体积的 KAC(5 mol/L)除多糖的电泳图片。2、3 电泳条带有拖尾。1、4 为优化的 CTAB 法和 SDS 法(加了除多糖试剂)提取的 RNA 电泳图片。条带很清晰,28S 亮度基本是 18S 的两倍,说明优化的 CTAB 法和优化的 SDS 法提取的 RNA 完整性较好,但是有 DNA 污染。去除 DNA 污染后的电泳图片见图 3。



1. 优化的 SDS 法, Modified SDS method;
2. 优化的 CTAB 法, Modified CTAB method

图 3 去除 DNA 后总 RNA 完整性的电泳检测结果
Fig. 3 Result of total RNA integrity after reduce DNA

2.2 总 RNA 纯度、浓度检测

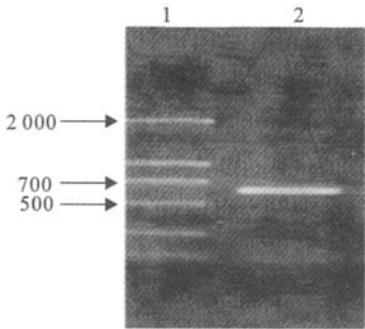
从表 1 中可以看出,优化的 CTAB 法和优化的 SDS 法总 RNA 的 OD260/ OD280 值均介于 1.8~2.0 之间,OD260/ OD230 值大于 2.0,说明优化方法提取的 RNA 纯度较高。优化的 CTAB 法提取的 RNA 产率明显高于优化的 SDS 法提取的 RNA。

表 1 蓝色葡萄风信子花蕾总 RNA
不同提取方法纯度及产率

Table1 Comparison of total RNA purity and quantity of common grape hyacinth by different methods			
方法 Methods	总 RNA 产率 /(ng · μL ⁻¹) RNA Product	纯度	
		A260/ A280	A260/ A230
优化的 CTAB 法 Modified CTAB method	310. 43	1. 86	2. 03
优化的 SDS 法 Modified SDS method	139. 2	1. 96	2. 11

2.3 PCR 扩增目标基因

对优化的 CTAB 法提取的总 RNA 反转录,PCR 扩增获得大约 600 bp 的特异条带(图 4),与所需目标片段大小一致,条带清晰,说明提取的 RNA 能用于后期的分子试验。



1. Marker; 2. PCR 扩增产物, RT-PCR products
图 4 葡萄风信子总 RNA 的 RT-PCR 反应
产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 4 1% Agrose gel electrophoresis result of common grape hyacinth RNA RT-PCR production

3 讨论

从文献报道上看,许多植物就是由于未能有效地分离纯化其组织中的 RNA,而阻碍了其分子生物学方面研究的进展。认为在这些植物组织中,或富含酚类化合物,或富含多糖,或含有某些尚无无法确定的次级代谢产物,或 RNase 的活性较高^[10~12]。用常规的 CTAB 法,SDS 法不能够从葡萄风信子中提取到高质量的 RNA,主要是因为葡萄风信子花蕾富含多糖类物质,这一点可从常规方法提取到的 RNA 呈现难溶的粘稠状看出,而且电泳点样时有飘样现象,点样孔不亮。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似,因此很难将它们分开^[3]。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^[4]。

在常规的 RNA 提取方法中,通过 SDS-盐酸胍处理可以去除部分多糖;在高浓度 Na⁺ 或 K⁺ 离子存在条件下,通过苯酚-氯仿抽提可以除去一些多糖^[5];通过 LiCl 沉淀 RNA 也可以将部分多糖留在上清液中^[6]。但即使通过这些步骤仍会发现相当多的多糖与 RNA 混杂在一起,所以还需要用更有效的方法来解决植物 RNA 分离纯化时多糖污染的问题。用低浓度乙醇沉淀多糖是一个去除多糖效果较好的方法^[9]。在 RNA 提取液

或溶液中缓慢加入无水乙醇至终浓度 10%~30%,可以使多糖沉淀下来,而 RNA 仍保留于溶液中。另一个常用的方法是醋酸钾沉淀多糖法^[7]。

本试验在普通的 CTAB 法和 SDS 法基础上着重添加了除多糖步骤:优化的 CTAB 法中加 1/10 体积的 5 mol/LKAC (pH4.8)和 1/10 体积的无水乙醇。优化的 SDS 法中加 1/3 体积的 5 mol/L KAC(pH4.8)。结果表明在匀浆上清液中加入一定体积的 5 mol/L KAC (pH4.8),去除多糖,效果较明显。另外,在优化的 CTAB 法和优化的 SDS 法中还加入了天泽基因的除多糖试剂 PS Erasol 进一步除去残留多糖。PS Erasol 其原理是从 RNA 样品中将粘性多糖沉淀,而部分 RNA 还留在溶液中,通过盐/醇沉淀回收。本研究表明 CTAB 裂解细胞的能力明显强于 SDS,与刘志等^[8]研究报道过的资料相一致从图 1 和图 2 可以看出,提取的 RNA 中有 DNA 污染,本试验主要用了天泽基因的除 DNA 试剂和 Promega 公司的 DNase,具体过程均参照说明书进行。结果发现天泽基因公司的除 DNA 试剂能有效去除 DNA,但是却给 RNA 带来了其他杂质,电泳后的 RAN 照片不清晰,呈弥散状。Promega 公司的 DNA 酶能有效去除 DNA,但是 RNA 损失很严重,LiCl 沉淀后,四管 RNA 合一管,才能有足够的 RNA 浓度。说明除去 DNA 的步骤还需要进一步的摸索。

本试验还进一步证实了前期研磨材料一定要细致,这是 RNA 提取产率提高的关键步骤。氯仿:异戊醇抽提时反复涡旋,让其与材料充分反应,有利于去除蛋白污染。

总之对于富含多糖类物质植物材料的 RNA 提取,无论基于哪种方法,若能有效去除多糖污染,便可得到较高质量的 RNA。

参考文献:

- [1] CHANG S J, JEPF P, JOHNC A. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 113~116.
- [2] Vandriessche E S, Beckmans S, Dejaegere R, *et al.* The antioxidant of choice for the purification of protein from phenol-rich tissues[J]. 1984, (4): 181~188.
- [3] Logemann J, Schell J WII, Lmititzer I. Improved method for isolation of RNA from plant tissues [J]. *Anal. Biochem.*, 1987, 163: 16~20.
- [4] Lewinsohn E, Steelecl, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of Gymnosperms[J]. *Plant Mol. Biol. Reprtr*, 1994, 12: 20~25.
- [5] Fang G, Hammars Grumetr. A quick and inexpensive method for removing polysaccharids from plant genomic DNA[J]. *Bio Techniques*, 1992, 13: 52~56.
- [6] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae[J]. *Anal Biochem*, 1988, 171: 650~657.
- [7] 顾红雅, 霍礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995. 21.
- [8] 刘志, 杨永华. CTAB 法提取中草药材滇紫草细胞的总 RNA[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(4): 372~373.
- [9] Hu C G, Honda C, Masayuki K, *et al.* A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20: 69~96.
- [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] 赵双宜, 吴耀荣, 夏光敏. 介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法[J]. *遗传*, 2002, 24(3): 337~338.
- [12] 沈文飏, 汪仁, 王益华, 等. 从水稻种胚中提取 RNAR 的新方法[J]. *遗传*, 2003, 25(2): 208~210.

作者: 郭翠英, 王跃进, 刘雅丽, 贺明阳, GUO Cui-ying, WANG Yue-jin, LIU Ya-li, HE Ming-yang
作者单位: 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌, 712100
刊名: 西北农业学报 ISTIC PKU
英文刊名: ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OCIDENTALIS SINICA
年, 卷(期): 2007, 16(3)
被引用次数: 12次

参考文献(12条)

1. CHANG S J;JEPF P;JOHNC A [A Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees](#) 1993(02)
2. Vandriessche E S;Becckmans S;Dejaegere R [The antioxidant of choic for the purification of protein from phenol-rich tissues](#) 1984(04)
3. Logemann J;Schell J WII;Lmititzer I [Improved method for isolation of RNA from plant tissues](#) 1987
4. Lewinsohn E Steelecl;Croteau R [Simple isolation of functional RNA from woody stems of Gymnosperms](#) 1994
5. Fang G;Hammars Grumetr A [A quick and inexpensive method for removing polysaccarids from plant genomic DNA](#) 1992
6. Su X;Gibor A [A method for RNA isolation from marine macroalgae](#) 1988
7. 顾红雅;霍礼嘉;明小天 [植物基因与分子操作](#) 1995
8. 刘志, 杨永华 [CTAB法提取中草药材滇紫草细胞的总RNA\[期刊论文\]-生物技术通讯](#) 2004(4)
9. Hu C G;Honda C;Masayuki K [A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaceharides and polyphenol compounds](#) 2002
10. 李宏, 王新力 [植物组织RNA提取的难点及对策\[期刊论文\]-生物技术通报](#) 1999(1)
11. 赵双宜, 吴耀荣, 夏光敏 [介绍一种简单高效的植物总RNA提取方法\[期刊论文\]-遗传](#) 2002(3)
12. 沈文飏, 汪仁, 王益华, 郑天清, 万建民 [从水稻种胚中提取RNA的新方法\[期刊论文\]-遗传](#) 2003(2)

本文读者也读过(10条)

1. 黄凤兰, 李长海, 孙婷婷, 高秀琴, 胡宝忠, HUANG Feng-lan, LI Chang-hai, SUN Ting-ting, Gao Xiu-qin, HU Bao-zhong [芍药花瓣总RNA的提取\[期刊论文\]-生物技术通讯](#)2005, 16(3)
2. 高双成, 施江, 王世华, 孔祥生, 张苗霞 [一种牡丹花瓣总RNA的提取方法\[期刊论文\]-河南农业科学](#)2007(10)
3. 岑鹏, 潘丽晶, 张妙彬, 范干群, 程萍, CEN Peng, PAN Li-jing, ZHANG Miao-bin, FAN Gan-qun, CHENG Ping [从富含多糖的石斛兰花蕾中提取总RNA初探\[期刊论文\]-广东农业科学](#)2009(6)
4. 和凤美, 朱永平, 王博, He Fengmei, Zhu Yongping, Wang Bo [一种新铁炮百合花瓣总RNA的提取方法\[期刊论文\]-分子植物育种](#)2009, 7(6)
5. 王红波, 金晓玲 [改良TRIZOL试剂法提取矮牵牛衰老花瓣总RNA\[期刊论文\]-中国农学通报](#)2010, 26(7)
6. 王燕, 王曼莹, 李思光, WANG Yan, WANG Man-ying, LI Si-guang [羊蹄躑花瓣总RNA提取方法的比较与改进\[期刊论文\]-南昌大学学报\(理科版\)](#) 2008, 32(1)
7. 张玉进, 孟祥春, 潘瑞炽, 王小菁 [非洲菊花瓣总RNA提取方法的改进\[期刊论文\]-植物学通报](#)2001, 18(6)
8. 付杨, 高翔, 敖曼, 王钦美, 王丽, FU Yang, GAO Xiang, AO Man, WANG Qin-mei, WANG Li [香雪兰花瓣总RNA的提](#)

[取和cDNA文库的构建\[期刊论文\]-东北师大学报（自然科学版）2008, 40\(3\)](#)

9. [张宇, 唐志鹏, 邓海燕, 王长江, ZHANG Yu, TANG Zhi-peng, DENG Hai-yan, WANG Chang-jiang](#) [富含多糖多酚芒果果肉组织总RNA的提取\[期刊论文\]-湖南农业大学学报（自然科学版）2009, 35\(6\)](#)

10. [朱昀, 王猛, 贾志伟, 练云, 金颖, 王国英, Yun Zhu, Meng Wang, Zhiwei Jia, Yun Lian, Ying Jin, Guoying Wang](#) [一种从富含多糖的玉米幼穗中提取RNA的方法\[期刊论文\]-植物学通报2007, 24\(5\)](#)

引证文献(12条)

1. [彭波, 陈瑞, 黄兴奇, 刘小烛, 董转年, 程在全](#) [野生稻颖果总RNA提取方法研究\[期刊论文\]-生物技术 2008\(01\)](#)

2. [李琴, 王健, 赵钟鑫, 尚啸](#) [三色堇花瓣总RNA 3种提取方法的比较\[期刊论文\]-江苏农业科学 2013\(05\)](#)

3. [杨晓燕, 张波, 黄方爱, 颜欢, 李月荣, 郑秋生](#) [适合转录组测序的葡萄叶片总RNA试剂盒提取法的改进\[期刊论文\]-生物技术通报 2013\(06\)](#)

4. [姚宁涛, 祝建波, 邓福军](#) [改良Trizol法快速提取棉叶片总RNA\[期刊论文\]-生物技术通报 2010\(07\)](#)

5. [张宇, 唐志鹏, 邓海燕, 王长江](#) [富含多糖多酚芒果果肉组织总RNA的提取\[期刊论文\]-湖南农业大学学报（自然科学版） 2009\(06\)](#)

6. [杨晨, 徐凤花, 单世华, 刘宇, 李春娟, 张廷婷, 闫彩霞](#) [花生子叶RNA提取方法比较与分析\[期刊论文\]-山东农业科学 2011\(01\)](#)

7. [张倩茜, 张伟丽, 刘凤民, 许修宏, 庞丹丹](#) [柱花草总RNA提取方法比较\[期刊论文\]-草业科学 2011\(07\)](#)

8. [蒋辉, 陈海霞](#) [湖南地区引种葡萄风信子的物候期及生长特性观察\[期刊论文\]-天津农业科学 2014\(04\)](#)

9. [杨峰, 李创, 刘艺平, 何明珍, 孔德政](#) [荷花花瓣总RNA的提取方法\[期刊论文\]-河南科学 2009\(10\)](#)

10. [尹慧, 陈莉, 李晓艳, 陈秋明, 义鸣放](#) [百合叶片总RNA提取方法比较及优化\[期刊论文\]-中国农业大学学报 2008\(04\)](#)

11. [黄雪梅, 张守涛, 杨超, 王芳](#) [玉米花粉总RNA提取方法的比较和分析\[期刊论文\]-河南农业科学 2009\(04\)](#)

12. [王远, 罗凤霞, 沈健, 魏哲虎, 周魏魏](#) [葡萄风信子的研究进展\[期刊论文\]-金陵科技学院学报 2008\(04\)](#)

引用本文格式: [郭翠英, 王跃进, 刘雅丽, 贺明阳, GUO Cui-ying, WANG Yue-jin, LIU Ya-li, HE Ming-yang](#) [富含多糖葡萄风信子花瓣总RNA提取方法研究\[期刊论文\]-西北农业学报 2007\(3\)](#)