改良CTAB法提取高质量香蕉叶片总RNA

淦国英，漆艳香，蒲金基，张 欣，谢艺贤
（中国热带农业科学院环境与植物保护研究所，海南 儋州 571737）

摘 要：以巴西香蕉叶片为试验材料，采用改良CTAB法提纯香蕉叶片总RNA。结果表明，改良CTAB法提取的香蕉叶片总RNA的28S、18SrDNA条带清晰、整齐，A_{260}/A_{280}值大于2.0，无需任何纯化处理即可用作香蕉MuACTIN基因的扩增模板，经RT-PCR扩增获得了带型清晰的目的条带，说明利用此法分离的RNA纯度和浓度符合RT-PCR的要求；而CTAB法提取的总RNA产量较低，且纯度不高。说明改良CTAB法能有效从富含多酚和多糖的香蕉叶片中提取高质量的总RNA。

关键词：改良CTAB法；香蕉叶片；总RNA；提取
中图分类号：Q522 **文献标识码**：B **文章编号**：1004-874X(2009)07-0192-04

Improved CTAB method for extracting high quality total RNA from banana leaves

GAN Guo-ying, QI Yan-xiang, PU Jin-ji, ZHANG Xin, XIE Yi-xian
(*Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou* 571737, *China*)

Abstract: In this study, improved CTAB method was applied to extract total RNA from banana Brazil leaves. The result showed that two bands of 28S rRNA and 18S rRNA extracted by improved CTAB method were appeared orderly, as well A_{260}/A_{280} value was more than 2.0. And using RNA as amplificating template of RT-PCR without any purification treatment, clear amplified band was acquired, which showed that purity and concentration of RNA extracted by improved CTAB method suited to apply to RT-PCR. But the total RNA extracted from CTAB method had lower yield and purity. Therefore, improved CTAB method could extract high quality total RNA of banana leaves.

Key words: improved CTAB method; banana leaves; total RNA; extract

香蕉是我国南方的五大名果之一，是国内消费和出口创汇的重要资源[1]。香蕉组织RNA的提纯是进行香蕉分子生物学研究的必要前提，在进行反转录PCR、cDNA合成、Northern杂交、蛋白质体外翻译以及cDNA文库构建、筛选相关基因过程中均需要有高质量、高纯度、完整性好的RNA。目前关于香蕉总RNA提取方法仅有少量报道，在国内仅有CTAB法提取香蕉果实RNA的报道[2-5]，但未见采用该方法成功提取香蕉叶片RNA的相关报道。由于香蕉组织含有大量的脂质、蛋白质、多糖和酶类物质[6]，使得高质量RNA的提取较为困难，特别是多糖和多酚杂质对RNA的分离和纯化有很大干扰。多糖的许多理化性质和RNA相似，抽提过程中易与RNA形成难溶的胶状物共沉淀，去除多糖的同时RNA也被携带去除，造成RNA产量减少，或者多糖溶解后形成粘稠的溶液污染RNA样品，阻碍具有生物活性的RNA分离，使之无法用于后续的分子生物学研究；而酚类化合物极易被氧化成多醌类物质而褐化，然后与RNA不可逆结合，导致RNA产量减少和活性丧失[7]。本试验在CTAB法提取香蕉果实RNA[2-3]的基础上进行改良，拟摸索出一种既快捷又高效的提取香蕉叶片RNA的方法，以期为深入开展香蕉抗逆、高产等性状的分子生物学研究奠定良好的基础，同时为其他富含多糖、多酚类植物的RNA提取提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试香蕉品种为巴西蕉，蕉苗由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。摘取已定植1个月的蕉苗的中上部叶片，用0.1%多菌灵浸泡2 min，再用

收稿日期：2009-03-16
资金项目：国家科技支撑计划项目(2007BAD48B05)
作者简介：淦国英(1981-)，女，在读硕士生，E-mail：ganguoying2009@163.com
通讯作者：谢艺贤(1963-)，男，研究员，E-mail：yixianxie@sucta.edu.cn

万方数据

无菌水冲洗 3 次，置于 25℃通风的恒温箱中晾干供试。

试验使用的试剂有：十六烷基三乙基溴化氨(CTAB)、焦碳酸二乙酯(DEPC)，为 Amresco 产品；Puper Script™ Reverse Ⅲ Transcriptase、Rnasin，为 Takara 产品；聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、β-巯基乙醇为 Sigma 产品，反转录引物、水饱和酚，为上海生工产品；其余试剂均为国产分析纯。

试验使用的仪器有：Eppendorf 高速冷冻离心机、TC-XP 型基因扩增仪、DYY-12 型电泳仪、DYY-34 型琼脂糖水平电泳槽、紫外分析仪、紫外可见分光光度计(BACK-MANDU800)、电子天平(1/1 000g)、PHS-3C 酸度计、电热恒温水浴锅、电热鼓风干燥箱、超净工作台等。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂配制 参照文献 [8-9] 配制 CTAB 提取液〔3% CTAB，2.0 mol/L NaCl，20 nmol/L EDTA，100 mmol/L Tris-硼酸(pH8.0)，2% PVP，2%β-巯基乙醇，β-巯基乙醇于使用前加入〕、3 mol/L NaAC (pH5.2)、12 mol/L LiCl。

1.2.2 RNA 的提取 RNA 提取参照 CTAB 法并加以改良，其具体步骤如下：(1)吸取 5 mL 提取液，移入 10 mL 离心管中，置于冰上预冷；(2) 称取 2 g 不带叶脉、且经消毒处理的香蕉叶片，置于经液氮预冷的研钵中，在液氮中充分研磨成粉末，待液氮挥发完后，将样品移入预冷的提取液中，涡旋混匀，65℃水浴 20 min，每隔 5 min 左右涡旋混匀 1 次；(3) 温育完毕后冷却至室温，加入 0.6 倍体积(3 mL)氯仿，适当混匀，25℃下 12 000 r/min 离心 15 min；(4) 取上层水相，加入等体积氯仿，适当混匀，25℃下 12 000 r/min 离心 15 min；(5) 取上清液，置于 10 mL 离心管中，加入 12 mol/L LiCl 至终浓度为 3 mol/L(0.6 倍体积)，-20℃下放置 4 h，4℃下 12 000 r/min 离心 20 min 沉淀 RNA；(6)于沉淀物中加入 5 μL β-巯基乙醇和 3 mL LiCl(3 mol/L)，沉淀完全溶解后于-20℃下放置 2 h，然后在 4℃下 12 000 r/min 离心 20 min，再次沉淀 RNA；(7) 沉淀物用 1 mL DEPC 处理水溶解，待沉淀完全溶解后立即用 RNase-free 枪头移至 2.0 mL 离心管中，再用等体积的水饱和酚、氯仿依次抽提；(8)于 2.0 mL 离心管中加入 3 mol/L NaAc(体积为上清液的 1/10)和 2 倍体积异丙醇，于-70℃下沉淀 2 h，然后在 4℃下 14 000 r/min 离心 20 min 沉淀 RNA，沉淀物用 75% 乙醇洗涤 2 次，置于冰上干燥后，用 TE 复溶，待 RNA 完全溶解后立即置于-70℃冰箱中保存备用。

1.2.3 RNA 完整性及质量检测 在 1×TAE 中进行 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳，琼脂糖浓度为 1%(每 100 mL 凝胶中加入 2.5 μL 的核酸染料)。上样量为 1 μL，在 180 V 下恒压电泳 15 min，然后在紫外凝胶成像系统中观察分析 RNA 的质量。

1.2.4 RNA 纯度及产率分析 用紫外分光光度计检测 CTAB 法和改良 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 的纯度及产率：吸取 RNA 样品 1 μL，稀释 20 倍，于 230、260、280 nm 处测量紫外吸光值(A)，计算 A_{260}/A_{280}、A_{260}/A_{230} 分析 RNA 纯度。RNA 产率以 A_{260} 值计算(1 个 A_{260} 单位=40 mg/mL)，计算公式为：RNA 的质量浓度(mg/mL)=(A_{260}×40×300)/1 000。

1.2.5 RT-PCR 以提取的总 RNA 为模板，用 Invitrogen 公司生产的 Super Script™ Ⅲ Reverse Transcriptase(200 U/μL)试剂盒进行扩增(操作按说明书进行)，反转录合成 cDNA 第一链后，将产物稀释 50 倍作为 PCR 反应的模板。PCR 反应体系(25 μL)为：1 μL cDNA、2 μL 200 μmol/L dNTP、1 μL 10 mmol/L 上下游引物、0.5 UTaq 酶。以香蕉的 MuACTIN 基因序列(GenBank 登录号为 AF246288) 设计 ACTIN 引物，ACTIN1：5′-TGT AGC AAT TCA GGC TGT TCT-3′；ACTIN2：5′-TCA GAG ATG GCT GGA AGA GAA -3′。反应程序为：94℃ 预变性 4 min；94℃ 40 s、50℃ 40 s、72℃ 90 s，35 个循环；72℃保温 10 min。反应结束后取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量

通过琼脂糖凝胶电泳检测制备的香蕉叶片 RNA 质量。从 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳图 (图 1) 可见，该法提取的香蕉叶片 RNA 的 28S 和 18S 条带都有拖尾，且亮度相近，说明 RNA 已有部分降解；此外，点样孔中有微弱白亮物质，

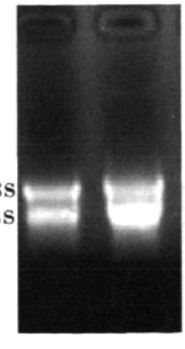


图 1 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳结果

万方数据

说明样品 RNA 中残留有少量的蛋白质、多糖或其他杂质[10]；而且在点样孔下方有微弱的 DNA 条带，说明样品 RNA 中有轻微的基因组 DNA 污染。从改良 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳图（图 2）可见，香蕉叶片 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰，28S 条带亮度是 18S 条带的 2 倍，说明获得的 RNA 完整性好、未发生降解[10]；此外，电泳图中没有 DNA 条带出现，说明 RNA 中没有 DNA 污染，纯度较高，完全可用于后续实验。

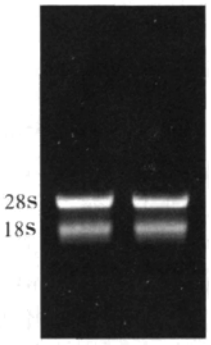


图 2　改良 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳结果

2.2　RNA 纯度和产率

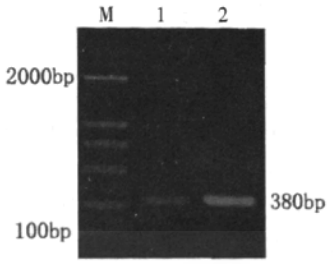
表 1 可以看出，CTAB 法提取的香蕉 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 1.63，介于 1.6~1.8 之间，说明 RNA 样品中存在少量的蛋白质、多糖或其他杂质污染[9]；而改良 CTAB 法提取的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 2.05，超过 2.0，说明改良 CTAB 法提取的香蕉叶片总 RNA 的纯度较高，几乎无蛋白质、多糖等杂质污染[9]。此外，改良 CTAB 法提取的 RNA 产率明显高于 CTAB 提取法（表 1）。

表 1　不同方法提取的香蕉叶片 RNA 纯度及产率比较

提取方法	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	产率(μg/g)
CTAB 法	1.84	1.63	75.86
改良 CTAB 法	2.11	2.05	95.25

2.3　RT-PCR 扩增效果

本试验分别以 CTAB 法和改良 CTAB 法提取的香蕉叶片 RNA 为模板，用香蕉 MuACTIN 基因特异引物 ACTIN1、ACTIN2 进行 RT-PCR 扩增，得到了大小为 380 bp 的特异条带。从图 3 可见，以 CTAB 法提取的 RNA 为模板得到的 RT-PCR 扩增产物条带模糊且亮度弱，说明 CTAB 法提取的 RNA 质量不高；而以改良 CTAB 法提取的 RNA 为模板得到的 RT-PCR 扩增产物



M：DL 2000 marker；1：以 CTAB 法提取的 RNA 为模板的 RT-PCR 条带；2：以改良 CTAB 法提取的 RNA 为模板的 RT-PCR 条带

图 3　香蕉叶片 RNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

条带清晰、边缘整齐且亮度强，说明改良 CTAB 法提取的 RNA 质量完好并具有很好的生物活性，完全可以满足多数后续实验的要求。

3　结论与讨论

香蕉植株不同部位含有不同种类的次生代谢物质，尤其叶片中含有较多的酚类物质，这些酚类物质在 RNA 提取过程中很容易与 RNA 结合形成极难溶解的胶状物，从而大大降低 RNA 的得率[7]。鉴于香蕉叶片富含多糖、多酚的特性，本试验在总结香蕉果实 RNA 提取方法的基础上加以改进，探索出一种适合于香蕉叶片 RNA 提取的改良 CTAB 法，该法可以高效、快速地从香蕉叶片中抽提出高质量的 RNA，且可以较彻底地去除多糖和酚类以及色素等次生代谢物的干扰。

改良 CTAB 法的改进之处有以下几方面：(1)改良 CTAB 法对提取缓冲液冰浴后再加样，避免了样品与缓冲液温差太大，温差过大时样品在缓冲液中结块或结球，以致缓冲液不能充分与样品接触，从而增加 RNase 作用的时间和机会，同时也使 RNA 与蛋白质、多糖、多酚、色素及 DNA 等杂质分离不彻底。(2)改良 CTAB 法在提取液中同时加入 PVP 和 β-巯基乙醇。PVP 作为多酚化合物的螯合剂，具有很强的结合酚能力，使氮酚不能被氧化成醌类，并防止其与 RNA 的结合，从而有效抑制酚的氧化，减少 RNA 的损失；β-巯基乙醇不但可以作为强还原剂防止多酚氧化，还可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活[7]。通过两者的协同作用，β-巯基乙醇提供还原条件，使得多酚类物质不易被氧化，而与水溶性 PVP 充分结合，形成螯合物，在后续的抽提步骤即可较完全地沉淀出酚，有效地避免了酚类物质对 RNA 提取的影响[11]。(3)针对香蕉叶片中叶绿素含量高、抽提过程中粗提 RNA 液色

万方数据

素残留严重的问题，改良 CTAB 法将粗提 RNA 液用 LiCl 于低温下分别沉淀 2 次，经 LiCl 2 次沉淀后的 RNA 几乎无多糖和色素残留。从而可有效去除 RNA 液中的色素和多糖[12]；此外，在 LiCl 中加入少量的 β-巯基乙醇，可有效防止 RNA 在沉淀过程中的降解。(4) 改良 CTAB 法采用异丙醇和 NaAc 沉淀有机溶剂抽提后的 RNA。RNA 提取过程中，一般用无水乙醇和 NaAc 进行沉　淀[13]，但在多糖、蛋白含量较高时宜用异丙醇沉淀，异丙醇的极性弱于乙醇，结合 NaAc 提供的高盐环境，易将多糖及蛋白游离在溶液中，从而较完全地去除残留在 RNA 中的多糖和蛋白[9]。对于富含多糖的香蕉叶片，用异丙醇沉淀 RNA 更易摆脱多糖、杂蛋白的污染。

参考文献：

[1] 刘世彪，彭小列，田儒玉. 世界热带五大名果树[J]. 生物学通报，2003 (3) :11-13.

[2] 庄军平，苏菁，陈维信. 一种从香蕉果实提取高质量 RNA 的方法[J]. 分子植物育种，2006 (1): 143-146.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 冯斗，张春发，张颖. 一种适用于提取香蕉果肉 RNA 的方法[J]. 广西农业生物科学，2004(3): 249-251.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社，1993: 136-148.

[9] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京:科学出版社，2003: 516-548.

[10] Schneiderbauer A, Sandermann J H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991,197(1):91-95.

[11] Zeng Y,Yang T. RNA isolation from highly viscoussamples rich in polyphenols and polysaccharides[J]. Plant Mol Biol Rep, 2002, 20:417a -417e.

[12] Lopez Gomez, Gomez Lim. A method for extracting intact RNA from rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp[J]. HortScience, 1992, 27:440-442.

[13] 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.

(上接第 172 页)

C 抗胃蛋白酶效果太差，植酸酶 D 的耐热稳定性较差、且在 pH 值为 5.5 条件下迅速下降至 40%左右，E 在 pH 值为 5.5~6.5 时活性只有 50%左右。目前市场上商品化植酸酶大多来源于曲霉的 3-植酸酶，其中黑曲霉 NRRL 3135 菌株 phyA 基因编码的植酸酶与烟曲霉 ATCC 13073 的菌株 phyA 基因编码的植酸酶显著不同且两者间具有强烈互补的酶学性质，可进一步通过分子生物学技术(如蛋白质工程)改造以获得较理想的植酸酶。可见，筛选“理想”的饲用商品植酸酶仍然是今后的研发重点之一[7]。目前，Bei 等[8]通过蛋白质工程已获得较理想的植酸酶。此外，虽然国标条件下的动物体外实验法是目前一种较为有效的评估饲料植酸酶活性的方法，但由于其反应条件不能完全模拟动物体内消化环境，因此仍具有相当的局限性。根据上述情况，我们认为要全面评估一种商品植酸酶，还必需进行相关的动物实验。

参考文献：

[1] 马东霞，苏晓鸥，张苏，等. 饲用植酸酶活性的测定分光光度法(GB/T18634-2002)[S]. 北京:全国饲料工业标准化技术委员会，2002.

[5] 宋友礼，颜亨宸. 植酸与植酸酶 [J]. 中国医药工业杂志，2002, 33(3):151-154.

[2] Boyce A, Walsh G. Comparison of selected physicochemical characteristics of commercial phytases relevant to their application in phosphate pollution abatement [J]. Journal of Environmental Science and Health Part A, 2006, 41:789 - 798.

[3] Inborr J, Gronlund A. Stability of feed enzymes in physiological conditions assayed by in vitro methods[J]. Agr Sci Finland, 1993, 2: 125 - 131.

[4] Yi Z, Kornegay E T. Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs[J]. Anim Feed Sci Tech, 1996, 61: 361 - 368.

[6] Eric Rodriguez, Jesus M P, Yanming Han, et al. Different sensitivity of recombinant Aspergillus niger phytase(r-PhyA) and Escherichia coli pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 365(2): 262-267.

[7] 陈庄，付捷，贝锦龙，等. 两种重组真菌植酸酶的纯化及其酶学性质比较)[J]. 四川大学学报 (自然科学版)，2007, 44 (5):1141-1146.

[8] Bei J, Chen Z, Fu J, et al. Structure -based fragment shuffling of two fungal phytases for combination of desirable properties[J]. J Biotechnol, 2009, 139(2):186~193.

万方数据