

木麻黄小枝总 RNA 提取方法的比较与优化

孙思^{1,2} 陈洁玲¹ 舒灿伟¹ 王军² 王新荣¹ 周而勋¹

1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 华南农业大学林学院, 广州 510642

摘要 分别采用 Trizol 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法、SDS 法和 Omega 试剂盒法从短枝木麻黄小枝中提取总 RNA。结果表明: 用 Trizol 法和异硫氰酸胍法没有提取到木麻黄总 RNA; 用 CTAB 法提取的 RNA 发生了降解; 只有 SDS 法和 Omega 试剂盒法成功提取到木麻黄小枝 RNA, 但质量均没有达到试验要求。对提取效果相对较好的 SDS 法进行改进, 主要是加入去除次生代谢物质的步骤。经检测, 改进后的 SDS 法提取的木麻黄小枝总 RNA 纯度高、完整性好, 能够满足 RT-PCR 分析等分子生物学研究的要求。

关键词 木麻黄; 小枝; 总 RNA; 提取方法

中图分类号 S 763; S 792. 93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0051-05

木麻黄(*Casuarina* spp.) 是世界上许多热带和亚热带地区广泛引种栽培的防护林树种, 其防护功能与作用尚无别的树种可以代替。因木麻黄具有特殊功能和实用价值, 故与其相关的生物技术与应用研究较多, 但关于木麻黄小枝上基因表达的研究较少^[1]。目前, 仅有 Laurent 等^[2]研究了 *cgMT1* 基因在粗枝木麻黄(*Casuarina glauca*) 地下部分的表达时, 同时测定了该基因在地上部小枝上的表达以作为对照。

从木麻黄小枝中提取高质量的 RNA 是探索其基因表达的前提。由于 Laurent 等^[2]使用的 Bugos 等^[3]的方法时间较早, 试验存在过夜沉淀等烦琐的过程和全程低温离心等严谨的要求, 且因为其主要研究对象不是小枝, 也没有讨论所提取总 RNA 的质量, 所以不能明确产物是否适合于进行今后的分子生物学研究。

已知木麻黄含有极丰富的次生代谢物质^[4], 这些次生代谢物质对 RNA 的提取和纯化有不利影响。因此, 笔者以含有几种提取植物 RNA 的主流变性剂 SDS 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法和 Trizol 法为基础, 参考近年来新研究的各种提取方法中去除次生代谢物质的手段, 探索了一种简便有效的提取木麻黄小枝总 RNA 的方法, 旨在为相关的分子生物学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试短枝木麻黄(*C. equisetifolia*) 品系 FJ-5 由福建省林业科学研究院赠送。取供试木麻黄小枝经液氮速冻后置于 -80°C 保存备用。

1.2 主要试剂

试剂盒为 Omega 公司的植物 RNA 提取试剂盒, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.3 RNA 提取方法

采用 Omega 试剂盒提取, 具体操作按试剂盒说明书进行, 并根据试验情况和观察结果, 在操作过程中对提取方法不断加以改进和优化。

Trizol 法: 具体操作参考说明书进行。

异硫氰酸胍法: 参考 Piotr 等^[5]和李志能等^[6]的方法进行。

CTAB 法: 参考张燕梅等^[7]和王蔚等^[8]的方法进行。

SDS 法: 参考 Kam-Lock 等^[9]的方法进行。

1.4 RNA 检测

使用 Implen NanoPhotometer 微量核酸蛋白分析仪(德国 Implen 公司)测定供试 RNA 的质量浓度值($\mu\text{g}/\text{mL}$)及光密度比值 D_{260}/D_{280} 和 D_{260}/D_{230} , 以检测 RNA 的纯度, D_{260}/D_{280} 低于 1.7 表示

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家科技支撑计划课题“沿海防护林主要病虫害防控技术研究”(2009BADB2B0203-01)

孙思, 硕士, 讲师, 在职博士研究生. 研究方向: 分子植物病理. E-mail: sunsi@scau.edu.cn

通信作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病原真菌及分子植物病理. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

蛋白等杂质过量, D_{260}/D_{230} 低于 2.0 表示酚和多糖等次生代谢物类杂质过量。用 $1 \times \text{TAE}$ 、1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。

$$\text{RNA 得率}/(\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{\text{浓度值} \times 10^{-3} \times 30 \mu\text{L}}{\text{样品质量}(\text{g})}$$

1.5 RT-PCR 分析

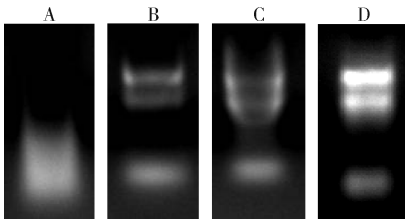
反转录使用大连 TaKaRa 公司 RT-PCR Kit 试剂盒, PCR 体系按说明书配制。选用植物通用的 18S rDNA 的引物对进行扩增, 引物序列和 PCR 反应条件参考 Simona 等^[10]的方法。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法的比较

试验结果表明, 用 Trizol 法和异硫氰酸胍法未能提取到木麻黄小枝总 RNA, 用 CTAB 法提取的 RNA 发生了降解(图 1-A), 而用 SDS 法(图 1-B)和 Omega(图 1-C)试剂盒能成功地提取到 RNA, 但由图 1 可知, SDS 法和 Omega 试剂盒 2 种方法得到的结果均不理想, 28S rRNA 和 18S rRNA 的亮度较为接近, 且条带中心比边缘“空虚”, 说明其完整性较差, 可能丢失了部分信息。

不同方法提取到木麻黄小枝总 RNA 纯度的检测结果见表 1。由表 1 可知, Omega 试剂盒提取到木麻黄小枝总 RNA 纯度高于 SDS 法提取到的 RNA 纯度, 但仍然未达到后续试验如 RT-PCR 等的要求, 特别是代表盐、胍和多糖等杂质含量的光密度 D_{260}/D_{230} 值, 远低于参考值 2.0。图 1-D 为用改进的 SDS 法提取木麻黄小枝总 RNA 的电泳分析, 结果表明提取效果较好, 操作方法与改进过程在后续文详述。



A、B、C 和 D 分别为 CTAB 法、SDS 法、Omega 试剂盒法和改进的 SDS 法。A、B、C 和 D correspond to CTAB method, SDS method, Omega RNA isolation kit method and improved SDS method, respectively.

图 1 不同方法提取 RNA 的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of RNAs extracted by different methods

表 1 不同方法提取木麻黄总 RNA 的光密度比值和得率

Table 1 The optical density ratios and yields of total RNA extracted by different methods

提取方法 Extraction methods	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{230}	得率/ $(\mu\text{g}/\text{g})$ Yield
SDS	1.082	0.289	61.8
Omega 试剂盒 Omega RNA isolation kit	1.578	0.421	129.0

2.2 SDS 法的改进

因试剂盒提取 RNA 的步骤已经固定, 故下一步选择在 SDS 法的基础上进行改进。首先考虑在加入提取缓冲液前先进行抽提, 除去次生代谢物质的主体部分, 在提取后再进行纯化以清除残留的杂质。已有的研究表明, 丙酮作为一种高效的有机溶剂可以实现这个目标^[7]。

改进方法的第 1 步: 用液氮研磨木麻黄小枝后, 先用 70% 的丙酮抽提 2~3 次(此方法用 I 表示)。经丙酮抽提后, RNA 的 2 个光密度比值都有大幅上升, 证明了丙酮溶解和去除干扰物质的作用。试验中观察发现, 如不使用丙酮抽提而直接使用提取缓冲液, 之后使用酚/氯仿/异戊醇抽提到第 3 次时, 仍能在中间层观察到极少量白色物质, 因此必须继续增加抽提次数; 而先使用丙酮后, 酚/氯仿/异戊醇抽提到第 3 次时肉眼观察中间层已经完全清澈, 同时 RNA 的得率较改进前的原始提取方法明显上升, 可能的原因也同样是因为使用丙酮抽提显著降低了杂质对提取过程的干扰。

改进方法的第 2 步: 在改进方法第 1 步的基础上参考已有的提取 RNA 方法继续改进。原始提取方法中已经包括了加入 PVP、高体积比无水乙醇和醋酸钠(NaAc)沉淀、高浓度氯化锂(LiCl)沉淀等去除蛋白质和其他杂质的步骤^[11], 因此, 考虑在 2 次沉淀之间再加上纯化 RNA 的步骤, 备选方案为按顺序用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提 1 次(此方法用 II 表示)^[7]或用低浓度 LiCl(2 mol/L)洗涤沉淀、溶解杂质(此方法用 III 表示)^[10]。

试验观察结果显示: 使用 II 方法可进一步提高 RNA 的光密度值, 得率轻微降低, 说明用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提 1 次后提高了 RNA 的纯度, 且不会导致 RNA 大量损失; 使用 III 方法后 RNA 的光密度值略有提高, 但得率显著下降, 说明用低浓度 LiCl 洗涤沉淀、溶解杂质可导致 RNA 的大量损失。根据已有的研究结果^[7], 应该是低浓度

表 2 改进的 SDS 法提取木麻黄总 RNA 的光密度比值和得率

Table 2 The optical density (OD) ratios and yields of total RNAs extracted with improved SDS method

提取方法 ¹⁾ Extraction method	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{230}	得率/ $(\mu\text{g}/\text{g})$ Yield
SDS	1.082	0.289	61.8
SDS+ I SDS+ I	1.543	0.764	109.2
SDS+ I + II SDS+ I + II	1.708	1.488	96.6
SDS+ I + III SDS+ I + III	1.692	1.082	33.0
SDS+ I + II + IV SDS+ I + II + IV	1.889	2.012	91.8

1) I: 液氮研磨后先用 70% 的丙酮抽提 2~3 次; II: 2 次沉淀之间按顺序用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提 1 次; III: 2 次沉淀之间用低浓度 LiCl (2 mol/L) 洗涤沉淀、溶解杂质; IV: 在高体积比无水乙醇和 NaAc 沉淀 RNA 之前, 用低体积比无水乙醇和 NaAc 沉淀去除多糖。I: Samples were extracted with acetone 2~3 times after being ground in liquid nitrogen; II: Between the two steps of precipitation, samples were extracted with phenol: chloroform: isoamyl alcohol and chloroform: isoamyl alcohol, respectively; III: Between the two steps of precipitation, samples were washed and the impurity substances were dissolved with low concentration of LiCl (2 mol/L); IV: Before precipitating RNA with high volume ratio absolute ethyl alcohol and NaAc, polysaccharide was precipitated by low volume ratio absolute ethyl alcohol and NaAc.

LiCl 溶解部分沉淀 (RNA 中的杂质), 只会使沉淀的量部分减少, 但实际操作中加入低浓度 LiCl 后, 沉淀全部溶解, 在 4 °C、12 000 r/min 下离心 20 min 后也无肉眼可见的沉淀, 使最后得到的 RNA 的量减少, 因此, 下一步试验将继续使用 II 方法。

根据以上试验结果, 光密度 D_{260}/D_{280} 值已经超过了 1.7 的参考值, 但光密度 D_{260}/D_{230} 值仍未达到 2.0 的参考值, 即仍有多糖类物质的干扰, 因此, 在高体积比无水乙醇和 NaAc 沉淀 RNA 之前, 再增加一步低体积比无水乙醇和 NaAc 沉淀去除多糖的步骤 (用 IV 表示)^[12]。2 个光密度比值分别为 1.889 和 2.012, 均超过参考值, RNA 得率 (91.8 $\mu\text{g}/\text{g}$) 只有轻微降低。

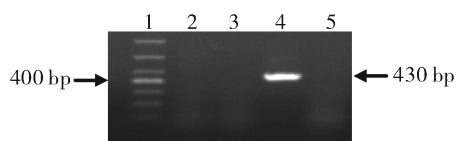
电泳检测结果显示每次提取均存在不同程度的 DNA 污染, 因此, 为保证后续试验的顺利进行, 需用 DNase I 处理以消除 DNA。

综合原始与传统方法, 改进后木麻黄小枝总 RNA 的提取方法: 预先混合 750 μL 提取缓冲液和 750 μL 氯仿/异戊醇; 液氮研磨 100 mg 组织 1 mL 70% 丙酮抽提 3 次; 倒掉丙酮, 加入混合液, 涡旋振荡; 12 000 r/min 室温离心 2 min, 取其上清液, 加入等体积酚/氯仿/异戊醇, 混匀后 12 000 r/min 室温离心 2 min, 重复该步骤直至中间层清晰; 取其上清液, 加入 1/10 体积的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L, pH 5.2), 混匀后 12 000 r/min 室温离心 10 min; 取其上清液, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L, pH 5.2), 混匀后 4 °C 沉淀 30 min; 12 000 r/min、4 °C 离心 20 min; 加入 DNase I、DNase I Buffer 和 RNA 酶抑制剂, 37 °C 温浴 15 min, 用 DEPC 水补足 400 μL , 依次加入等体积酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提 1 次; 取其上清液, 加入 10 mol/L LiCl 至终浓度 2 mol/L, -20 °C 沉淀 60 min; 12 000 r/min、4 °C 离心 20 min; 70% 乙醇和无水乙醇各洗涤沉淀 1 次, 风干后用 30 μL DEPC 水溶解沉淀, -80 °C 保存备用。提取缓冲液的成分为: 0.25 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 20 mmol/L EDTA, 1% (质量/体积) SDS 和 4% (质量/体积) PVP。

重复 2 次使用最终确定的方法提取木麻黄小枝总 RNA, 并测定光密度 D_{260}/D_{280} 、 D_{260}/D_{230} 值和得率, 2 次测定结果的所得值分别为 1.812、1.982、84 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 1.857、2.067、82 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。测定结果中几项指标的数值略有下降, 这可能与加入 DNase I 处理的步骤有关, 但仍能达到参考指标, 对后续试验没有负面影响。对使用改进后方法提取的木麻黄小枝总 RNA 进行电泳检测的结果见图 1-D。28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍, 表明 RNA 的完整性较好。

2.3 RT-PCR 分析

用本试验建立的改进的 SDS 法提取的木麻黄小枝总 RNA, 经反转录后, 用植物通用 18S rDNA 的上下游引物进行扩增, 能够扩增出预期长度约为 430 bp 的条带 (图 2 泳道 4)。以未经反转录的 PCR 和不加模板的 RT-PCR 产物为对照 (图 2 泳道 2 和 3), 结果没有产生条带, 说明已经去除了 DNA 的污染。用试剂盒法提取的 RNA 进行 RT-PCR, 也没有产生条带 (图 2 泳道 5)。说明本试验建立的改进 SDS 法提取效果比试剂盒提取的效果好。



泳道 1、2、3、4 和 5 分别为 Marker、改进的 SDS 法提取的 RNA 直接进行 PCR、不加模板 RNA 的 RT-PCR、改进的 SDS 法提取的 RNA 进行 RT-PCR 和 Omega 试剂盒法提取的 RNA 进行 RT-PCR。Lane 1, 2, 3, 4 and 5 are Marker, control PCR using the total RNA extracted with improved SDS method, RT-PCR without any template RNA, RT-PCR using the total RNA extracted with improved SDS method, RT-PCR using the total RNA extracted with RNA extraction kit, respectively.

图 2 18S rDNA 的 RT-PCR 扩增

Fig. 2 RT-PCR amplification of the 18S rDNA

3 讨论

变性剂的选择是核酸提取成功的关键,但其他步骤也对最终获得核酸的质量有很大影响,特别是提取极易降解的 RNA,需要根据各步骤的作用原理进行更谨慎的选择。木麻黄小枝的特点是含有极为丰富的次生代谢物,包括单宁、黄酮和多糖等,再加上蛋白质的作用,可能对提取 RNA 的过程产生干扰,使 RNA 产物纯度降低。因为这些次生物质易与 RNA 发生不可逆的共沉淀,如果在使用提取缓冲液提取后再进行纯化就为时已晚,很难比较彻底地分离这些物质。这一特点不同于低等的微生物和一些草本植物,因此,本试验选择在加入关键的提取缓冲液前先用丙酮进行抽提,除去次生代谢物质的主体部分,在提取后再进行纯化以清除残留的杂质,而不是先变性分离 RNA 后再进行纯化。加入这一步骤后代表 RNA 质量的 D 值和产量的得率均有较大幅度上升,表明该步骤是可行的。

Bugos 等^[3]建立的从植物中提取 RNA 的方法,使用了十二烷基肌酸钠(sarkosyl)作为变性剂,这主要是针对一些用胍类变性剂提取 RNA 效果较差的植物,且具有无需使用超速离心的优点。本试验建立的针对木麻黄小枝特点提取 RNA 的方法与该方法相比具有以下优势:一是使用 SDS 为变性剂,SDS 的价格仅为 sarkosyl 的 1/8 左右;二是试验时间大大缩短,无需过夜沉淀,提取过程可在 5 h 内完成;三是除两处沉淀 RNA 的步骤需 4 °C 冷冻离心外,其他离心均可在常温下完成。

本试验使用的各种提取方法都是经过验证在其他植物上有效的,但在本试验中仅有 SDS 法和

Omega 试剂盒法能成功提取到木麻黄小枝总 RNA,说明任何一种方法都没有普遍的适用性,必须进行尝试与验证。Trizol 法主要适用于微生物和内含物较少的植物,通常不适用于次生代谢物丰富的木本植物^[13-14]。异硫氰酸胍法没有提取到木麻黄小枝总 RNA,这与 Bugos 等^[3]建立的方法提取结果相近,该方法适用于胍类变性剂较难提取 RNA 的植物种类。Trizol 法中的 Trizol 因含有异硫氰酸胍,结果提取失败;异硫氰酸胍法的变性剂中既有 sarkosyl,也有异硫氰酸胍,结果也提取失败;Bugos 等的方法变性剂中只有 sarkosyl,不含异硫氰酸胍,结果提取成功。据此推测异硫氰酸胍可能不适用于提取木麻黄小枝总 RNA。使用 CTAB 已经成功地从包括木麻黄小枝在内的多种木本植物中提取到了 DNA^[15-16],本试验中 CTAB 法除变性剂外,提取过程与 SDS 法相近,但只有降解的条带,说明 CTAB 可能仅适用于提取木麻黄小枝 DNA,而不适用于提取 RNA。试剂盒法的适用性虽较为普遍,但提取的 RNA 纯度有不确定性,如纯度过低(杂质过多)则可能对下游试验产生不利影响(如本研究的 RT-PCR 试验未能取得预期的结果),这可能也是试剂盒的普遍适用性带来的负面结果。

参 考 文 献

- [1] 黄桂华,仲崇禄,苏晓华,等. 分子生物技术在木麻黄科植物研究中的应用[J]. 广东林业科技, 2006, 22(3): 75-80.
- [2] LAURENT L, HASSEN G, EMILE D, et al. Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca* [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49: 81-92.
- [3] BUGOS R C, CHIANG V L, ZHANG X H, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine [J]. Biotechniques, 1995, 19: 734-737.
- [4] 郭权, 梁子超. 木麻黄组织抽提物对青枯菌生长的抑制作用及其与抗病性的关系[J]. 华南农业大学学报, 1985, 6(3): 49-57.
- [5] PIOTR C, NICOLETTA S. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on [J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 581-585.
- [6] 李志能, 黄文俊, 张佳琪, 等. 异硫氰酸胍法快速提取二球悬铃木组织总 RNA 的研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 266-269.
- [7] 张燕梅, 周文钊, 李俊峰. 剑麻不同组织 RNA 提取方法比较分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 201-208.
- [8] 王蔚, 周文钊. 剑麻核酸的高效提取及应用[J]. 热带作物学报,

- 2008, 29(6): 725-729.
- [9] KAM-LOCK C, CHAI-LING H, PARAMESWARI N, et al. A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides [J/OL]. *Nature Protocols*, 28 March 2007. <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/208>.
- [10] SIMONA B, ILSE K. Isolation of high-quality RNA from poly-phenol-polysaccharide- and lipid-rich seeds [J]. *Phytochemical Analysis*, 2006, 17(3): 144-148.
- [11] 杨占军, 谷守琴, 张健. 几种植物组织总 RNA 提取方法的特点及疑难对策 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(18): 8341-8342.
- [12] YAO J, FU W, WANG X, et al. Improved RNA isolation from *Laminaria japonica* Aresch (Laminariaceae; Phaeophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21: 233-238.
- [13] 荆贝贝, 金伟波, 王亚红, 等. 银杏种仁总 RNA 提取方法 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(10): 2064-2065.
- [14] 赖茜, 余迪求. 4 种榕树总 RNA 提取方法的比较 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2008, 30(6): 636-640.
- [15] 李晓青. 木麻黄小枝基因组 DNA 的快速提取研究 [J]. *福建师范大学学报: 自然科学版*, 1999, 15(3): 84-88.
- [16] 张博, 张露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 提取方法 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2004, 28(1): 13-16.

Comparison and optimization of total RNA extraction methods from twigs of *Casuarina* spp.

SUN Si^{1,2} CHEN Jie-ling¹ SHU Can-wei¹ WANG Jun² WANG Xin-rong¹ ZHOU Er-xun¹

1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract High-quality RNA extracted from the twigs of *Casuarina equisetifolia* is used as the basis for the study of its gene expression. Five RNA extraction methods, i. e. Trizol method, CTAB method, guanidine thiocyanate method, SDS method and Omega RNA isolation kit, were used to extract total RNA from the twigs of *C. equisetifolia*. The results showed that RNA was unable to be extracted with Trizol and guanidine thiocyanate methods, and the RNA extracted with CTAB method was degraded; only SDS and Omega RNA isolation kit methods could successfully to extract RNA from the twigs of *C. equisetifolia*, however, the RNA quality didn't meet the requirement of further experiment. SDS method, the most favourable methods in this study, was improved to get better results, and the major improvement was the addition of steps for removing secondary metabolites. Evaluation experiment indicated that RNA with high quality and yield was obtained from the improved SDS method, and could be used for further study of molecular biology such as RT-PCR.

Key words *Casuarina* spp.; twigs; total RNA; extraction method

(责任编辑: 陈红叶)