

桑椹总 RNA 抽提方法的比较

周向红, 易乐飞, 王萍*

(淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为对比 CTAB 改良法、E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II、EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法 4 种方法抽提桑椹总 RNA 的效果, 对该 4 种方法抽提后的总 RNA 进行纯度、得率和完整性检测以及进一步的 RT-PCR 检测。结果显示: CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 均适用于桑椹总 RNA 抽提, 获得的总 RNA 纯度高、得率高、完整性好, 完全可用于后续的分子生物学实验; 但两者相比, CTAB 改良法成本更低, 操作更简单。

关键词: 桑椹; 总 RNA; 抽提; 方法比较; 多酚; 多糖

Comparison of Methods for Total RNA Extraction from Mulberry Fruit

ZHOU Xiang-hong, YI Le-fei, WANG Ping*

(School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Four methods, including modified CTAB, E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II, EZ-10 Span Column Total RNA Isolation Kit and guanidine thiocyanate, were evaluated for their performance for isolating total RNA from mulberry fruit by comparing total RNA yield, purity and completeness as well as RT-PCR results. The results showed that modified CTAB method and E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II were adequate for extracting total RNA from mulberry fruit. The acquired total RNA had a good quality and could be absolutely suitable for being used for further molecular biology experiments. Besides, the modified CTAB method was more economical and easier to operate than E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II.

Key words: mulberry fruit; total RNA; extraction; comparison; polyphenol; polysaccharide

中图分类号: Q812

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0209-04

桑椹又名桑葚、桑果、桑枣等, 为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的成熟聚花果, 在我国已有几千年的栽培历史, 从南到北均有分布, 资源丰富^[1]。桑椹含有多种维生素、游离氨基酸、有机酸、矿物质、白藜芦醇、芦丁、多糖、黄酮类物质和花色素等, 具有驻颜抗衰老、增强免疫力、防癌抗诱变、保肾护肝、促进造血细胞生长、降低血糖血脂等功效, 素有“中华果皇”之美誉; 桑椹既是食品又是药品, 也是国际公认的第三代水果之一, 是开发功能性食品的优质原料, 在食品和医药工业中有广泛的应用前景, 目前已开发出果汁、果酱、天然色素等产品^[1-4]。

随着桑椹的保健和药用价值越来越受到重视, 开展其营养成分、药用组分、贮藏和加工工艺等相关功能基因组研究尤为重要; 通过上述研究能改进桑椹的味

道, 优化营养品质, 提高药用组分含量, 增加耐贮藏性, 最后提高桑椹的商品价值^[5]。开展上述功能基因组研究(例如 cDNA 文库构建、Northern 杂交、相关基因克隆、基因表达分析等)的第一步也是关键的一步就是高质量桑椹总 RNA 的抽提。植物总 RNA 抽提已有很多研究^[6-7], 但不同植物以及同一植物的不同组织和不同生长阶段因其内含物不同适用的 RNA 抽提方法就会不同。桑椹含有丰富的多酚、多糖以及其他一些次生代谢产物, 这给总 RNA 的分离纯化带来了较大困难; 而且桑椹总 RNA 抽提方法目前尚无报道, 因此寻找适合桑椹总 RNA 抽提的方法显得尤为必要。本实验拟比较 CTAB 改良法、E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II、EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法 4 种抽提方法, 获得适合桑椹总 RNA 抽提的方法。

收稿日期: 2010-07-29

基金项目: 教育部大豆重点实验室开放课题(SB08A03)

作者简介: 周向红(1977—), 女, 实验师, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: zxh309309@yahoo.com.cn

* 通信作者: 王萍(1957—), 女, 教授, 博士, 主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail: y_pwang@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

紫红色桑椹(采摘后速冻于液氮中备用)。

E.Z.N.A.TM总RNA抽提试剂盒II试剂盒 美国Omega公司; RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit 试剂盒 加拿大Fermentas公司; EZ-10柱式总RNA抽提试剂盒试剂盒、Taq酶、dNTP、琼脂糖、Tris、EDTA 加拿大BBI公司; CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)、异硫氰酸胍、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、LiCl 上海生工生物工程公司; 无水乙醇(分析纯); Goldview染料 北京赛百盛公司; 引物由上海生工生物工程公司合成。

SmartSpec Plus 核酸蛋白定量仪、iCycler PCR仪、Quality one 凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司; 电泳仪和电泳槽 北京六一仪器厂。

1.2 抽提方法

1.2.1 CTAB改良法

① 100mg 桑椹经液氮研磨后加入 700 μ L CTAB 裂解液[0.1mol/L Tris-Cl(pH8.0), 1.4mol/L NaCl, 0.05mol/L EDTA, 2g/100mL CTAB, 2g/100mL PVP], 涡旋振荡混匀后, 置于 60℃水浴 30min; ②加入等体积的氯仿, 振荡混匀, 室温 12000r/min 离心 10min, 取上清液; ③加入 1/4 体积 10mol/L LiCl, 放置 30min, 12000r/min 离心 10min, 弃上清液; ④加入 1mL 75% 乙醇漂洗沉淀, 12000r/min 离心 5min, 弃上清液; ⑤自然干燥后加入适量 DEPC 处理水溶解 RNA。

1.2.2 E.Z.N.A.TM总RNA抽提试剂盒II法

参照试剂盒说明书进行, 共需 13 个步骤完成 RNA 抽提。

1.2.3 EZ-10柱式总RNA抽提试剂盒法

参照试剂盒说明书进行, 共需 9 个步骤完成 RNA 抽提。

1.2.4 异硫氰酸胍法

①取 100mg 桑椹于液氮研磨, 加入 1mL 裂解液(4mol/L 异硫氰酸胍、25mmol/L 柠檬酸钠、0.5g/100mL 十二烷基肌氨酸钠), 振荡混匀; ②加入 0.1mL 2mol/L 乙酸钠(pH4.0)、1mL 酚和 0.2mL 氯仿, 振荡混匀 15s, 12000r/min 离心 10min, 取上清液; ③加入等体积异丙醇, 放置 30min, 12000r/min 离心 10min, 弃上清液; ④加入 1mL 75% 乙醇溶液漂洗沉淀, 12000r/min 离心 5min, 弃上清液; ⑤自然干燥后加入适量 DEPC 处理水溶解 RNA。

1.3 总RNA质量检测

1.3.1 核酸蛋白定量仪检测

使用核酸蛋白定量仪测定桑椹总 RNA 在波长 230、260、280nm 处的吸光度, 计算 A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280} 的比值得到纯度, 计算 $A_{260} \times 40(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times \text{RNA 原液体积(mL)} / \text{所取样品质量(g)}$ 得到得率($\mu\text{g/g}$)。每种抽提方法重复抽提 3 次, 因此最后的结果用“平均值 \pm 标准差”表示。

1.3.2 电泳检测

从 CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的总 RNA 中取出约 500ng, 从 EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法抽提的总 RNA 中取出全部剩余量, 接着进行 1.0% 非变性琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察并拍照, 以检测其完整性。

1.3.3 RT-PCR

各取 1mg 桑椹总 RNA 为模板, 以 random 6 mers 为引物, 使用 RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit, 按说明书的反应条件合成第一链 cDNA。使用上海生工的随机引物 S19(5'ACCCCGAAG3')、S1036(5'AAGGCACGAG3')和 S1500(5'CTCCGCACAG3'), 分别进行 PCR, 反应在 25mL 体系中进行, 体系中含有 1 \times PCR Buffer、2mmol/L MgCl_2 、0.2mmol/L dNTP、0.6mmol/L 引物、2U Taq 酶、1mL 第一链 cDNA。PCR 循环为 95℃预变性 5min, 接着 40 个循环, 每个循环中 95℃变性 30s、36℃退火 30s、72℃延伸 2min, 最后 72℃重复延伸 5min。反应后取 3mL PCR 产物进行电泳检测并拍照。

2 结果与分析

2.1 总RNA纯度与得率

表 1 4 种方法抽提的桑椹总 RNA 的纯度及得率

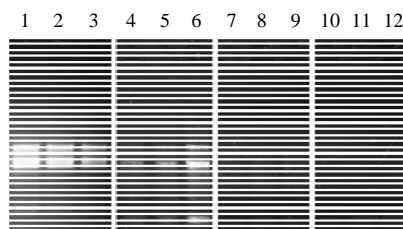
Table 1 Comparison of four methods for extraction of total RNA from mulberry fruits in terms of total RNA purity and yield

方法	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	得率/(mg/g)
CTAB 改良法	2.39 ± 0.08	2.03 ± 0.03	67.50 ± 3.24
E.Z.N.A. TM 总 RNA 抽提试剂盒 II	2.18 ± 0.42	1.94 ± 0.06	54.28 ± 13.09
EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒	0.43 ± 0.19	2.87 ± 0.99	7.80 ± 3.81
异硫氰酸胍法	0.68 ± 0.10	1.21 ± 0.12	10.96 ± 0.66

表 1 显示, CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的桑椹总 RNA 纯度高, A_{260}/A_{280} 接近 2.0, A_{260}/A_{230} 大于 2.00, 得率均大于 54mg/g; 而 EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 均不理想, 得率均低于 11mg/g。因此将 CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的总 RNA 继续进行 RT-PCR 检测。

2.2 桑椹总RNA完整性

电泳结果显示, CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的总 RNA 完整性好, 28S、18S rRNA 条带清晰完整, 无明显降解, 无 DNA 残留, 点样孔干净、无杂质残留; 而 EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法抽提样品无明显条带显示。



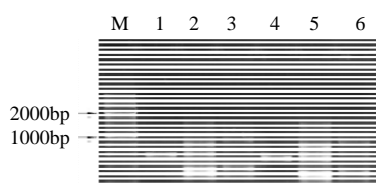
1~3、4~6、7~9、10~12 泳道分别为 CTAB 改良法、E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II、EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法抽提的桑椹总 RNA。

图 1 4 种不同方法抽提的桑椹总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophorogram of total RNA from mulberry fruit extracted by four different methods

2.3 桑椹总 RNA 的 RT-PCR

总 RNA 反转录后进行随机引物 PCR, 电泳显示清晰的扩增条带, 这说明 CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的总 RNA 质量良好, 总 RNA 中没有抑制反转录酶活性的物质, 完全能满足在分子水平上对桑椹进行深入研究的需要。



M. 200bp DNA Marker; 1~3、4~6 分别为 CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的 RNA 的 RT-PCR 结果。

图 2 桑椹 cDNA-RAPD 凝胶电泳图

Fig.2 cDNA-RAPD amplification from mulberry fruit

3 讨 论

RNA 纯度是评价抽提方法的指标之一, 即要求 RNA 中没有明显的蛋白质、多糖、多酚和 DNA 等残留。桑椹富含多酚和多糖等次生代谢产物, 给桑椹 RNA 分离纯化带来了很大困难。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似, 在 RNA 抽提过程中易与 RNA 一同形成难溶的胶状物而难以分开^[8]; 多酚容易被氧化为醌类物质, 并与 RNA 不可逆结合, 从而阻碍 RNA 抽提^[9]。因此获得高质量桑椹总 RNA 的关键是去除多酚和多糖等次生代谢

产物的影响。近年来已有一些去除多酚和多糖的相关报道^[9-11]。CTAB 在高离子强度(大于 0.7mol/L NaCl)的溶液里, 与蛋白质和大多数酸性多聚糖以外的多聚糖形成不溶的复合物, 但不能与核酸形成沉淀^[12], 因此 CTAB 多被用于去除多糖, 在植物 RNA 抽提中被广泛使用。PVP 具有很强的结合多酚的能力, 这样在抽提初始阶段通过离心可以将多酚去除^[13]。DNA 与 RNA 在 LiCl 溶液中具有不同的溶解度, 因此脱水剂 LiCl 可以选择性地沉淀 RNA, 还可防止多糖等其他生物大分子杂质沉淀, 从而纯化大分子 RNA^[12,14]。结果表明, CTAB 改良法确实能有效地去除多糖和多酚, 获得了高质量桑椹 RNA。在异硫氰酸胍法中裂解液主要成分为蛋白变性剂, 不含去除多糖和多酚的成分, 因此不能有效地抽提到桑椹总 RNA。由此可见, 桑椹总 RNA 抽提的关键还是要防止酚类化合物氧化和去除多糖等物质。这和香蕉^[15-16]、棉花^[13,17]等植物的相关研究结果一致。一般认为, 纯的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 2.0, A_{260}/A_{230} 比值应大于 2.0。在本实验中, CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的桑椹总 RNA 纯度良好, 其 A_{260}/A_{280} 比值接近 2.0, A_{260}/A_{230} 比值大于 2.00。相反, EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法抽提的桑椹总 RNA 纯度较差, 其 A_{260}/A_{230} 比值远小于 2, 表明有大量盐或多糖存在; EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒抽提的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值远大于 2.0, 表明有降解; 异硫氰酸胍法抽提的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值远小于 2.0, 表明有蛋白质或酚类等有机物质污染。

RNA 完整性是评价抽提方法的指标之二, 即要求 RNA 不被 RNase 或者机械剪切等降解。cDNA 文库构建、基因克隆和基因表达分析等许多后续分子操作都需要完整的 mRNA。但是细胞内 mRNA 种类繁多、大小不等, 而且 mRNA 一共只占总 RNA 的 1%~6%^[18], 无法通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。相反, 在真核细胞内 rRNA 只有 4 种, 占据了总 RNA 的约 90%^[19], 可以电泳检测。而且, 一般认为 RNase 和机械剪切对所有的 RNA 具有几乎相同的降解机率。因此, 传统上用总 RNA 中 rRNA 的电泳表现来反映 mRNA 完整性, 即 rRNA 显示完整则表示 mRNA 完整。在动物中 4 种 rRNA 分别是 28S、18S、5.8S、5S rRNA, 在植物中最大的 rRNA 分子比动物的 28S rRNA 稍小, 沉降系数(sedimentation coefficient)只有约 25S^[19-21], 但通常将动植物最大的 rRNA 分子统称为 28S rRNA。因此植物 mRNA 完整性则由 28S、18S rRNA 的电泳条带完整性表示。一般认为, 电泳后 28S、18S rRNA 条带完整、清晰、无拖尾、无弥散, 表示总 RNA 质量良好。在本试验中, CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 抽提的桑椹总 RNA 完全符合上述要求, 说明完整性良好。相反,

EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法抽提的桑椹总 RNA 几乎看不见 28S、18S rRNA 条带。

RNA 得率是评价抽提方法的指标之三,即要求最大限度地抽提出所有的 RNA。通常情况下,样品裂解越充分,得率越高;多酚等与 RNA 不可逆结合的越少,得率越高;RNA 沉淀越充分,得率越高。与 CTAB 相比,异硫氰酸胍虽是强烈的蛋白质变性剂,对组织细胞的裂解也充分,但是多糖和多酚等物质的制约使得异硫氰酸胍法的实际得率很低。得率不仅与抽提方法有关,更与样品 RNA 含量有关。在本实验中,CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 获得的桑椹总 RNA 的得率和香蕉果实^[15-16]、花生种子^[22]、葡萄果皮^[23]等相近,大约为 31~80mg/g。相比之下,叶片的得率要高很多,如葡萄^[23]、麦冬^[24]、半夏叶片^[25]等叶片总 RNA 得率在 190mg/g 以上。可能原因是果实本身 RNA 含量普遍偏低,如抽提葡萄幼叶总 RNA 得率为 261.20 $\mu\text{g/g}$,成熟叶得率为 191.40 $\mu\text{g/g}$,而完熟果皮得率仅为 31.50 $\mu\text{g/g}$ ^[23]。这种得率差异与不同抽提方法、不同物种、同一物种不同组织甚至同一组织不同生长阶段都有关系。

无酶抑制剂残留是评价抽提方法的指标之四,即要求总 RNA 中没有影响后续酶反应的微量杂质。由于样品裂解过程中加入了一些蛋白质变性剂,如异硫氰酸胍、CTAB 等,这些物质的微量残留会严重抑制后续酶反应,因此有效去除这些杂质残留尤为必要。在本实验中,CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 获得的总 RNA 完全适合后续的 RT-PCR 反应,说明总 RNA 中没有抑制反转录酶活性的物质。

综上所述,CTAB 改良法和 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 这两种方法都适用于桑椹总 RNA 的抽提,完全可以满足后续相关分子生物学研究的要求。但与 E.Z.N.A.TM 总 RNA 抽提试剂盒 II 相比,CTAB 改良法成本更低,操作步骤更少。EZ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒和异硫氰酸胍法虽然在动物组织细胞和植物幼嫩叶片上有不错表现,但在桑椹上表现不佳。因此不同植物以及同一植物的不同组织和不同生长阶段往往需要根据自身特点选择不同的 RNA 抽提方法。

参考文献:

- [1] 吴祖芳,翁佩芳.桑椹的营养组分与功能特性分析[J].中国食品学报,2005,5(3):102-107.
- [2] 周吴.桑椹子化学成分研究[D].南宁:广西大学,2007.
- [3] 杨小兰,毛立新,张晓云.黑桑椹对高脂血症大鼠的降脂作用研究[J].食品科学,2005,26(9):509-510.
- [4] 游元元.基于桑叶桑椹功效的多元光谱色谱信息研究及桑叶品质评价[D].成都:成都中医药大学,2008.
- [5] 罗云波.功能基因组的研究对未来食品产业发展的影响[J].农产品加工:学刊,2005(9/10):14-15.
- [6] KIEFER E,HELLER W,ERNST D. A Simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18(1): 33-39.
- [7] CHANG S J, PURYEAR J, CAINEY J. A simple and efficient method for RNA isolating from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11(2): 113-116.
- [8] LOGEMANN J, SCHELL J, WILLMITZER L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J]. Anal Biochem, 1987, 163(1): 16-20.
- [9] SCHNEIDERBAUER A, SANDERMANN H Jr., ERNST D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197(1): 91-95.
- [10] LÓPEZ-GOMEZ R, GOMEZ-LIM M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp[J]. HortSci, 1992, 27(5): 440-442.
- [11] TESNIERE C, VAYDA M E. Method for the isolation of high quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9(3): 242-251.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 66-67; 512; 1689.
- [13] 武耀廷, 刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总 RNA 的热硼酸改良法[J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 67-71.
- [14] SU X, GIBOR A. A method for RNA isolation from marine macroalgae[J]. Anal Biochem, 1988, 174(2): 650-657.
- [15] 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, 4(1): 143-146.
- [16] 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, 23(1): 136-137.
- [17] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/ 酚法提取棉花组织总 RNA[J]. 棉花学报, 2003, 15(3): 166-167.
- [18] STURANI E, COSTANTINI M G, MARTEGANI E, et al. Level and turnover of polyadenylate-containing ribonucleic acid in *Neurospora crassa* in different steady states of growth[J]. Eur J Biochem, 1979, 99(1): 1-7.
- [19] DEY P M, HARBORNE J B. Plant Biochemistry[M]. San Diego: Academic Press, 1997: 11-12.
- [20] CLICK R E, TINT B L. Comparative sedimentation rates of plant, bacterial and animal ribosomal RNA[J]. J Mol Biol, 1967, 25(1): 111-122.
- [21] HELDT H W, HELDT F. Plant Biochemistry[M]. San Diego: Academic Press, 2005: 532.
- [22] 任增凯, 禹山林, 杨庆利, 等. 花生种子总 RNA 提取的一种有效方法[J]. 花生学报, 2008, 37(3): 20-23.
- [23] 张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178-181.
- [24] 刘君, 韩烈保, 李雪, 等. 一种高质量麦冬总 RNA 的提取方法[J]. 生物技术通报, 2007(6): 101-104.
- [25] 吴林, 薛建平, 徐有明, 等. 半夏叶片总 RNA 四种提取方法及效果的比较[J]. 中草药, 2008, 39(6): 901-905.