

不同方法提取银杏叶片总RNA及RT-PCR

杨谷良 刘世旺 詹火元 徐艳霞 (黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北黄冈 438000)

摘要 以银杏叶片为材料, 分别采用CTAB法、SDS法和TRIzol法提取银杏叶片总RNA。结果表明:CTAB法、SDS法所提取的RNA经电泳检测, 28S rRNA、18S rRNA和5S rRNA 3条带清晰, RT-PCR得到的条带与目的片段大小一致, 说明所提取的RNA纯度高、质量好; TRIzol法所得到的RNA降解严重, 没有得到完整的电泳条带。CTAB法和SDS法适于富含多糖和多酚等物质的植物总RNA提取。

关键词 银杏; 总RNA; 提取; CTAB; SDS

中图分类号 S662.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03482-01

Comparison of RNA Extraction from *Ginkgo biloba* L. Leaf and RT-PCR

YANG Gu-liang et al (Huanggang Normal College, Huanggang, Hubei 438000)

Abstract In order to obtain high quality RNA from *Ginkgo biloba* L. leaf in which polyphenols and polysaccharides are rich, the method of CTAB, SDS and TRIzol were used to extract RNA and the effects of RNA extraction were studied with different methods. The results showed that three bands of 28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA were appeared after gel electrophoresis with the method of CTAB and SDS. The RNA samples were used to amplify cDNA through RT-PCR and the amplifications were observed in agarose gel by electrophoresis. The experimental results showed that the purity and concentration of the extracted RNA can meet the demands of molecular biology analysis. The RNA samples extracted with the method of TRIzol were degraded gravely and obtained without gel electrophoresis band. The method of CTAB and SDS are suited to extract the RNA of the plant tissues in which polyphenols and polysaccharides are rich.

Key words *Ginkgo biloba* L.; Total RNA; Extraction; CTAB; SDS

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 又名白果树、公孙树, 为雌雄异株的裸子植物, 是重要的药用植物, 其药用成分包括黄酮类、萜内酯、聚戊烯醇类和多糖等, 具有抗结核、抗细菌、抗皮肤真菌等功效^[1]。银杏叶片高质量总RNA的提取是进行银杏分子生物学研究的基础。由于银杏叶片内含物质极其复杂, 含有多糖、多酚及一些未能确定的次生代谢物, 这些物质的存在大大增加了提取高质量RNA的难度^[2]。笔者分别采用CTAB法、SDS法和TRIzol法来提取银杏总RNA。

1 材料与方法

1.1 材料 供试银杏叶片采自长江大学银杏科技园, 采集的样品用0.1%的DEPC处理后, 用干冰保存带回实验室保存于-70℃冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 预处理。普通玻璃器皿使用前于180℃干热灭菌8 h后, 用锡箔纸包裹备用; 一次性使用的塑料制品用0.1% DEPC溶液浸泡24 h后湿热灭菌; 所有溶液用DEPC处理过的水配制; 所有化学药品为RNA提取专用。

1.2.2 提取方法。

1.2.2.1 CTAB法^[2-5]。提取液: 2% (W/V) CTAB、2% (W/V) PVP、20 mmol/L EDTA、2.0 mol/L NaCl、2% (W/V) 的亚精氨和2%的β-巯基乙醇(使用前加入)。提取步骤: 取0.1 g叶片于研钵中, 加入液氮研磨成粉末状, 转入加有1 ml 65℃预热的提取液中, 65℃温浴30 min。加入等体积的氯仿异戊醇(24:1), 充分混匀, 冰浴10 min, 4℃、10 000 r/min离心15 min。取上清至一新离心管中, 加入1/4体积10 mol/L LiCl, 混匀后于4℃过夜, 4℃、10 000 r/min离心10 min, 将沉淀溶于100 μl水中。加入1/10体积3 mol/L NaAc和2.5倍体积的无水乙醇, -20℃沉淀30 min, 4℃、10 000 r/min离心

10 min, 弃上清, 75%乙醇洗沉淀2次, 于超净工作台中晾干后溶于适量水中, -70℃保存备用。

1.2.2.2 SDS法^[6-8]。提取液: 0.2 mol/L Tris-HCl (pH值9.0), 0.2 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 4% (W/V) SDS, 2% β-巯基乙醇, 2% (W/V) PVP。提取步骤: 取0.1 g叶片于研钵中, 加入液氮研磨成粉末状, 转入加有1 ml 65℃预热的提取液中, 同时加入1 ml 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 涡旋振荡混匀后于4℃、12 000 r/min离心5 min。取上清, 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 充分混匀后于4℃、12 000 r/min离心5 min。取上清, 加入1/10体积3 mol/L NaAc, 2.5倍体积的无水乙醇, -20℃沉淀30 min, 4℃、10 000 r/min离心10 min, 弃上清, 75%乙醇洗沉淀2次, 于通风橱中干燥后溶于适量水中, -70℃保存备用。

1.2.2.3 TRIzol法^[9]。取0.1 g银杏叶片, 液氮研磨成粉末状后, 加入1 ml TRIzol (Invitrogen), 按试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 RT-PCR。根据GeneBank上登陆的苯丙氨酸解氨酶基因(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL, GeneBank接收号为AY578145)序列, 合成PCR引物, UP: 5'-CCTAAGGAAG-GATTGGCC-3'和DOWN: 5'-AGTGACTGGGTTGGCAAG-3'。

PCR扩增反应体系为每管20 μl, 模板cDNA 1 μl, 引物UP和DOWN各17 pmol, 10×PCR Buffer 2.0 μl, dNTPs 0.012 μmol, MgCl₂ 0.05 μmol, Taq DNA聚合酶1 U。

PCR扩增程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min; 55℃ 1 min; 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min, 4℃保存。

2 结果与分析

分别取上述3种方法提取的总RNA 1 μl和10 μl变性加样Buffer混和, 在1.2%非变性凝胶上电泳分析, 发现使用CTAB法和SDS法所提取的总RNA有28S、18S和5S 3条清晰的条带, 且28S比18S的亮度要亮, 说明所提取的RNA样品完整、未降解, 而使用TRIzol法没有形成完整的条带, RNA降解严重(图1), 可能是因为TRIzol不能充分裂解银杏叶片组织的细胞。

基金项目 湖北省自然科学基金项目(2006ABA186); 黄冈师范学院自然科学重点项目(06CA21)。

作者简介 杨谷良(1974-), 男, 湖南宁乡人, 博士, 讲师, 从事植物分子生物学方面的教学与研究工作。

收稿日期 2007-01-24

(下转第3496页)

(上接第3482页)

取2 μ l RNA 样品,加入98 μ l DEPC 处理的水后,在核酸蛋白分析仪上测定,发现 CTAB 法和 SDS 法提取 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.926 4 和 1.903 1,说明提取的 RNA 无杂质污染,提取过程中加入的 CTAB、SDS、 β -巯基乙醇、PVP 等物质能有效地去除多糖、蛋白质、酚类物质等的干扰。

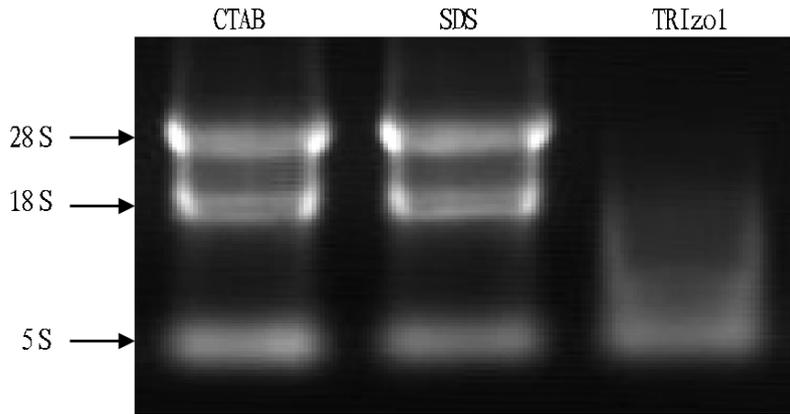


图1 银杏叶片总 RNA 图谱

分别以 CTAB 法和 SDS 法提取的银杏叶片 RNA 为模板进行逆转录,以逆转录得到的 cDNA 为模板,利用引物对 UP 和 DOWN 进行 PCR 扩增,扩增结果如图 2 所示,均得到了一条大小为 670 bp 左右的扩增条带。

3 结论

由于所选择的材料为银杏的老叶,多糖、酚类等物质含量较高^[2],提取高纯度的 RNA 有一定的难度。在提取过程中,使用了亚精氨、 β -巯基乙醇和 PVP 等物质,同时,增加了 NaAc 等的纯化步骤,降低了多糖、酚类等的干扰^[10],所获得

的 RNA 质量较高,RT-PCR 后获得了目的片段,为后续分子生物学的研究打下了基础。

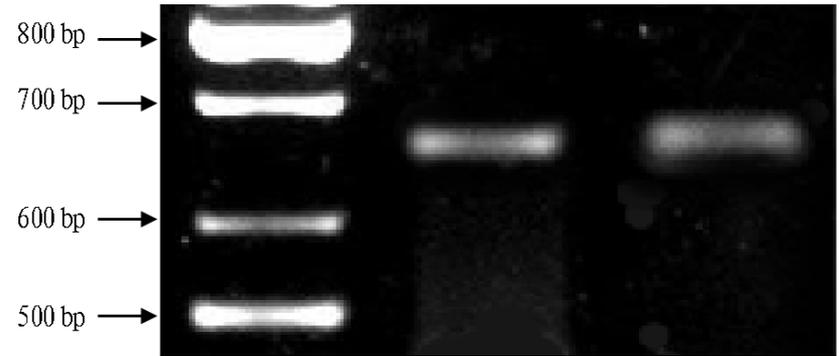


图2 银杏 PAL 基因的 RT-PCR 图谱

参考文献

- [1] 莫小路,黄学林.银杏悬浮培养细胞的生长、分化与萜内脂化化合物的积累[J].生物工程学报,2004,20(3):445-449.
- [2] 程水源,陈昆松,杜何为,等.银杏 RNA 的提取[J].果树学报,2005,22(4):428-429.
- [3] 蒋建雄,张天真.利用 CTAB/酸酚法提取棉花组织总 RNA[J].棉花学报,2003,15(3):166-167.
- [4] 杨谷良,谭晓风.热硼酸盐法提取梨雌蕊 RNA 方法改进及提取效果[J].西北林学院学报,2006,21(2):54-56.
- [5] 程超华,赵立宁,减巩固,等.一种提取悬铃木苜蓿 (*B. tricuspis* (Hance) Miino) 花序 RNA 的方法[J].中国麻业,2006,28(2):76-78.
- [6] 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.
- [7] 刘海,林德球,徐杰,等.一种从富含香蕉水果果肉的多酸和多酚化合物中提取 RNA 简单和快捷的方法[J].果树学报,2006,23(1):136-137.
- [8] 曹庆芹,湛谋华,伊华林,等.柑橘及近缘属总 RNA 的有效提取[J].果树学报,2005,22(4):426-427.
- [9] TRIzol plus RNA purification kit manuals [EB/OL]. [2006-09-20]. <http://www.invitrogen.com/cortert/sfs/manuals/15596026.pdf>.
- [10] 李宏.植物组织 RNA 提取的难点及对策[J].生物技术通报,1999(1):36-39.