

改进的 CTAB 法提取中华芦荟叶总 RNA

赵春喜, 马利华, 杨同文* (1. 郑州市卫生学校, 河南郑州 450005; 2. 周口师范学院, 河南周口 466000)

摘要 [目的] 为分离中华芦荟次生代谢相关基因, 构建成熟叶 cDNA 文库, 探索从适合富含多糖和凝胶植物组织中提取高质量 RNA 的方法。[方法] 以中华芦荟成熟叶为材料, 采用改进的 CTAB 方法提取纯化芦荟叶总 RNA。[结果] 所提取的叶总 RNA OD_{260}/OD_{280} 值为 1.88, 电泳显示 28 S、18 S 条带完整清晰, 以此 RNA 为模板的 RT-PCR 结果显示目标特异条带。[结论] 用该方法提取的 RNA 可用于 cDNA 合成、文库构建等后续分子生物学实验。

关键词 中华芦荟; CTAB 法; 总 RNA 提取

中图分类号 S682.33 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06671-02

Extraction of Total RNA in *Aloe vera* L. var. *chinensis* Leaf with Improved CTAB Method

ZHAO Chunxi et al (Zhengzhou Health School, Zhengzhou, Henan 450005)

Abstract Objective The cDNA library of cloning genes related to secondary metabolites was constructed. Method The total RNA was extracted from mature *Aloe vera* L. var. *chinensis* leaf with polysaccharides and gel with improved CTAB method. Result The electrophoresis pattern showed the bands of 18 S rRNA and 28 S rRNA were sharp and complete, OD_{260}/OD_{280} value of the extracted RNA was 1.88. The result of RT-PCR with the total RNA was positive. Conclusion These suggested the improved CTAB method could be suitable for the extraction of total RNA in *Aloe vera* L. var. *chinensis* with high quality and used in the subsequent molecular biological experiments such as reverse transcription and cDNA library construction.

Key words *Aloe vera* L. var. *chinensis*; CTAB method; Total RNA extraction

RNA 提取是分子生物学研究的基本操作, 高质量 RNA 的获得是进行 Northern 杂交分析、RT-PCR、cDNA 文库构建及体外翻译等实验的必要前提。常用的提取植物 RNA 的方法有异硫氰酸胍法^[1]、酚-SDS 法^[2]、CTAB-LiCl 法^[3]、TRIZOL 法及各种试剂盒法等。虽然这些方法在很多植物上都有成功的报道, 但由于不同植物及相同植物的不同组织间在物质组成上千差万别, 因此一种方法仅适用于某种或某类材料, 对于特殊的植物材料, 理想的 RNA 提取方法是在探索中逐渐完善的。

芦荟(*Aloe*) 属于单子叶植物百合科(Liliaceae) 多年生草本肉质植物, 富含多糖、凝胶、蒽醌等众多次生物质, 很多栽培种被证明具有多种医疗和保健功效^[4]。为了构建芦荟叶 cDNA 文库, 分离次生代谢相关基因, 笔者以中华芦荟 *A. vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Bergl 成熟叶为材料, 重点改进 CTAB 法中除多糖的操作步骤, 探索从适合富含多糖和凝胶植物组织中提取高质量 RNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料 选用盆栽 2 年的中华芦荟第 3 叶, 提取时剪取鲜叶中段约 0.5 g, 随即进行提取操作。

1.2 提取液与器具 提取缓冲液: 2% CTAB; 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 值 8.0; 25 mmol/L EDTA, pH 值 8.0; 2.0 mmol/L NaCl; 2% PVP; 2% - 巯基乙醇 (使用时加入)。SSTE 缓冲液: 0.5% SDS; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0; 1.25 mmol/L EDTA, pH 值 8.0; 1.0 mmol/L NaCl。

以上 RNA 提取液均用 0.1% DEPC 水处理并高压灭菌, 含 Tris 的溶液用经高压灭菌的 DEPC 水直接配制, 玻璃器皿于 180℃ 烘烤 6 h 以上, 塑料制品等用 0.1% DEPC 水 37℃ 浸泡过夜后高压灭菌。各种试剂配制参考文献 [5] 进行。

1.3 RNA 提取 在参考相关文献^[3,6] 的基础上, 进行了改良和优化, 具体步骤如下: 称取芦荟鲜叶 0.5 g 置于 180℃ 烘

烤过的研钵中; 向研钵中加入 1 ml 经 60℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液, 充分研磨至糊状; 用尖端剪除 0.5 cm 的蓝色吸头将糊状物全部转移到 2 ml 的离心管中, 充分振摇, 于 60℃ 水浴加热约 20 min, 其间剧烈振荡 2 次; 将离心管于 4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于新离心管中, 每管加入等体积水饱和酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 轻轻颠倒混匀, 冰上放置 10 min; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于新离心管中, 加入 1/10 体积 4 mol/L KAc (pH 值 4.8)、1/10 体积无水乙醇, 轻轻颠倒混匀, 然后加入等体积氯仿-异戊醇 (24:1), 混匀, 冰上放置 10 min; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于新离心管中, 加入 1/3 体积的 LiCl (8 mmol/L), 使 LiCl 终浓度为 2 mmol/L; 4℃ 放置 6 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 接着进行二次 LiCl 沉淀操作; 于离心管中加入 500 μl SSTE 缓冲液溶解沉淀, 加入 1/3 体积的 LiCl (8 mmol/L), 使 LiCl 终浓度为 2 mmol/L, 4℃ 放置 6 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次, 晾干 RNA, 加 50 μl 的 DEPC 水溶解。

1.4 总 RNA 的质量检测及浓度测定 对获得的芦荟总 RNA 取 5 μl 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测; 取 10 μl 总 RNA 溶液, 加 DEPC 水稀释至 1 ml, 分别在 260 和 280 nm 处测吸光值, 并计算 A_{260}/A_{280} 的比值。RNA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times$ 样品稀释倍数 $\times 40 \mu\text{g/ml}$; RNA 产量 (μg) = RNA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) $\times V$ (ml); RNA 产率 [$\mu\text{g/g}$ (鲜质量)] = RNA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) \times RNA 溶液的体积 (ml) / 样品鲜质量 (g)。

1.5 RT-PCR 根据 GenBank 中木立芦荟 (*A. arborescens* Mill) NADP 苹果酸酶基因序列 (AY179511) 设计 1 对引物: 5'-AGTGGCTACTCTTTGTTGC-3'; 5'-CTCACCGTCAGTAACCACT-3', 以所得总 RNA 反转录产物为模板, 50℃ 条件下退火进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度及产率 利用紫外分光光度计分析 RNA 纯度, 测得取样 0.5 g 时的 RNA 吸收值: $OD_{260} = 0.134$, $OD_{280} = 0.071$, $OD_{260}/OD_{280} = 1.88$, 平均得率为 53.60 $\mu\text{g/g}$ 。说明所

作者简介 赵春喜 (1950 -), 男, 河南郑州人, 讲师, 从事药理教学和研究。* 通讯作者, E-mail: tongwenyang@eyou.com。

收稿日期 2008-03-21

提取的总 RNA 中蛋白、多糖等杂质含量较少,产品的纯度较高,但该方法的产率相对偏低。

2.2 RNA 的完整性电泳检测 取提取的 5 μ l 总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示,总 RNA 28S、18S 的 RNA 条带清晰完整,其亮度比在 2:1 左右,无明显前脱尾现象,说明提取的 RNA 完整性较好,无明显降解。在上样孔处看不到亮斑,且条带基本无后脱尾,显示所提 RNA 较为纯净,多糖类物质除去较彻底。

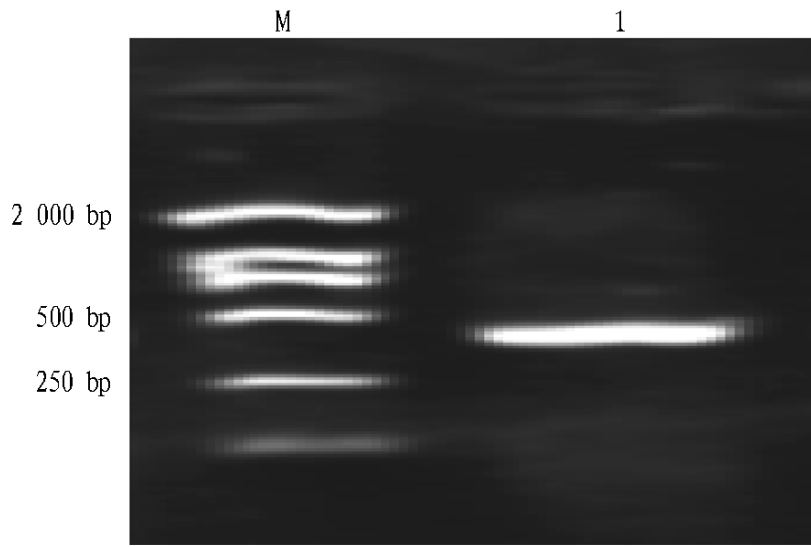
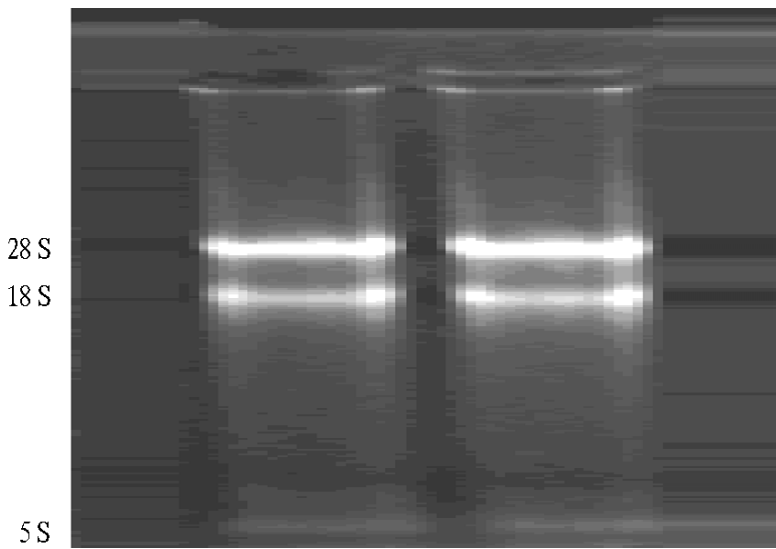


图1 中华芦荟成熟叶总 RNA 提取电泳图

Fig.1 Electrophoresis pattern of total RNA extraction from mature leaves of *A. vera* L. var. *chinensis*

2.3 RNA 反转录后的 PCR 扩增结果 以所得总 RNA 反转录产物为模板扩增中华芦荟 NADP 苹果酸酶 cDNA 的片段,结果如图 2 所示,所得产物片段大小 430 bp 左右,与预期结果一致。上述结果表明,获得的芦荟总 RNA 质量较好,能够满足如 RT-PCR 等以 RNA 为基础分子生物学研究。



注:M 为 DL2000 marker; 1 为 Amplified cDNA fragment。

Note: M. DL2000 marker; 1. Amplified cDNA fragment.

图2 RT-PCR 扩增 NADP 苹果酸酶基因片段

Fig.2 Fragment of NADP malic enzyme gene amplification by RT-PCR

(上接第 6616 页)

有明显的脱色效果。

3 小结

获得较好质量的壳聚糖实验条件,即碱处理方式 1+1+1,碱液浓度 50%,温度 110℃,甲壳素粒度 20,甲壳素的品种东海小虾壳。

参考文献

[1] 张卫东,李正魁,朱佳廷,等.壳聚糖电离辐射降解的研究[J].核农学

3 讨论

高质量的 RNA 是进行分子生物学研究的基础和关键,但淀粉、多糖、多酚等次生物质的存在使植物 RNA 的提取变得棘手。植物成熟组织常富含多糖,由于它的许多理化性质与 RNA 相似,因此很难将它们分开。多糖的污染使 RNA 溶解困难,定量不准,甚至抑制下游反应酶的活性^[7],因此污染了较多多糖的 RNA 样品不适于进一步的分子生物学研究。

通常除去多糖的方法有:在高浓度 Na⁺ 或 K⁺ 条件下,通过苯酚、氯仿等有机溶剂抽提;通过 LiCl 选择沉淀 RNA,使部分多糖留在上清液中;用低浓度乙醇选择沉淀多糖(10%~30%),而 RNA 仍保留于溶液中;无水乙醇和 5 ml/L 醋酸钾溶液配合以去除多糖杂质。实践经验表明,采用任何单一的方法都不能彻底除去 RNA 中的多糖,综合应用多种方法才可达到理想的效果。

芦荟是多年生肉质草本植物,成熟芦荟叶 60%~70% 属透明凝胶部分,凝胶中含大量多糖和多种次生物质,是较难提取 RNA 的植物之一。此前笔者曾用 Trizol 一步法和试剂盒法提取芦荟总 RNA,结果显示前者产物中多糖含量较高,电泳时样品出孔困难,后者对芦荟 RNA 的提取存在 DNA 污染问题。基于 LiCl 对 RNA 的选择沉淀特性,笔者用 CTAB 法提取芦荟叶总 RNA,同时对操作步骤进行了优化:根据芦荟叶的特点,将预热的提取缓冲液直接加到研钵,与材料一起研磨,这样不仅研磨充分,而且能迅速使溶出的蛋白变性,抑制了 RNA 酶活性;将水浴温度调整为 60℃,避免了材料中淀粉的糊化,使之更易于分离除去;综合应用多种措施及 LiCl 二次沉淀等方法尽可能地除去多糖杂质。结果表明,用改进 CTAB 法所提取的芦荟总 RNA 完整、无 DNA 污染、纯度较高,能满足反转录、PCR、构建 cDNA 文库等分子操作的要求。

参考文献

- [1] CHOMCZYNSKI P, SACCH N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, 162:156-159.
- [2] VAN DRIESSCHE E, BEECKMANS S, DEJAEGERE R, et al. The antioxidant of choice for the purification of protein from phenol-rich tissues[J]. *Anal Biochem*, 1984, 141:184-188.
- [3] TAYLOR B, POWELL A. Isolation of plant DNA and RNA[J]. *Focus*, 1982, 4:4-6.
- [4] 常秀莲,冯咏梅,丛丽华,等.芦荟的生物学功效研究新进展[J]. *食品科技*, 2007(5):10-13.
- [5] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,等译. 北京:科学出版社, 2003:582-584.
- [6] 杜希华,陆海,高述民,等.文冠果花药总 RNA 提取方法研究[J]. *北京林业大学学报*, 2003, 25(1):10-13.
- [7] FANG G, HAMMARS, GRUMET R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. *Bo Techniques*, 1992, 13:52-56.

报, 2005, 19(1):55-57.

- [2] 肖锦,周勤.天然高分子絮凝剂[M].北京:化学工业出版社, 2005:134, 136.
- [3] 陈盛,陈祥旭,黄丽梅,等.甲壳素脱乙酰度方法及测定比较[J]. *化学世界*, 1996(8):419-422.
- [4] 夏文水,王璋.脱乙酰化反应条件对壳聚糖性能的影响[J]. *无锡轻工业学院学报*, 1992, 11(2):105-110.
- [5] 张一烽,张富尧,陈剑峰.高脱乙酰度壳聚糖的制备及结构与性能研究[J]. *浙江化工*, 1992, 23(2):20-23.