

柑橘叶片总 RNA 的两种提取方法比较

姜娟, 薛皎亮, 谢映平*

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要:为了简便、快速提取高质量的柑橘(*Citrus reticulata* Banco)叶片总 RNA, 采用 TRIzol 法, 对北京天根公司 RNAlant Reagent 和日本 TaKaRa 公司 RNAiso Reagent 两种 RNA 提取试剂进行比较并适当改进。结果表明:通过琼脂糖凝胶电泳, 使用 TaKaRa 公司试剂提取的总 RNA 28S 和 18S 条带清晰, 紫外分光光度计检测分析 A_{260}/A_{280} 为 1.820, A_{260}/A_{230} 为 2.088, RNA 的浓度为 $2.840 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, 用于 RT-PCR 反应可成功克隆柑橘 β -actin 看家基因 228 bp 片段;采用天根公司试剂, 琼脂糖凝胶电泳显示 RNA 带型较模糊, 紫外分光光度计检测分析 A_{260}/A_{280} 为 1.464, A_{260}/A_{230} 为 1.603, RNA 的浓度为 $2.020 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, 达不到 RNA 的标准。TaKaRa 公司 RNAiso Reagent 试剂提取的柑橘叶 RNA 纯度和完整性较好, 能用于 Northern 杂交、cDNA 文库的建立及基因克隆等分子生物学实验, 为柑橘的进一步分子生物学研究奠定了基础。

关键词: 柑橘; 总 RNA; TRIzol 法; RT-PCR

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)02-0190-04

Comparison of Two Methods for Extracting Total RNA from *Citrus* Leaves

JIANG Juan, XUE Jiao-liang, XIE Ying-ping*

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The two methods for extracting high quality total RNA from the leaves of *Citrus reticulata* Banco were compared by using RNAlant Reagent (Beijing Tiangen Corporation) and RNAiso Reagent (Japanese TaKaRa Corporation), respectively. The results showed that two bands of 28S and 18S rRNA were distinguished by agarose gel electrophoresis with RNAiso Reagent, which the values of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} were 1.820 and 2.088, respectively, and the yield reached $2.840 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$. At the same time, a citrus house keeping gene β -actin fragment, the 228 bp sequence was successfully cloned by RT-PCR. Otherwise, with RNAlant Reagent, the two RNA bands of 28S and 18S were dim, and the values of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} were 1.464 and 1.603, respectively, the yield of RNA was only $2.020 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, which was lower than the standard. Therefore, the RNAiso Reagent was a better method for extracting RNA of *Citrus* in purity and quality, it could accord with the requirements of subsequent molecular biology reaction, such as Northern hybridization, cDNA library construction and RT-PCR.

Key words: *Citrus reticulata* Banco; Total RNA; TRIzol method; RT-PCR

柑橘(*Citrus reticulata* Banco)是热带亚热带常绿经济果树, 蚧虫(昆虫纲 Insecta, 半翅目 Hemiptera, 蚧总科 Coccoidea)是其重要的害虫, 对叶片、枝条

和果实造成危害, 直接影响柑橘的产量和品质。蚧虫的虫体具有多种蜡腺, 分泌蜡质, 在虫体表面形成保护性蜡壳, 化学防治十分困难, 并且污染环境,

杀伤天敌和造成农药残留。采用植物诱导抗性是实现防治蚧虫的重要途径。茉莉酸(JA)和茉莉酸甲酯(MeJA)是一类与损伤相关的植物激素和信号分子,能够激发植物防御基因的表达,产生化学防御效应^[1]。研究茉莉酸作为外源信号分子处理诱导柑橘抗虫基因的表达与防御蚧虫侵害的关系,对应用植物激素防治蚧虫具有重要的意义。

从柑橘叶片中提取高纯度、高质量的 RNA 是进行柑橘诱导抗虫基因研究的前提和关键。由于柑橘组织中多糖、多酚等物质含量高,难以清除,提取的 RNA 得率很低或杂质含量高^[2]。有关柑橘组织 RNA 的提取曾报道过 LiCl 沉淀法^[3]、TRIZOL-LiCl 法^[4]和异硫氰酸胍法^[2]等,所需试剂种类较多,操作步骤繁杂,提取时间较长。本文采用 Trizol 法,比较了天根公司的 RNAPlant Reagent 试剂和 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 试剂的使用效果,并作适当改进,提取出高质量的 RNA 模板,成功扩增出了柑橘的看家基因片段,为柑橘的诱导抗虫基因表达和相关基因克隆研究提供一种简便快速、适用性好的 RNA 提取方法。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料采用实验室盆栽柑橘(*Citrus reticulata* Banco), 5 a 生,高约 50 cm。实验时取其嫩叶。

1.2 主要试剂

DEPC (diethylpyroca-rbonate)、Tris-base 为 Amresco 公司(美国)生产, RNAiso Reagent、Oligo d(T)₁₅、RNase Inhibitor、DL2000 Marker 均购自 TaKaRa 公司(日本), M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司(美国), RNAPlant Reagent、dNTP、RNase-Free ddH₂O、Hot Taq 均购自天根公司(北京), PCR 所用柑橘 β -actin 看家基因引物序列分别为: 5'引物: 5'-CACACTGGAGTGATGGTTGG-3'; 3'引物: 5'-ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG-3', 由北京三博远志公司合成。EDTA 为天津科密欧化学试剂开发中心生产, 无水乙醇和硼酸为天津天大化工实验厂生产, 氯仿和异丙醇为天津化学试剂三厂生产。

1.3 实验仪器

CJ-C 层流洁净工作台(上海上净实业有限公司), ZDX-35B1 型座式自动电热压力蒸汽灭菌器

(上海申安医疗器械厂), DHG-9075A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), 755-B 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), Eppendorf 5331 型 PCR 仪(德国 Eppendorf), DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), 1-15k 冷冻离心机(sigma 公司), GDS-8000 system UVP Bioimaging system 凝胶成像系统(Gene company limited)。

所需要的玻璃器皿 180℃ 烘烤 8 h 使用, 塑料制品用 0.1% DEPC 水浸泡 24 h, 高压灭菌烘干后才能使用。

1.4 柑橘总 RNA 提取

1.4.1 用改进的天根公司的 RNAPlant Reagent

取 30 mg 液氮研磨过的柑橘幼嫩叶片, 加 0.5 ml 提取试剂, 震荡至彻底混匀, 室温放置 5 min。4℃ 13 684 × g 离心 2 min, 上清液转入新的无 RNase 离心管。加入 0.1 ml 5 mol/L NaCl(4℃ 预冷), 温和混匀。加入 0.3 ml 氯仿(4℃ 预冷), 充分混匀。4℃ 13 684 × g 离心 10 min, 小心吸取上清液水相转入新的无 RNase 离心管。再用氯仿按上述方法重复抽提 1 次。在第二次吸取的上清液水相中加与之等体积的异丙醇(4℃ 预冷), 混匀, -20℃ 放置 10 min。4℃ 13 684 × g 离心 10 min, 弃掉上清, 加 1 ml 的 75% 乙醇(4℃ 预冷)洗涤沉淀, 4℃ 2 375 × g 离心 3 min, 倒出液体, 剩余的少量液体短暂离心, 然后用枪头吸出, 室温干燥 2~3 min。加 20 μ l RNase-Free ddH₂O(4℃ 预冷), 反复吹打, 混匀, 充分溶解 RNA。溶解后立即鉴定纯度、含量及质量, 如质量好就立即进行下一步反转录实验。

1.4.2 用改进的 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent

取 30 mg 液氮研磨过的柑橘幼嫩叶片, 加入 1 ml RNAiso Reagent, 用力震荡充分混匀, 室温放置 5 min。4℃ 12 000 × g 离心 5 min, 取上清液转移到新的无 RNase 离心管中。加 0.2 ml 氯仿(4℃ 预冷), 盖好管盖, 剧烈振荡数秒, 室温放置 5 min。4℃ 12 000 × g 离心 15 min。将上清液转移到新的离心管中, 加入与上清液等体积的异丙醇(4℃ 预冷), -20℃ 静置 10 min, 4℃ 12 000 × g 离心 10 min, 去上清。向沉淀中加入 1 ml 的 75% 乙醇(4℃ 预冷)清洗沉淀, 4℃ 12 000 × g 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置晾干 5 min 左右。加入 20 μ l 的 RNase-Free ddH₂O(4℃ 预冷), 使 RNA 充分溶解。溶解后立即鉴定纯度、含量及质量, 如质量好就立即进行下一步反转录实验。

上述两种实验方法主要改进之处是所用试剂 NaCl、氯仿、异丙醇、75% 乙醇和 RNase-Free ddH₂O 均在 4℃ 保存预冷,异丙醇沉淀时 EP 管置于 -20℃。

1.5 总 RNA 的电泳检测

取 5 μl RNA 样品,点样于 1% 琼脂糖凝胶,用 0.5 × TBE 缓冲液于 120 V 稳压电泳 20 min。EB 染色 15 min,凝胶成像系统检测 rRNA 的带型并照相。

使用紫外分光光度计测定 RNA 在波长为 230、260 和 280 nm 处的吸光值,计算 A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280} 以检测总 RNA 纯度。根据公式计算 RNA 浓度:总 RNA 浓度($\mu\text{g ml}^{-1}$) = $A_{260} \times 40 \mu\text{g ml}^{-1} \times$ 稀释倍数。

1.6 cDNA 的合成及看家基因的 PCR 扩增

参考 Promega 公司的 M-MLV 反转录酶使用说

明合成 cDNA:总 RNA 模板 5 μl, 1 μl 100 μmol/L 引物 Oligo d(T)₁₅ 在 PCR 仪上 70℃ 加热 5 min,迅速在冰上冷敷,短暂离心后加入 M-MLV 5 × Reaction Buffer 5 μl, dNTP 5 μl, RNase Inhibitor 0.5 μl, M-MLV 反转录酶 1 μl,加 ddH₂O 至总体积为 25 μl,轻弹管壁混匀,42℃ 孵育 60 min,95℃ 变性 5 min。-20℃ 保存备用。

以 cDNA 为模板,用柑橘 β-actin 引物 (20 μmol/L) 进行 PCR,PCR 反应体系见表 1。PCR 扩增反应程序:94℃ 预变性 2 min,然后 94℃ 20 s, 47℃ 30 s, 65℃ 1 min, 30 个循环,最后 65℃ 延伸 5 min。4℃ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验。

表 1 PCR 反应的 3 种体系

Table 1 Three mixtures for PCR reaction

体系 Mixture	模板 Template (μl)	上游引物 Forward primer (μl)	下游引物 Reverse primer (μl)	ddH ₂ O (μl)	10 × hot buffer (μl)	dNTP (μl)	Hot Taq (μl)
1	1	0.5	0.5	18	2.5	2	0.5
2	2	0.5	0.5	17	2.5	2	0.5
3	1	0.25	0.25	18.5	2.5	2	0.5

2 结果和分析

2.1 总 RNA 电泳检测

采用 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 提取柑橘叶片的 RNA 量较大,电泳显示的 28S 和 18S 的条带比较清晰,亮度比约为 2: 1(图 1A),说明提取的总 RNA 质量较好且无明显降解。使用天根公司的 RNaplant Reagent 提取的 RNA,电泳显示 28S 和 18S 的条带的带型较模糊,并含高分子带,即有 DNA 污染(图 1B)。

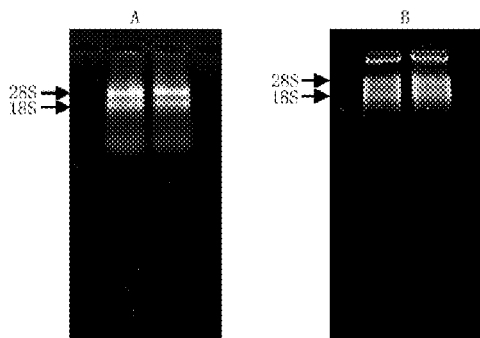


图 1 柑橘叶总 RNA 电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of RNA extracted from *Citrus* leaves
A. RNAiso Reagent (TaKaRa); B. RNaplant Reagent (Tiangen)

2.2 总 RNA 纯度及浓度比较

采用两种方法提取总 RNA,它们的纯度和浓度见表 2,使用 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 提取总 RNA,其 A_{260}/A_{280} 为 1.820,介于 1.7 ~ 2.0, A_{260}/A_{230} 为 2.088,大于 2.0。而采用天根公司的 RNaplant Reagent, A_{260}/A_{280} 为 1.464, A_{260}/A_{230} 为 1.603,不能满足后续实验的要求。

表 2 2 种方法提取柑橘叶片的总 RNA 质量比较

Table 2 The quality comparison of total RNA extracted from *Citrus* leaves using two methods

方法 Methods	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	RNA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Tiagen reagent	0.063	0.101	0.069	1.603	1.464	2.02
TaKaRa reagent	0.068	0.142	0.078	2.088	1.82	2.84

2.3 PCR 检测 RNA 的质量

用 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 提取的柑橘叶片总 RNA 反转录合成 cDNA,以其为模板,用柑橘 β-actin 引物进行 PCR 反应,比较 3 种体系(表 1)的扩增效果。琼脂糖电泳显示,3 种体系得到的

PCR 产物片段均略小于 250 bp(图 2),符合预期片段 228 bp。其中 PCR 反应体系 1 扩增出的条带较亮,效果较好,但引物二聚体较多;PCR 反应体系 2 扩增效果也较好,但因为模板加倍,所以在胶孔附近有 DNA 杂带;PCR 体系 3 扩增条带清晰,引物二聚体较少,扩增效果最好。因此,采用 PCR 反应体系 3 扩增 β -actin,可以得到较满意的扩增条带。

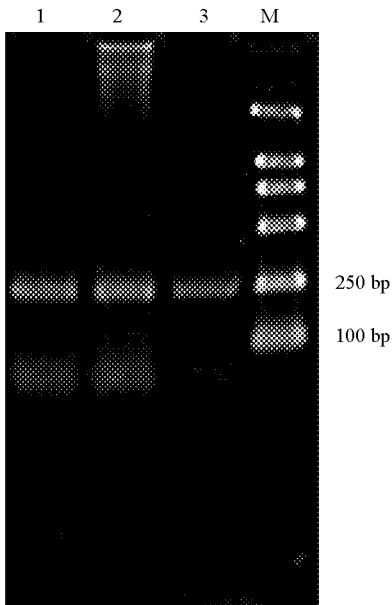


图 2 柑橘叶 β -actin 基因的 RT-PCR 电泳图谱

Fig. 2 Gel electrophoresis of β -actin gene from *Citrus* leaves by RT-PCR

1,2,3 分别为 3 种 PCR 反应体系。1,2,3 present three reaction mixtures, respectively. M: DL2000 DNA ladder

3 讨论

柑橘组织中的多糖和多酚等物质对提取总 RNA 造成一定的干扰,难以提取高质量的 RNA。徐昌杰等^[4]对柑橘组织,尤其是果实中 RNA 的提取进行了试验,认为改良 Bugos 法较适宜柑橘果实和叶片等组织 RNA 的提取,能有效去除多糖的干扰,但用此方法提取的总 RNA 存在一定的 DNA 污染,需先用 DNase 降解 DNA。曹庆芹等^[2]采用改良的异硫氰酸胍法提取柑橘及其近缘属的总 RNA,用提高盐浓度及二次变性的方法能有效避免 DNA 的污染,但步骤比较繁琐。叶庆亮等^[3]在提取柑橘类果树总 RNA 时需要两次 LiCl 沉淀和 CaCl₂ 处理。随着生物技术的提高和试剂盒的成本降低,应用 Trizol 试剂盒提取 RNA 变得更广泛,但每种试剂盒对不同组织的 RNA 提取效果存在差异^[5]。徐昌杰等^[4]

曾使用 Life Technologies 公司提供的 Trizol 和 Promega 公司的 RNAGents 提取柑橘总 RNA,虽然快捷,但成本昂贵,获得的 RNA 还需再经过 LiCl 沉淀和纯化。

我们采用了天根公司的 RNApant Reagent 和 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 两种试剂盒提取柑橘叶片总 RNA,并进行了适度改进,主要是将所用试剂在 4℃ 预冷,异丙醇沉淀时 EP 管置于 -20℃,提取的 RNA 明显改善。这可能是与室温相比,低温降低了 RNA 酶的活性,减少了 RNA 的降解,而且操作过程快捷、简单。同时,我们发现使用天根公司的 RNApant Reagent 试剂盒,提取的柑橘叶片总 RNA 质量不高,有 DNA 污染现象,说明这种试剂盒不太适合柑橘叶组织 RNA 的提取,可能是此试剂去除 DNA 的能力稍弱,DNAase 1 处理的效果也不太理想,在提取过程中还要加 NaCl 和氯仿抽提 2 次。而使用 TaKaRa 公司的 RNAiso Reagent 提取的 RNA 质量较好,纯度和浓度都较高,提取的 RNA 受多糖、多酚和蛋白质的污染较小。同时,采用这种试剂盒提取的 RNA 反转录扩增柑橘 β -actin 基因片段获得成功,证明这种试剂盒和改进的方法是柑橘叶片组织 RNA 提取的一种简便快速、适用性好的方法。此外,柑橘看家基因 β -actin 的成功扩增证明此基因可以作为内参,为我们进一步进行蚜虫和茉莉酸甲酯诱导柑橘抗虫基因表达和相关基因克隆研究提供了基础。

参考文献

- [1] Xu W(徐伟), Yan S C(严善春). The function of jasmonic acid in induced plant defence [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2005, 25(8): 2074-2082.(in Chinese)
- [2] Cao Q Q(曹庆芹), Chen M H(谌谋华), Yi H L(伊华林), et al. Efficient extraction of total RNA in *Citrus* and relative [J]. J Friut Sci(果树学报), 2005, 22(4): 426-427.(in Chinese)
- [3] Ye Q L(叶庆亮), Peng A H(彭爱红), Cao Li(曹立), et al. An effective and general protocol for the isolation of total RNA from the tissues of *Citrus* trees [J]. Acta Agri Univ Jiangxi(江西农业大学学报), 2007, 29(5): 732-739.(in Chinese)
- [4] Xu C J(徐昌杰), Chen K S(陈昆松). A study on methods for RNA extraction from *Citrus* tissues [J]. J Friut Sci(果树学报), 2004, 21(2): 136-140.(in Chinese)
- [5] Li J T(李劲涛), Yang J(杨军), Yang H N(阳海宁), et al. The total RNA extraction and RT-PCR of mutants of *impatiens balsamina* induced by space flight [J]. Lett Biotechn(生物技术通讯), 2007, 18(5): 806-808.(in Chinese)