

大豆不同器官中的 RNA 的提取分析*

付 畅 王豫颖 代红杰

(哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150080)

摘要 从植物组织中提取高质量的 RNA 是进行基因克隆和基因表达分析的基础。同种植物不同器官的组织由于组成成分的差别,其 RNA 的提取有不同的难点。本文分别采用异硫氰酸胍法、改进的异硫氰酸胍法提取了大豆的根、茎、叶、胚芽等不同器官的 RNA,结果发现异硫氰酸胍法适合根和茎的 RNA 提取,改进的异硫氰酸胍法不仅适合根与茎的 RNA 提取,还适于胚芽 RNA 的提取。而两种方法对从叶中提取 RNA 则均不是很理想。

关键词 大豆;不同器官;RNA 提取;异硫氰酸胍法

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2004)04-0281-04

从植物组织中提取高质量的 RNA 是进行 Northern 杂交分析、建立 cDNA 库,RT-PCR 以及示差分析等分子生物学研究的前提。植物组织中含有的酚类化合物、多糖、某些尚未确定的次级代谢物、RNase 等物质在破胞前彼此独立,在破胞后则与 RNA 相互作用导致 RNA 的丢失、降解或后续酶促反应受到抑制^[1]。目前虽已建立了许多较为成熟的分离 RNA 的方法。但不同植物或同种植物不同部位的组织的蛋白质、多糖、酚类、脂类等成分的含量有较大差异,不同部位的组织的幼嫩程度也不一样^[2],因此从不同的材料或相同材料不同部位提取 RNA 时难点各异,适宜的 RNA 提取方法也不尽相同。我们采用了两种方法从大豆的根、茎、叶、胚芽中提取 RNA。经比较发现,异硫氰酸胍法^[3]较适于大豆的根和茎的 RNA 提取。相比之下,王芳等人的改进的异硫氰酸胍法^[4]不仅更适于大豆的根和茎的 RNA 提取,而且还适于胚芽 RNA 的提取。两种方法对大豆叶片的 RNA 提取则均有待于进一步改进。本文通过系统分析为从大豆不同器官中提取 RNA 确立了适宜的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

黑豆 40 号大豆的胚芽、根、茎、嫩叶

1.2 实验方法

1.2.1 异硫氰酸胍法提取 RNA^[3](略有改进)

(1) 取 300mg 大豆胚芽放入经液氮预冷的研钵中,加入液氮,迅速研磨成粉末。

(2) 在冰上预冷的 1.5mL 离心管中加入 1mL RNA 提取液(4M 异硫氰酸胍;20mmol/L NaAc pH=5.2;0.2 mmol/L DTT;0.5% Sarkosyl;用前加 1%10 μ l β -巯基乙醇),用烘烤过的铁匙把研钵中的粉末迅速转移入离心管中,充分振荡 5min。

(3) 于 4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 10min,取上清。

(4) 向上清液中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)并振荡混匀,于 4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 10min,取上清。

(5) 重复步骤(4)几次,直至两相间几乎无蛋白层。

(6) 吸取上清,加入等体积的氯仿,充分混匀。4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 10min,取上清。

(7) 在上清液中加入 2/3 体积的 6mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇,冰浴沉淀 10min,4 $^{\circ}$ C 10000r/m 离心 10min,弃上清。

(8) 将沉淀再于 4 $^{\circ}$ C 10000 r/m 离心 2min 后弃上清,干燥后将沉淀溶于适量的 DEPC 处理的 ddH₂O 中,贮存于-70 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 王芳等的异硫氰酸胍法^[4](略有改进)

(1) 取 300mg 大豆胚芽放入经液氮预冷的研钵

* 收稿日期:2004-07-12

作者简介:付畅(1974-),女,讲师,博士,研究方向为生化与分子生物学。Tel:0451-88060576, E-mail: fuchanghnu@sina.com.cn

中,加入液氮,将材料研磨成细粉。

(2)向在冰上预冷的 1.5mL 离心管中加入 1mL RNA 缓冲液 I (25mmol/L Tris-HCl pH=8.0, 4mol/L 异硫氰酸胍;室温保存,用前加 10 μ l β -巯基乙醇 1%),用烘烤过的铁匙把研钵中的粉末迅速转移入离心管中,振荡混匀后冰浴 5min,4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 20min。

(3)取上清,向其中加入 0.03 体积的 3mol/L NaAc(pH=5.0) 和 2.5 体积的无水乙醇,颠倒混匀后于-70 $^{\circ}$ C 沉淀 0.5h。

(4)4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 20min 后弃上清,加入 1mL RNA 缓冲液 II (4 $^{\circ}$ C 保存 10mmol/L EDTA; 100mmol/L NaCl;0.2% SDS; Tris-HCl 50mmol/L pH=8.0)后振荡混匀。

(5)加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)后振荡混匀;于 4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 15min。

(6)取上清重复步骤(5)几次,直至两相间几乎无蛋白层。

(7)将水相转移至另一干净的离心管中,加入等体积的氯仿后振荡混匀,4 $^{\circ}$ C 12000r/m 离心 10min。

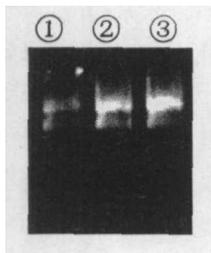


图1 异硫氰酸胍法提取大豆的胚芽 RNA 的电泳检测

Fig.1 Electrophoresis detection of RNA extracted by guanidine thiocyanat method from soybean embryo

①-③:胚芽

对从不同器官提取的 RNA 样品进一步测定了

(8)将水相转移至另一干净的离心管中,加入 2/3 体积的 6mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇,冰浴沉淀 10min,4 $^{\circ}$ C 10000r/m 离心 10min 后弃上清。

(9)将沉淀再于 4 $^{\circ}$ C 10000r/m 离心 2min,吸取上清,干燥。

(10)将沉淀溶于适量的 DEPC 处理的 ddH₂O 中,于-70 $^{\circ}$ C 贮存。

2 结果分析

2.1 采用异硫氰酸胍法从大豆的胚芽、根、茎、叶中提取 RNA 的分析

取 5 μ L RNA 样品经非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性(见图 1、图 2)。茎、根的 RNA 的 18s 与 28s 的条带较明晰完整,28sRNA 的亮度是 18sRNA 的 2 倍,RNA 基本无降解。胚芽的 18s 与 28s 条带不清晰、略有弥散,且 5s 的条带明显,表明胚芽的 RNA 稍有降解,叶部也稍有降解。各图中的条带均有些拖尾,表明多糖杂质较多^[5]。

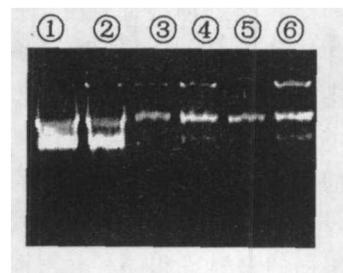


图2 异硫氰酸胍法提取大豆的叶、茎、根的 RNA 的电泳检测

Fig.2 Electrophoresis detection of RNA extracted guanidine thiocyanat method from soybean leaf, stem and root

①-②:叶;③-④:茎;⑤-⑥:根

260nm,280nm,230nm 的紫外吸收值(见表 1)。

表 1 采用异硫氰酸胍法提取大豆不同器官 RNA 的产量和纯度的比较*

Table 1 Comparison of quality and quantity of RNA from different organs of soybean extracted by guanidine thiocyanat method

波长 Wave length	胚芽 Embryo	叶部 Leaf	茎部 Stem	根部 Root
230	0.691 0.525 0.690	0.303 0.246 0.273	0.322 0.19 0.331	0.19 0.465 0.397
260	0.178 0.208 0.186	0.068 0.053 0.059	0.073 0.05 0.113	0.165 0.178 0.16
280	0.103 0.104 0.113	0.035 0.029 0.032	0.046 0.02 0.059	0.037 0.095 0.08
OD260/OD280	1.785	1.875	1.905	2.352
OD260/OD230	0.301	0.219	0.285	0.476
产率(μ g/ μ L)	7.640	2.40	3.20	6.68

注:a,所测 RNA 均未去除 DNA 杂质

纯的 RNA 的 OD260/OD280 = 2.0, D260/OD230 > 2.0,若 OD260/OD280 < 2.0 表明 RNA 中

存在蛋白质污染,若 D260/OD230 < 2.0 表明存在酚类、多糖、胍盐的污染^[4,6]。表 1 中的结果表明,采用

异硫氰酸胍法从大豆的根部所提 RNA 样品中的蛋白质杂质基本去除,而大豆的胚芽、茎、叶的 RNA 中蛋白质杂质较多。大豆胚芽、茎、叶的 RNA 的 D260/OD230 均 < 2.0,且相应的电泳条带模糊、有拖尾现象,表明异硫氰酸胍法总体上对多糖的去除效果不理想^[10]。该法可从大豆的根和茎中提取出完整性好的 RNA,但是所提 RNA 中的蛋白质杂质和多糖杂质都较多。

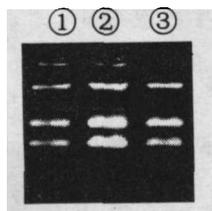


图3 王芳等人的方法提取的大豆胚芽 RNA 的电泳检测

Fig. 3 Electrophoresis detection of RNA extracted by WANG's method from soybean embryo

①—④:胚芽

对从不同器官提取的 RNA 样品进一步测定了

2.2 用王芳等的方法(略有改进)从大豆的胚芽、根、茎、叶中提取 RNA 的分析

加 5 μ L RNA 样品经非变性琼脂糖凝胶电泳检测完整性(见图 3、图 4)。胚芽、茎、根 18s 与 28s 的条带明晰完整,28sRNA 的亮度是 18sRNA 的 2 倍, RNA 基本无降解。叶的 RNA 样品稍有降解。根、茎、胚芽的条带无拖尾现象,表明多糖杂质较少。

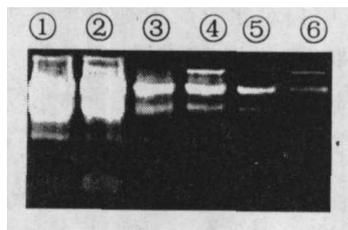


图4 王芳等人的方法提取的大豆根、茎、叶 RNA 的电泳检测

Fig. 4 Electrophoresis detection of RNA extracted by WANG's method from soybean leaf, stem and root

①—②:叶 ③—④:茎 ⑤—⑥:根

260nm, 280nm, 230nm 的紫外吸收值(见表 2)。

表 2 以王芳等的方法从大豆的不同器官的产量和纯度的比较*

Table 2 Comparison of quality and quantity of RNA from different organs of soybean extracted by WANG's method

波长 Wave length	胚芽 Embryo	叶部 Leaf	茎部 Stem	根部 Root
230	0.066 0.065 0.073	0.073 0.082 0.096	0.058 0.07 0.095	0.07 0.079 0.075
260	0.040 0.045 0.061	0.057 0.063 0.077	0.04 0.064 0.054	0.04 0.062 0.045
280	0.022 0.022 0.030	0.032 0.028 0.043	0.018 0.03 0.026	0.022 0.02 0.025
OD260/OD280	1.96	1.941	2.0	2.174
OD260/OD230	0.721	0.786	0.693	0.676
产率(μ g/ μ L)	1.96	2.64	2.08	2.0

注 a, 所测 RNA 均未去除 DNA 杂质

从大豆胚芽、根、茎中提取的 RNA 的 OD260/OD280 比值均在 2.0 左右,表明蛋白质杂质的去除较为干净,而从大豆叶中提取的 RNA 的蛋白质杂质较多。从胚芽、根、茎、叶中提取的 RNA 的 D260/OD230 的比值均大于异硫氰酸胍法的比值,且相应的电泳条带清晰无拖尾现象,表明该法对去除多糖等杂质比异硫氰酸胍法效果好。用王芳等的方法所提的 RNA 的完整性和纯度都很好,该法很适合根、茎、胚芽的 RNA 提取。

2.3 两种方法提取的 RNA 的完整性、纯度、产率的比较

采用异硫氰酸胍法从大豆根、茎中提取的 RNA 的完整性好,但蛋白质和多糖杂质较多;用王芳等改进的异硫氰酸胍法从大豆的胚芽、茎、根中提取的 RNA 的完整性好,去除多糖和蛋白的效果比较好;但产率低于异硫氰酸胍法所提的 RNA。

3 讨论

大豆是一类重要的经济作物,随着分子生物学的发展,在大豆中进行基因克隆和基因表达分析的研究需要从大豆的不同器官中分离高质量的 RNA。

3.1 从大豆中提取 RNA 的两种方法的比较

采用异硫氰酸胍法从大豆根、茎、叶、胚芽提取的 RNA 的电泳条带均有拖尾现象,而且 OD260/OD230 比值均远小于 2.0,表明此方法对去除大豆各器官中所含的杂质多糖效果不理想。采用王芳等改进的异硫氰酸胍法提取了大豆的根、茎、叶、胚芽的 RNA。由于经过两步抑制(异硫氰酸胍, SDS)明显抑制了 RNase,所提 RNA 的完整性优于异硫氰酸胍法, RNA 条带均明晰完整,只有叶的 RNA 略有降解。该方法去糖的效果也明显优于异硫氰酸胍法,

OD260/OD230 的比值明显比异硫氰酸胍法的比值大,所提 RNA 的条带均比较清晰基本没有拖尾。

3.2 大豆不同器官 RNA 提取的难点与方法的选择

茎中含大量纤维素及少量蛋白质和无机盐,而且组织相对老。根位于形态学上端,是吸收矿物质的主要器官,根中含有水、无机盐、纤维素及少量植物激素^[7],纤维素含量较茎中少。可能是这两器官中代谢物的组成相对比较简单提供了先决条件使得从根、茎中提取 RNA 比较容易,用两种方法均能从大豆的根、茎中提取出完整性很好的 RNA,但在去除杂质多糖方面,采用王芳等的方法效果则更好。

从大豆叶片所提 RNA 的条带模糊且拖尾,表明多糖杂质较多^[7]。多糖在水中的理化性质与 RNA 相似,会形成难溶的胶状物与 RNA 共沉淀下来,多糖的存在会抑制许多酶反应^[1]。两种方法对大豆叶片 RNA 的提取效果均不够理想。因此在提取大豆叶片中的 RNA 时对多糖的去除应尤为重视,并采取更有效的去除多糖的方法。

随着大豆的萌发,蛋白、糖以及其它代谢物会源源不断的运往胚芽,使胚芽中积累大量的蛋白质、糖及大量次生代谢物^[7],因而从胚芽中提取 RNA 难度较大,王芳等的改进的异硫氰酸胍法较适合胚芽,经过异硫氰酸胍和 SDS 两步抑制有效抑制了 RNase,并有利于蛋白质的去除。此外在实验中加入还原剂 β -巯基乙醇,有效减小了酚类物质的影响^[1],避免了褐化现象发生。而 0.03 体积的 3mol/L NaAc (pH=5.0) 和 2.5 体积的无水乙醇沉淀、2/3 体积的 6mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇沉淀也有助于去除多糖。

4 结论

从大豆这种高蛋白质的植物的各器官中提取 RNA 的方法不尽相同,我们所采用的两种方法均可以从大豆的根、茎中提取出完整性好、纯度相对较高的 RNA,但相比之下,采用王芳等的方法效果更佳。从大豆的胚芽中提取 RNA 时,王芳等的方法比较适合,所提 RNA 的完整性明显好于异硫氰酸胍法,但蛋白质杂质较多,应更注重去除。对于从大豆叶片中提取 RNA,两种方法的效果均不够理想。王芳等的方法提取的 RNA 完整性好,对多糖的去除比较有效。

参 考 文 献

- 1 李宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点与对策[J]. 生物技术通报,1999,15(1),36-39
- 2 潘瑞积,董恩得编著. 植物生理学(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社,1995
- 3 Clark MS 主编. 顾红雅,翟礼嘉主译. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998,122-123
- 4 王芳,张斌,单雷,等. 一种从花生种子中提取 RNA 的改进方法[J]. 花生学报,2002,31(41),24-26
- 5 王玉成,杨传平,姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报,2003,25(2),208-210
- 6 姚红艳,赵双宜,夏光敏. 改良尿素氯化锂方法提取成熟小麦种子总 RNA[J]. 中国生物工程杂志,2002,23(4),86-88
- 7 陆时万,徐祥生,沈敏健编著. 植物学(第二版)上册[M]. 北京:高等教育出版社,1991

ANALYSIS OF RNA LATION FROM DIFFERENT SOYBEAN SRGAS

Fu Chang Wang Yu-Ying Dai Hong-Jie

(Life and Environment College, Harbin Normal University, Harbin, 150080)

Abstract Isolation of high-quality RNA is the base of studies on gene cloning and regulations on gene expression. Because of the difference in contents of components, the difficulties of isolating RNA differ from different plants or different organs of the same plant. We applied two methods of guanidine thiocyanat and an improved method by Wang Fang to find a suitable method for RNA isolation from embryo, leaf, stem and root of soybean. The results suggest that the method of guanidine thiocyanat fits for extracting RNA from soybean root and stem, and the improved method by Wang Fang fits for embryo as well as root and stem. Both of the two methods don't work very well for RNA isolation from soybean leaves.

Key words Soybean; Different organs; RNA extraction; Guanidine thiocyanat method