



一种高效经济的高质量植物 RNA 提取方法*

张年辉 韦振泉 何军贤 杜林方** 梁厚果

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要 建立了一种高效经济的植物 RNA 提取方法. 在提取缓冲液中加入蔗糖、氯化钾和镁离子以提供对 RNA 分子的保护. 破碎后的细胞于提取缓冲液中裂解后, 用酚/氯仿变性并去除内源 RNA 酶和其他蛋白质, 而后用 pH 5.6 的 NaAc 沉淀 RNA. 用该方法提取 RNA 的得率较高, 经电泳检测, RNA 的完整性很好. RNA 印迹分析和 RT-PCR 也都得到很好的结果. 该方法还使实验成本大大降低.

关键词 RNA 分离, 植物, RNA 酶

学科分类号 Q781

RNA 酶的高稳定性是造成 RNA 分离困难的主要原因. RNA 提取过程中污染的 RNA 酶有两种来源: 外源性 RNA 酶和内源性 RNA 酶. 前者来自 RNA 制备过程中用到的玻璃和塑料制品、研究人员本身尤其是研究人员的手, 以及分离过程中用到的试剂和溶液. 但这些外源性 RNA 酶可以通过 RNA 酶抑制剂处理、干燥、戴手套或使用 RNA 研究的专用试剂等措施而得到解决^[1~3]. 而后者是植物组织本身所固有的, 在根等组织, 或者在植物特定生理状态下 (如快速发育和果实成熟期间) 其含量很高, 而且当细胞破碎后即释放出来. 因此, 为了获得高质量的 RNA, 必须使用 RNA 酶的抑制剂或采用破碎细胞和灭活 RNA 酶同步进行的方法, 以最大限度地降低细胞破碎过程中所释放的 RNA 酶的活性^[1]. 异硫氰酸胍或其氯化物是最有效的 RNA 酶变性剂之一^[4]. 利用这种变性剂已建立起了许多有效的 RNA 分离方法^[1~3]. 但异硫氰酸胍用量大 (4 mol/L)、价格昂贵, 且操作稍有不慎, 就会引起 RNA 的降解. 使用试剂盒尽管可以避免这一问题, 但试剂盒大多价格不菲, 而且其初始样品处理量有限 (一般 100 mg 左右), 这样在 RNA 需要量很大的分子生物学操作中, 如纯化 mRNA 和消减杂交等, 势必要增加其用量, 显得不够经济. 我们在实验中建立了一种高质量的植物 RNA 提取方法, 在提取过程中通过采取经济实用且有效的方法, 保护 RNA 的完整性和防止 RNA 酶对 RNA 的降解, 不仅得到了质量很好的 RNA, 还大大降低了实验成本.

1 材料和方法

1.1 植物材料

为室内培养的黄化油菜 (*Brassica napus* L.) 突变体 *Cr 3529* 及其野生型 3529 叶片. 林可霉素处理按文献 [5] 的方法进行, 林可霉素溶液浓度为 0.5%.

1.2 主要试剂

EGTA 和 DEPC 为 Amresco 公司产品; 琼脂糖为 Sigma 公司产品; 其余均为国产分析纯试剂.

RNA 提取液: 200 mmol/L Tris, 400 mmol/L KCl, 200 mmol/L 蔗糖, 35 mmol/L $MgCl_2$, 25 mmol/L EGTA.

3 mol/L NaAc (pH 5.2 及 5.6).

以上试剂, 除含 Tris 者外, 均用 0.1% 的 DEPC 37℃ 处理 12 h, 然后再高压灭菌; 含 Tris 的溶液用经高压灭菌的 DEPC- H_2O 直接配制. 玻璃器皿于 200℃ 干热灭菌 8 h. 塑料制品用 0.1% 的 DEPC 37℃ 处理 12 h, 再高压灭菌.

Tris 饱和的重蒸酚 (pH 8.0) 及氯仿/异戊醇 (24:1).

1.3 RNA 提取方法

植物材料于液氮中研磨成粉后转至离心管. 按

* 国家自然科学基金资助项目 (30270121) 和国家教育部博士点基金资助项目 (20020610094).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85412766, E-mail: dulinfang@yahoo.com

收稿日期: 2004-03-24, 接受日期: 2004-05-28

3~4 ml/g 样品的比例加入提取缓冲液, 1 倍提取缓冲液体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) (先加苯酚, 再加提取缓冲液和氯仿/异戊醇). 剧烈振荡混匀后, 4℃, 6 000 r/min 离心 5 min. 将上清转至一新的离心管, 重复苯酚/氯仿/异戊醇抽提直至界面清亮后, 再用等体积的氯仿/异戊醇抽提一次. 上清液转至一新离心管, 加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 及 2 倍体积的无水乙醇于 -20℃ 至少沉淀 3 h 后, 4℃, 8 000 r/min 离心 10 min. 用 3 mol/L NaAc (pH 5.6) 洗下核酸沉淀, 转移至 Eppendorf 离心管中, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min. 弃上清液, 将沉淀重溶于 0.4 ml 0.3 mol/L NaAc (pH 5.6) 中, 与 1 ml 无水乙醇混合, 于 -20℃ 沉淀至少 3 h. 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 所得 RNA 用 70% 乙醇洗后, 干燥, 溶于适量 DEPC 水中.

1.4 RNA 的完整性及质量检测

1.4.1 RNA 的非变性胶电泳在 1×TAE 中进行, 5 μg 上样, 琼脂糖浓度为 1.5%. RNA 的甲醛变性胶电泳按文献 [3] 的方法进行, 10 μg 总 RNA 电泳分离后, 凝胶先用 DEPC-H₂O 洗 10 min 以去除甲醛, 而后浸入用 0.4 mol/L NaAc (pH 5.6) 配制的亚甲基蓝溶液 (0.2%) 中染色 5 min, 用 DEPC 水脱至背景清晰.

1.4.2 RNA 印迹按文献 [3] 的方法进行.

1.4.3 RT-PCR 按 TaKaRa 公司 AMV 反转录酶操作说明书进行. cDNA 第一链合成后, 92℃ 灭活反转录酶, 并加入 RNase (10 g/L) 去除 RNA. 然后按常规 PCR 方法扩增第二链. 25 μl PCR 反应体系中包括 2 μl cDNA, 0.2 mmol dNTP, 正向与反向引物各 1 mmol, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq 酶. 引物序列分别为: 叶绿体基因 *psbA*, 正向, 5' ATG ACT GCA ATT TTA GAG AGA CGC 3', 反向, 5' TTA TCC ATT TAT AGA TGG AGC CTC AAC 3'; 细胞核基因 *Actin1*, 正向, 5' GTG ACA ATG GAA CTG GAA TGG 3', 反向, 5' AGA CGG AGG ATA GCG TGA GG 3'. cDNA 模板于 94℃ 变性 2 min 后, 35 个循环扩增 (94℃ 1 min, 54℃ 1 min, *psbA* 72℃ 1.5 min, *Actin1* 72℃ 45 s), 然后 72℃ 保温 8 min. 取 5 μl 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查.

2 结果与讨论

2.1 方法的建立

高质量的 RNA 是进行基因表达研究和从

cDNA 克隆新基因的前提和基础. 但由于 RNA 酶的高稳定性以及其无所不在的特性, 使得 RNA 分离要比 DNA 分离困难很多. 如何高效快速地灭活 RNA 酶, 尤其是植物组织破碎后即释放出来并与 RNA 接触的内源 RNA 酶, 就成为了 RNA 提取成功的关键. 目前实验室普遍采用的异硫氰酸胍法^[3]中, 由于高浓度异硫氰酸胍 (4 mol/L) 的使用, 大大增强了对 RNA 酶的抑制效果. 但高浓度异硫氰酸胍的使用无疑增加了实验成本. 我们试图建立一种实验成本低廉且同样高效的 RNA 提取方法. 具体做法是: 向液氮磨碎的植物组织中先加苯酚以释放出的内源 RNA 酶迅速变性, 再加入 RNA 提取缓冲液和氯仿, 而后剧烈振荡以增强变性效果. 为避免剧烈振荡对大分子核糖体 RNA (rRNA) 的破坏, 我们采取了以下两个办法: a. 在提取缓冲液中加入蔗糖和氯化钾, 以增加溶液的渗透压, 从而对 RNA 分子起到很好的渗透保护作用; b. 有研究表明, 提取缓冲液中加入镁离子可以有效地减少某些大分子 rRNA 的降解^[2]. 为此, 我们在提取缓冲液中还加入了 35 mmol/L MgCl₂, 并用 EGTA 替代 EDTA. 为避免在提取过程中由于偶然因素所带进的外源 RNA 酶对 RNA 的降解, 所用试剂都经冰预冷, 提取过程也都尽量在低温下进行.

植物组织破碎并使核蛋白体游离出来后, 下一步即是将 RNA 与蛋白质和 DNA 分离开来. 本方法仍采用酚/氯仿抽提去除蛋白质, 然后根据顾红雅等^[2]的苯酚法中采用醋酸盐沉淀 RNA 作了一些改进: a. 先将 DNA 相对较为完整地 with RNA 一起分离出来. 为此, 在提取缓冲液中加入对核酸分子起到渗透保护作用的蔗糖和氯化钾, 用 EGTA 抑制 DNA 酶的活力. b. 将蛋白质变性并去除后, 用乙醇/NaAc (pH 5.2) 沉淀核酸, 然后用 3 mol/L NaAc (pH 5.6) 溶解, 离心后的 RNA 沉淀中已去除了大部分的 DNA. 将沉淀重溶于 0.3 mol/L NaAc (pH 5.6) 后, 再用乙醇沉淀以完全去除 DNA.

2.2 RNA 质量检测

用本方法从油菜幼苗中得到了得率较高的高质量 RNA (表 1). 非变性胶 (图 1a) 和变性胶 (图 1b) 分离后, 光合作用组织的总 RNA 分出了 5 条 rRNA 带; 用质体蛋白翻译抑制剂林可霉素抑制叶绿体发育后, 属于叶绿体的 16 S 及其他低于 16 S 的 rRNA 含量大大减少, 因而组织中的总 RNA

仅有 2 条主要的 rRNA 带. 但所有 RNA 样品的 25 S rRNA 亮度都要明显高于 18 S rRNA, 说明该方法提取的 RNA 很少发生降解. 同时, 也未见大分子质量的条带, 说明无 DNA 的污染.

Table 1 Ratio of A_{260}/A_{280} and yield of total RNA from 1 g oilseed rape seedlings

A_{260}/A_{280}	Yield/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1.96 ± 0.03	246.8 ± 21.7

Note: Results represent $\bar{x} \pm s$ of five separate RNA isolations.

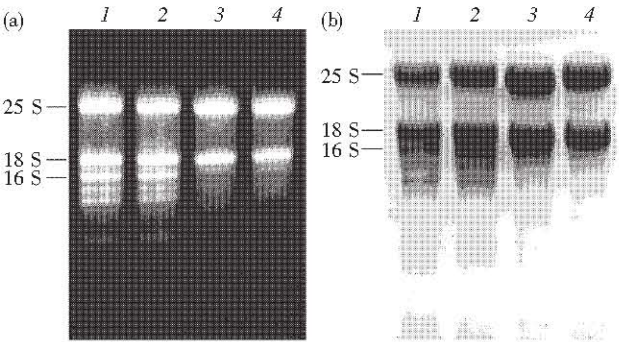


Fig.1 The non-denaturing electrophoresis (a) and formaldehyde denaturing electrophoresis (b) of total RNA from oilseed rape leaves

1: Wild type; 2: Mutant type; 3: Wild type treated by lincomycin; 4: Mutant type treated by lincomycin.

将甲醛变性胶分离后的 RNA 转至尼龙膜, 再与³²P 标记的细胞核基因 *cab* 和 *rbcS* 为探针所得的 RNA 印迹结果显示 (图 2), 杂交信号明显而清晰, 没有拖尾, 进一步表明用该方法提取的 RNA 完整性很好.

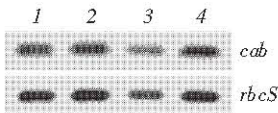


Fig.2 RNA gel blot analysis of *cab* and *rbcS* expression in the oilseed rape leaves

1: Wild type; 2: Mutant type; 3: Wild type treated by lincomycin; 4: Mutant type treated by lincomycin.

以该方法提取的野生型油菜 3529 叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 设计特定的引物扩增质体基因 *psbA* 和细胞核基因 *Actin1*. 图 3 的结果表明, 质体基因与细胞核基因都得到了很好的扩增, 进一

步说明 RNA 样品的纯度也很好.

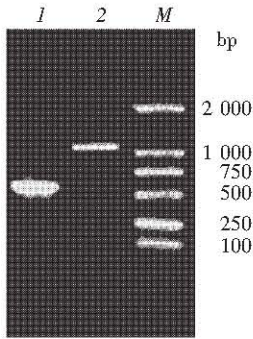


Fig.3 Agarose electrophoresis of the RT-PCR products
1: Cytoplasmic gene *Actin1* (505 bp); 2: plastid gene *psbA* (1 062 bp); M: DNA marker.

2.3 小结

与其他方法比较, 本方法具有两个显著的优点: a. 经济. 本方法所用的全部试剂, 除抑制外源 RNA 酶所用的 DEPC 外, 其余的如用于 RNA 酶变性、去除蛋白质和 DNA 全为常规试剂, 这使得实验成本大大降低. 当分离 1 g 植物组织 RNA 时, 使用本方法可以较 Lessard 等^[3] 的异硫氰酸胍法降低成本 50%, 而使用试剂盒的成本则至少为本方法的 20 倍. 显然, 当分离的 RNA 量大而样品数又多时, 使用本方法就更显其实验成本低廉的优势. b. 所得 RNA 质量很好. 由于我们在提取缓冲液中加入了一些对 RNA 分子起到保护作用的组分, 在提取过程中采取切实有效的措施防止了内外源 RNA 酶对 RNA 分子的降解. 因此, 该方法具有极强的可操作性, 重复性也很好 (表 1). 非变性胶及变性胶电泳结果都显示出 25 S rRNA 的亮度明显高于 18 S rRNA, 说明在该方法中 RNA 很少发生降解; RNA 印迹和 RT-PCR 结果也表明, 该方法提取的 RNA 结构完好, 纯度较高, 完全可以满足基因表达分析和分子克隆实验. 而且, 该方法采用醋酸盐/乙醇沉淀 RNA, 避免了 LiCl 沉淀法中小分子 RNA 的丢失^[2]. 因此, 该方法还可用于对真核生物表达调控起重要作用的小分子 RNA 的研究工作中.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7.1 ~ 7.25
- 2 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作. 北京:

- 北京大学出版社, 1995. 74 ~87
- Gu H Y, Qu L J, Ming X T, *et al.* Plant Genes and Molecular Manipulations. Beijing: Beijing University Press, 1995. 74 ~87
- 3 Lessard P, Decroocq V, Thomas M. Extraction of RNA, cloning and subtractive hybridization. In: Clark M S, ed. Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual. New York: Springer-Verlag Berlin Herdelberg, 1997. 152 ~181
- 4 Gordon J A. Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. Biochemistry, 1972, **11** (10): 1862 ~1870
- 5 Sullivan J A, Gray J C. Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. Plant Cell, 1999, **11** (5): 901 ~910

An Efficient and Economic Method for Preparation of High Quality Plant RNA *

ZHANG Nian-Hui, WEI Zhen-Quan, HE Jun-Xian, DU Lin-Fang **, LIANG Hou-Guo

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract An efficient and economic method for high quality RNA preparation from plant tissues was established. To avoid RNA degradation, sucrose, potassium chloride and Mg^{2+} were included in the extraction buffer. Plant tissues were lysed in the extraction buffer, then ribonucleases (RNases) and other proteins were denatured and extracted by phenol/chloroform. After that, the DNA was selectively fractionated from RNA with sodium acetate (NaAc) (pH 5.6). The isolated RNA with this method gave good yield. Results of non-denaturing electrophoresis or formaldehyde agarose gel electrophoresis both showed higher amount of 25 S ribosomal RNA (rRNA) than that of 18 S rRNA. Northern hybridization gave sharp and clear signals. Both plastid gene and nuclear gene were amplified successfully by RT-PCR. These results show that, the RNAs isolated with this method are in good integrity and purity, and can meet the needs of most molecular biological experiments including gene cloning and expression analysis. In this method, phenol/chloroform were used to remove proteins and inactivate RNases, NaAc (pH 5.6) was used to precipitate RNAs, thus largely reduced the experimental expenses.

Key words RNA isolation, plant, RNase

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30270121) and The Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (20020610094).

** Corresponding author. Tel: 86-28-85412766, E-mail: dulinfang@yahoo.com

Received: March 24, 2004 Accepted: May 28, 2004