

虎杖不同组织总 RNA 提取方法探索

雷阳梅, 唐益雄

(中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 介绍了一种适合虎杖根、茎、叶、花等不同组织总 RNA 提取的方法(CTAB 法结合酸酚、高盐溶液以及 Trizol), 该方法较原来的 CTAB 法耗时短, DNA 去除干净, 所提取的总 RNA 可直接用于 RT-PCR, GeneRacer, Northern 等操作。

关键词: 虎杖; RNA 提取; 多酚; 多糖

中图分类号: S567 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)08-0093-02

虎杖(*Polygonum cuspidatum*)为蓼科蓼属植物。药用部位为根及根茎, 具有活血镇痛、清热利湿、止咳化痰、入肺经等功效^[1]。虎杖中的虎杖苷, 又名白藜芦醇糖苷, 具有抗菌、抗氧化、保护心血管系统、抗癌等多种作用^[2~4]。虎杖的化学成分非常复杂, 基本可分为 4 类: 二苯乙烯类、酚类、萘醌类和多糖类, 其中酚类化合物包括蒽醌和黄酮类^[1]。虎杖中植物次生代谢产物非常丰富, 这给 RNA 的提取造成了一定的困难, 也就给科研工作者通过 RNA 途径克隆次生代谢相关基因造成一定困难。而虎杖中的次生代谢物对于人类健康有着极其重要的意义。笔者对虎杖总 RNA 的提取方法进行了探索, 获得了很好的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

供试虎杖的根、茎、叶、花采自野外生长的虎杖植株(选择较幼嫩部位)。

1.2 试剂

除特别说明外, 所有化学试剂均为 Ameresc 公司生产, Trizol 为天根生物试剂有限公司生产, RT-PCR 和 GeneRacer 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.3 传统 CTAB 法提取 RNA

取 700 μ L RNA 提取液[2% CTAB(w/v), 2% PVP K25(w/v), 100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 25 mmol/L Na₂-EDTA (pH 8.0), 2.0 mol/L NaCl], 加入终浓度为 2%(v/v)的 β -巯基乙醇混匀, 65 $^{\circ}$ C 温浴; 新鲜组织经液氮研磨后约取 100 mg

置于 65 $^{\circ}$ C 抽提液中, 剧烈振荡; 加入等体积的氯仿抽提 2~3 次, 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min); 取上清, 加 1/4 体积的 10 mol/L LiCl, 颠倒混匀, 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱沉淀 3~6 h, 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 15 min), 弃上清; 70%乙醇洗涤沉淀, 室温干燥几分钟, 加 DEPC 处理水溶解沉淀;

1.4 改进的 CTAB 法提取 RNA(结合酸酚、高盐溶液与 Trizol)

取 700 μ L RNA 提取液[2% CTAB(w/v), 2% PVP K25(w/v), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol/L Na₂-EDTA (pH 8.0), 2.0 mol/L NaCl], 加入终浓度为 2%(v/v)的 β -巯基乙醇混匀, 65 $^{\circ}$ C 温浴; 新鲜组织经液氮研磨后约取 100 mg 置于 65 $^{\circ}$ C 抽提液中, 剧烈振荡; 加入等体积酸性酚/氯仿抽提(蛋白少的组织直接用氯仿抽提), 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min); 再用氯仿抽提 1 次; 取上清加入 1~2 倍体积的异丙醇[可以考虑用 1/2 体积的高盐溶液(1.2 mol/L NaAc, 0.8 mol/L 柠檬酸钠)加 1/2 体积的异丙醇去除多糖]; 室温沉淀 30 min, 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min), 弃上清; 加 100 μ L 水溶解沉淀, 加 400 μ L Trizol 混匀静置 3 min, 加 200 μ L 氯仿摇匀静置分层, 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min); 取上清, 加 2.5 倍体积的无水乙醇, 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, pH 5.2, 混匀, -70 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 离心(10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 15 min); 70%乙醇洗涤沉淀, 室温干燥几分钟, 加 DEPC 处理水溶解沉淀。在电泳检测 RNA 质量时, 不需 DEPC 处理电泳缓冲液 TBE, 将普通的 6

收稿日期: 2007-04-18

基金项目: 中欧合作基金

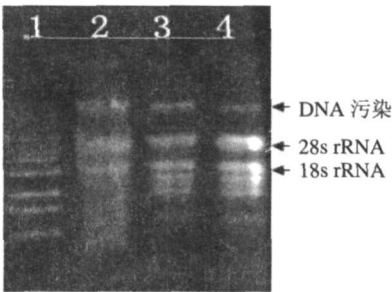
作者简介: 雷阳梅(1977-), 女, 湖南郴州人, 在读硕士研究生, 主要从事次生代谢途径关键酶的克隆与表达研究。

通讯作者: 唐益雄(1965-), 男, 湖南邵阳人, 研究员, 博士, 主要从事分子生物学方面的研究。

倍核酸电泳上样缓冲液中加入 30% 的甲醛点样即可有效防止 RNA 在电泳过程中降解。

2 结果与分析

用传统 CTAB 法(LiCl 沉淀)所提取的总 RNA 存在明显的基因组 DNA 污染(图 1)。而用改进的 CTAB 法结合 Trizol 溶液所提取的虎杖组织总 RNA 样品,经稀释后在紫外光下检测.所有样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值均大于 2.0。表明所提取的 RNA 样品酚类物质和蛋白质等杂质少,质量较好。1%琼脂糖凝胶电泳检测,可观测到 28S rRNA, 18S rRNA, 5S rRNA 3 条带(图 2),且 28S rRNA 条带的亮度基本为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍,无拖带现象。表明所提取的 RNA 样品较为完整,基本无降解。

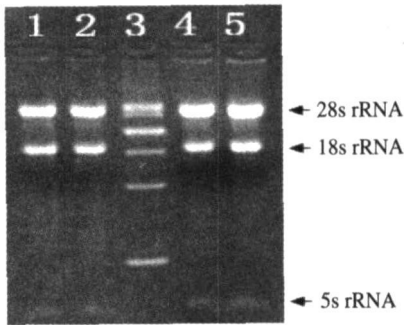


1 为天根公司的 DNA MARKER III; 2, 3, 4 分别为虎杖根、茎、叶总 RNA

图 1 传统 CTAB 法提取的虎杖根、茎、叶总 RNA

3 结论与讨论

本方法操作过程中不适合采用多次酸性酚氯仿进行抽提,因为这样会把所有的核酸卷走,最后得不到 RNA 沉淀。我们已经利用 CTAB 法结合酸酚、



1, 2, 4, 5 分别为根、茎、叶、花总 RNA; 3 为天根公司的 DNA MARKER III

图 2 改进 CTAB 法提取的虎杖根、茎、叶、花总 RNA

高盐溶液以及 Trizol 从虎杖茎中提取 RNA,克隆到了白藜芦醇形成型的芪合酶基因 PCRS(登录号为 DQ900615)。当虎杖的根偏老时, RNA 沉淀常常呈褐色,且不易溶解,可以使用过柱的 RNA 提取方法,硅胶膜柱子能去除大部分蛋白和色素。

参考文献:

[1] 杨建文, 杨彬彬, 张艾, 等. 中药虎杖的研究与应用开发 [J]. 西北农业学报, 2004 13(4): 156 - 159.

[2] Paola Signorelli, Riccardo Ghidoni. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2005 16: 449 - 466.

[3] Robert E King, Joshua A Bomser, David B Min. Bio activity of resveratrol[J]. Comprehensive Food Science and Food Safety, 2006 5: 65 - 70.

[4] Silvia Bradamante, Livia Barengi, Alessandro Villa. Cardiovascular protective effects of resveratrol [J]. Cardiovascular Drug Reviews, 2004, 22(3): 169 - 188.

农业部主管, 中国农业科学院主办
中央级农业技术期刊, 全国农业核心期刊

农业科技通讯

邮发代号: 2 - 602
月刊单价: 6 元 全年: 72 元
全国各地邮局均可订阅

启迪种业科技研发
开拓种业人员思想
帮助种业公司决策

本及时报导种植业动态和最新农业成果, 尤其是种业界的新品种、新技术。侧重大田, 兼顾园艺。本刊技术实用, 信息及时可靠, 是种子经营、农业种植的一本专刊。也是种子经营单位良好的信息发布媒体。

本刊新增设试验研究栏目, 欢迎广告作者踊跃投稿。

地址: 100081 北京中关村南大街 12 号《农业科技通讯》编辑部

电话: 010 - 68919664 68976831 传真: 010 - 68919664 E - mail: tongxuna@yahoo.com.cn