

# 香蕉不同组织中总 RNA 提取方法的研究<sup>①</sup>

王 尉<sup>1,2</sup>, 梁国鲁<sup>1</sup>, 谢江辉<sup>2</sup>

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 中国热带农业科学院 亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091

**摘要:** 针对香蕉组织中多糖、多酚等次生物质含量高的特点, 以香蕉根、茎、叶、果实为试材, 对其总 RNA 提取进行研究. 比较了 SDS 法、改良 SDS 法、改良 CTAB 法和 Trizol 试剂盒法提取总 RNA 的效果, 结果分析表明: 改良 SDS 法能从香蕉根、茎、叶中获得质量高、完整性较好的总 RNA, 而改良 CTAB 法对果实的提取效果较佳, 所得 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均高于 1.8, A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 大于 2.0, 28 S rRNA 带的亮度约是 18 S rRNA 的 2 倍. 其产率在根、茎、叶中均在 400  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  以上, 果实中可达 49.34  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . 以上 2 种方法所得的总 RNA 均能满足 RT-PCR、Northern blot 和 cDNA 文库建立等分子生物学研究, 且具有快速、简便易行、成本较低的特点, 适合于富含多糖、多酚的植物材料.

**关键词:** 香蕉; 不同组织; 总 RNA 提取; 改良 SDS 法; 改良 CTAB 法

**中图分类号:** S668.1

**文献标识码:** A

高质量 RNA 的提取是进行 RT-PCR、Northern blot 和建立 cDNA 文库等分子生物学研究的必要前提. 目前植物材料中总 RNA 提取的常用方法有异硫氰酸胍法<sup>[1]</sup>、苯酚法<sup>[2]</sup>、SDS 法<sup>[3]</sup>、CTAB<sup>[4]</sup>法及 Trizol 试剂盒法<sup>[1]</sup>等. 不同种植物或同种植物的不同组织, 甚至同一组织在不同生长发育时期, 用同种方法提取 RNA 的效果可能存在差异<sup>[5]</sup>. 香蕉组织不仅具有坚硬的细胞壁, 而且富含多种次生代谢物, 它们以不同方式严重干扰 RNA 的提取, 如多糖可形成难溶胶状物质与 RNA 一起被沉淀<sup>[6]</sup>, 多酚和色素极易被氧化成褐色物质, 与核酸不可逆的结合使 RNA 受到损失<sup>[7]</sup>. 此外, 细胞内和环境中的 RNase 极易使组织 mRNA 产生降解, 给实验操作过程带来一定的困难. 本实验在参考其它植物 RNA 提取方法<sup>[1-4, 8]</sup>的基础上加以改进, 建立了一种能有效分离香蕉根、茎、叶、果肉等不同组织中总 RNA 的提取方法, 也为其他植物 RNA 的提取提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

香蕉根、茎、叶为组培苗移栽后 6 个月的植株(由亚热带作物研究所提供), 果肉取自市售的新鲜香蕉. 材料采后用液氮处理放于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存.

### 1.2 主要试剂

改良 SDS 提取液: 2% 十二烷基硫酸钠(SDS), 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0), 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 7.4), 1.4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 2%  $\beta$ -巯基乙醇. CTAB 提取液: 2% CTAB, 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-Cl(pH 8.0), 1.4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(pH 8.0), 2%  $\beta$ -巯基乙醇. 所用的试剂均

① 收稿日期: 2006-09-12

作者简介: 王尉(1980-), 男, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学的研究.

通讯作者: 谢江辉, 副研究员.

用无 RNase 水配制. 玻璃器皿在 180 °C 下烘烤 12 h, 塑料制品用 0.1% DEPC 水浸泡 24 h, 然后再高温灭菌.

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 改良 SDS 法

称取 2 g 新鲜香蕉组织用液氮迅速研磨至粉末状, 然后转入 15 mL 改良 SDS 提取缓冲液中于 65 °C 水浴 15 min. 冷却后加入 1/3 体积的 5 mol/L KAc (pH 4.8), 温和混匀, -20 °C 放置 10 min, 低温离心 (12 000 r/min, 4 °C, 20 min). 取上清液, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 冰浴 2 h 以上, 再 4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min. 将沉淀溶于适量 RNase-free 水, 分别用水饱和酚及氯仿/异戊醇各抽提一次. 加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2), -20 °C 下沉淀 30 min, 再 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min. 沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次, 干燥后, 用适量 RNase-free 水充分溶解, 加入 1/3 体积 12 mol/L LiCl, 20 °C 静置 4 h 以上, 再低温离心, 75% 酒精洗涤, 条件同上. 最后用适量 RNase-free 水完全溶解, -80 °C 保存.

#### 1.3.2 改良 CTAB 法

称取 2 g 果肉在液氮中迅速研磨至粉末, 转入 20 mL 65 °C 预热的 CTAB 提取缓冲液中, 放置 40 min, 每隔 5~8 min 震荡 1 次. 冷却至室温, 用等体积的氯仿/异戊醇抽提 1 次, 4 °C 下 12 000 rpm 离心 15 min, 给上清液加 12 M LiCl 至终浓度为 3 M, -20 °C 中放置 4 h 以上, 4 °C 下 12 000 rpm 再离心 20 min. 沉淀用适量 DEPC 处理水溶解, 再用等体积的水饱和酚与氯仿/异戊醇分别抽提 1 次. 上清液中加 1/3 体积的 5 M KAc (pH 4.8) 和 1/15 体积无水乙醇, 冰上放置 30 min. 4 °C 下 15 000 g 离心 20 min, 沉淀多糖, 取上清液加入 1/10 体积 3 M NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积无水乙醇, -80 °C 沉淀 2 h 以上. 然后 4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min, 用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 真空干燥后完全溶解于适量 RNase-free 水中, -80 °C 保存.

#### 1.3.3 Trizol 法

购买 Takara 公司 Trizol 法试剂盒, 按产品说明书中方法进行 RNA 提取.

#### 1.3.4 SDS 法

参考 Bugos 法<sup>[9]</sup>.

### 1.4 RNA 浓度和质量检测

#### 1.4.1 核酸蛋白仪测定

取 2  $\mu$ L RNA 原液, 稀释 30 倍, 在核酸蛋白仪 (DU 640) 上测定 A 260/A 230, A 260/A 280 比值, 分析其纯度, 计算 RNA 回收率.

RNA 回收率 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) = (A 260  $\times$  40  $\times$  稀释倍数  $\times$  原液体积) / 样品重量 (g)

#### 1.4.2 电泳检测

取 2  $\mu$ L 左右的总 RNA, 在 1.2% 含有溴化乙锭 (EB) 琼脂糖凝胶中以 4~5 v/cm 高压电泳 25 min 后, 于凝胶成像系统下紫外光拍照.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方法提取香蕉不同组织总 RNA 的产量和纯度比较

由表 1 结果可知, 改良 SDS 法在分离香蕉根、茎、叶中总 RNA 的质量明显优于其他 3 种方法, 所有 A 260/A 230 比值均大于 2.0, A 260/A 280 高于 1.8, 说明得到的 RNA 质量较高, 其产量可达 400  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  以上. 而对于果实, 改良 CTAB 法效果最好, 分离的 RNA A 260/A 280 和 A 260/A 230 比率分别为 1.99 和 2.04, 且 RNA 产率在 0.05 显著水平上均达到极显著. 改良 SDS 法和 Trizon 法对果实中总 RNA 的提取效果较差, SDS 法虽然 A 260/A 280 高于 1.8, 但 A 260/A 230 却只有 1.72, 表明有多糖、酚、蛋白等次生代谢物的污染.

表 1 不同方法提取香蕉不同组织总 RNA 的产量与纯度比较

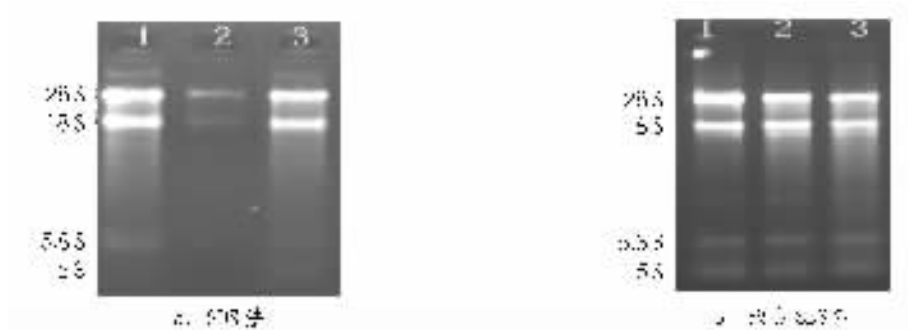
Table 1 Comparison of Total RNA Yield and Purity Among Banana Different Organs by Different Method

方 法	组织部位	吸光度比值		RNA 产量	差异性分析
		A 260 nm/A 280 nm	A 260 nm/A 230 nm		
SDS	根	1.43	1.52	7.71	b
	茎	1.82	1.84	417.32	c
	叶	1.88	1.72	525.94	b
改良 SDS	根	2.01	2.15	457.6	d
	茎	1.85	2.12	482.03	d
	叶	1.98	2.03	542.31	b
	果实	1.38	0.51	14.23	b
改良 CTAB	根	1.62	2.78	87.83	c
	茎	1.58	2.82	413.01	b
	叶	1.69	2.9	512.20	b
	果实	1.99	2.04	49.34	c
Trizol	根	1.92	2.05	1.89	a
	茎	1.82	1.75	2.66	a
	叶	1.86	1.65	2.82	a
	果实	1.58	1.23	2.38	a

注: Duncan 检测, 每行中不同字母表示差异达 0.05 显著水平.

## 2.2 SDS 法与改良 SDS 方法提取香蕉根、茎、叶中总 RNA 的电泳分析

从图 1 可以看出, 改良 SDS 法比 SDS 法对香蕉根、茎、叶中总 RNA 的提取效果较好. 在改良 SDS 法中, 所提取的 RNA 基本没有发生降解和 DNA 污染, 28 S 的亮度几乎是 18 S 亮度的 2 倍, 并且 5.8 S 与 5.0 S 条带也比较清晰. 此外, 紧贴 18 S 带下均存在一条带, 这可能是叶绿体中的 16 S. 而用 SDS 法从香蕉叶和茎中提取的总 RNA 皆存在明显的 DNA 污染, 并且在同等点样体积下, 根中总 RNA 提取量明显较低, 图 1 根中虽然看不出 DNA 的污染, 但当增加点样量时, 仍会有 DNA 条带出现(图略).



1: 香蕉叶的总 RNA; 2: 香蕉根的总 RNA; 3: 香蕉茎的总 RNA

图 1 SDS 法和改良 SDS 法提取香蕉叶、根、茎中的总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretic Pattern Analysis of Total RNA from Banana Leaf, Root, Stem using SDS Method and Improved SDS Method

### 2.3 CTAB 法与 Trizol 法提取香蕉根、茎、叶中总 RNA 的电泳分析

由图 2-a 可知, 采用 CTAB 法提取香蕉根、茎、叶中总 RNA 有少量 DNA 的污染, 并且 28 S 和 18 S 条带的亮度发生逆转现象, 即 18 S 的亮度高于 28 S, 说明 RNA 发生了降解, 这可能是在水浴过程中裂解时间过长所致。

在 Trizol 法(图 2-b)中, 虽然从根、茎、叶中提取的总 RNA 未发生降解和 DNA 等污染, 但是得率太低。这是由于 Trizol 试剂含酚和异硫脲酸胍等组分缓冲能力较差, 当所用材料中含有较多碱性物质时就不能很好地分离其中的总 RNA。



1: 香蕉叶的总 RNA; 2: 香蕉根的总 RNA; 3: 香蕉茎的总 RNA

图 2 改良 CTAB 法和 Trizol 试剂法提取香蕉叶、根、茎中的总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoretic Pattern of Total RNA from Banana Leaf, Root, Stem using Improved CTAB and Trizol kit

### 2.4 改良 SDS 法、改良 CTAB 法、Trizol 试剂提取香蕉果实总 RNA 的电泳分析

分别用改良 SDS 法、Trizol 法和改良 CTAB 法提取香蕉果肉中总 RNA, 结果表明, 改进后的 CTAB 法对提取香蕉果肉总 RNA 的效果最佳, 而改良 SDS 法和 Trizol 法的效果较差(图 3-a), 存在显著的 DNA、多糖等污染。与香蕉根、茎、叶相比, 果实中含有较多的糖、酚等次生代谢物, 在图 3-b 中, 无糖、酚等的污染, 那是由于分离的 RNA 经过了 2 次酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)抽提和醋酸钾-无水乙醇沉淀, 去除了蛋白和多糖等杂质。与其他 2 种方法相比改良 CTAB 法得率显著提高。因为改良 CTAB 法采用了 2 次去除多糖的步骤, 即先用 12 mol/L LiCl 选择性沉淀 RNA, 使多糖留在上清液中, 再用 1/15 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 1/5 体积无水乙醇去除多糖, 所以在沉淀时减少了 RNA 与多糖的结合。



1: 改良 SDS 法; 2: 改良 CTAB 法; 3: Trizol 法

图 3 改良 SDS 法、改良 CTAB 法和 Trizol 法提取香蕉果肉中总 RNA 纯化前后的电泳图

Fig. 3 Electrophoretic Pattern of Different Method Extracting Total RNA from Banana Fruit using Improved SDS, Improved CTAB and Trizol Kit before Purification and Purification Later.

### 3 讨 论

目前关于植物总 RNA 提取方法的报道已很多<sup>[1-8]</sup>, 但不同植物或同一植物的不同品种或同种植物的不同组织器官, 往往因种属、组织部位及发育成熟度的差异, 其内含物组份及含量都存在一定差异, 同时不同的 RNA 提取方法亦各有优缺点, 故应对不同物种及不同组织特性的材料进行选择或改良适合的 RNA 提取方法<sup>[3]</sup>.

与 SDS 法相比, 改良 SDS 法增加了提取材料的量, 采用了 SDS 提取液 65 °C 水浴 15 min, 1/3 体积 5 mol/L KAc (pH 4.8) 选择性沉淀多糖, 及 1/4 体积 12 mol/L LiCl 从基因组中选择性沉淀 RNA 等关键性步骤, 因而在提取香蕉根、茎、叶中总 RNA 取得了良好的效果. 而在果实中, 由于多糖含量高达 15%~20%<sup>[10]</sup>, 且多糖与 RNA 具有相似的理化性质而易形成共沉淀, 若先加 1/3 体积 5 mol/L KAc (pH 4.8), 则在沉淀多糖的同时也会使 RNA 发生共沉淀而造成损失, 故改良 SDS 法对香蕉果实总 RNA 的提取率较低, 同时有多糖等的污染. 而改良 CTAB 法, 先用氯仿/异戊醇粗提蛋白后, 加 1/4 体积 12 mol/L LiCl 从混合液中选择性沉淀 RNA, 使多糖留在上清液中, 大大减少了多糖的干扰, 再经酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)有效去除蛋白并抽提掉部分酚溶性多糖, 最后通过 1/3 体积 5 mol/L KAc (pH 4.8) 和低浓度(1/15V)乙醇溶液选择性沉淀残存多糖, 从而对香蕉果实总 RNA 的分离达到了较佳效果, 这也是 CTAB 法所不及的. 因此, 提取 RNA 时针对不同材料应注意提取方法的选取和步骤选择顺序的合理性.

本实验的 4 种 RNA 提取方法中, 均未加入能抑制酚类氧化的螯合剂 PVP, 代之通过在各提取液中添加 2%β-巯基乙醇还原剂来达到有效阻止酚类物质被氧化, 从而与 RNA 结合造成损失的目的. 这是因为 PVP 的存在能与一部分 RNA 特别是含较长 Poly(A)尾巴的 mRNA 相紧密结合<sup>[11]</sup>, 并且 PVP 还可与后续所加的水饱和酚发生不可逆的结合, 产生白色絮状物, 造成不必要的离心沉淀损失<sup>[12]</sup>.

### 4 结 论

富含多糖、多酚、蛋白质等大量次生物质给香蕉组织总 RNA 提取带来一定的困难. 针对这一特点, 本实验比较了 4 种不同 RNA 提取方法, 得出改良 SDS 法比较适合香蕉根、茎、叶中总 RNA 的提取, 而改良 CTAB 法对于果实效果较佳. 在上述两种不同的方法中, 均采用 2%β-巯基乙醇代替 PVP 作为还原剂, 且分别用不同的去除多糖方法, 所得的 RNA 均可满足分子生物学研究, 同时也为荔枝、枇杷、苹果等富含多糖、多酚等果树总 RNA 的提取提供参考价值.

#### 参考文献:

- [1] 程水源, 陈昆松, 杜何为, 等. 银杏 RNA 的提取[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 428-429.
- [2] 赵卫国, 彭金英, 苗雪霞, 等. 一种桑树 RNA 的提取方法[J]. 蚕业科学, 2004, 30(2): 224.
- [3] 徐昌杰, 陈昆松, 张波, 等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报, 2004, 21(2): 136-140.
- [4] 山蓝, 王莉莉, 张继澍. 从富含多糖和多酚的柿果中提取具转录活性 RNA 的方法[J]. 植物生理通讯, 2002, (5): 463-466.
- [5] Insworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (snrrel) [J]. *Plant Mol Biol Repr*, 1994, 12: 198-203.
- [6] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. *Meth Enzymol*, 1974, 31: 528-545.
- [7] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues[J]. *Anal Biochem*, 1987, 163: 16-20.
- [8] 张玉进, 孟祥春, 潘瑞炽, 等. 非洲菊花瓣总 RNA 提取方法的改进[J]. 植物学通报, 2001, 18(6): 722-726.
- [9] Bugos R C, Chiang V L, Zhang X, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine[J].

Biotechniques, 1995, 19: 734 – 737.

- [10] 胡位荣, 朱西儒, 王正询, 等. 香蕉果实采后及贮藏生理研究进展[J]. 广州大学学报, 2003, 2(3): 228 – 234.
- [11] Joseph S, David W. Russell. Molecular Cloning[M]. Science publication. 2003: 518.
- [12] Hu C G, Honda C, Kita M, et al. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds[J]. Plant Mol. Biol. Rep, 2002, 20: 69 – 69.

## A Study of the Methods for Total RNA Extraction from Different Tissues of Banana

WANG Wei<sup>1,2</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1</sup>, XIE Jiang-hui<sup>2</sup>

1. School of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Southern Asia Subtropical Crop Research Institute of CATAS, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

**Abstract:** SDS, modified SDS, modified CTAB and Trizol Kit were employed to extract total RNA from the tissues of banana root, stem, leaf and fruit. Modified SDS was found to be the best procedure for RNA extraction from banana root, stem and leaf, while modified CTAB was the best for RNA extraction from the fruit. The ratios of A260/A280 and A260/A230 were up to 1.8 and 2.0, respectively, for both methods. The band 28S was twice as bright as the band 18 S by visualizing the ribosomal RNA of the samples on agarose gel electrophoresis. The yield was above 400  $\mu\text{g/g}$  in the root, stem and leaf samples and 49.34  $\mu\text{g/g}$  in the fruit samples. Therefore, the extracted RNA should be suitable for application in RT-PCR, Northern blot, cDNA library construction and other biotechnological researches, and the two methods are believed to be especially useful for total RNA extraction of plant materials which have plenty of polysaccharides and hydroxybenzene.

**Key words:** banana; different tissues; total RNA extraction; modified SDS; modified STAB

责任编辑 欧 宾