

异硫氰酸胍法快速提取二球悬铃木组织总 RNA 的研究

李志能, 黄文俊, 张佳琪, 张俊卫, 包满珠, 刘国锋*

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘 要: 针对二球悬铃木组织中多酚物质含量较高的特点, 采用异硫氰酸胍法从二球悬铃木花序和叶片中提取到质量高、完整性好的总 RNA, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍, 通过 RT-PCR 克隆到二球悬铃木中与拟南芥 *Leafy* 基因同源的部分编码区。高质量的 RNA 为 Northern 杂交和利用同源序列法克隆二球悬铃木的相关基因提供了前提条件。

关键词: 二球悬铃木; 多酚; 异硫氰酸胍法; 总 RNA 提取

中图分类号: S792.37

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0266-04

Guanidine Thiocyanate Method of Total RNA Isolation in *Platanus acerifolia*

LI Zhi-Neng, HUANG Wen-Jun, ZHANG Jia-Qi, ZHANG Jun-Wei, BAO Man-Zhu, LIU Guo-Feng*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Guanidine Thiocyanate method was used to isolate total RNA from the inflorescence tissue and leaves of *Platanus acerifolia* successfully with regard to high quantity of phenolic compounds in its tissue. The high-quality total RNA was obtained by guanidine thiocyanate that eliminated the interferences of polyphenols and acquired the 28S rRNA, which is approximately two times as light as the 18S rRNA. The isolated RNA was of sufficient quality for cloning partial cDNA of *Leafy* gene homologous to *Leafy* in *Arabidopsis thaliana* according to RT-PCR. The method described here was the basis of Northern blotting and cloning genes from *P. acerifolia* according to homologous sequence.

Key words: *Platanus acerifolia*; Polyphenol; Guanidinium thiocyanate; Total RNA extraction

从植物组织中提取纯度高、完整性好的 RNA 是进行 Northern 杂交、RT-PCR、cDNA 文库构建和差别显示分析等分子生物学研究的关键。现在虽然有一些较为成熟的总 RNA 的分离方法能成功地从不同植物或不同组织中提取出 RNA, 但是从不同的材料或相同材料不同部位提取 RNA 时难点不同, 因此需针对生物材料的具体特点选择适宜的 RNA 提取方法。悬铃木被誉为“行道树之王”^[1], 是一种乔木类木本园林植物, 其中二球悬铃木是一球悬铃木和三球悬铃木的杂交种, 因其具有冠大荫浓、生长迅速、耐修剪等优点, 在我国长江流域地区成为首选行道树种, 但是其组织和器官中富含多酚和次生代谢物质, 而且 RNase 的活性较高, 这些因素导致 RNA 提取难度增大, 一定程度上限制了育种工作的进行, 目前国内外尚未见有悬铃木 RNA 提取成功的报道。尽管用 Trizol Kit 法提取组织 RNA 已在很多物种中有成功报道, 但悬铃木 RNA 用 Trizol Kit 法提取并

不能达到理想的效果。针对悬铃木组织成分复杂的特点, 我们分别用了 Trizol Kit 法和异硫氰酸胍法提取二球悬铃木组织 RNA, 结果表明异硫氰酸胍法能成功提取悬铃木花芽和叶片的总 RNA, 并从完整性、产量、纯度及用于 RT-PCR 研究等方面对该方法进行了评价, 为文库构建、Northern 杂交和利用同源序列法克隆花发育相关基因提供了前提条件。

1 材料与方法

1.1 材料

二球悬铃木 (*Platanus acerifolia*) 花芽和叶片均采自华中农业大学校内 30 ~ 40 年树龄的成熟二球悬铃木, 直接采集新鲜花序或叶片置于液氮中备用。

1.2 主要试剂

异硫氰酸胍 buffer: 0.75 mol/L 柠檬酸钠 (pH 7.0), 10% 十二烷基肌氨酸, 4 mol/L 异硫氰酸胍, 2% PVP。

收稿日期: 2006-11-03, 修回日期: 2007-01-26。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500394); 教育部新世纪人才计划 (NCET-04-0733) 资助项目。

作者简介: 李志能 (1980 -), 男, 湖北孝感人, 博士研究生, 从事植物生物技术与遗传育种研究。

* 通讯作者 (E-mail: glliu@mail.hzau.edu.cn)。

其它试剂:SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH); pMD 18-T Vector (TaKaRa)、焦碳酸二乙酯 (DEPC) (Amresco)、LiCl (Sigma)、聚乙烯吡咯烷酮 (soluble PVP 40, Sigma)、异硫氰酸胍 (Amresco)、2 mol/L NaAc、水饱和酚、 β -巯基乙醇等其它试剂为国产分析纯。一次性塑料耗材和各种试剂 (Tris 除外) 均用 0.1% DEPC 水 (V/V) 处理, 并高压灭菌去除 DEPC; 玻璃器皿于 140℃ 灭活 RNase。相关引物由上海英俊生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 Trizol Kit 法 具体操作见 Trizol Kit 操作说明 (Trizol reagent) [2]。

1.3.2 异硫氰酸胍法提取 ①异硫氰酸胍 buffer 中加 700 μ L/L 100 mL β -ME, 冰上预冷; ② 10 mL 离心管中加 4 mL buffer; ③ 1~2 g 新鲜样品加液氮研磨成粉末后加入离心管内, 摇匀; ④ 依次加入 0.4 mol/L NaAc 0.4 mL、水饱和苯酚 4 mL、氯仿/异戊醇 0.8 mL, 每加一种试剂都摇动离心管, 混合均匀, 最后振荡混匀, 冰浴 15 min; ⑤ 4℃ 条件下 12 000 r/min, 离心 30 min; ⑥ 4 mL 上清转入新的离心管, 加等体积异丙醇, -20℃ 冷冻 1 h; ⑦ 4℃ 条件下 12 000 r/min, 离心 25 min; ⑧ 去上清, 加 1.5 mL buffer、1.5 mL 异丙醇, -20℃ 冷冻 1 h; ⑨ 4℃ 条件下 12 000 r/min, 离心 20 min; ⑩ 沉淀用 1 mL 70% 乙醇洗 2 次; ⑪ 沉淀晾干, 溶于 50 μ L DEPC-H₂O, 摇匀, -20℃ 保存。

1.3.3 RNA 质量检测 1.1% 琼脂糖凝胶, 0.5 \times TBE 缓冲液, 80 V 电泳 30 min。取 5 μ L 稀释至 3 mL, 测波长在 230、260、280 nm 处的吸光值, 即 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} 。

1.3.4 RNA 转录活性检测 cDNA 合成 第一链逆转录 cDNA 合成采用 CLONTECH SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, 按试剂盒说明书进行操作。用该方法合成的单链 cDNA 3' 端带有接头: 5'-AT-TCTAGAGGCCCGAGGCGCCCGAC-3'。

1.3.5 RT-PCR 扩增 Leafy 基因的第三段 Exon 根据 Michael 和 David [3] 的报道, 在 *P. racemosa* 中 Leafy 基因 (GenBank, accession number: AF106842) 序列设计 RT-PCR 引物为: Forward (5'-TGACGAACCAGG-TATTCAGA-3'); Reverse (5'-AGGAAGGACCAG-TAATGGCT-3')。

PCR 反应体系如下: 2 μ L 第一链逆转录 cDNA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs (NH₄⁺ balanced), 5 μ L 10 \times Buffer, 1 μ L primer, 1.5 U Taq 酶。

PCR 反应程序如下: 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 2 min, 38 个循环, 循环结束后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖 (含 1% EB) 电泳检测。

1.3.6 连接 T 载体及测序 回收和连接扩增片段并转化 *E. coli* DH5 α 。而后用 M₁₃ 引物 (Forward: CAGGAAACAGCTATGAC; Reverse: GTAAAACGAC-GGCCAG) 菌落 PCR 筛选白斑摇菌, 抽提质粒, 经酶切鉴定后, 送上海英俊公司测序, 其结果用 Clustal W 1.83 软件进行序列比较分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量分析

Trizol Kit 法并不适合提取悬铃木 RNA, 而异硫氰酸胍法提取到的二球悬铃木花序和叶片的总 RNA, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍 (图 1), $A_{260/280}$ 值约为 1.75, 表明 RNA 完整性很好, 可以用于进一步的分子生物学研究。花序和叶片的 RNA 产量分别约为 166 μ g/g 和 178 μ g/g 鲜重 (表 1)。



1: Trizol 法提叶片 RNA; 2, 3: 异硫氰酸胍法分别提取花序和叶片 RNA

Lane 1: Leaf with Trizol Kit; Lane 2, 3: Inflorescence and leaf with guanidine thiocyanate

图 1 异硫氰酸胍及 Trizol Kit 法提取二球悬铃木总 RNA
Fig. 1 Total RNA extraction with guanidine thiocyanate or Trizol Kit

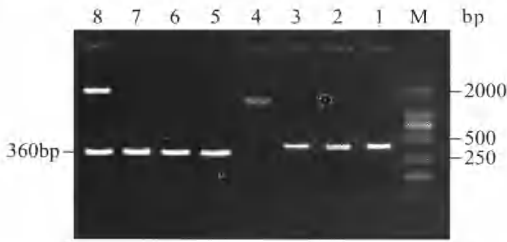
表 1 二球悬铃木花序和叶片总 RNA 质量及产量分析
Table 1 Quality and quantity analysis of total RNA of inflorescence and leaf in *P. acerifolia*

样品 Sample	吸光度比值 Absorbancy ratios		产量 (μ g/g FW) Yield
	OD _{260/230}	OD _{260/280}	
花序 Inflorescence	1.59 \pm 0.05	1.72 \pm 0.08	166.26 \pm 7.02
叶片 Leaf	1.67 \pm 0.07	1.79 \pm 0.11	178.53 \pm 3.65

2.2 RT-PCR 扩增 Leafy 基因的第三段 Exon、连接及测序

用上述改进的异硫氰酸胍法提取的二球悬铃木花序的 RNA, 经第一链逆转录为 cDNA, 以此 cDNA 模板成功扩增出 Leafy 基因第三个外显子 (ACCES-

SION:EF488451),连接T载体后,经酶切及PCR鉴定(图2)并测序,其大小为360 bp(图2、图3)。



M:DNA Marker; 1~3:以质粒 DNA 为模板 M_{13} 引物 PCR 扩增验证; 4:质粒 DNA; 5,6:以 cDNA 为模板 PCR 扩增; 7:以质粒 DNA 为模板 PCR 扩增验证; 8:质粒 DNA 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切检测
Lane M:DNA marker; Lane 1~3:PCR identification with M_{13} from plasmid DNA; Lane 4:Plasmid DNA; Lane 5,6:RT-PCR amplified from the first strand cDNA; Lane 7:PCR identification with the third exon of *Leafy* gene in *P. racemosa* from plasmid DNA; Lane 8: restriction endonucleases analysis with *EcoR* I and *Hind* III

图 2 RT-PCR 扩增 LFY 基因片段、PCR 及酶切检验

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic analysis of RT-PCR-amplified the third exon of *Leafy* gene from inflorescence, PCR identification and restriction endonucleases analysis

用Clustal W 1.83软件进行序列分析,发现所克隆的片段与 Michael 在加州悬铃木中 *Leafy* 基因第三个外显子的同源性高达 98% (图3)^[3],与昆兰树、拟南芥、杨树、桉树和银杏 *Leafy* 基因的同源性分别为 76%、71%、75%、70% 和 57% (表 2)。

表 2 二球悬铃木 *Leafy* 基因部分编码区与其它 *Leafy* 同源基因的同源性比较

Table 2 Comparison of amino acid sequences between partial cDNA in *P. acerifolia* and other *Leafy* (*LFY*) homologs

LFY 同源基因 LFY homologs	同源性(%) Percentage of identity	基因登陆号 GenBank accession No.
加州悬铃木 <i>PlaraLFY</i>	98	AF106842
昆兰树 <i>TroLFY</i>	76	AF230078
拟南芥 <i>LFY</i>	71	M91208
杨树 <i>PTLF</i>	75	U93196
桉树 <i>ELF1</i>	70	AF034806
银杏 <i>GinLFY</i>	57	AF108228

Pa3exon	TGACGAAC	CAGGTATTCAGATATGCAAAAAGGGCTGGAGCAAGCTACATAAACAAGCCAAAGATGAGACACTATGTGCACTG	82
PlaraLFY	TGACGAAC	CAGGTATTCAGATATGCAAAAAGGGCTGGAGCAAGCTACATAAACAAGCCAAAGATGAGACACTATGTGCACTG	839
TroLFY	TGACAAAC	CAGGTGTTAGATACGCGAAGAAGCGAGTGGCAGTTACATAAACAAGCCAAAGATGAGACACTACGTACACTG	848
ELF1	TGACGAAC	CAGGTGTTAGCTACGCGAAGAAGGGCGGAGCAAGCTACATAAACAAGCCAAAGATGAGACACTATGTGCACTG	773
GinLFY	TGACAAAT	CAAGTATTCGACATGCGAAACATTCGGGTGCTGTTACATTAACAAGCCAAAGATGAGACACTATGTGCACTG	968
LFY	TGACGAAC	CAAGTATTCAGTACGCGAAGAATCAGGAGCGAGTTACATAAACAAGCCAAAGATGAGACACTACGTTCAGTG	947
PTLF	TGACAAAT	CAGGTGTTAGCTATGCCAAGAAGCGAGGAGCAAGCTACATCAACAAGCCAAAGATGAGACACTACGTGCATTG	854
Pa3exon	CTATGCTTTG	CATTGCCTTGATGAAGACGCATCTAATGCACTGAGGA-GAGCTTTC	163
PlaraLFY	CTATGCTTTG	CATTGCCTTGATGAAGACGCATCTAATGCACTGAGGA-GAGCTTTC	921
TroLFY	CCTACGCTT	GCACTGCCTGGATGAGGAGGTGTTCAACACTCTCAGGA-GAGCTTTC	930
ELF1	CTACGCCCT	GCACTGCCTGGACGACGCGCTCCAACGCGCTTCGCAAGAGCTT-CAAGGAGCG	855
GinLFY	TTATGCACT	GCATTCGCTGGACGTAGATCAATCGAATCGTCTGAGAA-GACTCTACAAGAACGAGGGGAAATGTTGGAGC	1050
LFY	TTTACGCGT	CCACTGCCTAGACGAGAAGCTTCAAAATGCTCTCAGAA-GAGCGTTTAAAGAACGCGGTGAGAAGCTTGGCTC	1029
PTLF	TCTATGCTT	TACATTGCCTCGATGAGGACGCATCCAATGCACTTACGA-GAGCGTTCAAGGAGAGAGGAGAAAATGTTGGAGC	936
Pa3exon	GATGGAGGC	CAGGCTGCTACAAGCCACTTGTGTCCATGGCAGCTCGGCAA---GGGTGGGACATCGATGCCATCTTCAATGCT	242
PlaraLFY	ATGGAGGC	CAGGCTGCTACAAGCCACTTGTGTCCATGGCAGCTCGGCAA---GGGTGGGACATCGATGCCATCTTCAACGCT	999
TroLFY	ATGGAGGC	CAAGCATGCTACAACCCCTCGTTGCTATAGCGGCATTTCAA---GGATGGGACATTGATGCCATCTTAAATGCC	1008
ELF1	CTGGAGGC	CAAGCCTGTTACACCCCTGGTCAACATCGCCGCGCGCAGGGCCGGCTGGGACATCGACGCCATCTTCAATGCC	937
GinLFY	ATGGAGAC	AGGCTGTTATATCCCTCGTTGTGATGGCCAAAGAGAAT---GGGTGGGACATTGAAGCTGTTTTTAACCAA	1128
LFY	ATGGCGT	CAGGCTTGTACAAGCCACTTGTGAACATCGCTTGTGCTCAT---GGCTGGGATATAGACGCGCTCTTTAACGCT	1107
PTLF	ATGGAGAC	AGGCTTGTACAAGCCCTTGTAGCCATCGCATCAGGCCAA---GGCTGGGACATAGATTCCATTTCAATGCT	1014
Pa3exon	CACCATCGCCT	TGCAATCTGGTGCCTACCTACAAAGCTCGTCAAGCTTGCCATGCGGAACGTAAACA---T---GCTG	315
PlaraLFY	CACCATCGCCT	TGCAATCTGGTATCGTACCCACCAAGCTCGCTCAAGCTATGCCATGCGGAACGTAAACA---T---GCTG	1072
TroLFY	CACCCCGCCT	CTCTATCTGGTATGTCCCCACCAAGCTCGCTCAAGCTTGCCATGCGGAACGTAGCAACAACG---CTGCCT	1087
ELF1	CACCCCGCCT	CTCTCATCTGGTATGTCCCCACCAAGCTCGCCAGCTTGCCATGCTCAGCGCACTCTCCGCTCTGCTG	1018
GinLFY	CATGAAAACT	TGCAATTTGGTATGTCCCTACAAAATTACGCCAACTGTGCACTCTGAGAAAAAGCAAG---ACCT	1203
LFY	CATCCTCGT	CTCTCTATTTGGTATGTTCCAAACAAAGCTCGCTCAAGCTTGGCATTTGGAGCGGAACATGCGGTGCTGCGG	1189
PTLF	CATCCTCGGCT	TGCATTGGTATGTGCCGACCAAGCTCGTCAACTTGTATGCAGAGCGCAATAG---T---GCCA	1087
Pa3exon	GTGCTCTC	AGCTTCACTTCCGGT---GGAGGCATTACTGGTCTTCTCT---360	
PlaraLFY	GTGCTCTC	AGCTTCACTTCCGGT---GGAGGCATTACTGGTCTTCTCTCT---1120	
TroLFY	CTTCCAGCT	CTCTGCTGCTGCTGCT---GCTGCTGCTGCTGCTG---CCATTGCG	1134
ELF1	CTTCTCTCG	CTTCACTTCCACC---TCTGCCCCACGCTCACCATTCTCG	1066
GinLFY	CATTGA	---	1209
LFY	CTCGGGCT	TTTAGTTGGCGGTATTAGCTGTACCGGATCGTGAAGCTCTCG	1238
PTLF	CTTCTTCAAG	CTGTCTCTGCT---ACTGGAGGTCACCTG---CGTTTTC	1133

图 3 悬铃木 *Leafy* 基因部分编码区与其它 *Leafy* 基因片段序列对比(右边数字代表氨基酸的位置)

Fig. 3 Sequence comparison of partial cDNA in *P. acerifolia* and the other *Leafy* gene

(The nucleotide sequence is numbered on the right)

3 讨论

异硫氰酸胍是一种强 RNA 酶抑止剂^[4,5],本实验在传统异硫氰酸胍法基础上,针对二球悬铃木多酚物质含量很高、研磨之后的材料极易褐化的特点进行了改进,在异硫氰酸胍缓冲液中加入 2% 可溶性的 PVP,成功提取了二球悬铃木花序及叶片的 RNA, RNA 纯度及完整性较好,适合其它分子生物学操作^[6]。

β -ME 可以保护 RNA 免受多酚类物质的干扰^[7,8],但是异硫氰酸胍法在第四步抽提过程中,使用了酚/氯仿/异戊醇混合液,苯酚直接与植物材料接触,使植物组织被强氧化,发生褐化效应, β -ME 作为强还原剂能防止多酚氧化,还可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活,为了防止褐化效应的发生,我们采用 β -ME 来防止酚类物质的氧化。

PVP 作为多酚化合物的螯合剂,具有很强的结合酚的能力,使之不能被氧化成醌类,有效地防止其与 RNA 的结合^[8]。缓冲液中同时使用还原剂 β -ME 和螯合剂 PVP40,有效地降低了酚类物质的影响。

RNA 沉淀出来后,沉淀用 1 mL 70% 乙醇洗两次,有利于避免残留盐类物质及缓冲液影响 RNA 纯度,而使得 OD_{260/230} 偏低。

利用 RT-PCR 克隆到的二球悬铃木 *Leafy* 基因

片段与 Michael 等在加州悬铃木中报道的 *Leafy* 基因第三个外显子的同源性高达 98%,说明本实验方法提取的 RNA 质量较高,完全适合 RT-PCR 等分子生物学操作。

参考文献:

- [1] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社,1990.
- [2] Trizol Reagent. Product description TRIZOL reagent[Z]. Manufacturer protocol (1995). Life Technologies, Gaithersburg, MD.
- [3] Michael W Frohlich, David S Parker. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils[J]. *Systematic Botany*, 2000, 25(2): 155 - 170.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156 - 159.
- [5] Maliyakal E J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(9): 238 - 241.
- [6] Xu Q, Wen X P, Tao N G, Hu Z Y, Yue H L, Deng X X. Extraction of high quality of RNA and construction of a suppression subtractive hybridization (SSH) library from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt)[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 587 - 591.
- [7] 李菁芳, 黄劲毅, 田仁鹏, 张路珍, 方呈祥. 一种适用于 RT-PCR 的杉树类植物中总 RNA 提取的方法[J]. *武汉植物学研究*, 2004, 22(6): 551 - 556.
- [8] 王曼玲, 朱虹琳, 周明全, 胡中立, 宋运淳. 莲藕组织总 RNA 的快速提取方法[J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(5): 475 - 477.