

用 CTAB- PVP 法提取棉花各组织总 RNA 的研究

刘洋 何心尧 马红波 吴泳历 杨佑明

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 针对棉花组织总 RNA 难以提取、不同组织的提取方法难以统一的问题, 借鉴 Jaakola 等的越橘果实总 RNA 提取方法(即 CTAB-PVP 法), 对棉花组织总 RNA 的提取效果进行了分析。实验结果表明: 得到的棉花纤维、胚珠、叶片、胚根、花瓣、下胚轴和花药各组织的 RNA 完整性好, 其 D_{260}/D_{280} 比值为 1.7~2.0, 产率 30~180 $\mu\text{g/g}$ (鲜质量); 用开花后 15 d 纤维的 RNA 为材料进行反转录, 再利用 RT-PCR 和 3 RACE 技术进行克隆, 各获得 1 个大小为 542 和 712 bp 的 cDNA 克隆, 经序列分析鉴定, 这 2 个片段分别编码棉花微管结合蛋白和微丝结合蛋白。

关键词 棉花; RNA 提取; CTAB-PVP

中图分类号 S 562.01

文章编号 1007-4333(2005)06-0053-04

文献标识码 A

Extraction of total RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues with CTAB-PVP method

Liu Yang, He Xinyao, Ma Hongbo, Wu Yongli, Yang Youming

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A new improved CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide) method, the CTAB-PVP method, was developed in order to isolate high-quality RNA from the most tissues of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). The total RNAs were extracted from fiber, ovule, leaf, radicle, petal, hypocotyls and anther using CTAB-PVP. The extracted total RNA was of high integrality and the D_{260}/D_{280} ratio of each sample was between 1.7 and 2.0. The average yield of RNA was ranged from 30 to 180 $\mu\text{g/gfw}$ (gram fresh weight). The total RNA extracted with this method can be suitably used for most RNA-based analyses, including reverse transcription and RT-PCR, etc.

Key words cotton; RNA extraction; CTAB-PVP

以 RNA 为基础的植物分子生物学研究的必要前提是获得足够量、高质量的 RNA。但由于棉花组织中富含复合蛋白、多糖和酚类等次生代谢产物, 得到总 RNA 的完整性、产率和质量均不十分理想。前人的工作还表明棉花植株不同组织之间差异较大, 目前还难以找到一种适合于棉花植株各组织中提取高质量的总 RNA 的方法。

前人曾利用热硼酸盐法^[1]、冷酚法^[2]、热酚法^[3]、高盐法^[4]、异硫氰酸胍法^[5]、SDS^[6]法和 CTAB-酚法^[7]等方法成功地从棉花组织提取了总 RNA。最近, 又出现了改良的热硼酸盐法^[8]和热酚法^[9]。但这些方法中仍然存在许多问题, 如热硼酸

盐法和改良热酚法虽然可以从棉花大多数组织提取到合格的总 RNA, 但不能提取胚珠的总 RNA^[8]; 高盐法、异硫氰酸胍法、SDS 法虽然操作简单, 但是总 RNA 的完整性较差, 且试剂昂贵。另外, 实验表明常用的试剂盒也不适合于棉花总 RNA 的提取。

Jaakola 等^[10]发展了 CTAB-PVP 法并成功用于越橘果实总 DNA 的提取, 其步骤简单, 得到的总 RNA 完整性好。因越橘果实和棉花组织都富含复合蛋白、多糖和酚类等次生代谢产物, 所以本课题组借鉴上述方法对棉花进行各种组织总 RNA 提取的研究。

收稿日期: 2005-05-07

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项(JY03A16)

作者简介: 刘洋, 硕士研究生; 杨佑明, 副教授, 通讯作者, 主要从事棉花纤维发育与其功能基因组研究,

E-mail: ymyang@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料和取样

采用陆地棉品种 (*Gossypium hirsutum* L.) 徐州 142 及其无纤维无短绒突变体, 于 2004-05-01 在本校科学园区种植, 常规管理。从 7 月 15 日起, 每天用棉线系住开花前 1 d (记为 1 DPA) 花的花冠使其自交, 挂牌并注明挂牌日期。采集开花当天 (0 DPA) 的花和开花后 15 d (15 DPA) 的棉铃, 迅速剥取出 0 DPA 的胚珠和 15 DPA 的种子, 置于液氮中迅速冷冻, -80 °C 保存。于 2004-07-20 采集徐州 142 的幼嫩叶片、胚根、花瓣、下胚轴和花药 (均在大田自然条件下生长), 在液氮中迅速冷冻, 于 -80 °C 保存。

1.2 试剂、器皿

实验用的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 购自北京化学试剂公司; 聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP-40, 分子量 40 000) 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自 AM-RESCO 公司; 焦碳酸二乙脂 (DEPC) 和苯酚 (pH 4.0) 购自上海生工生物技术有限公司。

研钵、玻璃器皿在使用之前 180 °C 烘 8 h, 离心管、枪头等塑料器材使用前用 0.1% (体积分数) 的 DEPC 37 °C 处理 12 h, 然后高压灭菌, 80 °C 烘干, 避免 RNase 的污染。

1.3 操作步骤

从 -80 °C 冰箱中取出材料放入研钵中, 加液氮, 研磨样品, 在 7 mL 离心管中加入 0.2~0.5 g 材料, 置于冰上。加入 3 mL 65 °C 预热的提取缓冲液 2% (质量分数) CTAB、2% (质量分数) PVP-40、100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol/L EDTA、2.0 mol/L NaCl、0.5 g/L 亚精胺 (spermidine)、65 °C 溶解 10 min, 0.1% (体积分数) 的 DEPC 37 °C 处理 12 h, 然后高压灭菌, 使用前加入 2% (体积分数) β-巯基乙醇, 充分震荡离心管, 65 °C 温浴 10 min, 其间震荡离心管 2~3 次。4 °C 12 000 g 离心 10 min。取上清液转移至新的 7 mL 离心管中, 用等体积的 V (氯仿) : V (异戊醇) = 24 : 1 抽提 2 次, 每次充分震荡, 放置 10 min, 4 °C 12 000 g 离心 10 min。将上清液分装到 1.5 mL 离心管中, 每管 900 μL, 共 5 管。然后加入 1/3 体积 8 mol/L LiCl, 轻轻混匀, 4 °C 冰上 6~8 h 沉降 RNA; 4 °C 18 000 g 离心 20 min; 弃去上清液, 加 500 μL 70% (体积分数) 冰冷乙醇洗涤沉淀 2 次, 弃掉乙醇, 将离心管倒扣在吸水纸上数分钟; 每

管中加入 100 μL SSTE (1.0 mol/L NaCl, 0.5% (质量分数) SDS, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)), 0.1% (体积分数) 的 DEPC 37 °C 处理 12 h 后高压灭菌) 溶解沉淀, 将 5 个离心管中的溶液合并成 1 管。用等体积的 V (苯酚) : V (氯仿) : V (异戊醇) 为 25 : 24 : 1, 及等体积的 V (氯仿) : V (异戊醇) = 24 : 1 各抽提 1 次, 每次充分震荡, 放置 10 min, 4 °C 12 000 g 离心 10 min。取上清液, 加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 在 -20 °C 沉降 2 h。4 °C 18 000 g 离心 20 min。弃掉乙醇, 加 500 μL 70% (体积分数) 冰冷乙醇洗涤沉淀 2 次, 弃掉乙醇, 将离心管倒扣在吸水纸上数分钟。加入适量无 RNase 的水溶解 RNA, 置于 -80 °C 保存备用。

1.4 RNA 质量和含量检测

称取 0.5 g 琼脂糖加入 50 mL 0.5 × TBE (Tris 5.4 g、硼酸 2.75 g、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 加蒸馏水定容至 1 L), 加热熔化琼脂, 加入溴化乙锭 (EB) 使其质量浓度达 0.5 g/L, 在电泳槽中加入 0.5 × TBE, 加 RNA 样品, 180 伏稳压电泳 15 min, 在 Alpha Multi-image Light Cabinet 凝胶成像系统下观察、照相。

取 2 μL 棉花组织总 RNA (所加 RNA 的量, 根据所提 RNA 的大致含量而定, 保证 D_{260} 在 0.1~0.9) 加水至 500 μL。比色杯 Joseph 和 David^[10] 的方法处理, 用 Perkin Elmerd Lamboda Bio 20 紫外分光光度计检测各样品在 260 与 280 nm 波长下的光密度 D , 计算二者之比 (即 D_{260}/D_{280})、RNA 质量浓度 (RNA) 和产率。 (RNA) = $D_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数。RNA 产率 ($\mu\text{g/g}$ 鲜质量) = RNA 含量 \times RNA 溶液的体积 / 样品鲜质量。

1.5 RT-PCR 和 RACE

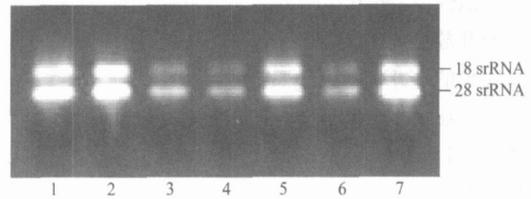
根据已知的 EST 设计简并引物 TF 5'-TG GAGGAAA (G) TAC (T) GGA (TC) CAA (G) AAA (G) -3', 根据已知信息设计基因特异引物 TT 5'-AA GCAA GGA GGA GCA GA TGT-3'。通用引物采用 QT 5'-GACTCGA GTCGACATCGA (T) 17-3'; QO 5'-GACTCGA GTCGACATC G-3', 引物由上海生工生物工程公司合成。RT-PCR、RACE 方法见文献[11、12]。

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性及适用组织类型

利用 CTAB-PVP 法从棉花叶片、纤维、胚根、

花瓣、胚珠、下胚轴和花药等组织成功提取到总 RNA ,其中,胚珠、下胚轴和花药等组织的总 RNA 难以用常规的方法提取。经电泳检测,均可以观察到 28 s、18srRNA 条带,条带清晰,且 28srRNA 的条带较亮,亮度基本为 18srRNA 的两倍,没有拖带现象(图 1),表明所提取的 RNA 基本无降解,完整性好,可用于以 RNA 为对象的分子生物学研究。值得指出的是,从徐州 142 无纤维无短绒突变体的 0DPA 胚珠提取的 RNA 不仅纯度高、完整性好,而且产率较高(表 1)。这说明此方法适合于从较广泛



1 为 0 DPA 胚珠; 2 为叶片; 3 为 15 DPA 纤维;
4 为胚根; 5 为花瓣; 6 为下胚轴; 7 为花药

图 1 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA

Fig. 1 Total RNA on 1% agarose gel

表 1 CTAB- PVP 法所获得的 RNA 的产率和 D_{260}/D_{280}

Table 1 Yield and A_{260}/A_{280} of RNA extracted by CTAB- PVP method

| 材料 | 胚珠 (0DPA) | 突变体胚珠* (0DPA) | 叶片 | 纤维 (15DPA) | 胚根 | 花瓣 | 下胚轴 | 花药 |
|---|--------------|------------------|--------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| RNA 产率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ | 168.36 | 180.63 | 120.11 | 32.35 | 63.75 | 71.91 | 46.72 | 83.75 |
| D_{260}/D_{280} | 1.76 | 1.82 | 1.93 | 1.98 | 1.91 | 1.74 | 1.75 | 1.84 |

注: *指徐州 142 无纤维无短绒突变体胚珠,其他材料为徐州 142。

The ratio of D_{260}/D_{280} nm of all samples was 1.7 - 2.0. The yield of total RNA is 30 - 180 $\mu\text{g}/\text{g}$, 32.35 $\mu\text{g}/\text{g}$ from 15DPA fiber tissues and 180.63 $\mu\text{g}/\text{g}$ from 0DPA ovule tissues of cotton.

的棉花组织中提取 RNA。

2.2 RNA 纯度及产率

经检测,所有样品即 D_{260}/D_{280} 值均在 1.7 ~ 2.0(表 1),表明 RNA 样品含酚类物质和蛋白质等杂质少,该方法所提取的 RNA 样品纯度较好。

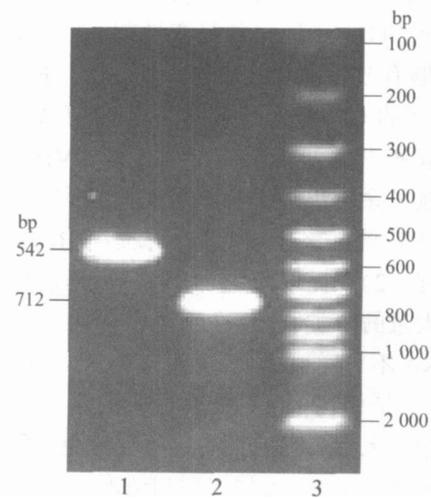
从不同棉花组织提取的 RNA,其产率在 30 ~ 180 $\mu\text{g}/\text{g}$ (表 1),表明从不同组织提取 RNA 的产率差异较大,0 DPA 突变体胚珠的产率最大,达到 180.63 $\mu\text{g}/\text{g}$,15 DPA 纤维的产率最少,为 32.35 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

2.3 RNA 反转录后的 PCR 扩增结果

以 CTAB- PVP 法所提取的 15 DPA 纤维的 RNA 为材料,利用 RT- PCR 技术获得了一个大小为 542 bp 的 cDNA 克隆(编号: *GhMAP- LC3*, GenBank 登陆号: AY311346)(图 2),经过 NCBI 的 BLASTX 检索,其与拟南芥的微管结合蛋白基因序列有 85% 的相似性,可能为棉花微管结合蛋白基因家族成员。该基因具有完整的开放读码框,编码含 119 个氨基酸的蛋白质。

以 CTAB- PVP 法所提取的 15 DPA 纤维的 RNA 为材料,利用 3 RAC 技术克隆了一个大小为 712 bp 的片段(编号: *GhMFAP- 1*, GenBank 登陆号: CV794678)(图 2),经过 NCBI 的 BLASTX 检

索,其与桃树的 profilin(微丝结合蛋白基因)有 96%



1 为 *GhMAP- LC3* 基因产物,2 为 *GhMFAP- 1* 基因产物,
3 为 DNA 检测分子标准。

图 2 *GhMAP- LC3* 基因和 *GhMFAP- 1* 基因
PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 PCR products of *GhMAP- LC3* and
GhMFAP- 1 gene on 1% agarose gel

Fig. 1 and 2 are major products with approximate molecular weights of 550 and 700 bp respectively. cDNA synthesized from total RNA prepared from 15DPA fiber tissues by CTAB- PVP method was used as PCR templates, indicating the total RNA extracted with this method is suitable for the analysis based on RNA, including reverse transcription and RT-PCR.

的相似性,可能为其成员之一。此基因序列含有完整的开放读码框,编码含 131 个氨基酸的蛋白质,具有完整的 3' 末端和 poly(A) 的尾。

上述结果表明,获得的 RNA 可以应用于反转录和 RT-PCR 等以 RNA 为基础的分析研究,且完整性好。

3 结论与讨论

利用 CTAB-PVP 方法提取的棉花各组织总 RNA 完整性好、产率高。得到的总 RNA 可以直接用于 cDNA 合成及 RT-PCR、RACE 等分子生物学技术。

此前,本实验室主要利用热硼酸盐法和热酚法提取棉花组织的总 RNA,但在研究棉花纤维细胞起始过程时,未能提取到徐州 142 无纤维无短绒突变体 0 DPA 胚珠的 RNA。而利用 CTAB-PVP 法不仅得到了棉花的纤维、叶片、下胚轴和花药的 RNA,也得到了质量较好的胚珠、根、花瓣等组织的总 RNA,说明 CTAB-PVP 法适合于从较广泛的棉花组织提取 RNA。

与常规 RNA 提取方法,如高盐法、SDS 法、热酚法不同,本实验方法最大的改进是使用 CTAB 作为提取液。CTAB 是一种强变性剂,变性效果优于 SDS,能够有效除去蛋白(含复合蛋白)等杂质。此外,与常规的 CTAB 法比较,本方法还有如下改进: 1) 在提取液中加入较高质量浓度的 PVP。这不仅有效地去除棉花组织中的酚类物质和多糖,还能去除一些其他色素物质和脂类,提高 RNA 的完整性和纯度。2) 在提取液中加入 β -巯基乙醇。棉花中含有大量的酚类物质,在细胞破碎时其自动氧化而与 RNA 不可逆地结合,从而影响 RNA 的产率和纯度,这也是棉花 RNA 难以提取的重要原因。在提取液中加入 β -巯基乙醇,这不仅避免了酚类物质的氧化还提高了 RNA 的产率和纯度^[13]。3) 在用苯酚-氯仿抽提时,使用低 pH 的苯酚(pH4.0)。苯酚在低 pH 的情况下能促进水相中的蛋白和 DNA 向有机相分配,从而最大限度的除去总 RNA 中的蛋白和 DNA。4) 用 LiCl 选择性的沉淀 RNA。这可以充分除去 RNA 中的 DNA 污染。如果必要,可以进行 2 次 LiCl 沉淀,但是,最后一步必须用 70%(体积分数)乙醇洗涤 2 次,避免 RNA 中因含有 LiCl 而影响反转录的效果。

用本实验方法提取的 RNA 能满足大多数分子生物学的研究,但有些实验,如 Northern 杂交、构建 cDNA 文库等对 RNA 的质量要求更高,因此,在得到 RNA 后,用 DNase I(RNase Free)处理,即可得到纯度更高的 RNA。

参 考 文 献

- [1] Wan C H, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223: 7-12
- [2] 刘长军, 孟玉玲, 侯嵩生, 等. 棉花法呢基焦磷酸合酶 cDNA 克隆、序列分析及其在种子发育过程中的表达特征[J]. *植物学报*, 1998, 40(8): 703-710
- [3] 秦治翔, 杨佑明, 张春华, 等. 棉纤维次生壁增厚相关基因的 cDNA 克隆与分析[J]. *作物学报*, 2003, 29(6): 860-866
- [4] 徐亚浓, 王学德, 蒋淑丽, 等. 排除棉酚等干扰提取棉纤维细胞 RNA 方法的研究[J]. *棉花学报*, 2002, 14(3): 143-146
- [5] 王文锋, 肖月华, 侯磊, 等. 棉花总 RNA 的快速提取方法[J]. *河南农业大学学报*, 2002, 36(3): 229-231
- [6] 夏兰芹, 郭三堆. 棉花 RNA 的快速提取方法[J]. *棉花学报*, 2000, 12(4): 205-207
- [7] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/ 酚法提取棉花组织总 RNA[J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167
- [8] Wu Y, Llewellyn D J, Dennis E S. A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20: 213-218
- [9] 王友华, 卢孟柱, 段留生. 棉花幼苗根总 RNA 提取的改进热酚法[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(4): 723-726
- [10] Jaakola L, Pirttila A, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Molecular Biotechnology*, 2001, 19: 201-203
- [11] Joseph S, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 46-53
- [12] Joseph S, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 61-65
- [13] Salzman T, Fujita K, Zhur Salzman P, et al. An improved RNA isolation method for plant tissues contains high levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates [R]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 7: 11-17