

## 4 种榕树总 RNA 提取方法的比较<sup>\*</sup>

赖 茵<sup>1,2</sup>, 余迪求<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:**用 Trizol 法、SDS-LiCl 法、改良 CTAB 法分别对对叶榕(*Ficus hispida*)、聚果榕(*F. racemosa*)、高榕(*F. altissima*)、苹果榕(*F. oligadon*) 4 种榕树叶片提取总 RNA。通过紫外吸光值及甲醛变性凝胶电泳检测, 结果显示: Trizol 法只适合于对叶榕总 RNA 的提取, 在其余 3 种榕树中不能提得; SDS-LiCl 法可以从除苹果榕外的其余 3 种榕树中提取到总 RNA, 但是质量和产量都不高, 有比较明显的降解; 改良 CTAB 法对 4 种榕树的总 RNA 提取效果都比较好, 通过 northern 杂交检验, 杂交条带清晰, 说明 RNA 质量达到了后续杂交实验的要求。另外, 改良 CTAB 法在提取 RNA 的同时还可以得到较好质量的 DNA。改良 CTAB 法简单、经济, 适合于榕树总 RNA 的大量提取, 并可实现 RNA, DNA 的同时提取。

**关键词:**总 RNA 提取方法; 4 种榕树; 改良 CTAB 法; Trizol 法; SDS-LiCl 法

**中图分类号:** Q 522 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)06-0636-05

RNA 分离技术是分子生物学的基本技术。基因表达及功能研究, cDNA 文库的构建, 蛋白质的体外翻译等方面的研究都首先需要提取出高质量的 RNA。木本植物细胞壁较厚, 组织中影响 RNA 提取的物质如糖类、酚类、蛋白质等的含量普遍较高, RNase 的活性也比较高, 所以导致木本植物的 RNA 的提取比较困难, 不容易把 RNA 从各种杂质中分离出来, 而且也容易发生降解<sup>[1]</sup>。

RNA 的提取方法很多, 比如 Trizol 法、异硫氰酸胍法、CTAB 法、尿素法、SDS 法、热硼酸盐法等, 这些方法各有优缺点, 不同的方法适用于不同类型的材料, 根据材料自身的物理化学特性而定。CTAB 法、Trizol 法、SDS-LiCl 法是植物 RNA 提取的常用方法。3 种方法各有特点因而各有适用的范围。CTAB 法对于木本植物 RNA 的提取有较好的效果。在前人的研究中, 用 CTAB 法或经过改良的 CTAB 法可以从内含物丰富的植物材料, 如苹果属植物、银杏、草坪草、细毛樟、月季花瓣、茄属植物、烟草、毛茛花、荔枝树皮当中提取到较高质量的 RNA<sup>[2-7]</sup>。SDS-LiCl 法也能从内含物比较丰富的

材料中获得质量较好的 RNA, 比如橡胶树的乳汁<sup>[8]</sup>等。Trizol 法多用于动物组织细胞以及微生物的 RNA 提取, 对于植物材料, 一些内含物质较少的草本植物, 比如草坪草、小麦、豌豆、水稻、以及一些茄属植物的叶片, 用 Trizol 法可以得到较高质量的 RNA<sup>[4,9]</sup>, 对于少数木本植物如构树也可以用 Trizol 法得到较好质量的 RNA<sup>[9]</sup>。

榕属(*Ficus*) 植物是热带植物区系最大的木本种属之一。在热带雨林植物群落中, 占据着乔木层、灌木层、藤本层等层次的一定空间, 它们既是热带雨林的重要组成部分, 也为其他生物提供着生态位, 是热带雨林生态系统的一类关键植物<sup>[10]</sup>。提取出高质量的 RNA 是对榕属植物进行深入的分子生物学研究的基础, 但是目前国内外均未见榕属植物 RNA 提取方法的相关报道。我们基于分子生物学实验的需要, 对榕树 RNA 提取方法进行了探讨, 为榕树的进一步的分子生物学研究打下了基础, 也对木本植物的 RNA 提取方法的选择提供了一点提示。

\* 收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3570316)。

作者简介: 赖 茵(1983-) 女, 四川人, 硕士生, 主要从事植物抗虫方面的研究。

通讯作者: 余迪求, 男, 湖南人, 研究员, 主要从事植物功能基因方面的研究。

## 1 材料方法

**1.1 材料试剂** 以对叶榕(*Ficus hispida*)、聚果榕(*Ficus racemosa*)、高榕(*Ficus altissima*)、苹果榕(*Ficus oligadon*) 4种榕树为材料。选用在西双版纳热带植物园温室的防虫网下统一栽培的这4种榕树的第1片完全展开叶,经8h持续人为损伤或虫咬后用液氮冷冻后于-80℃保存。

研钵用氯仿润洗消毒后与枪头、离心管、移液管等用具一起在高压灭菌锅里灭菌2h以上,烘干,存于冰箱中冷冻备用。实验中所用的提取液、水及各种液态试剂都加1%的DEPC于37℃放置过夜以抑制其中的RNA酶的活性。

### 1.2 RNA提取方法

**1.2.1 Trizol法** 按照Invitrogen公司使用说明进行。

**1.2.2 SDS-LiCl法** 在预冷的研钵中加入材料,加液氮充分研磨后加入10mL提取缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.1mol/L NaCl, 0.02mol/L EDTA pH 8.0, 1% SDS),使提取液充分覆盖材料,加5mL Tris饱和酚和5mL V(氯仿):V(异戊醇)=24:1的混合液,待融化后转入50mL离心管中静置,自然分层后4℃8000r/min离心20min,弃上清,用5mL DEPC-SDS-H<sub>2</sub>O充分溶解后加5mL 4mol/L的LiCl,冰上放置4h以上,4℃8000r/min离心25min,弃上清,加入10mL DEPC-SDS-H<sub>2</sub>O溶解沉淀,加20mL无水乙醇和1mL 5mol/L的NaCl,-20℃沉淀过夜。4℃8000r/min离心20min,弃上清,加75%乙醇5mL,再离心,弃上清,冰上晾干,加适量DEPC-SDS-H<sub>2</sub>O溶解,-20℃保存<sup>[11]</sup>。

**1.2.3 改良CTAB法** 在灭过菌的大离心管中加入10mL CTAB提取缓冲液(2% CTAB, 0.125mol/L 硼酸, 2mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.025mol/L EDTA pH 8.0, 使用前加入2%β-巯基乙醇),置65℃水浴预热。放适量材料在预冷研钵中,加入少量PVP加液氮充分研磨成粉,将粉末转入到预热的离心管中,充分振荡混匀,65℃温浴7~8min,迅速取出离心管置于冰上,待完全冷却后加入5mL Tris饱和酚和5mL V(氯仿):V(异戊醇)=24:1的混合液,混匀后4℃10000r/min离心25min,取上清,加入等体积的4mol/L的LiCl,轻轻颠倒混匀,冰上过夜,4℃

10000r/min离心25min,倒出上清,沉淀加75%的酒精洗过晾干后,加适量的DEPC-SDS-H<sub>2</sub>O溶解得RNA,-20℃保存<sup>[12]</sup>。往上清中加入等体积的异丙醇混匀后置4℃沉淀1h以上,10000r/min离心20min,弃上清,用75%的酒精洗过晾干后加Rnase-H<sub>2</sub>O溶解后得DNA。

**1.3 Northern杂交方法** 参照文献合成一对*rbcl*基因的引物<sup>[13]</sup>,通过PCR在榕树中得到一段DNA片段,经过测序以及blast分析确定其为*rbcl*基因的片段,以此片段为探针,对CTAB法提得的4种榕树RNA做northern杂交。杂交参照Sambrook等1989的方法进行<sup>[15]</sup>。上游引物:5'-ACGTAGCTTATCCTTTAGACC-3';下游引物:5'-TGGCATAGAGACCCAATCTT-3'。

**1.4 RNA纯度和产量的检验** 把所得RNA稀释40倍后用紫外分光光度计测量吸光度,再把测得的吸光度换算成浓度以计算RNA产量。用OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>来表示RNA的纯度。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>的值接近于2说明RNA纯度比较高,当OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>小于2时说明有蛋白质或其它有机物的污染,当OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>大于2时说明RNA有降解。

**1.5 RNA完整性检测** 用甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳来检验RNA的完整性。取大约10μg经EB染色的RNA样品,点样于1.5%的甲醛变性的琼脂糖凝胶上,90V恒压电泳约1h,18S和28S RNA比较清晰明亮且28S的亮度是18S的2倍,则认为RNA的完整性较好,没有降解。

## 2 结果

**2.1 3种提取方法对4种榕树RNA的产量和质量的影响** 通过紫外分光光度计的检测可以看出(见表1),在3种提取方法中:CTAB法的产量相对比较高(170~550μg/g),纯度也相对较好(OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>为2.22~2.39)。SDS-LiCl法的产量明显低于改良CTAB法及Trizol法,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>也偏离2.0较多,说明所得RNA的质量不好。Trizol法得到的RNA虽然用紫外分光光度计测得的产量较高,但是通过电泳检测可以看出在除了对叶榕外,其它3种榕树中检测不到RNA的存在,并且有大量杂质残留点样孔,说明测得的浓度并非RNA的真实浓度,而是其中的杂质干扰吸光值的结果。而对于4种榕树来说,对叶榕的RNA产量最高且纯度最好,而苹果榕和高榕产量相对低

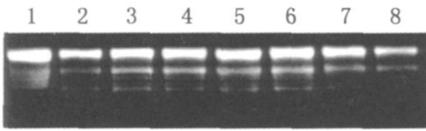
且纯度也不好。

**2.2 3种方法提取的RNA的完整性的比较** 用CTAB法从这4种榕树中都提取出了RNA,电泳条带清晰,28S的亮度大约是18S的2倍,说明RNA质量良好(图1)。SDS-LiCl法从对叶榕、聚果榕、高榕中都提到了RNA,但是电泳条带比较模糊,只能看见28sRNA 1条带,说明已经发生了降解,并且从苹果榕中没能提出RNA来(图2)。Trizol

表 1 不同提取方法对不同样品提得的RNA的产量和纯度的比较

Tab. 1 The yield and quality of different RNA samples by different extraction methods

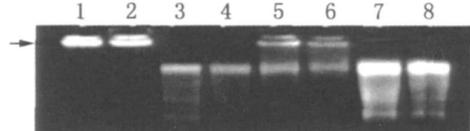
提取方法	对叶榕( <i>Ficus hispida</i> )		聚果榕( <i>F. racemosa</i> )		高榕( <i>F. altissima</i> )		苹果榕( <i>F. digadon</i> )	
	产量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	产量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	产量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	产量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>
改良CTAB法	550	2.22	290	2.28	330	2.33	170	2.39
SDS-LiCl法	440	2.37	270	1.52	150	2.96	110	0.93
Trizol法	720	2.1	280	1.81	240	1.49	290	2.5



1, 2: 苹果榕; 3, 4: 高榕; 5, 6: 聚果榕; 7, 8: 对叶榕

图 1 改良CTAB法提得4种榕树RNA的甲醛变性凝胶电泳

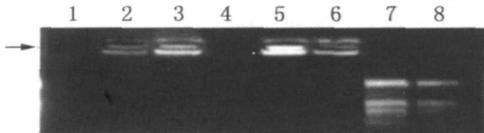
Fig. 1 Gel electrophoresis of RNA isolated by improved CTAB method



1, 2: 苹果榕; 3, 4: 高榕; 5, 6: 聚果榕; 7, 8: 对叶榕. 箭头所指为点样孔位置。

图 2 SDS-LiCl法提得4种榕树RNA的甲醛变性凝胶电泳

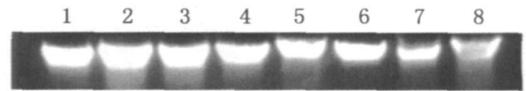
Fig. 2 Gel electrophoresis of RNA isolated by SDS-LiCl method



1, 2: 苹果榕; 3, 4: 高榕; 5, 6: 聚果榕; 7, 8: 对叶榕. 箭头所指为点样孔位置。

图 3 Trizol法提得4种榕树RNA的甲醛变性凝胶电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis of RNA isolated by trizol method



1, 2: 苹果榕; 3, 4: 高榕; 5, 6: 聚果榕; 7, 8: 对叶榕

图 4 CTAB法提得的DNA的琼脂糖凝胶电泳图

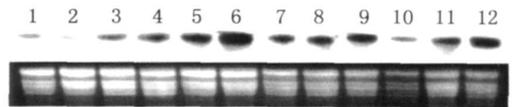
Fig. 4 Gel electrophoresis of DNA isolated by improved CTAB method

## 2.4 CTAB法提得RNA的northern杂交检验

为检验所提RNA的完整性,用一个编码1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基的基因(*rbcL*)的片段作探针,和CTAB法提得的4种榕树的总RNA做northern杂交.得到的杂交条带比较清晰明显(图5),说明提取的RNA的完整性较好,质量达到了northern杂交的要求,可以用于后续的杂交实验。

zol法在对叶榕中提取到了条带清晰、完整性较好的RNA,但是在聚果榕、高榕和苹果榕中都没有能够提取出RNA来,而且多数点样孔很亮,可能是由于含有较多的多糖等杂质(图3)。

**2.3 改变CTAB法提得DNA的电泳检测** 改良CTAB法在提取RNA的同时还得到了4种榕树的DNA,经过0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,所得4种榕树的DNA完整性均较好(图4)。



1~ 3: 苹果榕; 4~ 6: 高榕; 7~ 9: 聚果榕; 10~ 12: 对叶榕

图 5 CTAB法提得的4种榕树的总RNA的rbcL基因northern杂交结果图

Fig. 5 Northern results of *rbcL* gene of different *Ficus* species RNA isolated by improved CTAB method

### 3 讨论

提取 RNA 的方法很多, 基本原理都是把细胞破碎以后, 把 RNA 和糖、蛋白质、DNA 等杂质分离开来。根据材料自身的物理化学性质, 不同的提取方法适合于不同的材料。

Trizol 法比较简单方便, 耗时也比较短, 但是可能由于步骤比较简单, 对杂质的去除不够彻底, 对细胞壁较厚的组织裂解可能不够完全, 所以只适用于内含物相对比较少细胞壁薄一些的植物组织, 比如对叶榕叶片。而高榕、苹果榕等胞壁较厚、内含物较多的材料用 Trizol 法提取的效果不好。另外, Trizol 试剂价格昂贵、成本较高, 所以不适用于这几种榕树总 RNA 的大量提取。

SDS-LiCl 法在对内含物质比较丰富的苹果榕和高榕进行 RNA 提取时容易产生不溶物质和有色物质, 导致产量和质量降低。而且这种方法步骤比较繁琐, 耗时也较长, 1 次提取要 2~4 d 才能完成, 增加了 Rnase 污染的机会, 容易使 RNA 发生降解。所以不太适用于内含物质比较丰富的植物, 但是对内含物较少的植物如拟南芥的提取效果很好。

改良的 CTAB 法步骤比较简单, 耗时相对 SDS-LiCl 法也更短, 成本也相对较低, 对于本实验用到的 4 种榕树均有较好的提取效果, 并且对于内含物较丰富的苏铁、银杏等植物的提取效果也很好<sup>[14]</sup>。提取步骤的简化可以减少 Rnase 污染的机会, 减少 RNA 的降解。并且在提取 RNA 的同时可以得到较好质量的 DNA, 提高了效率。

对叶榕、聚果榕、高榕、苹果榕同属榕属却处于不同的演替阶段, 具有不同的生长特性, 叶片的物理化学性质也有所不同, 所以 RNA 提取的难易程度也有所不同。对叶榕属先锋性树种<sup>[15]</sup>, 光合速率较高, 生长速度也较快<sup>[16]</sup>, 叶片里积累的糖、酚等次生物质相对较少, 所以 RNA 的提取相对容易, Trizol, SDS-LiCl 法, 改良 CTAB 法都可以提得较好质量的 RNA。高榕属于顶级树种, 生长比较缓慢, 叶片中积累的次生代谢物质相对较多, 造成 RNA 的提取相对困难, Trizol 法不能提得。苹果榕属于演替中间类型, 叶片内含物也相对较多, RNA 的提取也较困难, 在本实验中 Trizol, SDS-LiCl 法都不能从中提取到 RNA。在本实验中, 只有改良 CTAB 法在 4 种榕树中都提到了较好质量的

RNA。说明不同的植物生长特性决定了植物材料的理化性质, 由此决定了其适用的提取方法。即使是同科同属的植物, 因为生长特性不同其适用的方法也有所不同, 所以在进行 RNA 提取的时候要根据材料的特点选用适宜的方法。

### 参考文献:

- [1] 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 1-4.
- [2] 曹秋芬, 孟玉平, 孙毅. 苹果属植物总 RNA 有效、快速提取方法[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(4): 428-429.
- [3] 杨谷良, 刘世旺, 詹火元, 等. 不同方法提取银杏叶片总 RNA 及 RT-PCR[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(12): 3482-3496.
- [4] 望飞勇, 何勇, 许海波, 等. 草坪植物 RNA 提取方法的比较研究[J]. 长江大学学报: 农学卷, 2007, 4(1): 56-60.
- [5] YING Zeng, TAO Yang. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20: 417-417.
- [6] 谢吉容, 程再全, 黄兴奇, 等. 月季花瓣的 RNA 提取方法[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(4): 480-484.
- [7] WANG Xue-chu, TIAN Wei-min, LI Yin-xin. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues[J]. Mol Biotechnol, 2008, 8: 57-64.
- [8] TANG Chao-rong, QI Ji-yan, LI He-ping, et al. A convenient and efficient protocol for isolating high-quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007, 70: 749-754.
- [9] 袁明珠, 温柔, 刘吉升, 等. 几种植物材料中总 RNA 的提取[J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 285-292.
- [10] 许再富, 朱华, 杨大荣, 等. 滇南热带雨林榕树类群多样性及生态学意义[C]. 热带植物研究论文报告集(第4集), 昆明: 云南人民出版社, 1996.
- [11] Jrgen Logemann, Jeff Schell, Lothar Willmitzer. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 163(1): 16-20.
- [12] 李璐, 付乾堂, 余迪求. 一种从苏铁叶片中有效提取 RNA 的方法[J]. 云南植物研究, 2008, 5.
- [13] 秦民坚, 黄芸, 杨光, 等. 射干及类似药用植物叶绿体

- rbcl 基因序列分析[J]. 药学学报, 2003, 38(2): 147-152.
- [14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] QISHI SONG, DARONG YANG, GUANGMING ZHANG. Volatiles from *Ficus hispida* and their attractiveness to fig wasps[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27(10): 1929-1942.
- [16] 李庆康, 马克平. 植物群落演替过程中植物生理生态学特性及其主要环境因子的变化[J]. 植物生态学报, 2002, 26(增刊): 9-19.

## Comparison of different total RNA isolation methods for four *Ficus* species

LAI Han<sup>1,2</sup>, YU Di-qiu<sup>1</sup>

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Using Trizol, SDS-LiCl and improved CTAB methods, total RNA were isolated from four *Ficus* species that they are *F. hispida*, *F. racemosa*, *F. altissima* and *F. oligadon*. Via OD value and Gel electrophoresis test, the results showed that Trizol method is applicable for total RNA isolation only for *F. hispida* in the four species, while the SDS-LiCl method failed to extract total RNA from *F. oligadon* and the yield and the quality for the other three species were low, the improved CTAB method can isolate high quality total RNA from all the four species, and further Northern blot analysis testified the integrity of RNA isolated by the improved CTAB method. It was also found that the improved CTAB method could get high quality total DNA during RNA isolation. In all, the improved CTAB method is simple, economical and suitable for isolating total RNA from the *Ficus* species.

**Key words:** total RNA isolation method; four species of *Ficus*; improved CTAB method; Trizol method; SDS-LiCl method

\*\*\*\*\*

(上接第 624 页)

**Abstract:** Utilizing bagasse as substrate the culture conditions for *therma reesei* QM9414 was studied through single factor experiments and orthogonal test. The results showed that the optimal culture conditions were as follows: medium prepared from 1g bagasse, 2.5 g wheat bran and 14mL Mandels nutritional liquid containing 7.5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, adjustment of initial pH to 4.0, at 30 °C for 120h. Under these optimal fermentation conditions, cellulase activity reached 8.26 U/g dry medium.

**Key words:** bagasse; *Trichoderma reesei* QM9414; orthogonal test; solid-state fermentation; optimization of culture condition