

成熟油菜次生休眠种子 RNA 的快速高效提取方法

赵祥祥^{1,2}, 刘福霞¹, 唐 璿¹, 赵祥强³, 王兴龙³, 卢长明²

1. 淮阴师范学院 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300;
2. 中国农业科学院 油料作物研究所/基因工程与转基因安全研究室, 湖北 武汉 430062;
3. 南通大学 生命科学学院, 江苏 南通 226019)

摘 要: 针对成熟油菜次生休眠种子富含多糖和多酚、老健组织部分富含 RNA 酶、生理活性低等特点, 通过选用 RNA plant plus reagent 植物总 RNA 提取试剂, 添加 β -巯基乙醇抑制 RNA 酶活性、防止酚类物质氧化, 应用醋酸钠去除多糖类物质对 RNA 的影响, 以及缩短抽提时间等措施, 建立成熟油菜次生休眠种子 RNA 的快速高效提取方法。结果表明: 采用本方法提取的 RNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.92~2.05, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰而完整, 且无明显降解, 可以应用于后续的 mRNA 分离、建库和高通量转录组测序。

关键词: 油菜; 种子; 次生休眠; RNA 提取

中图分类号: S 634.3

文献标志码: A

文章编号: 1671-4652(2013)01-0064-04

A fast and efficient method for extraction of RNA from secondary dormant seeds of mature rapeseed

ZHAO Xiangxiang^{1,2}, LIU Fuxia¹, TANG Tang¹, ZHAO Xiangqiang³,
WANG Xinglong³, LU Changming²

1. Key Lab for Eco-Agric Biotech around Hongze Lake of Jiangsu Prov, Huaiyin Nor Coll, Huaian 223300, China;
2. Gen Engin and GMO Biosafety Lab of Oil Crops Res Inst, Chinese Acad of Agric Sci, Wuhan 430062, China;
3. Coll of Life Sci, Nantong Univ, Nantong 226019, China)

ABSTRACT: Isolation of high quality RNA is an essential prerequisite for gene expression analysis on rape seed development mechanism. The secondary dormant seeds of mature rapeseed were rich in polysaccharids and polyphenols, while the old tissues had high Rnase activity and low physiological activity. According to these characteristics, we developed a rapid and simple method for the isolation of total RNA through choosing RNA plant plus reagent DP437 (TIANGEN) and taking some measures such as adding β -mercaptoethanol, NaAc and reducing the extraction times to inhibit RNA enzyme activity, preventing oxidation of phenolic compounds and removing the effects of polysaccharide substance respectively. Two clear bands of 28S rRNA and 18S rRNA isolated from rapeseeds could be detected by agarose gel electrophoresis. RNA extracted by this method was intact without degradation. The $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ absorbance ratio was 1.92-2.05. These results showed that the RNA obtained from rapeseed with this method had high quality and were suitable for the subsequent molecular studies, including mRNA separation, standard mRNA library constructing and high-throughput RNA-seq etc. At the same time this method would provide technical guarantee for exploring the molecular mechanism of secondary dormancy in rapeseed, and also could be used for isolation of total RNA from mature dormant seeds rich in polysaccharides and polyphenols of other plants.

KEY WORDS: rapeseed; seed; secondary dormancy; RNA isolation

由于植物 RNA 具有很强的组织特异性, 针对不同植物甚至同一植物不同组织采取的提取方法不

收稿日期: 2012-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30900217); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2011410); 江苏省“333 高层次人才培养工程”培养对象和江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象资助项目。

作者简介: 赵祥祥(1974—), 男, 江苏沐阳人, 淮阴师范学院副教授、博士, 主要从事植物遗传改良与转基因安全研究。

E-mail: zhaoxiangxiang2002@yahoo.com.cn

尽相同^[1-2]。油菜种子属脂肪质种子,含有丰富的脂质、蛋白质、多糖、多酚和维生素等物质, RNA 提取较为困难。常规的 Trizol Reagent Kit^[3]、异硫氰酸胍一步法^[4]等已报道的植物组织 RNA 提取方法均不适用于油菜种子。目前已有不完全成熟或新鲜油菜种子 RNA 提取成功的先例^[5-7],但对于成熟油菜次生休眠种子总 RNA 的提取方法还缺乏研究与报道。

油菜种子具有显著的次生休眠特性^[8],明确油菜种子次生休眠的分子机制,可以为人工调控种子休眠提供理论依据,而高质量地提取油菜次生休眠种子的 RNA 则是研究种子休眠机制的必要基础。鉴此,本研究通过多次试验,摸索出一种从成熟油菜次生休眠种子中快速提取高质量 RNA 的方法,并成功应用于后续的 mRNA 分离、建库和高通量转录组测序。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为次生休眠特性较强的甘蓝型(*Brassica napus* L.)常规油菜品种苏油 211, 2009 年秋种于淮阴师范学院生物科技园试验田,油菜花期套袋自交,成熟后收获、脱粒,25 °C 条件下保存油菜种子。

RNA plant plus reagent 植物总 RNA 提取试剂购自北京天根生化科技公司(目录号为 DP437); DEPC 水(合肥新恩源生物科技公司代理的 Biosharp 品牌); TAE 缓冲液、RNase-free ddH₂O、苯酚-氯仿-异戊醇混合液(体积比为 25 : 24 : 1)、β-巯基乙醇、醋酸钠均为上海捷瑞生物公司产品; RNA 酶固相清除剂为北京天恩泽基因科技公司产品。其余生化试剂为国产分析纯。

1.2 油菜种子次生休眠诱导

参考 Gruber 等^[9]方法,用渗透势为 -1.5 MPa 的 PEG6000 溶液模拟干旱条件处理种子,诱导次生休眠。方法如下:分别取 100 粒种子放入 6 个培养皿中,注入 PEG6000 溶液浸泡处理 14 d;完成后将种子换入装有去离子水的培养皿中 8~9 d,非休眠种子将发芽;在绿色安全光下剔除发芽种子,将其中 4 个培养皿中的未发芽种子换入装有去离子水的培养皿中,置于交替的光照和温度条件下处理 3 d 以上,如果能够发芽,则属于次生休眠种子;将其余 2 个培养皿中未发芽种子用液氮固定后置于 -80 °C 冰箱保存备用。上述试验以不经次生休眠处理(用水代替 PEG6000)的发芽结果为对照,重复 6 次。

1.3 试验用品处理

离心管、枪头等聚乙烯塑胶制品用 0.1% DEPC 水浸泡 24 h 后高压灭菌备用。研钵、研杵和药匙用锡箔纸包裹,180 °C 烘烤 8 h 以上。电泳槽、制胶板、梳子等分别用 10%和 0.1%的 RNA 酶固相清除剂先后处理 5 min,然后经高压灭菌的 0.1% DEPC 水冲洗 2 次后用于制胶。

1.4 油菜次生休眠种子总 RNA 提取步骤

- 1) 取 0.1 g 成熟油菜次生休眠种子放入加有液氮的研钵中,迅速研磨成粉末;
- 2) 将粉末加入含有 800 μL RNAplant plus Reagent 植物总 RNA 提取试剂(使用前按照 1 : 4 的体积比将 β-巯基乙醇与 RNAplant plus reagent 混合)的离心管,涡旋振荡至彻底混匀;
- 3) 室温下平放离心管静置 5 min,再加入 500 μL 预冷的苯酚-氯仿-异戊醇混合液(体积比为 25 : 24 : 1)混匀,4 °C 下 13 000 r · min⁻¹离心 5 min,取上清液;
- 4) 将上清液转移至一新离心管中,加 70 μL 的 3 mol · L⁻¹醋酸钠和 1 400 μL 的无水乙醇,倒转 2~3 次混匀后冰上放置 3~5 min;
- 5) 4 °C 下 13 000 r · min⁻¹离心 4 min,弃上清,75%乙醇洗沉淀 2 次,室温下干燥,用 RNase-free ddH₂O 溶解沉淀即得,放置 -80 °C 冰箱备用。
- 6) 通过紫外分光光度计测定总 RNA 的含量与纯度,并进行 10 mg · L⁻¹的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外成像系统下观察总 RNA 的完整性。

1.5 标准 mRNA 文库构建

从提取的总 RNA 中分离、纯化 mRNA 后,委托上海生物信息技术研究中心进行标准 mRNA 文库构建,并用美国安捷伦 2100 自动生物分析系统(Aglient Technologies 2100 Bioanalyzer)检测文库质量,

质检合格后 -80°C 冰箱保存,以备后续的高通量转录组测序。

2 结果与分析

2.1 成熟油菜次生休眠种子的诱导

成熟油菜种子加水处理后(对照)的发芽率均在 99% 以上(图 1. a),说明所选用的油菜种子具有正常活力;而油菜种子经 PEG 诱导后加水处理,发芽率仅为 36%~47%(图 1. b);经交替光照和温度破眠处理后,其中 1~4 号培养皿中未发芽的种子几乎全部发芽(图 1. c),说明使用 PEG 溶液模拟干旱条件,可以诱导油菜种子次生休眠。

根据上述结果,本试验认定 5、6 号培养皿中未发芽种子即为次生休眠种子,将该部分种子用液氮固定,用于下面的 RNA 提取研究。

2.2 总 RNA 质量分析

利用本方法从 0.1 g 油菜次生休眠种子中提取到总 RNA 35~45 μg ,得率为 0.35~0.45 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RNA/样品)。紫外分光光度计测定结果表明,各样品的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 为 1.92~2.05。琼脂糖凝胶电泳显示,28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 条带清晰而完整,其中 28S rRNA 和 18S rRNA 2 条带亮而浓,28S rRNA 亮度约为 18S rRNA 的 2 倍,且无明显弥散(图 2)。

上述结果说明,采用本方法从成熟油菜次生休眠种子中提取的总 RNA 质量和纯度较高,完整性好,且未发生明显降解,可以满足进一步的分子生物学研究需要。

2.3 标准 mRNA 文库质检结果

从次生休眠种子总 RNA 中分离纯化所得的 mRNA,经超声波随机打断后构建用于 Solexa 测序平台的标准 mRNA 文库。对该文库的 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测结果表明(图 3),文库样品的主要峰值为 260~330 bp,说明文库构建质量合格,能满足高通量转录组测序等分子生物学实验要求。

3 小结与讨论

在油菜产区,由于收获季节种子大量落粒导致地下种子库持续存在,地下种子一旦条件适宜便发芽长大,成为杂草和污染源。次生休眠特性是导致油菜地下种子库长期存在和自生苗繁衍的根本原因,也是造成转基因油菜种子基因扩散的重要原因^[8]。掌握油菜次生休眠特性发生的规律与机制,对于调控油菜种子休眠,治理自生苗危害,以及减少或杜绝种子造成的基因扩散均具有重要的理论和实际意义。而如何从成熟的油菜次生休眠种子中快速高效地提取 RNA,则是开展油菜休眠机制研究的必要前提。

成功提取高质量的 RNA 关键在于抑制内源 RNA 酶活性、防止 RNA 降解^[10],特别是在成熟油菜次生休眠种子 RNA 提取过程中。由于成熟的油菜种子老健组织部分富含 RNA 酶,加之种子进入休眠状态后,生理活性又大大降低,从而使得油菜休眠种子 RNA 的分离效果和完整性难以得到保障。而采用已有的油菜种子 RNA 提取方法,则存在着试剂消耗量大、提取时间长等缺点,尤其是提取时间过长

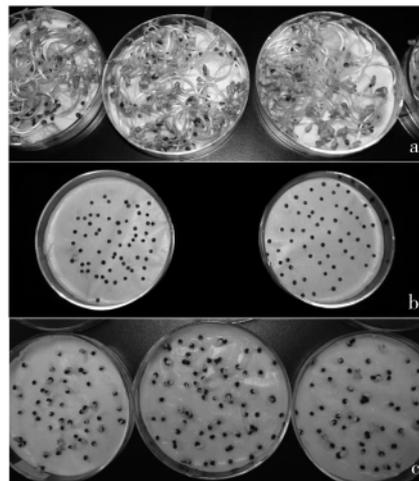


图 1 PEG 化学诱导法筛选油菜次生休眠种子

Fig. 1 Secondary dormant seeds of mature rapeseed induced by PEG

a. 成熟油菜种子加水处理后发芽(对照);
b. 成熟油菜种子经 PEG 诱导 14 d 后换入装有去离子水的培养皿中 8~9 d,非休眠种子发芽,大部分种子则未发芽;
c. 剩余的未发芽种子经交替的光照和温度破眠处理后发芽。

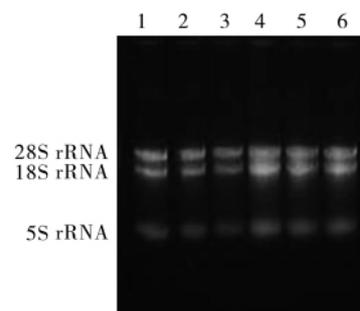


图 2 成熟油菜次生休眠种子 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel analysis of total RNA from secondary dormant seeds of mature rapeseed

1~6. 成熟油菜的次生休眠种子

直接增加了 RNA 受污染而降解的可能性,并最终导致提取失败。因此,通过缩短提取时间,以抑制内源 RNA 酶活性、减少与防止 RNA 降解是成熟油菜次生休眠种子 RNA 提取的最为关键技术。

本方法选用北京天根生化科技公司 RNAplant plus reagent 植物总 RNA 提取试剂,并通过加入 β -巯基乙醇抑制 RNA 酶活性和防止酚类物质氧化,应用高浓度醋酸酸钠去除多糖类物质对 RNA 的影响,并且尽量缩短抽提时间,使得完成油菜次生休眠种子 RNA 提取仅需 30 min,从而有效地减少了 RNA 在提取过程中的损失与降解。按照本方法制备的 RNA 质量好、纯度高,且具有试剂用量少、经济节约等优点,可以应用于后续的高通量转录组测序等分子生物学研究。

参考文献:

- [1] Asif M H, Dhawan P, Pravendra N. A Simple Procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18(2): 109-115.
- [2] 谢传胜, 宋国琦, 王兴军, 等. 拟南芥和烟草幼嫩种子 RNA 不同提取方法的比较 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(23): 78-81.
- [3] 于冰, 李海英, 张绍军, 等. 用 TRIzol 试剂一步法提取甜菜花蕾中的总 RNA [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2004, 21(1): 138-140.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159.
- [5] 许本波, 谢伶俐, 严寒, 等. 甘蓝型油菜籽粒 RNA 提取方法的探讨 [J]. *黑龙江农业科学*, 2007(5): 18-20.
- [6] 丁勇, 刘英, 杨鸯鸯, 等. 油菜种子高质量总 RNA 提取的一种有效方法 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(5): 465-468.
- [7] 严明理, 刘忠松, 官春云, 等. 一种提取高质量油菜种子和种皮 RNA 的方法 [J]. *生物科技通报*, 2007(6): 97-100.
- [8] Adler L S, Winkler K, Wyndham F S, et al. Potential for persistence of genes escaped from canola: germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica rapa* [J]. *Functional Ecology*, 1993, 7(6): 736-745.
- [9] Gruber S, Claupein W. Secondary dormancy of oilseed rape: first aspects of heredity [C]// *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*. Brisbane, Australia: [s. n.], 2004.
- [10] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

(责任编辑 王子斌)

(上接第 59 面)

- [8] Chalinda K B, Ganeged D k, 夏宜平, 等. 外源水杨酸对盐胁迫下非洲菊抗氧化酶活性和生理特性的影响 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2010, 36(6): 591-601.
- [9] 何亚丽, 刘友良, 陈权, 等. 水杨酸和热锻炼诱导的高羊茅幼苗的耐热性与抗氧化的关系 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(2): 89-95.
- [10] 王利军, 黄卫东, 战吉成. 水杨酸和高温锻炼与葡萄抗热性及抗氧化的关系 [J]. *园艺学报*, 2003, 30(4): 452-454.
- [11] 李永红, 魏玉香, 谷茂. 水杨酸预处理对鸡冠花幼苗热胁迫的生理效应 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(11): 2257-2262.
- [12] 吕俊, 张蕊, 宗学风, 等. 水杨酸对高温胁迫下水稻幼苗抗热性的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 2009, 17(6): 1168-1171.
- [13] 郑飞. 灌浆期高温胁迫对冬小麦的影响机理及其调控研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 1999.
- [14] 张志良. *植物生理实验指导* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 88-91.
- [15] 张国良, 戴其根, 张洪程, 等. 硅肥和接种纹枯病菌对水稻膜脂过氧化和防御酶活性的影响 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2006, 27(1): 49-53.

(责任编辑 王子斌)

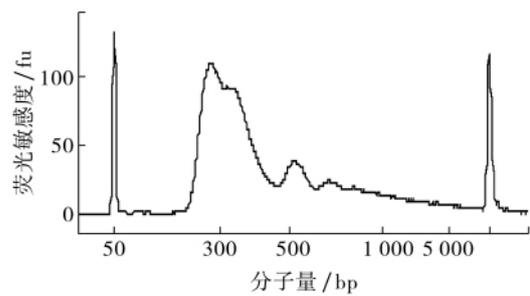


图 3 标准 mRNA 文库质检图
Fig. 3 Quality test of standard mRNA library