

一种适于提取荔枝花与幼果组织总 RNA 的方法

禰维言^{1,2}, 郑学勤^{1*}

(1. 中国热带农业科学院 热带作物生物技术研究所, 海口 571107; 2. 广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘要: 介绍了一种从荔枝花与幼果组织中提取高质量和较高产量的总 RNA 的方法, 该方法提取的总 RNA 可以满足构建 cDNA 文库、开展 RT-PCR、Northern 杂交分析、基因表达差异分析等方面研究的要求。

关键词: RNA 提取; CTAB; 荔枝

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)01-0059-03

A practical method for extracting total RNA from flower and fruit of Litchi

XUAN Wei-Yan^{1,2}, ZHENG Xue-Qin^{1*}

(1. Institute of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: A practical method for extracting high-quality and productive total RNA from flower and fruit of seedless litchi was introduced. These RNA samples thus prepared meet the needs of many molecular biological researches such as constructing cDNA library, RT-PCR, Northern blot and studies on difference analysis of gene expression.

Key words: RNA isolation; CTAB; litchi

从植物组织中提取高质量的总 RNA 是构建 cDNA 文库、开展 RT-PCR、Northern 杂交分析、基因表达差异分析等方面研究的必要前提。已有不少报道用不同的方法从不同植物组织中成功提取 RNA 的研究(冯斗等, 2004; 王玉成等, 2006; 刘洋等, 2006; 蔡文伟等, 2006; Liu 等, 2006; 张容等, 2006), 但由于不同植物组织其组成成分差异较大, 有些植物组织多酚类物质含量比较多, 如荔枝、橡胶等, 多酚类物质在 RNA 的提取过程中容易被氧化而产生褐变, 难以取得高质量的 RNA, 张以顺等(2004)报道用改良的 Tris-硼酸法和 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 能从荔枝胚中成功提取总 RNA。一些提取方法和试剂盒虽能提取到较好的 RNA, 但一次性处理的组织材料较少, 难以获得足量的总 RNA 来满足一些需要量较大的实

验, 如 SSH。而本文采用 CTAB、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇与 N-十二烷基肌氨酸钠联合使用提取法进行, 结果表明该方法能从较多的荔枝花与幼果组织中提取较大量的、质量较高的总 RNA。

1 材料和试剂

1.1 材料

荔枝花与幼果取自海南陆桥无核荔枝农场, 为 5~7 年生正常挂果果树, 品种为海南无核荔枝, 于盛花期和结果初期分别取即将开放的花蕾和 0.5~0.6 cm 大的幼果置于液氮中带回实验室, 置于 -80 °C 的冰箱中保存备用。DEPC ((diethyl pyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯) 为 Sigma 公司产品, VP、EDTA、KAc、LiCl 和 β -巯基乙醇为 Amresco 公司产

收稿日期: 2007-05-25 修回日期: 2008-05-20

基金项目: 国家“863”计划项目(AA001380)[Supported by National High Technology Research and Development Program of China (AA001380)]

作者简介: 禰维言(1963-), 女, 广西玉林人, 副教授, 博士, 主要从事作物逆境生理及植物基因工程研究, (E-mail) xuanweiyan_1@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zhengxxxqin@126.com)

品, Taq 酶和反转录酶(AMV-XL)为大连宝生物公司产品,其余试剂为国产分析纯。

1.2 试剂与器皿的处理

CTAB 抽提液(pH8.0)内含 2% CTAB、100 mmol/L Tris. Cl, pH8.0、20 mmol/L EDTA, pH8.0、1.4 mol/L NaCl,用 DEPC 水配制,用浓盐酸调 pH8.0,置于棕色瓶中室温下保存,CBS 缓冲液内含 42 mmol/L 柠檬酸钠和 0.83%(W/V)十二烷基肌氨酸钠,4 mol/L 异硫氰酸胍变性液,用 CBS 缓冲液做溶剂配制。其余试剂有 8 mol/L LiCl、3 mol/L NaAc(pH5.2)、2 mol/L NaAc(pH4.0)、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)、75%乙醇。CBS 缓冲液、8 mol/L LiCl、3 mol/L NaAc(pH5.2)、2 mol/L NaAc(pH4.0)等使用前均用 0.1%(体积分数)的 DEPC 37 °C 处理 12 h 以灭活 RNase,然后高压灭菌。研钵、玻璃器皿在使用之前 180 °C 烘 8 h 以上,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 以灭活 RNase,然后高压灭菌,80 °C 烘干备用。

2 方法

2.1 荔枝花蕾与幼果总 RNA 的提取步骤

(1)分别取 15 mL CTAB 提取缓冲液加入两个 RNase-free 的无菌 50 mL 离心管中,再分别加入 1 mL-巯基乙醇(临用前加入),65 °C 下预热。(2)分别称取花蕾和幼果 3~5 g,液氮中碾磨成细粉末,等份转入上述 50 mL 预热的离心管中,迅速涡旋散开,65 °C 水浴裂解 30~40 min。(3)每管加入 15 mL 氯仿:异戊醇(24:1),涡旋混匀,冰浴 10 min,4 °C,12 000 rpm 离心 10 min。(4)取上清,加入 1/3 体积 8 mol/L LiCl 和 1 mL-巯基乙醇,-20 °C 下沉淀过夜。(5)4 °C,12 000 rpm 离心 40 min。(6)沉淀用 4 mL 异硫氰酸胍变性液溶解,加入 120 μL-巯基乙醇和 880 μL 2 mol/L NaAc(pH4.0),混匀后加入 5 mL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),涡旋混匀,冰浴 10 min。(7)4 °C,12 000 rpm 离心 15 min。(8)取上清,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),涡旋混匀,冰浴 10 min。(9)4 °C,12 000 rpm 离心 15 min。(10)取上清,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),涡旋混匀,4 °C,12 000 rpm 离心 10 min。(11)上清,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),涡旋混匀,4 °C,12 000 rpm 离心 10 min。(12)

取上清,加入 1/3 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,-20 °C 下放置 2 h。(13)4 °C,12 000 rpm 离心 30 min,沉淀用预冷的 75%乙醇漂洗 3 次,每次漂洗 5 min。(14)超净工作台,冰上空气干燥 RNA 沉淀 10 min。(15)加入 300 μL DEPC 水溶解沉淀。取 1 μL 进行 RNA 电泳,检测 rRNA 的完整性,取 3~5 μL 稀释后用紫外分光光度计测 230、260、280 nm 处的 ABS 值。其余样品加入 3 倍体积的无水乙醇于-80 °C 下保存备用。

2.2 RT-PCR

用所提取的荔枝花总 RNA,根据多种植物的 MADS-box 及其 C-端保守的氨基酸序列设计一对简并性引物 P1 5'-ATGGGNMGNGGNAARAT-MGAYAT, P2 5'-RTTNGGMTGYATYGGNTG-MAC,进行 RT-PCR 反应,PCR 反应体系为 25 μL,反应条件为:94 °C,3 min;94 °C,30 s;55 °C 35 s;72 °C,1 min 10 s;35 cycles。回收目的片段,并对目的片段进行克隆、测序及序列分析,然后采用 3'-RACE 法扩增目的基因的 3'末端。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 纯度、产量和完整性检测

利用 CTAB 等多种试剂联合从荔枝花与幼果组织中能成功的提取总 RNA,用紫外分光光度法检测 260、280 nm 与 230 nm 处的 ABS 值,结果为 A_{260}/A_{280} 比值在 1.75~2.0 之间; A_{260}/A_{230} 比值均在 2.0 以上(表 1)。

表 1 样品总 RNA 紫外分光光度计检测结果

Table 1 Ultraviolet spectrophotometer analysis of total RNA isolated from flower and fruit of seedless litchi

样品 Sample	ABS 比值 Ratio of ABS			
	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	产率/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$
花 Flower	1.98	2.14	8.4	96.77
幼果 Fruit	1.94	2.29	5.88	82.35

从图 1 中可知,28S rRNA、18S rRNA 分带明显清晰,而且 28S rRNA 的量是 18S rRNA 的 1.5~2 倍,说明所提的 RNA 样品基本没有发生降解。由纯度和完整性检测的结果表明,所提取的总 RNA 样品的纯度与质量符合实验要求,可作为后续实验应用。

3.2 RT-PCR 与 3'-RACE 的结果

RT-PCR 的结果如(图 2),能扩增出多个条带,回收约 600 bp 的目标条带,命名为 LA5,建立克隆,

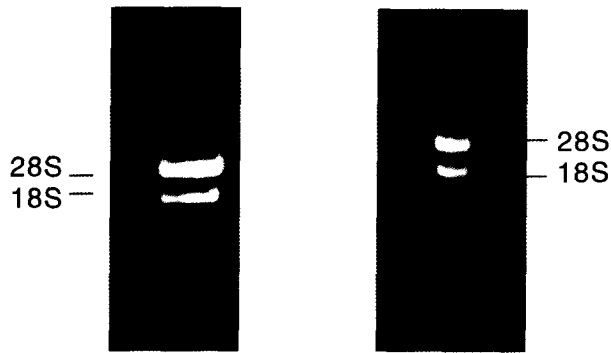


图 1 荔枝花总 RNA, 幼果总 RNA
Fig. 1 Total RNA of litchi flower and fruit

经测序后得到 639 bp 的目标序列。

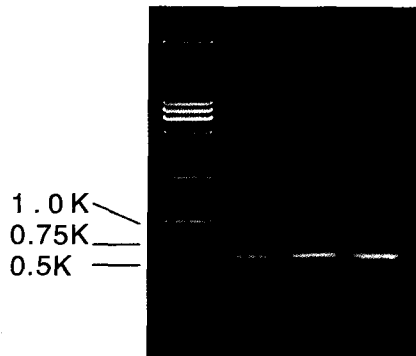


图 2 无核荔枝 MADS-box 基因的 RT-PCR
Fig. 2 RT-PCR of litchi MADS-box gene
1. DNA Ladder Marker; 2. RT-PCR 产物。

根据 RT-PCR 扩增的目标序列设计基因特异引物, 采用 3'-RACE 法扩增其 3' 末端, 得到约 400 bp 的条带(图 3), 测序后得到了目的基因的 3' 末端序列, 经拼接后得到了长 867 bp 的具有完整的开放阅读框和 3'-UTR 的 MADS-box 基因, 该基因编码含 218 个氨基酸残基的蛋白质, 经 Northern blot 检测结果表明, 该基因在开花结实期只在雌花与雄花中表达, 而在叶片与幼果中不表达。

上述结果表明, 获得的 RNA 可以应用于 RT-PCR 等以 RNA 为基础的分析研究, 而且能达到预期的目的。

4 本方法的特点

荔枝为含多酚类物质较多的植物, 本方法采用了强还原剂 β -巯基乙醇来防止多酚类物质氧化, 而且可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活, 从而阻止酚类物质被氧化, 有效地防止其与 RNA 结合。

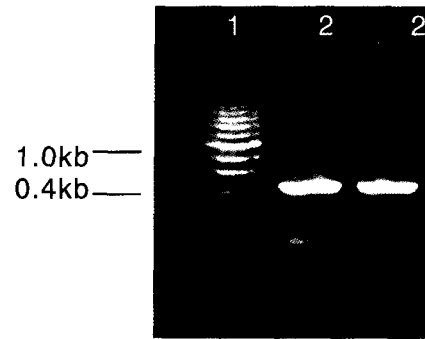


图 3 DNA Ladder Marker
Fig. 3 Product of 3'-RACE
1. DNA Ladder Marker; 2. RACE 产物。

而异硫氰酸胍既可破坏细胞结构使核酸从核蛋白中解离出来, 对 RNA 酶也有强烈的变性作用而使其失活, 同时利用了高浓度的 N-十二烷基肌氨酸钠对 Rnase 变性作用来抑制 Rnase。实验结果表明, 联合使用 CTAB、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇与 N-十二烷基肌氨酸钠等提取荔枝花与幼果组织总 RNA 的方法, 不但可以获得较高质量的 RNA, 而且产量也比较高。

参考文献:

- Cai WW(蔡文伟), Yang BP(杨本鹏), Zhang SZ(张树珍), et al. 2006. Experimental study on the technique in extracting the total RNA from *Dracaena Vand, ex L*(龙血树总 RNA 提取方法的研究)[J]. *China Trop Med*(中国热带医学), 6(2):242-243
- Feng D(冯斗), Zhang CF(张春发), Zhang Y(张颖). 2004. A suitable method for isolating total RNA from banana pulp(一种适用于提取香蕉果肉 RNA 的方法)[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*(广西农业生物科学), 23(3):249-251
- Liu Y(刘洋), He XR(何心尧), Ma HB(马红波), et al. 2006. Extraction of total RNA from cotton(*Gossypium hirsutum*) tissues with CTAB-PVP method(用 CTAB-PVP 法提取棉花各组织总 RNA 的研究)[J]. *J China Agric Univ*(中国农业大学学报), 11(1):53-56
- Liu YZ, Liu Q, Tao NG, et al. 2006. Efficient isolation of RNA from fruit peel and pulp of ripening Navel Orange (*Citrus sinensis*)[J]. *J Huazhong Agric Univ*, 25(3):300-304
- Wang YC(王玉成), Zhang GD(张国栋), Jiang J(姜静). 2006. A widely applied total RNA extraction method(一种适用范围广的总 RNA 提取方法)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 26(1):84-87
- Zhang R(张容), Zheng YF(郑彦峰), Wu Y(吴瑶), et al. 2006. A simple and efficient method for preparation of plant RNAs(一种简单有效的植物 RNA 提取方法)[J]. *Hereditas*(遗传), 28(5):583-586
- Zhang YS(张以顺), Xiang X(向旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004. A method for extraction of total RNA from litchi embryo(一种提取荔枝胚中总 RNA 的方法)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 40(2):226-228