

# 树莓果实总 RNA 提取方法的比较研究

刘 丹<sup>1</sup>, 高庆玉<sup>1</sup>, 张丙秀<sup>1</sup>, 焦奎宝<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 浆果所, 黑龙江 绥化 152204)

**摘 要:** 比较了 SDS 法和 Trizol 法提取树莓果实总 RNA 的效果。结果表明: Trizol 法提取的 RNA 经电泳检测, 未见条带, 说明 Trizol 法并不适合富含多糖多酚的树莓。SDS 方法提取树莓果实总 RNA 完整性好, 28S 和 18S 条带清晰,  $OD_{260}/OD_{280}$  值为 1.83, 在 1.7~2.0 之间,  $OD_{260}/OD_{230}$  值为 2.01。结果证明, SDS 法提取的总 RNA 可直接用于分子克隆等分子生物学实验。

**关键词:** 树莓; 总 RNA; SDS 法; Trizol 法

**中图分类号:** S 663.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0136-03

树莓(*Rubus* spp. Raspberry)为聚合果, 果实柔软多汁, 色泽鲜艳, 味酸甜而富芳香, 其 VE 和 SOD 的含量为水果之最, 属高钾低钠果品<sup>[1]</sup>, 有止渴、除痰、发汗、活血等功效。树莓不仅适于鲜食和加工而且是重要的功能及保健水果, 在食用及药用等方面极具发展前途。随着生物技术的进步和发展, 人们对植物的许多生理特性进

行到了分子水平的研究, 进行 Northern 杂交分析、cDNA 文库构建等分子生物学研究均需要高质量的 RNA<sup>[2]</sup>, 而由于材料本身的内源 RNA 酶和外源 RNA 酶的影响, RNA 的提取条件比 DNA 要苛刻得多。关于树莓果实组织 RNA 提取的研究未见报道。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂, 内含异硫氰酸胍等物质, 能迅速破碎细胞, 抑制细胞释放出的核酸酶<sup>[3]</sup>, 具有步骤简单、配制试剂少等优点<sup>[4]</sup>, 是近年应用较多的植物 RNA 提取方法。SDS 法也是提取果实 RNA 常用的方法之一, 在果树组织 RNA 提取中应用较多。现采用 SDS 及 Trizol 法对树莓果实 RNA 的提取进行研究, 旨在选择一种提取高质量 RNA 的方法, 为后续分子试验奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**第一作者简介:** 刘丹(1984-), 女, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。

**通讯作者:** 高庆玉(1960-), 男, 博士, 教授, 现主要从事逆境生理及果树栽培教学与科研工作。E-mail: gaoqingyu@tom.com。

**基金项目:** 国家公益性行业农业科研专项基金资助项目(ny-hyzx07-028)。

**收稿日期:** 2010-10-22

## Initial Establishment of Rapid Propagation of Wild *Rubus parvifolius* Linn

ZHANG Qi-chun, HAN Xiang, ZHAO Yang, WANG Nan, LI Yun-xiao, ZHANG Guo-hai

(Forestry College of Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003)

**Abstract:** With the branch of wild *Rubus parvifolius* Linn. as test material, through tissue culture technology, plantlet regeneration of wild *Rubus parvifolius* Linn. was studied. The results indicated that the optimal time of drawing material for wild *Rubus parvifolius* Linn. tissue culture was April; during this period, the contamination rate of explant was the lowest; the semi-lignified stem with an axillary bud was the ideal explant for tissue culture; the optimal sterilizing treatment for the stem with an axillary bud was 75% alcohol 30 s + 0.5% NaClO 20 min; The optimal medium for starting training was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.5 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; The optimal medium for bud proliferation was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; The optimal medium for rooting was 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+active carbon 1.0 g/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L; 76.7% plantlets survived after acclimatization and transplanted.

**Key words:** wild; raspberry; rapid propagation; branch

树莓(*Rubus* spp. Raspberry)品种为费尔杜德,由东北农业大学园艺站提供。Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 25 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl)、SDS 缓冲液(2 g SDS 溶于 0.025 mol/L 硼砂中)、6 mol/L LiCl、3 mol/L NaAc, 以上试剂均用灭菌的 DEPC 处理水配制。 $\beta$ -巯基乙醇、Tris-苯酚、氯仿、Trizol 溶液、异丙醇, 仪器设备或试剂均无 RNAse 污染。

## 1.2 试验方法

1.2.1 SDS 方法 ①取 0.1~0.5 g 材料液氮中速冻, 研磨成粉, 迅速置于盛有 1 mL Tris-HCl 缓冲液的离心管中, 颠倒混匀, 冰浴 30~40 min, 不断混匀, 防止样品冻结凝于管底, 于离心机 4℃、10 000 r/min 离心 1 min 后, 用移液枪吸出上清液。②在离心管加入 0.6 mL SDS 缓冲液、0.06 mL  $\beta$ -巯基乙醇、0.4 mL Tris-苯酚和 0.3 mL 氯仿, 震荡 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液放入新的离心管中。③加入 0.3 mL Tris-苯酚和 0.3 mL 的氯仿, 震荡 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清液。④等体积氯仿重复抽提 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min。⑤吸取上清液到新离心管内, 加入等体积的 10 mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇, 冰浴 10 min 后 12 000 r/min 离心 10 min。⑥取适量的 DEPC 水溶解 RNA 后, 加入 1/10 体积 NaAc 和 3 倍体积的无水乙醇, 冰浴 10 min, 离心 10 min。⑦倒去上清液, 用 75% 的乙醇清洗沉淀 3 次, 干燥, 溶于 40  $\mu$ L DEPC 水。

1.2.2 Trizol 法 ①取 0.1 g 材料置液氮中迅速研磨成粉末, 将其移入装有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管中, 并在旋涡振荡器上充分混匀。②加入约 1/5 体积的氯仿后, 旋涡混匀 15 s, 室温静置 5 min, 12 000 r/min 4℃离心 15 min。③将上清液转入新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 轻轻颠倒混匀, 室温静置 5 min, 12 000 r/min 4℃离心 10 min。④吸去上清, 保留沉淀, 并向沉淀中加入 200  $\mu$ L 70% 乙醇洗涤沉淀 3 次。⑤倒出乙醇, 将沉淀室温自然晾干后加入适量 DEPC 水, 充分溶解沉淀。

1.2.3 测定方法 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 评价 2 种方法提取的 RNA 质量。树莓 RNA 纯度采用 SMA3000 进行检测测出 230、260、280 nm 处的 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 2 种方法提取的树莓果实组织总 RNA 的质量比较

SDS 法和 Trizol 法所提取的果实 RNA 对比结果表明, SDS 法提取的 RNA 有 28S 和 18S 条带, 且 28S rRNA 条带亮度约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍, 表明 RNA 无降解, 且 RNA 完整, Trizol 法提取的 RNA 未见 28S、18S 条带(图 1)。

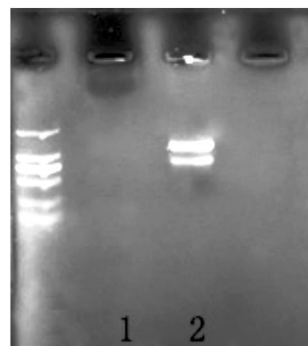


图1 树莓果实总 RNA 琼脂糖电泳图

注: 1. Trizol 法提取 RNA; 2. SDS 法提取 RNA。

### 2.2 2 种方法提取的树莓果实和叶片组织总 RNA 的纯度比较

用 SMA3000 测定 RNA 溶液的 OD<sub>230</sub>、OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 值, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>、OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 比值, SDS 法提取树莓果实 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 1.83, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 值为 2.01。说明提取的 RNA 较纯且含量较高, DNA 含量较少, 多糖、蛋白、酚类等杂质污染也较少。而 Trizol 法提取的 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.22, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 0.57, 说明其蛋白、多糖等杂质污染严重, 提取纯度较低, RNA 不可用于 cDNA 等试验操作。图 2 为 SMA3000 测定 RNA 样品扫描图。

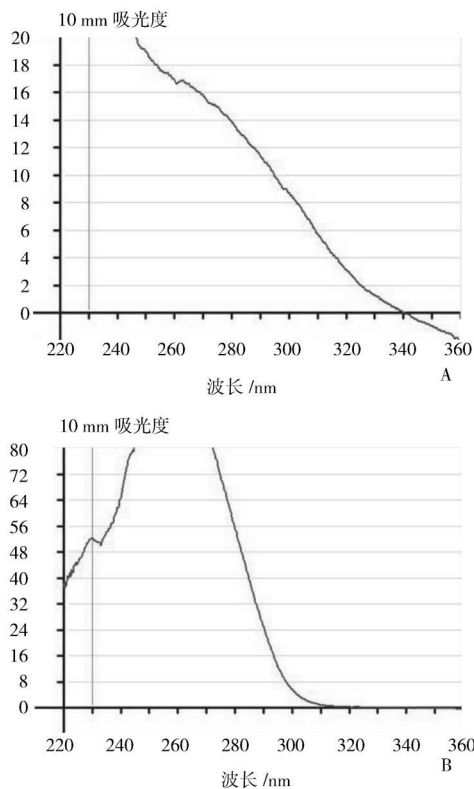


图2 RNA 样品扫描图

注 A 为 Trizol 法提取的 RNA 样品; B 为 SDS 法提取的 RNA 样品。

### 2.3 反转录检测

RNA 样品反转录结果见图 3。SDS 法获得的 RNA 反转录合成的 cDNA 在 0.5~2.0 kb 处出现明显的弥散片段,说明所提取的 RNA 质量较高,反转录较成功。而 Trizol 法反转录效果不明显。



图 3 总 RNA 的反转录产物电泳结果

注: 1: SDS 法提取的总 RNA 反转录效果; 2: Trizol 法提取的总 RNA 反转录效果。

### 3 讨论

纯度高、完整性好的 RNA 是进行分子克隆及基因表达分析的基础。迄今已有多种植物 RNA 提取分离方法的报道<sup>[5]</sup>。该研究通过 SDS 法和 Trizol 法对果实 RNA 的比较结果看, SDS 能提取的 RNA 质量较好, 质量、纯度均好于 Trizol 法。Trizol 法虽然操作简单, 但提取的 RNA 质量较差, 加入异丙醇后沉淀结聚成粘稠状, 难溶于水, 试验结果同周秦<sup>[6]</sup>等报道一致, 说明异丙醇沉淀 RNA 的同时导致了多糖、多酚物质的共沉淀。不溶沉淀的产生以及去除多糖和酚类等杂质同时造成的 RNA 损失<sup>[7-8]</sup>, 可能是导致 Trizol 法 RNA 电泳检测未见条带的原因。

多酚类物质和多糖是植物总 RNA 提取过程中的棘手问题<sup>[10]</sup>。树莓提取 RNA 过程中关键在于去除植物

中的糖、酚类物质, 也是提取过程中重要问题所在。该试验在 SDS 方法中, 选用 CTAB 法的 Tris-HCl 缓冲液, 能更好的去除植物中的糖、酚。在多糖的去除上, 并采用了 1/10 体积的 NaAc, 不仅可以去除多糖, 而且可以彻底去除色素类物质。而 SDS 可使蛋白质变性、凝聚; 苯酚、氯仿抽提, 即可较彻底地去除蛋白质等杂质。以达到提取高质量的 RNA 的目的。

### 4 结论

SDS 法对含多糖树莓总 RNA 提取取得了成功。所提 RNA 可以满足基本的分子试验操作, 去除了多糖、酚和蛋白质的干扰。此方法为树莓分子生物学研究奠定了较好的技术基础, 同时对其它富含多糖植物材料的 RNA 提取具有很好的借鉴意义。

#### 参考文献

- [1] 郭军战, 彭少兵, 陈铁山. 树莓和黑莓引种品种植实营养成分分析[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(1): 108-109.
- [2] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999(1): 36-39.
- [3] 于寒松, 彭帅, 谢远红, 等. 一种 RNA 提取试剂盒—Trizol 的使用方法初探[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 39-42.
- [4] 于秀梅, 康振生, 崔素萍, 等. 小麦不同器官总 RNA 含量及提取方法的比较研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(10): 29-32.
- [5] 袁贞, 沈文涛, 周鹏. 番木瓜果实总 RNA 提取方法比较[J]. 广东农业科学, 2008(10): 76-79.
- [6] 周秦, 黄有军, 曾燕如, 等. 山核桃胚和胚乳总 RNA 的提取与 cDNA 的合成[J]. 浙江林业科技, 2009(1): 36-39.
- [7] Asif M H, Dhawan P, Math P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruits[J]. Plant Mol Biol. Rep., 2000, 18: 109-115.
- [8] Liu J J, Goh C J, Loh C S, et al. A method for isolation of total RNA from fruits tissue of banana[J]. Plant Mol Biol. Rep., 1998, 16: 1-6.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 135-149.
- [10] 孙德权, 郭启高, 胡玉林, 等. Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009(5): 162-164.

## Study on Isolation of Total RNA from Raspberry Fruit

LIU Dan<sup>1</sup>, GAO Qing-yu<sup>1</sup>, ZHANG Bing-xiu<sup>1</sup>, JIAO Kui-bao<sup>2</sup>

(1. Horticultural College Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Berry Institute of Heilongjiang Academy of Agricul Science, Harbin, Heilongjiang 152204)

**Abstract:** SDS and Trizol were compared for extracting total RNA from fruit of raspberry in this paper. The results showed that no bands of RNA isolated by Trizol were found by agarose gel electrophoresis, indicating Trizol method was not suitable for the raspberry rich in polysaccharides and polyphenols. Total RNA isolated by the method of SDS displayed a good integrity, with clear bands of 28S and 18S, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> was 1.83 between 1.7 and 2.0, and OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> was 2.01. Reverse transcription results showed that total RNA extracted by the SDS can be directly used for molecular cloning and other molecular biology experiments.

**Key words:** raspberry; total RNA; SDS method; Trizol method