

梨组织 RNA 提取方法研究

孙长悦

(青岛农业大学 园艺学院 山东 青岛 266109)

摘要: 借鉴荔枝果实总 RNA 提取方法, 针对梨本身的特点利用改良 Bugos 法分别对叶片、花瓣、果肉中总 RNA 进行提取研究。结果表明: 改良 Bugos 法对梨不同组织中 RNA 的提取效果较好, 花瓣中 RNA 的相对含量最高, 叶片次之, 果肉最少。

关键词: 梨; 果肉; 叶片; 花; RNA

中图分类号: S 661.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0019-03

RNA 主要由以下几类分子组成: rRNA (占 RNA 总量的 80%~85%), tRNA 和核内小分子 RNA (占 10%~15%), mRNA (占 1%~5%)。rRNA 在总 RNA 分子中含量丰富, 由 28 S、18 S、5 S、4 S 几类组成, 它们之间同源性大, 分子量变化不大, 所以根据它们的密度和分子大小可以通过凝胶电泳进行分离。从细胞中分离 RNA 的纯度和完整性对于许多分子生物学实验至关重要, 提取高质量的 RNA 是进行 Northern 印迹及杂交分析、RT-PCR、cDNA 合成及体外翻译以及 cDNA 文库构建等许多分子生物学研究的必要前提, 因而备受研究者们重视。目前, 提取 RNA 的常规方法有异硫氰酸胍法^[1]、盐酸胍法^[2]、苯酚法^[3]、SDS 法^[4]、CTAB 法^[5]、LiCl-尿素法^[6]、热硼酸法^[7]、改良 Bugos 法^[8]等^[8-9]。但这些方法对梨等富含多糖、多酚以及一些尚未确定的次生代谢产物的植物组织来说, 有一定的局限性。虽然近年来也有成功地从芒果^[10]、猕猴桃^[11]、香蕉^[12]等果实中提取到高质量 RNA 的报道, 但由于不同植物组织的组成成分差异较大, 对某种植物能取得满意结果的 RNA 提取方法套用到其它植物组织时, 不一定就能取得较好的效果。同时, 各种方法在时间和试剂方面的消耗以及对仪器设备的要求各有不同, 所得 RNA 的质量也有差异。例如: 异硫氰酸胍法不但能得到高质量的 RNA, 而且能分离出细胞染色体 DNA, 但缺点是操作复杂、流程长、一次性提取的样品数量有限; 盐酸胍法适用于没有超速离心设备的情况下提取细胞总 RNA, 它利用盐酸胍抑制 RNA 酶, 匀浆裂解细胞, 有机溶剂抽提去除蛋白质, 通过选择性沉淀 RNA 分子而去除 DNA, 提取的 RNA 质量较好, 但整个操作过程复杂费时; 苯酚法提取效果不是很好, 产量不高; CTBA 法能够缩短 LiCl 和乙醇沉淀 RNA 的时间, 使单样品 RNA 提取时间缩短至 1.5 h 左右, 是目

前已报道的各种从果实中提取 RNA 方法中用时较短的方法之一, 但该方法提取的结果中 DNA 往往含量很高, 导致 RNA 纯度不够。植物组织的组分复杂, 不同的植物材料, 组成成分各异, 特别是多年生植物材料富含多酚类和多糖类物质, 一些模式植物的 RNA 提取方法用于提取多年生植物材料时, 难以去除多酚类和多糖类杂质, 这些方法对 RNase 抑制的能力、去除杂蛋白的能力以及对细胞或组织的破碎能力等都影响了所得 RNA 的产量和质量, 常出现获得的 RNA 产量低, 质量差, 易降解等问题, 有时甚至不能用于相关的研究^[8]。

在尝试多种 RNA 提取方法的基础上, 现探讨出一种快速简便的‘新梨七号’总 RNA 提取方法, 并取得了很好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 所用材料为‘新梨七号’, 果实于 2007 年 9 月底采收于山东省莱阳园艺学院实验站。并于 2008 年 4 月份采集其嫩叶, 花瓣。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖为西班牙粉状产品, DEPC 为 BBI 原装产品。其余试剂均为国产分析纯; RNA 提取缓冲液: 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0.5% SDS, 1% β -巯基乙醇 (pH 9.0) (现用现加); 其它试剂: 3 M NaAc (pH 5.2), 12 M LiCl, 无水乙醇, Tris 平衡酚, 氯仿: 异戊醇 (49:1) 溶液, 75% 乙醇, 异丙醇, 1× TAE 电泳缓冲液, EB 溶液, DEPC 水等。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取方法 果肉采取 3 个梯度进行实验, 第 1 次 10 mL 离心管中加入果肉材料为 0.7 g, 第 2 次 10 mL 离心管中放入 1.2 g, 第 3 次在第 1、2 次的基础上进一步加大量, 每 10 mL 离心管中放入材料 1.5 g; 叶片和花瓣未设置梯度, 每 10 mL 离心管中分别加入叶片 0.2 g, 花瓣 0.5 g, 并分别用液氮充分磨碎, 加入 4 mL RNA 提取液和 40 μ L 1% β -巯基乙醇, 室温放置 5 min;

作者简介: 孙长悦 (1983-) 男, 本科, 研究方向为植物生理分子生物。

收稿日期: 2008-10-30

加入 4 mL Tris 平衡酚, 充分混匀, 室温放置 3 min; 加入 0.8 mL 氯仿异戊醇, 充分混匀, 室温下放置 3 min; 加入 0.28 mL 3 M NaAc, 充分混匀, 并上放置 15 min, 12 000 rpm 离心 10 min; 取上清液于新 10 mL 离心管, 加入 2 mL Tris 平衡酚和 2 mL 氯仿异戊醇, 充分混匀, 12 000 rpm 离心 10 min; 取上清液于新 10 mL 离心管, 即加等体积异丙醇, 充分混匀, 置 -70°C 20 min, 12 000 rpm 离心 10 min; 弃上清液, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 沉淀溶于 0.4 mL DEPC 水, 转至 1.5 mL 离心管, 加入 0.25 倍体积 12 M LiCl, 混匀, 冰上放置 2 h, 12 000 rpm 离心 20 min; 沉淀溶于 0.2 mL DEPC 水, 用等体积 Tris 平衡酚氯仿异戊醇再抽提 1 次, 离心 10 min; 吸取上清液至新管, 加入 0.1 倍体积 3 M NaAc 和 2 倍体积无水乙醇, 混匀, -70°C 20 min, 12 000 rpm 离心 10 min; 弃上清液, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 沉淀溶于 10 μL DEPC 水, 放于 -70°C 冰箱备用。

1.2.2 RNA 质量检测 用 1.2% 琼脂糖凝胶 (EB 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 电泳分析 RNA 完整性 (上样量为 5 μL), 电压为 80 V, 电泳时间约 25 min, 至谱带完全分开始移至紫外灯下观察 并照相。

2 结果与分析

2.1 新梨 RNA 质量检测

检验 RNA 质量可采用琼脂糖凝胶电泳, 在较短时间内使 RNA 分开并呈明显的条带分布, 条带的大明暗度即可显示 RNA 量的多少。该实验中由叶片和花瓣提取的 RNA 在电泳过程中呈明显的 3 条带, 即 28 S、18 S 和 5 S, 但 5 S 带不很明显, 而由叶肉中提取的 RNA 只有 2 条带明显可见, 5 S 条带几乎不可见, 从图 1 也能看出, 提取的 RNA 基本不存在降解问题。

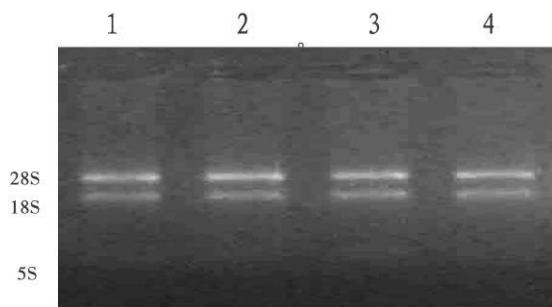


图1 梨果肉中 RNA 凝胶电泳 (1、3、4 上样量均为 3 μL , 2 号为 4 μL)

Fig.1 The electrophoresis of RNA extracted from pear fruit (1.5 g per tube, quantity of electrophoresis of 1, 3, 4 is 3 μL , 2 is 4 μL)

2.2 不同组织 RNA 含量分析

因改良 Bugos 法采用的是荔枝总 RNA 提取方法, 第 1 次实验时所用的果肉为每支离心管 0.7 g, 电泳后看不到任何条带, 然后将梯度加大至 1.2 g, 可以看到 2 条带但不明显; 当将梯度改为 1.5 g 时, 如图 1 所示, 可以

看到明显的 2 条带: 28 S、18 S。由以上可以看出: 当梨果肉用量为 1.5 g 时, 电泳效果较好, 可见明显条带。因此, 对新梨果肉来说, 可以 1.5 g 为基准, 稍微加大用量进行 RNA 提取等相关实验。

将图 1 和图 2 对比也可以看出, 尽管对梨果肉中的 RNA 提取时所用样品较多 (每管用量均为 1.5 g), 但提取的量仍较少。而对叶片和花瓣来说, 提取材料用量较少 (叶片每管为 0.2 g, 花瓣每管为 0.5 g), 但仍可获得较多的 RNA。

上样量不同, 条带的清晰度不一样, 在图 2 中, 对叶片来说 1 号管上样量大于 2 号管, 电泳所呈现的条带亮度也明显高于 2 号管; 对花瓣来说, 3 号管上样量多, 电泳所呈现的条带亮度也大于 4 号管; 由图 1 (1、3、4 上样量均为 3 μL , 2 号为 4 μL) 和图 3 (上样量为 5 μL) 的对比同样能说明这个问题。

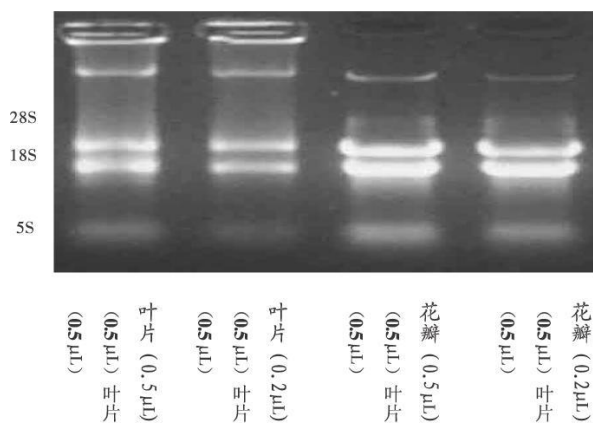


图2 梨叶片和花瓣中 RNA 凝胶电泳

Fig.2 The electrophoresis of RNA extracted from pear leaf and flower

3 讨论

一些 RNA 提取方法, 在进行具体实验时, 应根据研究对象的性质, 提取 RNA 的用途而在操作步骤和试剂使用量上作一定的修改。

有时在使用蛋白酶时, 为了抑制 RNA 水解酶的降解作用, 可在蛋白酶缓冲液用 5 mM 的 EDTA 代替 NaCl, 并且可将反应温度提高到 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$, 并将反应时间缩短到 15~25 min, 但酶用量必须提高 10~20 倍。溶菌酶使用时缓冲液中需加 EDTA, 因游离金属离子对酶有抑制。

许多植物材料中富含酚, 在细胞破碎时, 在多酚氧化酶作用下, 被氧化成有色的醌类物质, 影响核酸的提取及降低提取质量, 在提取液中加入 PVP (聚乙烯基吡咯烷酮) 和巯基乙醇对降低酚类的干扰可能有所帮助。PVP 将与酚形成复杂的聚合体, 在提取时将酚从核酸成分中游离。且 PVP 与巯基乙醇作为强还原剂可防止多酚的褐变。另外作为还原剂的这些成分在一定程度上可抑制 RNA 水解酶的作用。

在沉淀 RNA 时可用乙醇与异丙醇,乙醇的极性要强于异丙醇,所以一般用 2 V 乙醇沉淀,但在多糖、蛋白含量高时,用异丙醇沉淀可部分克服这种污染,尤其用异丙醇在室温下沉淀对摆脱多糖、杂蛋白污染更为有效。

在提取 RNA 时,如样品浓度低,则应增加有机溶剂沉淀时间, -70°C 下 $>30\text{ min}$; -20°C 过夜将有助于增加 RNA 的沉淀量。

在抽提过程中,若蛋白质含量或其它的杂质还较多,可以增加抽提次数。提取 RNA 请尽量在低温下操作,如果条件不容许,在室温下操作的时间要尽可能的短。

在实验过程中,应注意防止 RNase 对 RNA 的降解,采用改良 Bogus 提取叶片和花瓣 RNA 时存在一定程度 DNA 污染,因而应用这些样品进行 RT-PCR 或其它操作前应先用 RNase 降解 DNA 或对该方法所得 RNA 进行再次 LiCl 沉淀以进一步去除 DNA。

在提取果肉中 RNA 时,第 1 次做时材料的用量为 0.7 g,结果没有看到电泳条带,第 2 次材料用量为 1.2 g,再进行电泳时可以清晰地看到 2 条电泳条带,当继续加大材料用量,即材料为 1.5 g 时,效果较为明显,条带较为清晰。由此分析可能是由于果肉中所含水分较多,从而导致果肉中 RNA 的相对含量与叶片及花瓣相比有所减少,故提取难度稍大,提取量较少,在实际操作过程中要重点注意。

总之, RNA 分离的最关键因素是尽量减少 RNA 酶的污染。除细胞内 RNase 以外,环境中灰尘、各种实验器皿和试剂、人体的汗液以及唾液均存在 RNase。这类酶耐热、耐酸、耐碱,如煮沸也不能使之完全失去活性,蛋白质变性剂可以使之暂时失活,但变性剂去除后,又可恢复活性。RNase 的活性不需要辅助因子,二价金属离子螯合剂对它的活性无任何影响,故在提取 RNA 时,应尽量减少 RNA 酶对 RNA 的降解作用。在操作过程中,操作者的手直接接触之处毫无疑问会留下 RNase,说话带出的唾液也含有 RNase,故在整个操作过程中应戴口罩和手套;空气中飞尘携带的细菌、霉菌等微生物

也是污染外源 RNase 的一条途径,所以操作过程中应在比较洁净的环境中进行;同时,玻璃器皿应用 DEPC 水处理后在 200°C 烘 4 h 以上;塑料器材最好使用灭菌的一次性塑料制品, Eppendorf 管、微量加样吸头最好是新的,使用前进行高压灭菌。

参考文献

- [1] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159.
- [2] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues [J]. Anal Biochem, 1987, 163(1): 16-20.
- [3] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 77-83.
- [4] Vandriessche E S, Beckmans S, Dejaegere R, et al. Thiourea: the antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues [J]. Anal Biochem, 1984, 141(1): 184-188.
- [5] Chang S, Puryear J, Caimery J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113-116.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1993: 135-149.
- [7] Wanc Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhance the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Anal Biochem, 1994, 223(1): 7-12.
- [8] 徐昌杰, 陈昆松, 张波, 等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究 [J]. 果树学报, 2004, 21(2): 136-140.
- [9] 杨转英, 胡桂兵, 王惠聪, 等. 不同着色期荔枝果皮总 RNA 的提取及 mRNA 差显分析 [J]. 果树学报, 2008, 25(2): 281-285.
- [10] López-Gómez R, Gómez-Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using mangosocarp [J]. Hort Sci, 1992, 27(5): 440-442.
- [11] 陈昆松, 徐昌杰, 张上隆, 等. 富含多糖猕猴桃果实组织中总 RNA 提取方法的改进 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 371-373.
- [12] 李宏, 王新力, 彭学贤, 等. 香蕉不同组织中总 RNA 的有效分离 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(5): 384-388.

(致谢: 感谢青岛农业大学杨绍兰博士提供的实验方法及对论文写作的指导, 同时感谢青岛农业大学菌根技术研究所刘润进教授在论文写作格式方面提出了宝贵建议)

The Study for Extraction Methods of Different Tissues in Pear

SUN Chang-yue

(College of Horticulture Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Learning from the RNA extraction of lichi, Bugos method was improved to extract RNA from different tissues (fruit, leaf, flower) of pear. For more water was contented in fruits, different gradients were designed to choose a better amount for fruit RNA extraction, and a small amount of leaf and flower were used for the RNA extraction. These results showed that this method was better for RNA extraction of pear tissues, and the RNA concentration was highest in flower, leaf was second, fruit was the least.

Key words: Pear; Fruit; Leaf; Flower; RNA