

改良提取水稻胚乳和拟南芥花柱中DNA和RNA的SDS法

张志刚^{1,2,*} 李恂¹ 官春云¹ 白德朗^{1,2} 武小金²

¹湖南农业大学油料作物研究所, 长沙410128; ²国家杂交水稻工程技术研究中心, 长沙410125

Improvement of SDS Method for Isolating Genomic DNA and Total RNA from Rice Endosperm and Arabidopsis Style

ZHANG Zhi-Gang^{1,2,*}, LI Xun¹, GUAN Chun-Yun¹, BAI De-Lang^{1,2}, WU Xiao-Jin²

¹Oil Crops Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²National Hybrid Rice Research and Development Center, Changsha 410125, China

提要 在冷酚法的基础上, 经多次实践改进, 得出一种简单、快速的SDS法, 可以从富含多糖的水稻胚乳和富含多酚的拟南芥花柱中同时提取总DNA和总RNA, 所得DNA和RNA样品经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分析证明具有较高的纯度和完整性, 并可进一步满足PCR和RT-PCR的实验需要。

关键词 冷酚法; 水稻胚乳; 拟南芥花柱; 总DNA; 总RNA

某些植物组织富含多糖、脂质及酚类物质, 不利于RNA和DNA的分离和纯化, 因此, 能否有效地去除多糖、脂质及酚类物质是提取植物中高质量RNA和DNA成败的关键(Bekesiova等1999; Chang等1993; Chomczynski和Sacchi1987; 李宏和王新力1999; 沈文飏等2003)。水稻胚乳细胞是种子储藏营养物质的主要部位, 富含淀粉、糊精和一些低分子糖类(郑霏琴等1993); 拟南芥花柱中含有较多的色素、酚类、醌等次生代谢物质及蛋白质和多糖等有机大分子, 这些物质不仅影响总RNA和总DNA的提取效率, 还干扰以后的反转录、酶切和体外扩增(Vicient和Delseny1999; 李宏和王新力1999; 傅荣昭等1994)。本文在综合比较各种方法的基础上, 采用改良的SDS法从水稻胚乳和拟南芥花柱中提取总DNA和总RNA, 取得了较好的效果。该方法简单易行, 经济方便, 提取到的总DNA和总RNA可以应用于水稻胚乳和拟南芥花柱PCR检测、Southern杂交、Northern杂交和cDNA的合成及文库的构建等。

材料与方 法

1 材料

取授粉后10~15 d的两系杂交水稻组合(*Oryza sativa indica* cultivar-group) ‘准两优527’稻穗和

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)花柱, 放在-70℃冰箱中保存备用。

2 方法

取水稻穗或拟南芥花柱各0.5 g, 放入碾钵中, 加少量石英沙, 加入3 mL冰冷的抽提缓冲液(pH 8.0的50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、20 mmol·L⁻¹ LiCl、2 mmol·L⁻¹ EDTA、1% SDS, 高压灭菌)和3 mL冰冷的Tris-饱和酚, 研磨成浆状, 将浆状液转入10 mL离心管中, 于4℃下以8 000×g离心10 min, 吸取上层水相, 用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(体积比为25:24:1)抽提1~2次, 加入2倍体积无水乙醇, 混匀后静置30 min。离心后倒去液体, 沉淀的核酸溶解于1 mL冰冷的水中, 转入1.5 mL离心管中, 加入0.33 mL 8 mol·L⁻¹ LiCl和2 μL DEPC, 摇匀后放置4℃下过夜或-20℃ 2 h。4℃下以15 000×g下离心10 min, 将上层的DNA清液转入另一离心管中, 加入2/3体积的异丙醇沉淀, 沉淀的DNA用70%乙醇悬浮洗2次, 溶解于0.1 mL TE溶液中; 下层的RNA沉淀用70%乙醇悬浮洗2次, 倒置离心管, 放在室温下干燥, 用0.1 mL水溶解。取少量样品进

收稿 2005-09-26 修定 2006-03-20

资助 国家“948”项目(2003-Q04)。

✉-mail: zhangzhiganglh@163.com, Tel: 0731-2872941

行浓度测定和电泳分析。

实验结果

1 RNA 和 DNA 的纯度和完整性

以上述方法从水稻胚乳和拟南芥花柱中提取的总 RNA 和 DNA 样品, 用紫外分光光度计测定, RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.873~2.194 之间, OD_{260}/OD_{230} 值大于 2.0; DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.735~1.978 之间, OD_{260}/OD_{230} 也大于 2.0。说明提取的 RNA 和 DNA 纯度较高, 没有蛋白质、多糖等杂质的污染(李宏等 1999)。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, RNA 的图谱中可见到 28S 和 18S 两条完整的条带, 28S RNA 条带的亮度几乎是 18S 的 2 倍, 无明显的拖尾现象, 表明 RNA 样品比较完整(图 1)。DNA 分子量大小约为 22 kb, 点样孔清晰, 无拖尾现象和 RNA 污染, 符合 PCR 技术的要求(图 2)。

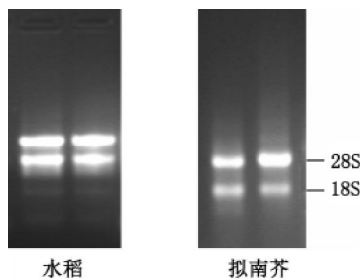


图1 水稻和拟南芥的 RNA 电泳图谱

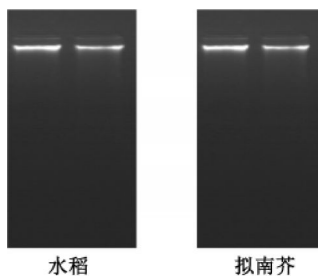


图2 水稻和拟南芥的 DNA 电泳图谱

2 水稻胚乳 *vp1* 基因和拟南芥 *dgat* 基因的扩增

根据 GenBank 中报道的水稻 *vp1* 基因序列(序列号 AK073805), 设计 1 对引物, 以上述方法提取的水稻总 DNA 和 RNA 为模板, 进行 PCR 和 RT-PCR, 分别扩增得到了 3.5 kb 的 *vp1* 基因 DNA 和

2.2 kb 包含全长编码序列的 *vp1* 基因 cDNA 目的条带(图 3)。另据拟南芥 *dgat* 基因序列(序列号 AJ238008)设计的 1 对引物, 以拟南芥花柱总 DNA 和 RNA 为模板, 进行的 PCR 和 RT-PCR, 分别扩增得到了 3.0 kb 的 *dgat* 基因 DNA 和 1.6 kb 包含全长编码序列的 *dgat* 基因 cDNA 目的条带(图 4)。由此说明, 用此法提取总 RNA 和 DNA 可以满足植物分子生物学实验的需要。

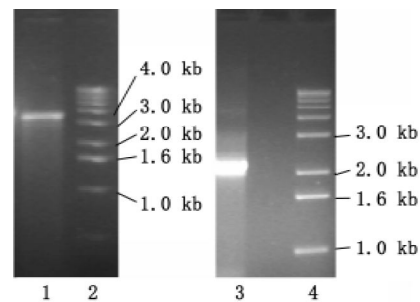


图3 水稻胚乳 *vp1* 的扩增

1: 水稻胚乳总 DNA 扩增的 *vp1* 基因 DNA; 3: 水稻胚乳总 RNA 扩增的 *vp1* 基因 cDNA; 2、4: 1 kb DNA marker。

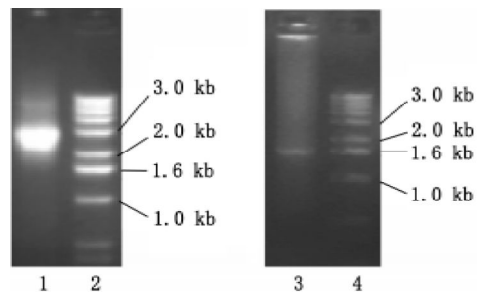


图4 拟南芥花柱 *dgat* 基因的扩增

1: 拟南芥花柱总 DNA 扩增的 *dgat* 基因 DNA; 3: 拟南芥花柱总 RNA 扩增的 *dgat* 基因 cDNA; 2、4: 1 kb DNA marker。

讨 论

从水稻胚乳和拟南芥花柱中提取高质量的 DNA 和 RNA, 除需要防止核糖核酸酶对 RNA 的破坏之外, 还要提防组织多糖、多酚和醌类物质对 RNA 和 DNA 的干扰。由于多糖的许多理化性质与 RNA 相似, 在沉淀 RNA 时, 多糖也随 RNA 一同沉淀下来, 很容易产生难溶于水的胶状沉淀; 多酚、醌类物质在酸性条件下极易氧化成红褐色物质, 然后和核酸不可逆地结合, 从而为

RNA样品的进一步研究带来困难(李宏和王新力 1999; 傅荣昭等 1994; 何振艳等 2005)。我们曾用Trizol试剂盒提取幼嫩的水稻胚乳和拟南芥花柱中RNA, 效果很好, 所提取的RNA能见到2条清晰的条带, 且28S的亮度是18S的2倍; 但提取较老的组织时, 得到的RNA为难溶于水的冻胶状物质, 电泳结果只能见到5S的条带。因此, 根据在比较综合分析的基础上采用SDS同时提取植物中RNA和DNA的结果, 我们认为, 从水稻胚乳及拟南芥花柱中提取高质量的DNA和RNA时, 应注意以下几点: (1)将研磨缓冲液的pH值提高到8.0, 且在低温条件下进行研磨破碎细胞可有效地防止多酚氧化物的氧化及多糖物质糊化; (2)利用乙醇沉淀核酸, 去除色素和大部分多糖, 然后用LiCl进一步沉淀核酸去除多糖; (3)破碎细胞时, 应加入研磨缓冲液和Tris-饱和酚, 这样, 细胞破碎后释放的内源RNase在研磨缓冲液中的EDTA、SDS和酚作用下即刻失活, 从而缩短了内源RNase与RNA共存时间, 降低内源RNase降解RNA的可能性。同时, 在乙醇沉淀核酸前, 用氯仿抽提1~2次, 用含DEPC的LiCl沉淀核酸, 这样, 可使核酸液中残余RNase变性和失活。

与传统的冷酚法(顾红雅等 1995)相比, 本文方法主要作了以下改进: (1)抽提缓冲液用常规药品配制, 可以降低药品使用成本; (2)利用乙醇沉淀核酸, 去除色素和大部分多糖, 然后用LiCl进一步沉淀核酸去除多糖, 得到的RNA更纯; (3)

用含DEPC的LiCl沉淀核酸, 可使核酸液中残余RNase变性和失活, 得到的RNA可以保存更长的时间; (4) LiCl沉淀RNA后的上清液, 用异丙醇沉淀可以得到植物总DNA, 即用本文方法可同时提取植物组织中的DNA和RNA, 这样可节约实验材料, 简化提取DNA的实验步骤。

参考文献

- 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编(1994). 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 141~144
- 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 潘乃瑾, 陈章良(1995). 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 77~83
- 何振艳, 徐文忠, 杨学习, 麻密(2005). 提取蕨类植物蜈蚣草总RNA的一种有效方法. 植物学通报, 22 (2): 198~202
- 李宏, 王新力(1999). 植物组织RNA提取的难点及对策. 生物技术通报, 15 (1): 36~39
- 李宏, 王新力, 彭学贤(1999). 香蕉不同组织中总RNA的有效分离. 植物生理学通讯, 35 (5): 384~388
- 沈文飏, 汪仁, 王益华, 郑天清, 万建民(2003). 从水稻种胚中提取RNA的新方法. 遗传, 25 (2): 208~210
- 郑霏琴, 王宗阳, 高继平(1993). 水稻胚乳中核糖核酸的分离. 植物生理学通讯, 29 (6): 438~440
- Bekesiova I, Nap JP, Mlynarova L (1999). Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. Plant Mol Biol Rep, 17: 269~277
- Chang S, Puryear L, Cairney J (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol Biol Rep, 11: 113~116
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162: 156~159
- Vicient CM, Delseny M (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seed. Anal Biochem, 268: 412~413