

# 一种简易快速高效提取麻疯树营养器官中 RNA 的方法

罗言云 魏琴 周黎军 张荣 邓鹜远 任琛 陈放\*

四川大学生命科学学院, 成都610065

## A Simple, Rapid and Highly Effective Method for Extracting Total RNA from *Jatropha curcas*

LUO Yan-Yun, WEI Qin, ZHOU Li-Jun, ZHANG Rong, DENG Wu-Yuan, REN Chen, CHEN Fang\*

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

**摘要** 以麻疯树根、茎、叶为材料, 用4种方法提取麻疯树中总RNA。琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱分析结果表明, 改良的张年辉法提取的RNA比张年辉法提取的完整性更好, 时间更短, 条件更粗放; 试剂盒A提取的RNA多数降解; 试剂盒B几乎不能提取其RNA。RT-PCR分析表明, 以改良的张年辉法提取的根、茎、叶中RNA作模板也可成功地进行RT-PCR扩增。据此, 我们认为用简易、快速、高效的改良张年辉法提取麻疯树根、茎、叶中RNA为最佳选择。

**关键词** 麻疯树; 改良的张年辉法; RNA提取; 营养器官

麻疯树(*Jatropha curcas*)为大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属植物, 在我国西南地区广泛分布。麻疯树根、茎、叶中含有大量的活性成分, 具有杀菌<sup>[1]</sup>、杀虫<sup>[2]</sup>等多种功效。麻疯树产业是联合国倡导的扶贫和生态保护的重点支撑项目<sup>[3]</sup>。研究麻疯树不同器官功能基因的表达与调控是进一步开发麻疯树各活性成分的基础。为此, 分离得到高质量的总RNA是首要条件。只有纯度高、完整性好的总RNA才能用于Northern杂交、mRNA纯化、cDNA文库构建、通过RT-PCR分离基因以及蛋白质体外翻译等进一步实验操作。植物组织中RNA的提取方法较多, 但不同植物的生理生化特点不同, 它们的RNA提取方法也各异。从富含次生代谢产物的珙桐种子<sup>[4]</sup>、草莓<sup>[5]</sup>、文冠果<sup>[6]</sup>、桃<sup>[7]</sup>、香蕉<sup>[8]</sup>、柿<sup>[9]</sup>、哈密瓜<sup>[10]</sup>、猕猴桃<sup>[11]</sup>、荔枝<sup>[12]</sup>、芒果<sup>[13]</sup>、葡萄<sup>[14]</sup>等组织中提取总RNA的报道较多。Lin等<sup>[15]</sup>用Watson公司的试剂盒(本文实验的试剂盒A)成功地从麻疯树种子中分离了总RNA, 实现了麻疯树毒蛋白(curcin)基因的cDNA克隆, 为种子中活性物质的基因研究建立了基础, 而提取麻疯树根、茎、叶中的RNA并用以进行基因研究还未见报道。本文以麻疯树根、茎、叶为材料, 选用了4种方法提取它们的RNA, 以期能找到一种快速、高效提取根、茎、叶中RNA的方法, 为麻疯树不同营养器官功能基因的研究提供实验基础。经过实验探

索, 已获得成功, 现报道如下。

## 材料与方法

### 1 材料

根、茎、叶取自实验室栽培的麻疯树(*Jatropha curcas*)幼苗。

### 2 方法

#### 2.1 RNA提取

**2.1.1 张年辉法** 器具的处理、提取缓冲液配方和其它试剂、提取过程完全按张年辉等<sup>[16]</sup>所述进行: 根、茎、叶样品用量为200 mg; RNA提取缓冲液配方为200 mmol·L<sup>-1</sup> Tris、400 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、200 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖、35 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、25 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二醇双乙胺醚四乙酸(EGTA)、3 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠(NaAc); Tris饱和重蒸苯酚(pH 8)、3 mol·L<sup>-1</sup> NaAc(pH 5.2)和氯仿: 异戊醇(24:1)在4℃下预冷保存。

**2.1.2 改良的张年辉法** 研钵在用前用酒精烧2~3 min, 其他器具的处理与张年辉法同; RNA提取缓冲液配方及其它试剂与张年辉法同; 所有试剂

收稿 2004-09-13 修定 2004-12-27

资助 国家“十五”重大科技攻关项目(2002BA901A15)。  
致谢 四川大学生命科学学院张年辉先生在实验中给予支持和帮助。

\*通讯作者 (E-mail: cfang@263.net, Tel: 028-85417281)。

均于常温存放, 用前不需预冷; 提取过程的改进主要体现在处理时间的缩短和常温下离心。具体步骤是: (1) 200 mg 样品在液氮中研磨后转移到EP管中, 按 3~4 倍量 ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 加入提取缓冲液, 1/2 (V/V) 提取缓冲液的苯酚, 1/2 (V/V) 提取缓冲液的氯仿-异戊醇, 剧烈震荡混匀。(2) 4℃下, 3 800×g 离心 2 min。上清液转移到新EP管中, 加入等体积的苯酚和氯仿-异戊醇, 剧烈震荡混匀, 常温下, 3 800×g 离心 2 min。重复1次。(3) 上清液转移到新EP管, 加入等体积的氯仿抽提, 常温下, 以 3 800×g 离心 2 min。(4) 上清液转移到新EP管中, 加入 1/10 体积的醋酸钠 (pH 5.2) 及 2 倍体积的 100% 乙醇于 -20℃ 下沉淀 3 h。(5) 于常温下, 6 800×g 离心 3 min。尽量倒去乙醇, 用 0.5 mL 的 NaAc (pH 5.6) 洗下沉淀, 共 1 次。(6) 常温下, 15 000×g 离心 3 min。沉淀加入 0.2 mL DEPC 水、0.04 mL 醋酸钠 (pH 5.6)、1 mL 100% 乙醇混合, 在 -20℃ 下沉淀 3 h。(7) 常温下, 3 800×g 离心 2 min。沉淀用 70% 乙醇洗 2 次。常温下, 15 000×g 离心 2 min, 除去乙醇, 沉淀溶解于 50 mL DEPC 水中, 于 -20℃ 中保存, 备用。

**2.1.3 试剂盒A法** 试剂盒A购于Watson公司, 完全按照其使用说明书操作。

**2.1.4 试剂盒B法(磁珠法)** 试剂盒B购自云南旺源生物技术有限公司, 完全按照其使用说明书操作。

**2.2 RNA电泳分析** 取 2  $\mu\text{L}$  RNA 样品, 点样于 1% 琼脂糖凝胶上, 每 100 mL 凝胶加入 2.5  $\mu\text{L}$  EB, 80 V 恒压 50 min, 在凝胶成像系统中观察检测提取 RNA 的完整性。

**2.3 RNA纯度鉴定** 取 1  $\mu\text{L}$  RNA 样品, 稀释 4 倍后测定波长 230、260 和 280 nm 处的吸收值 ( $A$ )。计算  $A_{260}/A_{280}$  及  $A_{260}/A_{230}$  用于纯度分析, 并于紫外光下对样品进行扫描。

**2.4 RT-PCR** 按一步法 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa) 操作手册进行。因到目前为止, 未见在麻疯树根、茎中成功分离功能基因的报道, 故没有现成的引物用于 RT-PCR 检测。本文用麻疯树叶的 JFIP 基因的特异引物——5' 引物 P1 (5' TAGCCAAAGTCATAAATTCTGGGGACA 3') 和 3' 引物 P2 (5' CATTCAACAAGACTCCC-ATGAGACCTTT 3')<sup>[17]</sup> 为引物, 分别以改良的张年辉法和张年辉法提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR。在 50℃ 下反转录 30 min 后, 进行 PCR。参数是: 94℃ 2 min; 94℃ 20 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。每个 RNA 样品均以未经反转录的 PCR 和不加模板的 RT-PCR 为对照。

## 实验结果

### 1 RNA完整性分析

用改良的张年辉法提取的根、茎、叶 RNA 条带清晰, 无拖尾, 不同分子量的 RNA (28S、18S、5.8S) 均可提出; 用张年辉法提取的根、茎、叶中 RNA 条带稍欠清晰, 略有拖尾, 不同分子量的 RNA (28S、18S、5.8S) 也均可提出; 用试剂盒 A 提取的 RNA 降解多; 用试剂盒 B 未能提出根、茎、叶中的 RNA (图 1)。

### 2 RNA纯度检测

采用 4 种方法提取的根、茎、叶中 RNA 的  $A_{230}$ 、 $A_{260}$ 、 $A_{280}$  值见表 1。经计算, 4 种方法提取的根中 RNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  值分别为 1.97、1.91、1.81, 茎中分别为 1.89、1.86、1.71, 叶中分别为 1.98、2.02、1.92。这些数字均在 1.8~2.0 之间, 表明样品几乎无蛋白质污染<sup>[5]</sup>。根中 RNA 样品的  $A_{260}/A_{230}$  分别为 1.65、1.61、1.46, 茎中分别为 1.51、1.56、1.48, 叶中分别为 1.59、1.65、1.54。这些数字均大于 1.0, 表明

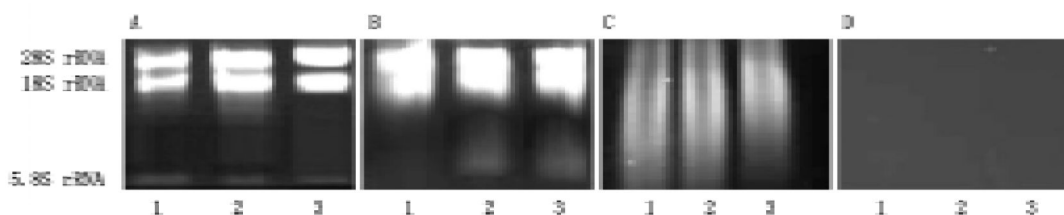


图 1 4 种方法提取的麻疯树根、茎、叶中 RNA 电泳图谱

A: 改良张年辉法; B: 张年辉法; C: 试剂盒A法; D: 试剂盒B法。1: 根 2: 茎 3: 叶。

样品几乎无多糖和酚类污染<sup>[5]</sup>。

将根、茎、叶 RNA 放在紫外光区进行扫描后发现 260 nm 处有高的吸收峰, 而在 280 nm 处

几乎无吸收峰(图 2, 根、茎扫描图略)。

### 3 RT-PCR

以麻疯树叶中的 JFIP 基因的特异引物(P1 和

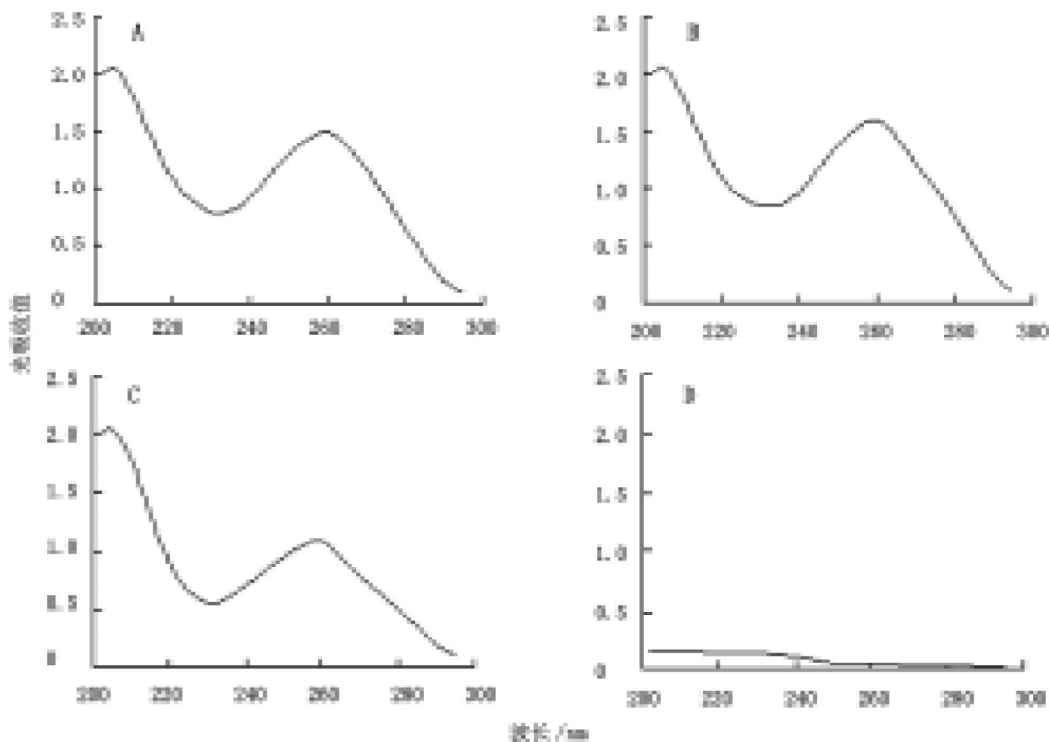


图2 4种方法提取麻疯树叶中RNA紫外光谱吸收图谱

A: 改良张年辉法; B: 张年辉法; C: 试剂盒A法; D: 试剂盒B法。

表1 用4种方法提取的麻疯树根、茎、叶中RNA的紫外光吸收值(A)

紫外光吸收值	根				茎			
	改良法	张年辉法	试剂盒A法	试剂盒B法	改良法	张年辉法	试剂盒A法	试剂盒B法
$A_{260}$	0.387±0.021	0.368±0.032	0.185±0.009	0.035±0.022	0.525±0.037	0.522±0.043	0.288±0.038	0.044±0.009
$A_{280}$	0.196±0.025	0.193±0.029	0.102±0.013	0.032±0.019	0.278±0.026	0.283±0.039	0.168±0.026	0.037±0.014
$A_{230}$	0.235±0.030	0.229±0.033	0.127±0.021	0.085±0.026	0.347±0.022	0.336±0.028	0.194±0.087	0.046±0.028
$A_{260}/A_{280}$	1.97	1.91	1.81	—	1.89	1.86	1.71	—
$A_{260}/A_{230}$	1.65	1.61	1.46	—	1.51	1.56	1.48	—
叶								
紫外光吸收值	改良法		张年辉法		试剂盒A法		试剂盒B法	
$A_{260}$	0.613±0.027		0.658±0.034		0.361±0.036		0.066±0.025	
$A_{280}$	0.309±0.029		0.352±0.031		0.188±0.027		0.058±0.032	
$A_{230}$	0.385±0.036		0.399±0.024		0.235±0.025		0.075±0.023	
$A_{260}/A_{280}$	1.98		2.02		1.92		—	
$A_{260}/A_{230}$	1.59		1.65		1.54		—	

P2)为引物,分别以改良的张年辉法和张年辉法提取的RNA为模板进行RT-PCR,结果预期的570 bp的目标带可成功地扩增,在未经反转录的和没有模板的对照中未见有扩增条带;而以试剂盒A提取的RNA为模板进行RT-PCR后,产物中未见目标带的被扩增(图3);试剂盒B未提出RNA,故未进行RT-PCR试验。

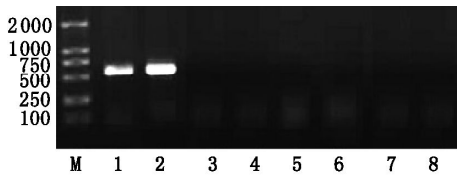


图3 RT-PCR产物的琼脂糖电泳图谱

M: DNA分子量标准; 1: RT-PCR产物,以张年辉法提取的RNA为模板; 2: RT-PCR产物,以改良的张年辉法提取的RNA为模板; 3: RT-PCR产物(无目标带),以试剂盒A提取的RNA为模板; 4、5: 未经反转录的对照; 6~8: 没有模板的对照。

## 讨 论

用改良的张年辉法和张年辉法提取的麻疯树根、茎、叶中RNA在得率上并无明显差异(表1),但改良的张年辉法比张年辉法提取RNA有以下优点: (1)RNA更完整(图1); (2)操作更快速(改良的张年辉法比张年辉法用的时间少近70 min); (3)操作条件更粗放(操作可在常温下进行,即常温下离心和使用常温下存放的试剂)。总之,用改良的张年辉法可得到更高质量的RNA,操作更方便、更简捷,还可降低成本。另外,使用前直接用酒精烧研钵以灭活RNA酶的方法可克服实验前由于不慎或准备不充分而造成的不良影响。

改良法之所以能在较粗放的条件下进行,我们推测这可能与提取液中的起渗透保护作用的蔗糖、氯化钾有关<sup>[16]</sup>。缩短提取时间利于其RNA的提取,可能与缩短了RNA酶与RNA作用时间,从而减少了RNA降解的可能性有关。如果在粗放的条件下操作,提取时间越短,则越利于保证RNA的完整性。

改良的张年辉法比张年辉法之所以更有利于麻疯树根、茎、叶中RNA的提取,可能与麻疯树根、茎、叶中含丰富的乳汁有关。据文献18和19报道,麻疯树乳汁富含麻疯树碱、糖类、小分子醛和酸类等。破碎细胞时RNA与乳汁可同时析出,会比无乳汁植物可能更易发生次生物物质氧化或和酚试剂发生化学反应。因此,快速提取

可减少次生物物质的氧化反应,减少与核酸的不可逆性结合,从而减少RNA的降解。改良的张年辉法是否适用于多数乳汁植物,还待进一步试验。

为何试剂盒A会导致麻疯树根、茎、叶中RNA的降解,试剂盒B无法提取麻疯树根、茎、叶中RNA,目前由于还不知其提取液的成分是什么,所以尚无从分析。这一问题也值得探讨。

## 参考文献

- 1 史玉俊. 麻疯树乳汁治疗单纯疣临床实验. 中草药, 1998, 29(7): 502
- 2 Fagbenro-Beyioku AF, Oyibo WA, Anufarmo BC. Disinfectant/antiparasitic activities of *Jatropha curcas* L. East Afr Med J, 1998, 75(9): 508~511
- 3 何文淑, 肖荣贵, 杨小琼等. 麻疯树在贫困地区农村发展和生态建设中的开发前景. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(10): 33~35
- 4 黎云祥, 陈放. 一种改进的珙桐(*Davidia involuclrata*)干种子总RNA的提取方法. 四川大学学报, 2002, 39(10): 968~970
- 5 李大力. 一种从富含次生物质的植物中提取RNA的方法. 南京大学学报(自然科学版), 2001, 25(5): 547~549
- 6 杜希华, 陆海, 高述民等. 文冠果花冠总RNA提取研究. 北京林业大学学报, 2003, 25(1): 11~13
- 7 金勇丰, 张耀洲. 桃果实ACC合酶cDNA的克隆. 园艺学报, 2000, 27(4): 257~262
- 8 李宏, 王新力, 彭学贤等. 香蕉不同组织中总RNA的有效分离. 植物生理学通讯, 1999, 35(5): 384~388
- 9 山蓝, 王保莉, 张继澍. 从富含多糖和多酚的柿果中提取具转录活性的RNA的办法. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 463~466
- 10 陆璐, 王鸣, 净学勤等. 哈密瓜ACC氧化酶cDNA克隆及其序列分析. 园艺学报, 2000, 27(1): 32~36
- 11 陈昆松, 徐昌杰, 张上隆. 富含多糖猕猴桃果实组织中总RNA提取方法的改进. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 371~373
- 12 张以顺, 向旭, 傅家瑞等. 一种提取荔枝胚中总RNA的方法. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 226~228
- 13 肖洁凝, 黄学林, 黎茵等. 富含多糖和次生物质的芒果子叶总RNA的提取. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 83~86
- 14 张今今, 王跃进, 王西平等. 葡萄总RNA提取方法的研究. 果树学报, 2003, 20(3): 178~181
- 15 Lin J, Chen Y, Xu Y et al. Cloning and expression of JRIP, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. Acta Bot Sin, 2003, 45(7): 858~863
- 16 张年辉, 韦振泉, 何军贤等. 一种高效经济的高质量植物RNA提取方法. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(9): 1~4
- 17 魏琴. 麻疯树种子抗真菌蛋白及相关基因的分离、表达研究[博士学位论文]. 成都: 四川大学, 2004. 79
- 18 李维莉, 扬辉, 林南英等. 可再生能源麻疯树种子油化学成分研究. 云南大学学报, 2000, 22(15): 324
- 19 Naengchomnong W, Thebtaramonth Y, Wiriyachitra P et al. Isolation and structure determination of two novel lathyrane from *Jatropha curcas*. Retrahedron Letters, 1986, 27(4): 5675~5678