

## 萝卜总 RNA 提取与 mRNA 差异显示技术

黄浩<sup>1,2</sup> 柳李旺<sup>1,\*</sup> 龚义勤<sup>1</sup> 陈崇顺<sup>2</sup> 宋贤勇<sup>1</sup> 朱献文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 园艺学院, 南京 210095; <sup>2</sup>南京师范大学生命科学学院, 南京 210097

## The Total RNA Extraction and mRNA Differential Display Technique in Radish (*Raphanus sativus*)

HUANG Hao<sup>1,2</sup>, LIU Li-Wang<sup>1,\*</sup>, GONG Yi-Qin<sup>1</sup>, CHEN Chong-Shun<sup>2</sup>, SONG Xian-Yong<sup>1</sup>, ZHU Xian-Wen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; <sup>2</sup>College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097

**摘要** 以萝卜幼小花药与叶片为材料, 初步建立了 mRNA 差异显示技术体系。4 种提取总 RNA 方法中, 改进的 SDS/ 酸酚法比 CTAB/ 酸酚法和 SDS / 碱酚法更合适; 改进的热硼酸法(HB)提取的 RNA 质量也较高, 但所需时间较长, 成本较高。以改进的 SDS / 酸酚法获得的 RNA 进行纯化后, 其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 2.0~2.2 之间, 表明 RNA 样品杂质较少; 总 RNA 进行反转录与差异显示分析表明, 高分辨力的 cDNA 片段在 100~380 bp 之间。

**关键词** 萝卜; 差异显示技术; 基因表达

基因表达的变化是调控生命活动过程的核心机制。近年来, 与发育相关的基因分离克隆已成为生命科学领域的研究热点之一。鉴别、克隆发育基因有多种策略, 如减法杂交、cDNA-AFLP、RDA、ISSH、cDNA 微阵列等。Liang 和 Pardee<sup>[1]</sup> 创立的 mRNA 差显技术(differential display reverse transcription PCR, DD-RT-PCR) 除成功地应用于动物及人类多种疾病与重要器官发生有关基因的鉴定克隆外<sup>[2]</sup>, 也已成功应用于植物果实发育、信号转导、植物抗逆与抗病性、胚胎发育、形态发生等有关基因的分离与克隆中, 如水稻凝集素基因表达、番茄果实膨大、小麦春化、水稻胞质雄性不育以及杂种优势相关基因等<sup>[3~7]</sup>。

目前, 有关萝卜分子生物学研究相对较少, 尚未见到萝卜 mRNA 差异显示技术的报道。已有研究表明, 以 mRNA 与总 RNA 作模板, 差异显示结果差别不大<sup>[8]</sup>。本文以萝卜叶片和花药为试材, 通过筛选合适的 RNA 提取方案, 建立起较完善的萝卜 mRNA 差异显示技术体系, 从而为开展萝卜重要园艺性状的分子鉴定与功能基因的分离克隆奠定基础。

### 材料与方法

实验材料为晚抽薹萝卜 (*Raphanus sativus*) 细胞质雄性不育系(CMS)的保持系(本研究室培育)鲜

嫩叶片和花药。

所有试剂均为新开封或经焦炭酸二乙酯(DEPC)处理过的专门用于提取 RNA, 经高压灭菌。提取缓冲液为 0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris、5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、1% SDS、2% β- 巯基乙醇, pH 8.2。玻璃器皿于 180~200℃ 下烘 8 h 左右, 塑料器皿用 DEPC 处理灭菌后一次性使用。

提取 RNA 采用 4 种方法。SDS / 酸酚法参考文献 9 的方法并略作修改, 具体操作流程为: 取 200 mg 左右的萝卜叶片和花药, 加液氮迅速研磨成粉状, 移入 2.0 mL 离心管中, 加 600 μL RNA 提取缓冲液、等体积酸酚、1/4 体积氯仿、15% 无水乙醇、少量聚乙烯吡咯烷酮[PVP (K30)], 混匀并剧烈震荡 4~5 min, 静置 15 min; 4℃、12 500×g 离心 15 min; 取上清液加入等体积酸酚, 1/5 体积 3 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钾(KAc), 剧烈震荡 4 min 后, 加入等体积氯仿, 混匀; 离心后取上清液加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1)溶液, 混匀后再重复抽提 1 次; 离心后取水相加入 2.5 倍无水乙醇和 1/10

收稿 2003-12-29 修定 2004-04-19

资助 国家自然科学基金(30300238)、江苏省自然科学基金(创新人才 BK2004418)、上海市科技兴农重点攻关(农科攻字 1-4)项目。

\* 通讯作者(E-mail: nauliulw@njau.edu.cn, Tel: 025-84395563)。

体积  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaAc, 混匀,  $-20^\circ\text{C}$  放置 2 h 以上;  $4^\circ\text{C}$ 、 $12 \text{ 500}\times g$  离心 15 min, 弃上清液用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次; 室温干燥后溶于  $20\sim 50 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (经 DEPC 处理) 中,  $-20^\circ\text{C}$  以下保存备用。其他 3 种方法为改进的热硼酸法<sup>[10]</sup>、CTAB/ 酸酚法<sup>[11]</sup>与 SDS/ 碱酚法<sup>[12]</sup>。取  $2 \mu\text{L}$  在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 检测 RNA 完整性。

总 RNA 中 DNA 消化参照 TaKaRa 公司操作指南进行, 再用 BACKMAN DU-640 核酸-蛋白分析仪测定  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ , 确定 RNA 浓度与纯度后, 调至  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 反转录时, 每个 RNA 样品, 对应一个简并的寡脱氧胸腺嘧啶核苷酸 [oligo(dT)] 锚定引物。取  $4 \mu\text{g}$  不含 DNA 的 RNA, 参照 Promega 公司操作指南进行反转录, 反转录的 cDNA 用于 DD-RT-PCR 扩增。扩增反应体系为  $20 \mu\text{L}$ , 其中含  $2 \mu\text{L}$   $10\times$  扩增缓冲液、 $0.2 \mu\text{L}$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 混合液、 $2 \mu\text{L}$   $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对应的简并 oligo(dT) 锚定引物、 $1 \mu\text{L}$  cDNA、 $1 \text{ U}$  Taq DNA 聚合酶、 $5 \mu\text{L}$   $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  随机十聚核苷酸引物, 双蒸水补足体积。于 PTC-100 PCR 仪 (MJ Research Inc.) 上进行扩增。反应程序:  $94^\circ\text{C}$  2 min 预变性;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $40^\circ\text{C}$  2 min,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环;  $72^\circ\text{C}$  7 min,  $4^\circ\text{C}$  保存。

扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 上高压电泳, 凝胶板用 10% 冰乙酸固定, 然后用超纯水清洗胶板 1 min, 于染色液 ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ 、0.056% HCOH) 中进行染色 (银染方法参照 Bassam 等<sup>[13]</sup>的方法)。经过染色的凝胶板用超纯水洗涤后

显影 ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCO}_3$ 、0.056% HCOH、 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaS}_2\text{O}_3$ ), 待条带清晰, 取出固定, 室温下自然风干并摄像保存。

## 实验结果

### 1 萝卜叶片与花药总 RNA 提取

萝卜组织尤其是花药含有较多的酚类和多糖, 给 RNA 提取造成了困难。本文用 4 种方法提取的总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳的结果 (图 1) 显示, 采用改进的 SDS/ 酸酚法提取的叶片和花药 RNA 中, 可以清晰地看见 3 条主带 28S、18S 与 5.8S RNA, 28S 约为 18S 亮度的 2 倍, 且带型清晰, 说明完整性好<sup>[14]</sup>, 同时可见 DNA (图 1-a); 采用改进的热硼酸法提取到的叶片 RNA 可见多条带, 且主带清晰, 表明总 RNA 质量较好 (图 1-b); 在以 SDS/ 碱酚法所获得的 RNA 加样孔附近, 多糖和蛋白很多, RNA 拖尾现象明显, 说明结果并不理想 (图 1-c); 采用 CTAB 法所提取的 RNA 样品可见到 2 条主带, 但较模糊, 表明 RNA 已经降解 (图 1-d)。

参照样品的 RNA 提取所需时间、纯度、产率等因素, 确定采用改进的 SDS/ 酸酚法获得的 RNA 进行差显分析。总 RNA 经 DNase I 消化后, 以 UV- 分光光度计测定浓度和质量, 其  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  在 2.00~2.20 之间, 产率为  $177\sim 246 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 说明样品中的蛋白质或杂质较少; 叶片中的 RNA 产率高于花药。琼脂糖非变性凝胶电泳的结果 (图 2) 也表明, 纯化后的总 RNA 条带完整、清晰, 适合于下一步的逆转录与差显分析。

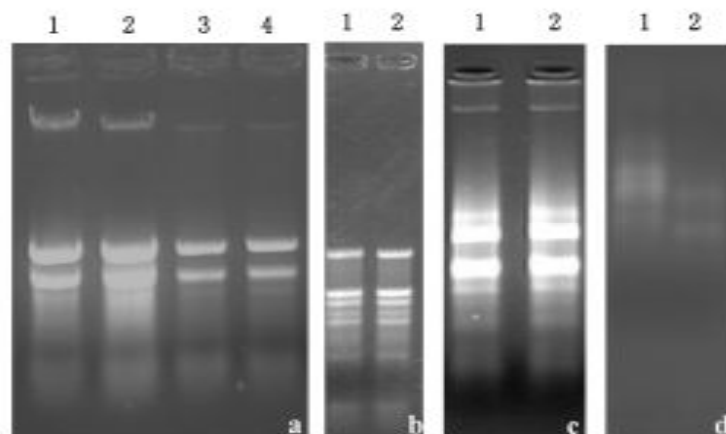


图 1 不同方法提取的 RNA

a. 改进 SDS / 酸酚法 (3、4 为 1、2 的 5 倍稀释); b. 热硼酸法; c. SDS / 碱酚法; d. CTAB/ 酸酚法。

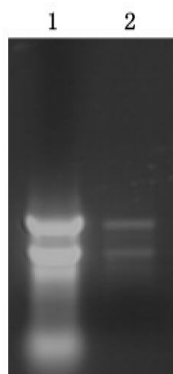


图2 纯化后的花药不同浓度RNA(改进的SDS/酸酚法提取)电泳图谱

## 2 mRNA DD-RT-PCR 分析

根据在UV-分光光度计上的测定结果调整合适浓度( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )进行反转录获得cDNA(图3)。随机选用4个差显随机引物与2个锚定引物的引物组对RNA样品反转录产物进行PCR分析,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测(图4)后,于变性PAGE



图3 合成cDNA的电泳图谱

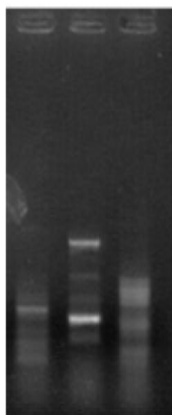


图4 部分DD-RT-PCR产物琼脂糖电泳图谱

胶上进行高压电泳,银染后,可以显现出较清晰的条带(图5)。图中每个泳道均为一个引物组合。对于多数引物组合cDNA片段带型清晰。分子量标准与测序分析表明,高分辨力的cDNA片段一般都在 $100\sim 380 \text{ bp}$ 之间;不同引物组合之间带型不同,反映了不同基因的差异表达。

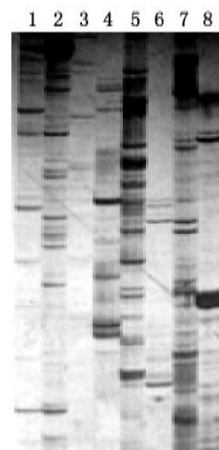


图5 不同引物组合差显分析

## 讨 论

与其他发育基因分离技术相比,由Liang与Pardee<sup>[1]</sup>创立的mRNA DD-RT-PCR技术有许多优点。能否提取到完整和高质量的RNA是差异显示技术成功应用的关键环节之一。从植物组织中提取RNA有许多方法<sup>[9~12,14]</sup>,但由于植物基因型的差异和组织特异性,常造成细胞组分不同,因而不同材料的RNA所采用的提取方案会有所差别。

本文采用4种RNA提取方法,从萝卜花药和叶片中提取总RNA。获得RNA样品的时间,改进的SDS/酸酚法为7~8 h,改进的热硼酸(HB)法为20 h左右,CTAB/酸酚法15 h,SDS/碱酚法24 h以上。因此,从防止外源RNase污染角度来说,改进的SDS/酸酚法比较适合于萝卜RNA的提取,可以保证其完整性。再就试剂成本来说,改进的HB法中使用的二硫苏糖醇(DTT)、脱氧胆酸盐与蛋白酶K价格较高,而改进的SDS/酸酚法最低,这在决定采用何种方法时,也是应当考虑的。

植物次生物质的有效去除对高质量RNA的获得至关重要。改进的SDS/酸酚法中使用的还原剂

$\beta$ -巯基乙醇和螯合剂PVP可防止酚类化合物氧化。此法还可采用结合低浓度乙醇和醋酸钾措施去除多糖,再加入酚和SDS等,使RNase失活后进一步用酚和氯仿抽提去除。改进的HB法和CTAB/酸酚法所获得的RNA经琼脂糖胶电泳检测,所含DNA量少,但是HB法的RNA产率不高,操作条件要求严格,而CTAB/酸酚法所得的RNA则会严重降解。SDS/碱酚法不能有效解决多糖等污染问题。尽管改进的SDS/酸酚法所提取到的RNA样品中也含有DNA,但这可在后续的步骤中加以去除。总之,改进的SDS/酸酚法所需费用低,简单快速,可以考虑作为提取萝卜RNA的首选方案。

引物浓度与合理组配也是DD-RT-PCR取得成功以及降低假阳性的关键。已有报道中的锚定引物多为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,少数用2.0和 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [1, 15];而随机引物浓度差异较大,有0.2、0.12、0.8、 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [1, 6, 15, 16]。本文选用 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结果较清晰。已有报道中使用的dNTPs浓度有0.2、0.1、0.02、0.01  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不等 [1, 6, 12, 16],本文则是以 $0.1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 扩增效果为最佳。浓度降低时,带型会变得极淡或扩不出;浓度太高背景又会过深。

多数差异显示分析中应用同位素,本文用的PAGE胶银染法 [13],快速、安全、简便,显色程度容易掌握,只要将显色液充分预冷就可获得高清晰的结果。在性状表达差异分析中,得到差异cDNA后,即可回收目的片段、克隆测序、验证,再采取一定策略获得cDNA全序列。本文中通过PAGE胶分离、银染获得的比较易辨的cDNA片段一般都在 $100\sim 380 \text{bp}$ 之间。为进行高效克隆,应进一步提高扩增效率,优化PAGE电泳,以获得较大的片段。

## 参考文献

- 1 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257:967~971
- 2 俞作仁, 郭睿, 葛晔华等. 用DDRT-PCR方法克隆小鼠精子发生早期相关基因的EST. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(1): 92~96
- 3 秦庆明, 张全, 赵文生等. 稻瘟菌侵染诱导水稻凝集素基因的表达(英文). *Acta Bot Sin*, 2003, 45(1):76~81
- 4 Brummell DA. Differential expression of expansion gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol Biol*, 1999, 39:161~169
- 5 赵大中, 陈民, 种康等. 运用差异显示法分离冬小麦春化作用相关cDNA克隆. *科学通报*, 1998, 43(9):965~968
- 6 江树业, 吕蓓, 陈启锋等. 粳型光敏核不育水稻Hs-1可育和不育幼穗mRNA的差异表达分析. *农业生物技术学报*, 2001, 9(1): 69~71
- 7 谢晓东, 倪中福, 孟凡荣等. 小麦杂交种与亲本发育早期种子的基因表达差异及其与杂种优势关系的初步研究. *遗传学报*, 2003, 30(3):260~266
- 8 Lauren S. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(22): 4738~4739
- 9 侯义龙, 张开春, 吴禄平等. 果树组织中总RNA提取的新方法. *沈阳农业大学学报*, 2002, 33(2):122~125
- 10 Wan CY, Wilkins TA. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Anal Biochem*, 1994, 223, 7~12
- 11 蒋建雄, 张天真. 利用CTAB/酸酚法提取棉花组织总RNA. *棉花学报*, 2003, 15(3):166~167
- 12 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1995
- 13 Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196:80~83
- 14 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总RNA提取的要点与原理. *东北林业大学学报*, 2002, 30(2): 1~4
- 15 Clark MS编. 顾红雅, 瞿礼佳译. 植物分子生物学: 实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998
- 16 Song P, Yamamoto E. Differential Display of cotton transcripts. *Plant Mol Biol Rep*, 1995, 13: 174~181