

## 一种提取荔枝胚中总 RNA 的方法

张以顺<sup>1</sup> 向旭<sup>2</sup> 傅家瑞<sup>1</sup> 黄上志<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>中山大学生命科学学院, 广州 510275; <sup>2</sup>广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640

## A Method for Extraction of Total RNA from Litchi Embryo

ZHANG Yi-Shun<sup>1</sup>, XIANG Xu<sup>2</sup>, FU Jia-Rui<sup>1</sup>, HUANG Shang-Zhi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Life Science School, Zhongshan University, Guangzhou 510275; <sup>2</sup>Pomology Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640

**提要** 用改良的 Tris-硼酸法和 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 提取 3 个荔枝品种胚中的总 RNA, 经纯度和甲醛变性胶分析, 其  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.91~2.02 之间, 基本完整, 未检出明显降解。

**关键词** 荔枝; 总 RNA; 胚; 提取方法

植物组织中 RNA 常用的提取方法有胍法<sup>[1]</sup>、苯酚法<sup>[2]</sup>和十六烷基溴化胺法<sup>[3]</sup>, 但这些方法对荔枝胚等富含多糖、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<sup>[4]</sup>、猕猴桃<sup>[5]</sup>、香蕉<sup>[6]</sup>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, 荔枝便是一个典型的例子。

荔枝属顽拗性种子的植物, 其组织中含有大量的多酚类物质。这些物质在 RNA 的提取过程中容易被氧化而产生褐变, 能有效去除酚类物质的试剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)虽可在一定程度上防止褐变, 但也很难获得纯度高的 RNA。因此, 建立一种简便的适合荔枝胚总 RNA 的提取方法, 是研究荔枝胚败育分子机制的关键, 本文对 López 等<sup>[4]</sup>的方法进行改良, 引入 80% 的乙醇 (pH 5.0) 对荔枝胚进行预处理, 取得了满意的结果。另外, 我们还对一些植物 RNA 提取试剂盒进行了筛选, 用上海申能博彩生物科技有限公司生产的 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0, 提取荔枝胚中总 RNA 的效果也较好。现将结果报道如下。

## 材料与方法

### 1 材料

荔枝幼果取自广东省农业科学院果树研究所

大丰基地荔枝园, 品种包括大核品种黑叶、焦核品种妃子笑和桂味, 均是七至九年生的正常挂果果树。盛花期选择花量较大、花穗健壮的单株, 挂牌记录各花穗的雌花开放期, 从谢花后 20 d 开始, 每隔 10 d 取幼果一批, 置冰壶中带回实验室, 置于 -20 °C 低温冰箱中保存备用。

### 2 试剂

3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 购自上海申能博彩生物科技有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。

### 3 荔枝幼胚总 RNA 的提取

**3.1 改良的 Tris-硼酸法** 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Tris-硼酸缓冲液 (pH 7.5) 内含 0.05 mol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na、0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、4% SDS、2% β-巯基乙醇, 用硼酸调 pH 至 7.5。TSSE 溶液含 40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.5)、20 mmol·L<sup>-1</sup> NaAc、5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、1% SDS。其它试剂: 5 mol·L<sup>-1</sup> KAc (pH 6.5); 8 mol·L<sup>-1</sup> LiCl; 酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1; 80% 乙醇 (pH 5.0); 3 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH 5.2)。

称取 1 g 荔枝幼胚, 加入 0.2 mL β-巯基乙醇, 液氮中充分研磨成粉状, 然后加入 10 mL 于 -20 °C 下预冷过的 80% 乙醇 (pH 5.0), 继续研磨匀浆, 分装于 6~7 只 1.5 mL 干净离心管中, 于 4 °C

收稿 2003-05-26 修定 2003-11-24

资助 广东省自然科学基金项目 (010118)。

\* 通讯作者 (E-mail: lsshshz@zsu.edu.cn, Tel: 020-84110797)。

下以  $12\ 000 \times g$  离心 10 min; 上清液弃去, 每管分别加入 1 mL 于  $-20^\circ\text{C}$  下预冷过的 80% 乙醇, 悬浮,  $4^\circ\text{C}$  下以  $12\ 000 \times g$  离心 10 min; 上清液弃去, 每管分别加入 0.6 mL Tris-硼酸缓冲液, 悬浮沉淀, 再加入 1/4 体积的无水乙醇和 0.11 倍体积的 KAc ( $5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6.5), 混匀后, 每管再分别加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 冰上放置 5 min, 于  $4^\circ\text{C}$  下以  $12\ 000 \times g$  离心 10 min; 上清液转入 1.5 mL Ependorf 管中, 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 室温下以  $12\ 000 \times g$  离心 5 min; 重复上述步骤, 直至无白色界面物质; 取上清液, 加入 1/3 体积的  $8\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl, 置于  $-20^\circ\text{C}$  下过夜, 次日于  $4^\circ\text{C}$  下以  $12\ 000 \times g$  离心 20 min; 沉淀用 100 mL TSSE 溶液溶解, 室温下以  $12\ 000 \times g$  离心 2 min; 取上清液, 加入 1/10 体积的 NaAc ( $3\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇,  $-70^\circ\text{C}$  下放置 30 min, 后于  $4^\circ\text{C}$  下以  $12\ 000 \times g$  离心 20 min; 沉淀分别用 70% 乙醇和无水乙醇 1 mL 洗涤, 凉干, 用 20~30 mL 无菌水溶解, 样品贮藏于  $-70^\circ\text{C}$  下备用。

**3.2 试剂盒法** 用上海博彩生物科技有限公司生产的 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 直接提取荔枝幼胚中的总 RNA 也能获得比较满意的效果。具体操作步骤和注意事项可参照说明书进行。

#### 4 RNA 含量、纯度和完整性检测

将上述两种方法提取的 3 个荔枝品种胚的 RNA 产品适当稀释后, 用 Pharmacia 紫外分光光

度计检测, 记录  $A_{260}/A_{280}$  比值, 并按 Davey 等<sup>[7]</sup> 的方法对 RNA 进行甲醛变性胶电泳分析。

### 结果与讨论

从实验结果看, 改良后的 Tris-硼酸法和 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 法均能从黑叶、妃子笑、桂味等荔枝的胚中提取出高质量的 RNA。所提 RNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  在  $1.91 \sim 2.02$  之间 (表 1), 表明用这两种方法提取的样品可成功地去除多酚类物质、多糖、蛋白质及 DNA 的污染。提取的总 RNA 以 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶进行电泳的结果显示, 两种方法提取的总 RNA 完整性好, 无降解 (图 1)。我们用这两种方法提取的桂味和黑叶 RNA 进行抑制性消减杂交实验, 已成功克隆了 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因等几个与荔枝胚败育相关基因的 cDNA 片段, 并以其序列设计 3' 及 5' 引物, 利用 GeneRacer™ Kit 对两种方法提取的桂味 RNA 进行反转录, 又成功扩增了该基因的全长 cDNA 序列 (另文发表)。这说明用这两种方法提取得到的荔枝胚 RNA 完全适用于分子生物学研究。

表 1 荔枝胚中提取的总 RNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  值

荔枝品种	3S Kit	改良的 Tris-硼酸法
桂味	1.97	1.95
妃子笑	2.02	1.91
黑叶	19.8	1.93

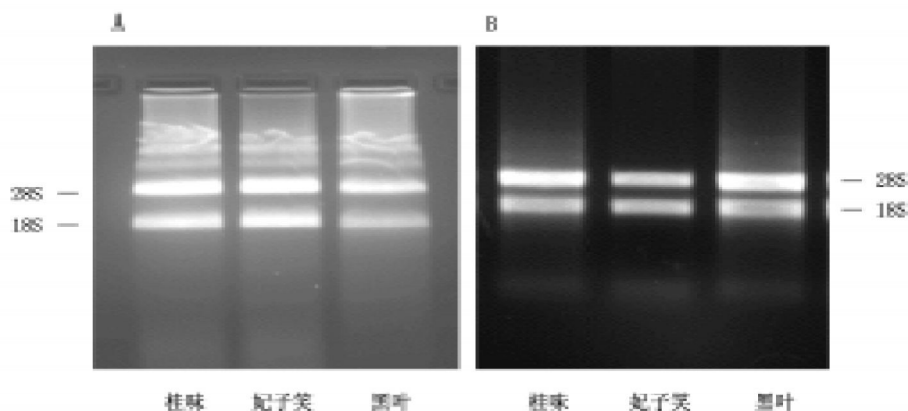


图 1 荔枝幼胚中提取的总 RNA 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳  
A: 用 3S 试剂盒法; B: 用改良的 Tris-硼酸法。

在荔枝胚 RNA 提取过程中, 多酚类物质不仅易被氧化产生褐变, 而且氧化后的酚类化合物会与 RNA 不可逆结合, 从而导致 RNA 活性丧失, 以及用苯酚、氯仿抽提时 RNA 的丢失<sup>[8]</sup>, 或形成不溶性复合物<sup>[9]</sup>。常规的去多酚类物质的方法是在提取 RNA 时加入一定量的 PVP, 但 PVP 在有效去除多酚类物质的同时, 亦携带走大量的 RNA, 以致 RNA 含量低于 LiCl 沉淀所必需的 RNA 浓度的下限, 而不能沉淀出 RNA<sup>[10]</sup>。改良后的 Tris-硼酸法用 80% 的乙醇 (pH 5.0) 对荔枝胚进行预处理, 可去除大部分多酚类物质; 基于硼酸可以与酚类化合物依靠氢键形成复合物, 从而抑制酚类物质的氧化及其与 RNA 结合的特性, 成功地排除了荔枝胚 RNA 提取过程中多酚类物质的干扰; 再通过 KAc 与无水乙醇的联用沉淀去多糖。这样, 在提取过程中不加 PVP, 即可取得很好的效果。用 3S 柱式细胞及组织总 RNA 抽提试剂盒 V2.0 法提取荔枝胚的总 RNA 有几点值得注意: (1) 荔枝幼胚的质量不能超过 150 mg。过量的材料将会破坏系统的缓冲能力, 无法获得高质量的 RNA, 甚至无 RNA。(2) 将样品转移到无菌的 Eppendorf 管中后, 要保证样品未融化。这主要是降低各种酶的活性, 防止多酚类物质被氧化及与 RNA 不可逆结合。(3) 加入 RLT 溶液到样品后, 不能按说明书中要求的在 56℃ 水浴中保温的程序去操作, 放置在

室温下 3~5 min 即可。56℃ 水浴中保温可导致荔枝胚中的淀粉糊化, 离心时堵塞柱子。

### 参考文献

- 1 Chirgwin JM, Przybyla AE, Mac Donald RJ et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochem*, 1979, 18:5294~5301
- 2 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天等. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995. 77~78
- 3 Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res*, 1980, (8): 4321~4325
- 4 López-Gómez R, Gómez-Lim MA. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using mango mesocarp. *Hortic Sci*, 1992, 27(5): 440~442
- 5 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. *植物生理学通讯*, 1998, 34(5): 371~373
- 6 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
- 7 Davey RB, Wallia KA, Boweing K. Adhesive contract madianan update on graft fixating and burn scar management. *Burns*, 1991, 17(4): 313~315
- 8 Schneiderbauer A, Sandermann HJ, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal Biochem*, 1991, 197: 91~95
- 9 Graham GC. A method for extraction of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 32~37
- 10 Manning K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal Biochem*, 1991, 195: 45~50