

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法

杜中军 徐兵强 黄俊生\* 王家保 徐立

中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 热带生物技术研究所, 海口 571001

## An Improved Method for Extracting Intact Total RNA from Mango Tissues Rich in Polysaccharides

DU Zhong-Jun, XU Bing-Qiang, HUANG Jun-Sheng\*, WANG Jia-Bao, XU Li

State Key Laboratory for Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101

**摘要** 2次用0.25体积无水乙醇和0.11体积的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钾溶液(pH 4.8)去除多糖,并用硼酸和聚乙烯吡咯烷酮去除多酚,成功地从0.2~0.3 g富含多糖和多酚的芒果嫩绿色、砖红色和转绿期的叶片以及果皮和果肉组织中提取到完整总RNA,所提取的RNA在体外能成功进行反转录合成cDNA。此法的全过程共需要22~24 h。

**关键词** 多糖; 芒果; RNA提取

从植物组织中提取纯度高、完整性好的RNA是进行植物分子生物学研究的必要前提和关键。植物组织中的多酚、多糖和蛋白质以及其他次生代谢物质影响RNA的提取<sup>[1]</sup>。有关富含多糖的猕猴桃<sup>[2]</sup>、葡萄<sup>[3]</sup>、紫丁香和糖槭<sup>[4]</sup>等植物组织中总RNA的提取已有所报道,但从富含多糖的芒果组织中提取总RNA的报道尚未见。我们在采用已有方法提取总RNA时发现,芒果组织中过多的多糖形成难溶胶状物,在LiCl沉淀之后无法进行下一步操作,其原因是芒果组织中多糖含量远远高于一般植物。为此,本文在López-Gómez等<sup>[5]</sup>所报道方法的基础上,改进并提出了一种能从富含多糖的芒果组织中提取完整总RNA的方法,并对一些实验操作细节作了总结,现报道如下。

## 材料与方法

## 1 材料

以我院种质资源圃的芒果(*Mangifera indica* L.)为试材,分别取嫩绿色、砖红色、转绿期叶片以及果皮和果肉组织。

## 2 方法

**2.1 RNase的灭除** 所用的研钵、药匙和剪刀用75%的工业酒精燃烧处理;吸头、离心管、LiCl和醋酸钾溶液以及蒸馏水用0.1%焦碳酸二乙酯

(DEPC)浸泡24 h后高温灭菌;70%乙醇用DEPC处理过的玻璃仪器和DEPC水配制;由于提取缓冲液中含有去污剂SDS,故用灭菌蒸馏水配制后进行高温灭菌即可;实验过程中始终戴手套和口罩,以避免皮肤、汗水和呼吸带来的RNase。

**2.2 琼脂糖凝胶电泳** 采用DEPC水配制pH 8.0的Tris-硼酸-EDTA电泳缓冲液TBE,电泳槽用 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH浸泡4 h以上,电压为 $10\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

**2.3 提取方法** 提取缓冲液由下述组成:2%(W/V) SDS、2%~5%(W/V)聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-40、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA、 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸调节pH到7.5,然后高温灭菌。

预先用75%的工业酒精燃烧处理研钵、药匙和剪刀各1,置冰中冷却后,再连续2次加入液氮以冷却研钵、药匙和剪刀。

预先称量估计0.3 g样品的多少,然后根据估计直接剪取约0.3 g样品放入经液氮冷却的研钵中,立即加入液氮,再加入约2%(W/V)的PVP-40,研磨样品至细粉状,用燃烧处理并液氮冷却后的药匙将细粉状样品转入到预先在室温下加入

收稿 2004-07-26 修定 2004-10-27

\*通讯作者(E-mail: dwlizj@yahoo.com.cn, Tel: 0898-66890763)。

600  $\mu\text{L}$  提取缓冲液的 2 mL 离心管中, 然后在通风橱中立即加入 30 L 约 5% 体积巯基乙醇, 0.25 体积无水乙醇和 0.11 体积的  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸钾溶液 (pH 4.8), 旋涡混匀 1 min; 立即加入 0.8 体积的氯仿/异戊醇 (49:1), 混匀后于冰上静置 5 min, 再在  $4^\circ\text{C}$  下以  $20\,000\times g$  离心 10 min; 取上清液, 加入等体积酚酸/氯仿 (1:1), 混匀后于  $4^\circ\text{C}$  下以  $20\,000\times g$  离心 10 min; 取上清液, 再加入 0.25 体积无水乙醇, 等体积氯/异戊醇 (49:1) 混匀,  $4^\circ\text{C}$  下以  $20\,000\times g$  离心 10 min; 取上清液, 加入 0.6 体积  $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl, 使其终浓度为  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  下放置 8 h 后, 于  $4^\circ\text{C}$  下以  $20\,000\times g$  离心 90 min; 用  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl 洗涤 2 次, 用 600  $\mu\text{L}$  的 DEPC 水重新溶解沉淀; 加入 0.8 体积的氯仿, 混匀后  $4^\circ\text{C}$  下以  $18\,000\times g$  离心 10 min; 加入  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸钾溶液 (pH 4.8) 使其终浓度为  $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 用 2 体积无水乙醇沉淀,  $-20^\circ\text{C}$  放置过夜或 8 h 以上; 并于  $4^\circ\text{C}$  下以  $18\,000\times g$  离心 20 min; 用 70% 乙醇洗涤 2 次, 以 50  $\mu\text{L}$  的 DEPC 水重悬 RNA 或以乙醇沉淀的形式于  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱保存。

**2.4 cDNA 的合成** 采用大连宝生物工程有限公司生产的 AMV 反转录酶, 用 DNA 酶消化后的总 RNA 为模板, 在 0.5 mL 离心管中加入 2  $\mu\text{g}$  模板总 RNA、4  $\mu\text{L}$  5 倍缓冲液、2  $\mu\text{L}$  dNTP 混合液各  $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、20 U 核糖核酸酶抑制剂、50 pmol 的 Oligo(dT)<sub>18</sub> 引物、10 U 的 AMV 反转录酶, 加 DEPC 水至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 轻轻搅拌后于室温放置 10 min 后移入  $42^\circ\text{C}$  恒温槽中保温 1 h, 冰浴冷却 2 min。然后以合成的 cDNA 为模板用芒果乙烯受体基因设计的特异引物进行 PCR 反应。5' 端引物为: 5' AAGACTACACTTGTGAGCTAGGAG 3'; 3' 端引物序列为: 5' AAAGATCATGAGCACACAGC 3'。

## 实验结果

### 1 RNA 质量分析

测定不同组织总 RNA 的  $\text{OD}_{260}$  和  $\text{OD}_{280}$  值的结果 (表 1) 表明, 嫩绿色叶片总 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值大于 2.0, 显示其纯度最高, 产量也最高。这可能是由于旺盛代谢幼嫩组织中次生代谢物质较少, RNA 含量本身较高之故。但砖红色叶片的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值最低为 1.73, 实验表明主要是由

表 1 芒果不同组织总 RNA 的 OD 值

材料	$\text{OD}_{260}$	$\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	产量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)
嫩绿色叶片	0.641	0.272	2.36	320.5
砖红色叶片	0.452	0.261	1.73	226.0
转绿期叶片	0.431	0.235	1.83	215.5
果皮	0.393	0.217	1.81	196.5
果肉	0.377	0.192	1.96	188.5

于砖红色色素较难去除所致。转绿期叶片、果皮和果肉的 RNA 产量分别为 215.5、196.5 和 188.5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 其 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值分别为 1.83、1.81 和 1.96。

另外, 对芒果 5 种不同组织中所提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析 (图 1) 发现, 25S 和 18S 泳带清晰, 没有弥散现象, 表明提取的 RNA 较完整, 没有发生明显的降解。

### 2 合成的 cDNA 用作 PCR 模板

分别以不同芒果组织所提取的总 RNA 为模板反转录, 以合成的 cDNA 为模板, 采用芒果乙烯受体基因设计的特异引物进行 PCR 反应, 得到乙烯受体基因片段与预期片段的大小 (520 bp) 相符 (图 2), 说明获得的 RNA 可用于反转录反应。

## 讨论

芒果组织中不仅含有大量的多酚, 还含有大

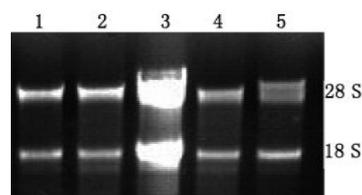


图 1 芒果不同组织总 RNA 电泳图谱

1~5 分别代表转绿期、砖红色、嫩绿色叶片及果皮和果肉。图 2 同此。

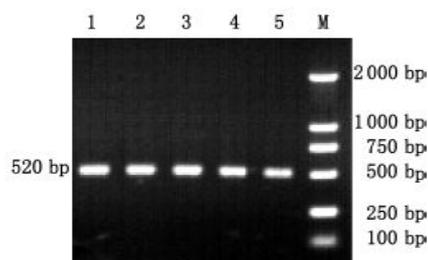


图 2 芒果不同组织的总 RNA 电泳图谱

量的多糖, 实验去除较为困难, 影响了高质量 RNA 的获得。去除多糖的方法有低浓度乙醇沉淀法<sup>[6]</sup>和醋酸钾沉淀法<sup>[7]</sup>, 提高缓冲液中 NaCl 浓度也有助于去除多糖<sup>[8]</sup>。Su 和 Gibor<sup>[9]</sup>在去除褐藻中的多糖时发现, 只有结合使用乙醇和醋酸钾时效果才佳。本文采用 López-Gómez 等<sup>[5]</sup>的方法, 用 0.25 体积无水乙醇和 0.11 体积的 5 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钾溶液可以去除多糖杂质。我们在利用该法时发现, 此法能较为彻底地去除多酚, 但得到的沉淀在经过 3 mol·L<sup>-1</sup> LiCl 洗涤后, 由于多糖的存在, 沉淀很难溶解。考虑到提取液中已经含有大量醋酸钾, 因此在以酚酸/氯仿抽提后, 再加入 0.25 体积无水乙醇, 利用无水乙醇和醋酸钾结合的方法, 可以克服上述沉淀以 3 mol·L<sup>-1</sup> LiCl 洗涤后不易溶解的缺点。在沉淀溶解后再以氯仿提取, 即可较彻底地去除蛋白质等杂质。

本文用酒精燃烧处理研钵、药匙和剪刀, 能避免很多方法中用 130℃ 或 180℃ 长时间烘烤的缺点, 可节省时间和减少能耗, 避免操作中的污染和 RNase 去除不彻底以及遗留核酸交叉污染的缺点; 另外, 预先连续 2 次以液氮冷却研钵和药匙, 可以保证组织一旦放入研钵中后就处于冷冻环境, 也可保证研钵处于相对较长时间的冷冻状态, 再在加样后浇 1 次液氮即可足以保证样品直到转移后都处于低温状态, 从而避免由于液氮冷冻不足而导致温度回升以致内源 RNase 对 RNA 降解和多酚氧化, 以及研磨期间再次加液氮引起粉末飞溅致使样品损失和交叉污染的后果; 还有,

预先称量估计后直接剪取, 可避免由于样品称量再研磨所导致的褐变; 本法在研磨过程中增加聚乙烯吡咯烷酮可避免芒果组织的氧化, 去除多酚。加入样品后再加 5% 体积的巯基乙醇则可避免提取液在贮存过程中和转移样品时巯基乙醇的挥发, 从而增加了实验的安全性。用 10 V·cm<sup>-1</sup> 电压, 在 20 min 左右完成电泳, 可有效避免 RNA 在电泳过程中的降解, 降低 RNA 的变性程度。

### 参考文献

- 1 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策. 生物技术通报, 1999, (1): 36~39
- 2 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
- 3 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
- 4 王玉成, 杨传平, 姜静. 紫丁香、糖槭总 RNA 的快速提取方法. 东北林业大学学报, 2001, 29(6): 90~91
- 5 López-Gómez R, Gómez-Lim MA. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. HortSci, 1992, 27: 440~442
- 6 Tesniere C, Vayda ME. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. Plant Mol Biol Rep, 1991, 9: 242~251
- 7 Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 198~203
- 8 Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. BioTech, 1992, 13: 52~56
- 9 Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae. Anal Biochem, 1988, 174: 650~657