

介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法

赵双宜, 吴耀荣, 夏光敏

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要:在液氮中研磨小麦幼叶和不同发育时期的种子, 经含 0.1% SDS 和 0.1% 十二烷基肌氨酸钠(LDS)的尿素缓冲液裂解后, 醋酸钠和氯仿沉淀变性蛋白质, 异丙醇沉淀核酸, 溶解后经 2.5mol/L LiCl 沉淀总 RNA, 洗涤后即可得到高质量的总 RNA, 其 OD_{260}/OD_{280} 为 2.05~2.10, 28S 和 18S RNA 带清晰, 叶片总 RNA 还可得到 23S 和 16S RNA 带, 产率可达 5mg RNA/10g 材料。当使用含 1% SDS 和 1% LDS 的尿素缓冲液裂解材料时, 则可用于 DNA 的分离提取, 其分子大小可达 50~100kb 以上。

关键词:植物 RNA 分离提取; 尿素; 氯化锂

中图分类号: R522

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)03-0337-02

Introduction of a Simple and Effective Method for Plant Total RNA Isolation

ZHAO Shuang-yi, WU Yao-rong, XIA Guang-min

(School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Wheat leaf and seeds at different development stages had been squashed in liquid nitrogen, then lysed by urea buffer which contains 0.1% SDS and 0.1% LDS, denatured protein had been removed by NaAc and chloroform precipitation, total RNA was further purified by LiCl. The RNA we obtained had sharp bands of 28S and 18S after agarose gel electrophoresis, 23S and 16S RNA bands can also be seen clearly in leaf RNA extract, the value of OD_{260}/OD_{280} of RNA was 2.05~2.10. 5mg RNA can be isolated from 10g leaf of wheat. This method can also be used in high molecular weight DNA isolation but the concentration of SDS and LDS must be increased to 1%.

Key words: plant RNA isolation; urea; LiCl

在对植物材料的 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)、Northern 印迹、3'-RACE 和 5'-RACE, 特别是高质量 cDNA 文库的构建需要从不同发育阶段的组织中提取高质量的 RNA, 而未降解的总 RNA 的提取是其首要的条件^[1], 虽然现在可以利用异硫氰酸胍、盐酸胍和商品化的试剂盒分离植物总 RNA, 但异硫氰酸胍和试剂盒价格昂贵, 且操作稍有不慎, 所分离的 RNA 就可能发生降解, 造成 28S 和 18S 带模糊和扩散, 难以满足实验的要求。作者在利用尿素缓冲液提取 DNA 的过程中, 由于变性剂浓度的降低, 而得到了大量未降解的 RNA, 经修改后已利用该方法从小麦幼叶和不同发育时期的种子中得到大量高质量的总 RNA, 并已成功用于构建 cDNA 文库。现将实验步骤报道如下:

1 材料和方法

1.1 实验材料

小麦(鲁麦 14, 辉县红)幼叶和不同发育时期的小麦种子。

1.2 实验方法

①取 5~10g 材料放入研钵中, 加入过量液氮, 迅速研磨成均匀的粉末(在研磨过程中, 保证材料始终浸在液氮中, 研磨约 30min 左右)。

②待液氮自然挥发干净后, 将材料转入 100ml 的离心管中, 加入 6~8 倍体积的裂解缓冲液 I, 轻轻搅拌后, 0℃ 冰浴 20min。

收稿日期: 2001-10-10; 修回日期: 2002-01-11

基金项目: 国家转基因专项(J99-A-037)农杆菌介导小麦转化技术的研究

作者简介: 赵双宜(1963-), 男(汉), 陕西省西安市人, 博士学位, 副教授, 植物遗传学专业。电话: (0531)8564123, E-mail: syzhao4123@sina.com

③12 000r/min,4℃离心 15min。

④取上清液,加 1/3 体积的 3mol/L 醋酸钠(pH 5.3),1/5 体积的氯仿-异戊醇(24:1),轻轻混匀,0℃冰浴 20min (加 5 倍体积裂解缓冲液 II 溶解沉淀以提取 DNA)。

⑤12 000r/min,4℃离心 15min。

⑥取上清,加入等体积冰浴冷却的异丙醇,混匀且冰浴 10min。

⑦5 000r/min,4℃离心 10min。将沉淀溶于 5ml 含有 0.1% SDS 的 TE 缓冲液中,加入 8mol/L LiCl 使终浓度至 2.5mol/L,冰浴 3hr 或 4℃过夜。

⑧12 000r/min,4℃离心 10min。

⑨70%乙醇洗涤沉淀两次,空气干燥 10min 后,溶于 DEPC 处理的 TE 或水中。加入 1/10 体积 10% 的 SDS,重复第④~⑥步进一步除去蛋白质。-70℃冰箱保存(或 70%乙醇,-20℃冰箱长期保存)。

裂解缓冲液 II 处理沉淀经离心、取上清和异丙醇沉淀(同 RNA 提取方法②~⑥),用玻璃棒搅高分子质量的 DNA,经 70%乙醇洗涤后溶于 TE 缓冲液中。

裂解缓冲液 I 成分:7mol/L 尿素,50mmol/L Tris-Cl pH8.0,10mmol/L Na₂EDTA, pH8.0,3.5mol/L NaCl,6.25%Tris 饱和酚 pH8.0,0.1% SDS+0.1% LDS。

裂解缓冲液 II 成分:7mol/L 尿素,50mmol/L Tris-Cl pH8.0,10mmol/L Na₂EDTA, pH8.0,3.5mol/L NaCl,6.25%Tris 饱和酚 pH8.0,1% SDS+1% LDS。

2 结果与讨论

本方法可从大量材料中分离提取高质量总 RNA(见图 1),也适用于微量材料(100mg 左右)。从叶片中也可同时得到 23S、16S 等 RNA 分子。电泳结果显示:幼叶材料有 4~5 条清晰的 RNA 带,种子材料中 28S 和 18S 带清晰,因 LiCl 沉淀小分子 RNA 不完全^[2],5S RNA 的含量较小。该方法利用了高浓度的尿素代替了异硫氰酸胍、盐酸胍和 Trizol 等昂贵试剂,因而成本低,且所需溶液和器材无需特殊处理。用含 0.1% SDS 和 0.1% LDS 裂解液处理材料时,细胞发生部分裂解,DNA 和蛋白质不能完全分离而留在细胞中,当变性剂浓度增加到 1% 时,细胞完全裂解,DNA 就与变性蛋白质分离而进入溶液。本方法提取的 RNA 纯度很高,OD_{260/280} 为 2.05~2.10,而一步法所提取的 RNA 因为微量异硫氰酸胍较难去除干净,OD_{260/280} 为 1.75~1.8^[3~4]。为防止 RNA 降解,我们建议所分离的 RNA 最好保存在 70%乙醇或 DEPC 处理的 TE 或水中。所分离的 DNA 分子量可达 50~100kb(见图 2),且无蛋白质和 RNA 的污染,可以进行正常酶切,克隆。

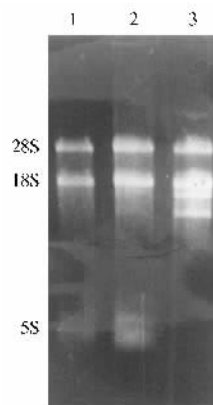


图 1 所分离的小麦 RNA 电泳结果

1 和 2: 种子 RNA; 3: 幼叶 RNA。

Fig. 1 RNA Electrophoresis of wheat

1, 2: seed RNA; 3: leaf RNA.

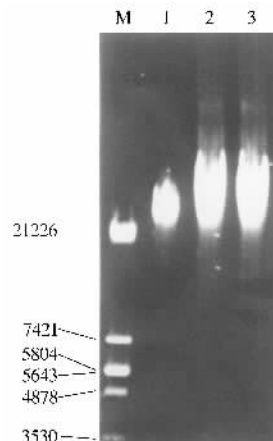


图 2 所分离小麦幼叶 DNA 电泳结果

M: 分子质量标准 λ /EcoRI; 1: λ DNA; 2, 3: 幼叶 DNA。

Fig. 2 DNA Electrophoresis of wheat leaf

M: MW marker λ /EcoRI, 1: λ DNA; 2, 3: leaf DNA.

参考文献(References):

- [1] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular Cloning[M]. A Laboratory Manual 2nd New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 343~361.
- [2] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995, 77~81.
- [3] 卢圣栋, 李尹雄, 胡晓年. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993, 135~149.
- [4] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅. 基因工程实验技术[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1997, 197~199.