

适合 RT-PCR 的苹果芽 RNA 快速提取方法研究

张立莎, 彭建营* (河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘要 [目的] 从苹果单芽中高效、快速提取 RNA, 为后续分子生物学研究奠定基础。[方法] 分别以苹果品种新红星、嘎拉和富士的单芽为材料, 用改良 SDS 法提取 RNA, 并经过甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和 RT-PCR 检测 RNA 质量。[结果] 研究出一种高效、快速的苹果单芽 RNA 提取方法, 该方法能在 2.5 h 内得到完整的 RNA, 经 RT-PCR 检验, 能获得理想的目的片段。[结论] 该方法稳定可靠, 适合苹果单芽 RNA 提取。

关键词 苹果芽; RNA 提取; RT-PCR

中图分类号 S661.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-11885-01

Study on a Rapid Extraction Method of RNA from Apple Bud for RT-PCR

ZHANG Li-sha et al (College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract [Objective] The study aimed to establish an effective and rapid protocol for RNA extraction from single apple bud, which was beneficial to subsequent molecular biological research. [Method] RNA from apple cultivars 'Starkrimson', 'Gala' and 'Fuji' buds was extracted by modified-SDS method, and RNA was detected by formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis and RT-PCR. [Result] An effective and rapid RNA extraction protocol was established, which could be completed in 2.5 h. RNA extracted through this protocol was detected by RT-PCR and an ideal target fragment was obtained. [Conclusion] The method is stable and reliable, and suitable for RNA extraction from single apple bud.

Key words Apple bud; RNA extraction; RT-PCR

植物组织总 RNA 的提取是进行分子生物学研究的重要前提, 随着人们对模式植物花芽分化分子机理研究的不断深入, 苹果作为重要的果树, 对其花芽分化的分子机理的研究也渐渐展开。对于不同的植物材料, RNA 提取方法也不尽相同, 内源 RNase、酚类化合物、多糖及色素的去除是苹果芽 RNA 提取的关键。现有的 RNA 提取方法大都比较费时, 试剂盒方法用时较短但成本太高, 对于特殊材料难以满足其后续分子生物学的需要。目前尚没有一种针对适合 RT-PCR 的苹果单芽 RNA 提取方法的报道, 笔者以处于花芽分化期的苹果芽为材料, 参考相关文献^[1-3], 研究出一种简单、快速的 RNA 提取方法, 以期为后续分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 分别采集花芽分化期新红星、嘎拉、富士 3 个苹果 (*Malus domestica* Borh.) 品种的芽, 取单芽用锡纸包裹, 液氮冷冻后 -70 °C 保存备用。

1.2 RNA 提取方法 取用锡纸包裹的单芽置于含液氮的容器中, 捣碎后, 迅速转入 1.5 ml 离心管中, 每管提前加 65 °C 预热 10 min 的 0.6 ml 提取缓冲液 (150 mmol/L Tris-borate, 50 mmol/L EDTA, 2% SDS, 2% 巯基乙醇) 及与试材等体积的 PVPP, 用手剧烈摇动, 充分混匀; 于 65 °C 水浴 10 min; 每管加入 1/11 体积 5 mol/L CH₃COOK (pH 值为 6.0)、1/4 体积 -20 °C 预冷的无水乙醇, 轻轻混匀, 每管加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 轻轻颠倒混匀, 4 °C 条件下 12 000 r/min, 离心 10 min; 吸取上清于新离心管中, 重复抽提一次。上清液中加入等体积的异丙醇, 室温下沉淀 10 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min。沉淀用适量 DEPC 水溶解, 加入 1/3 体积 LiCl (8 mol/L), 使 LiCl 终浓度为 2 mol/L, -20 °C

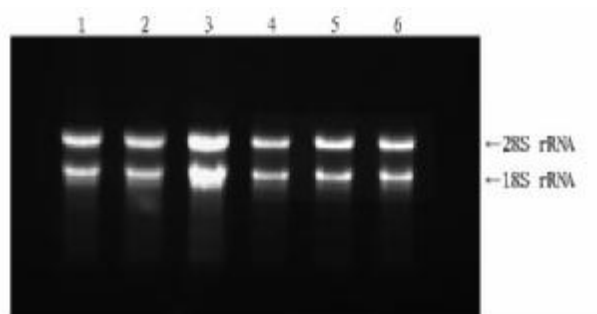
沉淀 20 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min, 离心 20 min; 弃上清, 70% 乙醇清洗沉淀, 于超净工作台晾干, 加 10 μl DEPC 水完全溶解。

1.3 电泳检测 RNA 质量 采用 RNA 变性电泳法检测 RNA 质量。①凝胶制备。称取 0.4 g 琼脂糖, 加入 37.6 ml 1 倍 MOPS 缓冲液, 加热溶解并降温到 60 °C, 加入 2.4 ml 37% 的甲醛, 混合均匀, 倒入电泳槽中制胶。②RNA 模板准备。制备上样缓冲液 (10 倍 MOPS 缓冲液 0.1 μl/μl, 甲酰胺 0.68 μl/μl, 甲醛 0.22 μl/μl, 适量 EB), 取 1 μl RNA 加 3 μl 上样缓冲液, 混合后 65 °C 加热 10 min, 将样品加入点样孔, 在 5 V/cm 的电压下电泳 40 min, 结果照相保存。

1.4 RT-PCR 取 1 μl RNA, 以 oligo dT (15) 为引物进行反转录, 过程按 AMV 反转录酶 (promega) 说明书进行。以反转录得到的 cDNA 为模板, 进行 *AFL2* 基因片段的特异性扩增^[4], PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 苹果单芽 RNA 的提取和电泳检测 利用改良的 SDS 法提取 3 个苹果品种单芽 RNA, 取 1 μl 所提取的 RNA 进行 1% 琼脂糖变性凝胶电泳, 结果如图 1 所示, 由于单芽之间大小



注: 1,2 为新红星, 3,4 为嘎拉, 5,6 为富士。下同。

Note: 1,2: Starkrimson; 3,4: Gala; 5,6: Fuji. The same as below.

图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

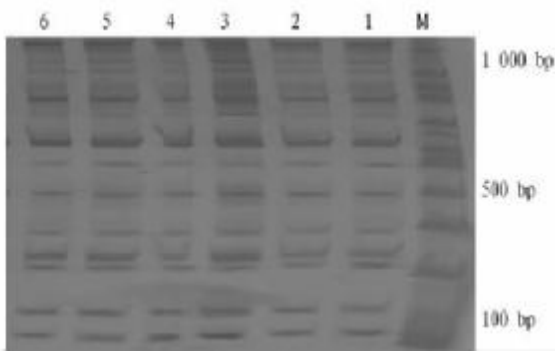
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis results of RNA

基金项目 河北省自然科学基金项目 (C2007000448)。

作者简介 张立莎 (1984 -), 女, 河北赞皇人, 硕士研究生, 研究方向: 果树发育分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2009-04-28

(下转第 11894 页)



注:1~6均为马铃薯样品。

Note:1-6 are potato samples.

图6 EM4和ME4引物组合的SRAP扩增谱带

Fig.6 SRAP amplification bands of EM4 and ME4 primers

用量过高非特异性产物增加,过低就没有足够的 Mg^{2+} 来激活 *Taq* 酶,最终导致扩增产物减少甚至失败。dNTP 用量过高,扩增时错误掺入率也增加,过低时,反应中过早消耗完,直接影响扩增产物的浓度。引物用量过低,引物与模板的结合率低,扩增反应过早终止,从而导致扩增图谱无产物,而过高则会引起引物与模板的非特异性配对,造成扩增背景模糊。

该研究确立的马铃薯大西洋 SRAP-PCR 反应体系是:模板 DNA 1.0 μ l (50 ng/ μ l), *Taq* 酶 1.7 μ l (1 U/ μ l), 引物对

1.5 μ l (1 μ mol/L) \times 2, $MgCl_2$ 2.4 μ l (25 mmol/L), dNTPs 0.6 μ l (10 mmol/L), 10 \times Buffer 3.0 μ l, ddH₂O 18.3 μ l, 总体积为 30 μ l。

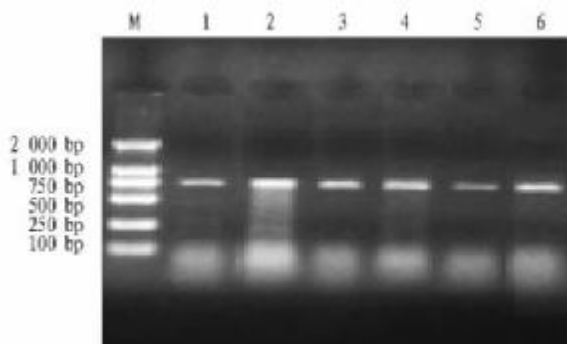
参考文献

- [1] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [2] RUIZ J J, GARCIA-MARTINEZ S, PICO B, et al. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers [J]. J Am Soc Horticul Sci, 2005, 130 (1): 88-94.
- [3] 吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 等. 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (6): 841-845.
- [4] 赵新亮, 郭霞光. 利用 SRAP 分子标记划分玉米自交系类群初探 [J]. 西北农业学报, 2007, 16 (3): 77-81.
- [5] 李严, 张春庆. 西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析 [J]. 园艺学报, 2005, 32 (4): 643-647.
- [6] 武志朴, 杨文香, 刘大群. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28 (3): 66-69.
- [7] 任羽, 王得元, 张银东. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2004, 2 (5): 689-693.
- [8] CLARK M S. 植物分子生物学: 实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [9] 杨志平. 马铃薯 (*S. tuberosum* L.) 种质资源的遗传多样性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [10] 雷剑, 柳俊. 一个与马铃薯青枯病抗性连锁的 SRAP 标记筛选 [J]. 中国马铃薯, 2006, 20 (3): 150-153.
- [11] 钱文成, 张桂华, 陈飞雪, 等. SRAP 在检测黄瓜基因多态性中的特征 [J]. 遗传, 2006, 28 (11): 1435-1439.

(上接第 11885 页)

各异,导致 RNA 浓度有所不同。从质量上来说,所提取 RNA 条带清晰、不拖尾、没有杂质的污染,28S rRNA 量约是 18S rRNA 的 2 倍, RNA 基本没有降解,品种间没有差异,说明该方法适合苹果芽 RNA 的提取。

2.2 RT-PCR 利用所提的 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应,产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果如图 2 所示。以该方法所提取的 RNA 反转录以后的 cDNA 为模板,成功扩增出约 700 bp 的 *AFL2* 基因特异条带,说明所提取 RNA 能够满足 RT-PCR 的需要。



注:M 为 DL2000 Marker。

Note:M stands for DL2000 Marker.

图2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The agarose gel electrophoresis results of RT-PCR products

3 讨论

RT-PCR 要求模板 RNA 完整没有降解,且不含蛋白质、多糖等,内源 RNase、酚类化合物、多糖及色素的去除是高质量苹果芽 RNA 提取的关键。试验结果表明,SDS 和氯仿能使蛋白变性并通过离心去除;硼酸、PVPP 可以与酚类化合物形成复合物,抑制酚类物质的氧化,从而抑制了其氧化物与 RNA 结合;低浓度乙醇和高浓度醋酸钾共同作用可以有效沉淀多糖^[5],且采用氯化锂沉淀 RNA 既能防止多糖与其产生共沉淀,又能使色素溶解^[6]。另外,试验流程短,简化了沉淀步骤和时间,在一定程度上避免了 RNA 的降解;试验方法相对简单,药品均由自己配制,降低了 RNA 提取的成本,适合大批量提取;采用锡纸包裹单芽将其击碎转管的方法又在最大程度上保留了芽子的全部遗传信息。

参考文献

- [1] LEPZ GMEZ R, LIM M A. A method for extracting RNA with modified Gomez method [J]. Hortscience, 1992, 27: 440-442.
- [2] CLAUDIO M, PAMELA G, MIRKO M, et al. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues [J]. Molecular Biotechnology, 2004, 26: 95-99.
- [3] 杨传平, 姜静, 那东辰, 等. 白桦花芽 RNA 的快速提取 [J]. 东北林业大学学报, 2002 (3): 1-4.
- [4] 曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 等. 苹果 LEAFY 同源基因的 cDNA 克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2003, 30 (3): 267-271.
- [5] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策 [J]. 生物技术通报, 1999 (1): 36-39.
- [6] 裴东, 谷瑞生. 几种提取木本植物中 RNA 方法的比较和改进 [J]. 植物生理学通讯, 2002 (4): 362-365.