

# 改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总 RNA

姚红艳 赵双宜\* 夏光敏

(山东大学生命科学院 济南 250100)

**摘要** 为了分离提取成熟小麦种子总 RNA, 去除多糖等杂质的严重干扰, 本实验对尿素-氯化锂分离 RNA 的方法做了三个方面的改进: 一、去除成熟种子的胚(含大量麦胚凝集素等糖蛋白), 发现裂解物的黏稠度明显下降; 二、在裂解粗提物中加入 CTAB 至终浓度为 0.2%, 可去除大部分多糖; 三、异丙醇沉淀 RNA 之后, 充分溶解, 离心去除残留的不溶性多糖等杂质。结果表明: 所提取的成熟小麦种子 RNA 的纯度和产率都有明显提高。

**关键词** 小麦成熟种子 RNA 提取 尿素-氯化锂 CTAB

为了对不同发育时期的小麦种子蛋白进行分子生物学方面的研究, 其前提是获得高质量的 RNA, 即需要 RNA 纯度高、完整性好。由于植物种子中含有大量酚类化合物、多糖以及次生代谢产物, 而且在果实成熟时 RNase 的活性较高, 严重干扰了 RNA 的提取。另外, 同种植物的不同组织, 其 RNA 提取方法会有很大的差异<sup>[1]</sup>; 基因型不同的植物同种组织材料, 合适的 RNA 提取方法也可能不一样<sup>[2]</sup>。因植物组织材料不同, 植物 RNA 提取方法需要通过实验验证。

尿素-氯化锂沉淀 RNA 的方法具有简便、经济和高效等优点, 用此方法来提取小麦幼叶和早期发育种子材料 RNA, 无论在产率还是纯度等方面均十分理想。然而, 该方法对植物接近成熟的种子 RNA 提取有一定难度, 因为种子中多糖含量较高, 此外还有大量的次生代谢产物, 使得 RNA 的提取受到严重干扰。因此, 在实验中将尿素-氯化锂法加以改进, 使之更适合于接近成熟小麦种子 RNA 的提取, 为以后进一步的工作创造了条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

(1) 体细胞不对称杂种 9 号不到灌浆期的种子(开花后 15~30 天)

(2) 裂解缓冲液: 7mol/L 尿素, 50mmol/L Tris-Cl

pH 8.0, 10mmol/L

Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0, 0.35mol/L NaCl, 6.25% 饱和酚, 0.1% SDS + 0.1% LDS

(3) 3mol/L 醋酸钠 pH 5.3

氯仿/异戊醇: 24:1

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB): 2% (w/v)

70% 乙醇(DEPC 处理过的水配制)

### 1.2 实验方法

(1) 分别取 5~10g 去胚和不去胚材料放入研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成均匀的粉末, 液氮挥发后转入冰上预冷的离心管, 向离心管中加入 6~8 倍体积的裂解缓冲液, 轻轻搅拌使充分混匀后, 0℃ 冰浴 20min。

(2) 于 4℃, 12000rpm, 离心 15min, 将上清转入另一离心管中, 加入 CTAB 使终浓度至 0.2%, 混匀, 0℃ 冰浴 1h; 加入 1/3 体积的醋酸钠, 1/5 体积的氯仿-异戊醇, 轻轻混匀, 0℃ 冰浴 20min。

(3) 于 4℃, 12000rpm, 离心 15min, 将上清转入新的离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 混匀且冰浴 10min; 于 4℃, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 沉淀溶于 5ml 含 0.1% SDS 的 DEPC 水中; 4℃, 5000rpm, 离心 10min, 小心转移上清于 1.5ml eppendorf 管中, 加入 8mol/L LiCl 使终浓度至 2.5mol/L, 冰浴 3h 或 4 过夜。

(4) 于 4℃, 12000rpm, 离心 10min, 沉淀用 70% 乙醇洗两遍, 稍微晾干后, 溶于 DEPC 处理水中, 加入 1/10 体积 10% SDS; 再加入 1/3 体积醋酸钠, 1/5 体积氯仿/异戊醇, 轻轻混匀, 0℃ 冰浴 20min; 于 4

收稿日期: 2003-01-21

\*通信作者, 电子信箱: syzhao@sdu.edu.cn

离心 15min,小心转移上清于新的 eppendorf 管中,加入等体积预冷的异丙醇,混匀且冰浴 10min。

(5)于 4℃,12000rpm,离心 10min,沉淀用 70%乙醇洗两遍,稍微晾干后,溶于适当体积的 DEPC 处理水中。检测后分装,置 -70℃ 备用。

(6)用琼脂糖凝胶电泳检测:采用 1.2%的琼脂糖,5V/cm 电泳 45~60min EB 染色。照相。

RNA 纯度和定量:使用 eppendorf Biophotometer 测定 260nm,280nm,230nm 的 OD 值,按标准 1OD260 相当于 33ngRNA 计算其含量,计算 OD260/OD280,OD260/OD230。

## 2 结果

使用改良的尿素-氯化锂沉淀法可从接近成熟小麦种子中提取高质量的总 RNA(图 1),从图中可以看出,提取的植物总 RNA 中,28S 和 18S 条带明晰完整,可用于 Northern 杂交分析,RT-PCR,cDNA 文库构建及差异显示分析等分子生物学研究,而用一步法和原尿素-氯化锂法不能从成熟种子中分离出很好的 RNA。总 RNA 的制备得率及紫外吸收值见表 1(各取 3 组材料的平均值),从表 1 可知,体细胞不对称杂种 9 号材料在方法改进前后的 OD260/OD280 比值均处于 2.0 附近,OD260/OD230 比值均大于 2.0,表明用这两种方法提取的 RNA 无蛋白质、酚和无机盐等杂质污染;就产率方面,用改进的

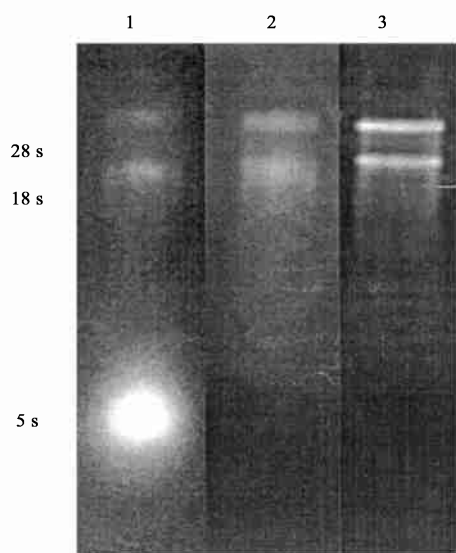


图 1 9 号成熟小麦种子总 RNA 电泳结果

1. 用一步法提取的总 RNA; 2. 尿素-氯化锂法提取的总 RNA;
3. 改进的尿素氯化锂法提取的总 RNA

方法提取的 RNA 得率明显高于原方法,是原方法的 4 倍左右。

表 1 RNA 的紫外吸收值及制备得率

材料	OD260/OD280	OD260/OD230	得率 ( $\mu\text{g RNA/g 材料}$ )
9 号(改进前)	1.94	2.0	16.95
9 号(改进后)	2.06	2.02	72.31

## 3 讨论

对植物组织 RNA 的分离提取,目前常用的方法有一步法、苯酚法和氯化锂沉淀法。本实验也用一步法来提取小麦成熟种子 RNA,但因种子材料中富含大量多糖以及一些不明次生代谢产物,所得 RNA 与其它干扰物共沉淀,很难溶出 RNA,严重干扰了 RNA 的提取,所以最终不能有效地分离出 RNA,从图 1 的 1 泳道中可以看出 5S 条带明显比 28S 和 18S 条带亮,28S 和 18S 带有些扩散和模糊,表明 RNA 部分降解。这样不管从产率还是完整性来讲,都难以满足分子生物学研究的要求。用原尿素-氯化锂方法来提取 RNA,也因上述原因,很难分离出高质量的 RNA(见图 1 的 2 泳道)。究其原因,可能是由于成熟种子内的多糖极其丰富,而种子中多糖的理化性质与 RNA 很相似,在去除多糖的同时使 RNA 也随之被带走,造成 RNA 产量的降低;而在沉淀 RNA 时,多糖也随之沉淀,这样很难将二者分开。这种含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水,或者溶解后的溶液很黏稠,而多糖又抑制许多酶的活性<sup>[4]</sup>,有多糖污染的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。因此,要获得高质量的 RNA,多糖的去除成了很棘手的问题。

目前,常用去除多糖的方法有:SDS-盐酸胍、高  $\text{Na}^+$  或  $\text{Li}^+$  离子存在下的苯酚-氯仿抽提、 $\text{LiCl}$  沉淀 RNA<sup>[5]</sup>、终浓度至 10%~30% 的无水乙醇沉淀<sup>[6]</sup>(葡萄浆果组织中 RNA 的提取)、醋酸钾沉淀<sup>[7]</sup>(用于云杉组织 RNA 提取)、CTAB 法等。这些方法在相应的材料中可去除大部分多糖,不过不同植物组织中多糖的成分复杂多样,很难找到一种通用的多糖去除方法,所以其相应多糖的去除方法需要摸索和实践。

作者在实验中,将 Chomczynsky 建立的 RNA 一步分离法<sup>[8]</sup>和尿素-氯化锂分离 RNA 的方法<sup>[3]</sup>加以比较,并稍加改进,从图 1 和表 1 中可以看出,后者改进之后的方法更适合于小麦成熟种子 RNA 的提

取,最终得到了高质量的 RNA,尤其是产率提高了 4 倍左右。这样,经上述三个方面的改进,在一定程度上解决了成熟小麦种子 RNA 提取中多糖干扰的问题,获得了高质量的 RNA,为进行小麦成熟种子蛋白分子生物学方面的研究提供了有效的方法。

### 参考文献

- [1] Anisworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel). *Plant Mbl Biol Repr*, 1994, 12:198~203  
 [2] Sux, Gbor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae. *Anal Biochem*, 1988, 174:650~657  
 [3] 赵双宜,吴耀荣,夏光敏. 介绍一种简单高效的植物总 RNA

- 的提取方法. *遗传*, 2002, 24(3): 337~338  
 [4] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 1992, 13:52~56  
 [5] Su X, Gbor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae. *Anal Biochem*, 1988, 174: 650~657  
 [6] Lewinsohn E, Steele CL, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mbl Biol Repr*, 1994, 12: 20~25  
 [7] Tesniere C, Vayda ME. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mbl Biol Repr*, 1991, 9: 242~251  
 [8] Chomczynsky P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156~159

## Improved Urea-LiCl Method for Extracting Total RNA from Wheat Mature Seeds

Yao Hongyan Zhao Shuangyi Xia Guangmin  
 (School of Life Science Shandong University Jinan 250100)

**Abstract** This experiment has used an improved urea-LiCl total extraction method to eliminate most of the polysaccharide in wheat mature seeds. There are three modifications compared with original method: (1) to eliminate the embryo (containing much agglutinin) of the seeds, which make the viscosity of the supernatant fluid drop down distinctly; (2) add CTAB in the lysis crude extracts to the final concentration 2‰, to eliminate most of the polysaccharide; (3) completely dissolving RNA in PEPC-treated water after RNA deposited, discard undissolved polysaccharide precipitate. The results showed that the purity and yield of extracted RNA of wheat mature seeds increase significantly with the improved method.

**Key words** Wheat mature seeds RNA extraction Urea-LiCl CTAB

## 《人类基因组——我们的 DNA》

Carina Dennis 和 Richard Gallagher 编著

众多国际知名学者与诺贝尔奖获得者参与编写

J.D. 沃森 作序

240 页,全彩大 16 开,科学出版社 2003 年 4 月出版,ISBN 7-03-010570-2/Q.1191

定价:48 元

在过去 40 年中,我已见过许多令人振奋的生物学事件的发生。但是,当我第一次读到这篇描述我们基因组概貌的草图时,我仍然感到震撼。……这是一篇启蒙后基因组时代的种子论文。——诺贝尔奖得主 David Baltimore

本书源于国际著名科学家的手笔,涉及人类基因组计划的方方面面,引人入胜。本书图文并茂,雅俗共赏,是一部意义非凡的好书,也是对这一堪称我们这个时代最具突破性的科学事件的最好纪念。

——杨焕明(国际人类基因组计划中国协调人)

人类基因组计划是这个时代最具突破性的科学事件。该书全面记录了这一划时代工作的方方面面。自 Crick 和 Watson 发现 DNA 结构以来,还没有一部科学出版物受到如此的赞许和期望。《自然》杂志(NATURE)的两位生物学主编 Carina Dennis 和 Richard Gallagher 编著的这本书引人入胜、装帧精美,使人类基因组计划得以接近普通读者。本书从对生物学和技术的基础简介开始,以发表于 2001 年 2 月的由国际人类基因组测序协作组合写的历史性研究论文“人类基因组测序和初步分析”(Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome)全文结尾。自始至终,书中描述了主要参与者和事件,论及该项工作的影响的各种观点,囊括全世界媒体报道,及对人类基因组测序的伦理、法律和社会意义的评估。

本书将作为理解人类基因组必不可少的资源和参考指南,以纪念人类最伟大的成就之一。