植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2007, **24** (5): 624–628, www.chinbullbotany.com

·技术与方法·

一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法

朱昀，王猛，贾志伟，练云，金颖，王国英*

中国农业大学农业生物技术国家重点实验室，北京 100094

摘要 介绍了一种大量提取玉米(*Zea mays* L.)幼穗总RNA的有效方法。由于玉米幼穗富含多糖，用普通的RNA提取方法和Trizol很难获得高质量的RNA。在热酚法提取RNA的基础上，通过在提取缓冲液中加入低pH值的醋酸钾来去除多糖。所得到的RNA获得率高，质量好，条带完整，实验证明可直接用于RT-PCR、微阵列等各项后续分子生物学实验。

关键词 玉米幼穗，多糖，RNA提取

朱昀，王猛，贾志伟，练云，金颖，王国英 (2007). 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法. 植物学通报 **24**, 624–628.

从植物组织中提取高纯度、高质量的 RNA 是进行分子生物学研究的必要前提和关键。分离 RNA 的主要困难在于 RNA 分子自身存在 2'-OH，稳定性差，很容易被广泛存在于植物组织的细胞及外部环境中非常稳定的 RNA 酶降解。此外，某些植物组织中的多酚、多糖和蛋白质以及其它次生代谢物质也会严重影响 RNA 的提取(李宏和王新力，1999)。有关富含多糖的猕猴桃(陈昆松等，1998)、蜈蚣草(何振艳等，2005)、香蕉(冯斗等，2004)、芒果(杜中军等，2005)和非洲菊(张玉进等，2001)等植物组织的总 RNA 提取已有报道，但尚未见到从富含多糖的玉米幼穗中提取总 RNA 的报道。玉米幼穗组织中多糖含量远远高于其它组织，我们在采用已有方法提取总 RNA 时发现，多糖由于与 RNA 溶解性的高度一致而在抽提时无法去除，它在水相中与 RNA 形成难溶的胶状物复合体，造成 RNA 获得率的大幅度下降和降解。为此，我们尝试在热酚法提取 RNA 的基础上进行改进。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以在中国农业大学种植的玉米(*Zea mays* L.)自交系 178 为材料，取开花前不同发育时期的幼穗。

1.2 实验方法

1.2.1 RNase的灭除

所用的研钵、研杵和药匙均用 180°C 烘烤 8 小时；离心管和枪头用 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethylpyroca-rbonate, DEPC)浸泡 12 小时后高温灭菌；所有的提取试剂都用 0.1% DEPC 水配制，搅拌过夜后高温灭菌(Tris-HCl 和 SDS 除外，用灭好菌的 0.1% DEPC 水配制即可)。实验过程中勤换手套，以避免皮肤、汗水带来的 RNase 污染。

1.2.2 RNA 提取

RNA 提取分为以下 14 个步骤。(1)配制 RNA 抽提缓冲液，10 mL 中含有 2.212 5 mL DEPC-H_2O，1 mol·L^{-1} Tris-HCl (pH9.0) 0.325 mL，4 mol·L^{-1} NaCl 0.162 5 mL，10%SDS 1.3 mL，水饱和酚 3.5 mL，3.5 mol·L^{-1} KAC(pH5.2) 2.5 mL。将以上抽提缓冲液 65°C 水浴预热。(2)在液氮中研磨 1-2 g 玉米幼穗，待液氮刚刚挥发，将磨碎的材料迅速加入到上述预热的 RNA 提取缓冲液中，剧烈振荡 10 分钟。(3)加入氯仿 4 mL，剧烈振荡 10 分钟；2 000 × *g*，4°C 离心 20 分钟，取上清。(4)加等体

收稿日期: 2006-11-02; **接受日期**: 2006-11-27
基金项目: 国家 973 计划(No. 2006CB101700)
* 通讯作者。E-mail: gywang@cau.edu.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-379

积氯仿, 混匀, 振荡10分钟, 2 000 × *g*, 离心15分钟。(5)取上清, 加1/3体积的8 mol·L^{-1} LiCl, 4°C沉淀8小时。(6)12 000 × *g*, 4°C, 离心20分钟, 弃上清。(7)沉淀用70%乙醇漂洗1次, 11 400 × *g*, 4°C,离心10分钟, 无水乙醇洗1次, 11 400 × *g*, 4°C, 离心10分钟, 吹干。(8)加适量水溶解, 即可电泳检测。如果有DNA污染, 可用以下方法去除。(9)用DNase处理, 在100 μL RNA溶液中加入以下混合物: RNase Inhibitor 3 μL, DNase 5 μL, 10×RNase-free DNase buffer 12 μL。在37°C消化30分钟。(10)加入等体积苯酚抽提蛋白, 剧烈振荡10分钟后, 11 400×*g*, 4°C, 离心10分钟; 取上清。用等体积氯仿去除多余苯酚和蛋白, 剧烈振荡10分钟后, 11 400 × *g*, 4°C, 离心10分钟。(11)取上清, 加入1/10体积3 mol·L^{-1}醋酸钠(pH5.2), 混匀, 再加3倍体积的无水乙醇, -70°C放置2小时(为了得到最大获得率, 可于-70°C过夜放置)。(12)11 400×*g*, 4°C, 离心20分钟。(13)沉淀用70%乙醇漂洗1次, 11 400 × *g*, 4°C, 离心10分钟, 无水乙醇洗1次, 11 400 × *g*, 4°C, 离心10分钟, 吹干。(14)溶于100 μL DEPC-H_2O中, 电泳检测完整性, 保存于-70°C, 备用。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳

采用DEPC水配制的1xTAE作为电泳缓冲液, 电泳槽用0.4 mol·L^{-1} NaOH浸泡4小时以上, 琼脂糖凝胶浓度为1%, 电压为5 V·cm^{-1}。

1.2.4 RT-PCR

以提取的总RNA为模板, 用Promega公司的M-MLV反转录酶合成cDNA第1链后, 稀释10倍作为PCR的模板。PCR反应体系(25 μL)中包括1 μL cDNA, 0.4 mmol dNTP ,上下游引物各10 pmol ,1 U Taq酶。玉米*ZmSINA1*引物序列分别为: 5'引物P1, 5'AGTGGTGGGCTGCTGATGGT3'; 3'引物P2, 5'GGATGATGGGATGGAATGGAA3'。cDNA模板在94°C变性5分钟后, 扩增(94°C 40秒, 60°C 40秒, 72°C 90秒) 35个循环; 最后72°C延伸10分钟。用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.5 微阵列杂交

以2个不同的RNA为模板, 用Invitrogen公司的荧光标记试剂盒进行反转录和CY3、CY5的荧光标记, 将标记后的两cDNA等量混合, 避光杂交12小时(所用芯片来自美国Arizona大学)。洗片后扫描。

2 实验结果

2.1 RNA完整性分析

经琼脂糖非变性凝胶电泳和分光光度计检测, 本方法提取的RNA完整性好, 28S rRNA的亮度高于18S rRNA, 无降解现象(图1A); RNA纯度很高, 无杂质污染, OD_{260}/OD_{280}在1.90-2.10之间, OD_{260}/OD_{230}在2.05-2.30之间。无论是完整性还是纯度均符合实验要求。而用普通RNA提取方法得到的RNA黏稠不易溶解, 条带模糊不清并伴随降解现象(图1B)。

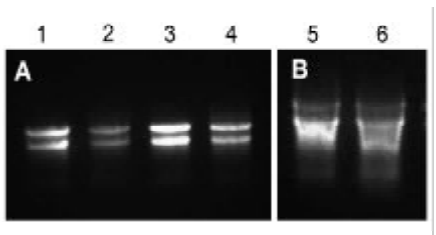

图1 两种方法提取玉米幼穗总RNA的电泳图

(A)改进热酚法提取富含多糖的玉米幼穗电泳图;
(B)普通方法提取富含多糖的玉米幼穗电泳图。
1:生长锥突起期; 2:小穗分化期; 3:小花分化期; 4:性器官分化期; 5:小花分化期; 6: 性器官分化期

Figure 1 Agarose eletrophoresis of the total maize youngear RNA isolated by different methods

(A) agarose electrophoresis of the total RNA extracted by the modified method;
(B) agarose electrophoresis of the total RNA extracted by the normal method
1: growth cone stage; 2: differentiation of spikletes stage; 3: differentiation of florets stage; 4: differentiation of sexual stage; 5: differentiation of florets stage; 6: differentiation of sexual stage

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-379

2.2 RT-PCR

以改进的热酚法提取的总RNA为模板, 玉米*ZmSINA1*基因特异引物P1、P2进行RT-PCR, 预期能扩增出长度为1 075 bp的片段。实验结果表明, 能成功扩增出目的片段, 而无模板对照则没有扩增出条带(图2), 说明该法提取的RNA样品质量好, 可以进一步用于后续实验。

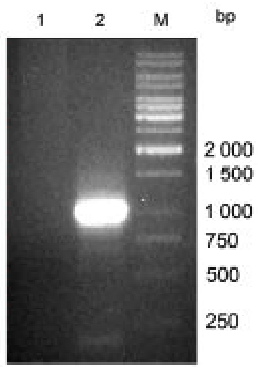

图2 RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

1:无模板对照; 2:以改进的热酚法提取RNA为模板的RT-PCR产物; M: DNA marker

Figure 2 Agarose electrophoresis of RT-PCR products

1: control without templet; 2: RT-PCR product (with RNA templet obtained by modified method); M: DNA marker

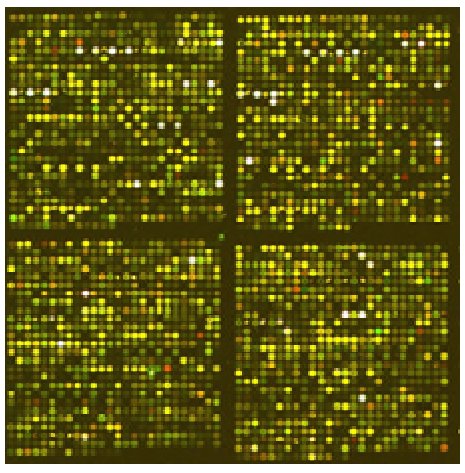

图3 微阵列杂交扫描图

Figure 3 Scan for microarray hybridization

2.3 微阵列杂交

以改进的热酚法提取的RNA为模板进行反转录, 将得到的cDNA用不同的荧光进行标记, 标记产物避光杂交后扫描得到不同RNA样本的表达图谱(图3)。实验结果显示, 大部分基因表达均衡, 在不同的RNA样本间没有差异, 个别基因有上调和下调的现象。此结果进一步说明用该方法提取的RNA质量高, 完整性好, 可以用于高精度的后续实验。

3 讨论

3.1 pH值的影响

在pH5.3的酸性环境中, DNA和RNA分别进入有机相和水相, 蛋白则被有机溶剂变性除去。水相经再次变性和分相处理后只剩下RNA, 经醇沉淀即可获得(袁明珠等, 2005)。因此在RNA提取过程中pH值是很重要的。在本实验中, 醋酸钾作为去除多糖的主要成分, pH值要调低, pH5.2或4.8的提取效果都不错, 在第10步的检测中已经看不到DNA的污染。

3.2 多糖的去除

多糖的污染是提取玉米幼穗RNA时遇到的一个棘手的问题。多糖的许多理化性质与RNA相似, 在提取中与RNA以复合体形式存在, 很难将它们分开。在去除多糖的同时RNA也会被除去, 造成RNA获得率的大幅度降低并降解。在溶解RNA时, 这种与多糖形成复合体的RNA难溶于水, 或溶解后产生黏稠水母状的胶质溶液。由于多糖可以抑制许多酶的活性, 因此污染了多糖的RNA样品无法用于进一步的分子生物学研究(李宏和王新力, 1999)。

目前去除植物组织中多糖的方法主要有3种。

一是用高浓度的Na^+、K^+改变多糖的溶解特性, 使其脱离水相进入有机相, 然后用酚仿抽提去除(Su and Gibor, 1988), 如用醋酸钾溶液沉淀多糖(Hughes and Galau, 1988; Bahloul and Burkard, 1993; Ainsworth,

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-379

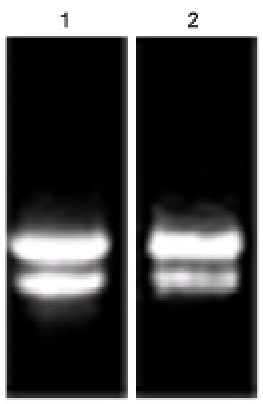

图4　放置1年的RNA电泳图

1: 新鲜提取的RNA; 2: 放置1年的RNA

Figure 4　Agarose electrophoresis of the total RNA stored for 1 year

1: agarose electrophoresis of freshly-extracted RNA; 2: agarose electrophoresis of sample C stored for 1 year

1994)。在本实验中, KAc的终浓度并不需要十分精确, 占总抽提液的1/5-1/3的醋酸钾都可以有效去除多糖并最终获得质量完好的RNA。

二是在沉淀RNA之前, 采用乙二醇丁醚(周波等, 2004)、乙醚(袁明珠等, 2005)或丁氧乙醇(何振艳等, 2005)分相把多糖去掉。

三是选择性沉淀多糖或RNA。LiCl可以选择性地沉淀RNA, 去除大部分多糖, 但实验周期较长, 沉淀RNA一般都需要至少2小时以上的冰浴。在本实验中, 经过LiCl过夜沉降的沉淀仍然是难溶于水的RNA多糖复合物, 推测可能和玉米幼穗组织中含糖量过高有关。所以玉米幼穗的RNA提取不适合用这种方法。文献报道低浓度乙醇(10%-30%)可以沉淀多糖(Tesniere and Vayda, 1991; Lewinsohn et al., 1994), 而RNA则要在75%乙醇中才能沉淀下来, 所以可以利用RNA与多糖在不同浓度乙醇中沉淀性不同来分离这2种物质。另有文献报道低浓度乙醇和醋酸钾溶液可以共同沉淀多糖(Lopez-Gomez and Gomez-Lim, 1992)。我们在前期的实验中采取25%的乙醇和醋酸钾共同沉淀多糖, 但是RNA却与多糖一起进入有机相, 并在接下来的抽提中损失掉。

3.3　提取环境与保存

很多实验室RNA的提取都是在超净工作台完成的, 这样浪费资源而且没有必要。由于RNase主要来源于人的皮肤汗液, 而空气中的含量很少, 本方法介绍的RNA提取在正常实验环境中即可进行。所得RNA质量完好, 无降解。为防止RNA在长期保存过程中降解, 我们建议所分离的RNA最好保存在70%乙醇或DEPC处理水中。用本方法提取的RNA保存在乙醇中, 放置1年仍没有降解(图4)。

综上所述, 用本方法对富含多糖的玉米幼穗组织总RNA的提取获得了成功。所提取的RNA排除了多糖和蛋白质的干扰, 可以满足后续分子实验操作。而利用常规的方法提取玉米幼穗RNA, 不预先去除多糖是无法得到高质量RNA的。本实验也尝试用低浓度乙醇和LiCl沉淀多糖, 但对于玉米幼穗其效果均不如醋酸钾。

参考文献

陈昆松, 徐昌杰, 张上隆 (1998). 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 **34**, 371-373.

杜中军, 徐兵强, 黄俊生, 王家保, 徐立 (2005). 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总RNA提取方法. 植物生理学通讯 **41**, 202-205.

冯斗, 张春发, 张颖 (2004). 一种适用于提取香蕉果肉RNA的方法. 广西农业生物科学 **23**, 249-251.

何振艳, 徐文忠, 杨学习, 麻密 (2005). 提取蕨类植物蜈蚣草总RNA的一种有效方法. 植物学通报 **22**, 198-202.

李宏, 王新力 (1999). 植物组织RNA提取的难点及对策. 生物技术通报 **1**, 36-39.

袁明珠, 温柔, 刘吉升, 揭英省, 黎金花, 尹汗萍, 曾秋莲, 龙刚, 杨德华, 刘海, 黄胜琴, 徐杰 (2005). 几种植物材料中总RNA的提取. 分子植物育种 **3**, 285-292.

张玉进, 孟祥春, 潘瑞炽, 王小菁 (2001). 非洲菊花瓣总RNA提取方法的改进. 植物学通报 **18**, 722-726.

周波, 张旸, 李玉花 (2004). 富含多糖草莓果实总RNA提取方法

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-379

的改进. **生物技术通讯 15**, 48-51.

Ainsworth C (1994). Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel). *Plant Mol Biol Rep* **12**, 198-203.

Bahloul M, Burkard G (1993). An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues. *Plant Mol Biol Rep* **11**, 212-215.

Hughes DW, Galau G (1988). Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Mol Biol Rep* **6**, 253-257.

Lewinsohn E, Steele CL, Croteau R (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mol Biol Rep* **12**, 20-25.

Lopez-Gomez R, Gomez-Lim MA (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* **27**, 440-442.

Su X, Gibor A (1988). A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Ann Biochem* **174**, 650-657.

Tesniere C, Vayda ME (1991). Method for the isolation of high quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mol Biol Rep* **9**, 242-251.

An Effective Method for Extracting Total RNA from Young Ears of Maize

Yun Zhu, Meng Wang, Zhiwei Jia, Yun Lian, Ying Jin, Guoying Wang*

State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract Here we report a modified hot phenol method for extracting the total RNA from young ears of maize. This method involves wiping off polysaccharides by adding KAC in the extraction buffer. RNA isolated by this method is of high quality and can be used for the later molecular manipulations.

Key words immature ear, polysaccharides, RNA isolation

Zhu Y, Wang M, Jia ZW, Lian Y, Jin Y, Wang GY (2007). An effective method for extracting total RNA from young ears of maize. *Chin Bull Bot* **24**, 624-628.

* Author for correspondence. E-mail: gywang@cau.edu.cn

(**责任编辑**: **白羽红**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-379