

葡萄花序总 RNA 提取方法研究

赵巍巍¹, 宗成文^{1*}, 曹后男¹, 陈蕾², 朴日子¹

(1. 延边大学农学院, 吉林龙井 133400; 2. 吉林省农业科学院果树研究所, 吉林公主岭 136100)

摘要 [目的]为筛选出提取葡萄花序总 RNA 的最佳方法。[方法]以藤稔葡萄花序为试材, 针对葡萄花序中多酚、多糖类物质含量较高的特点, 比较了 CTAB 法、SDS/酚法以及经改良的 CTAB 法对藤稔葡萄花序总 RNA 的提取效果。[结果]3 种方法均能从葡萄花序中提取到总 RNA。其中, 经改良的 CTAB 法能有效抑制酚类物质和多糖对总 RNA 提取的影响, 获得纯度高、完整性好的总 RNA, 其 28 S rRNA 亮度约为 18 S rRNA 的 2 倍, RT-PCR 分析表明: 该方法提取的总 RNA 适合于下一步的研究。[结论]经过改良的 CTAB 法提取葡萄花序总 RNA 的效果最佳。

关键词 葡萄花序; 总 RNA; 提取; 改良 CTAB 法; RT-PCR

中图分类号 S633.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-16161-02

Study on Methods of Extracting Total RNA from Grape Inflorescence

ZHAO Wei-wei et al (Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract [Objective] The study aimed to choose the best method for extracting the total RNA from grape inflorescence. [Method] With *Vitis vinifera* × *V. labrusca* 'Fujiminori' as the test materials, according to high content polyphenol and polysaccharide in grape inflorescence, the methods to extract total RNA were compared which were CTAB, SDS/Phenol, and Modified CTAB. [Result] All of 3 methods could extract total RNA from grape inflorescence. Among them, the modified CTAB method was more suitable, it could eliminate pollution from polyphenol and polysaccharide and got high quality RNA, the brightness of 28 S rRNA was twice of 18 S rRNA. Moreover, the RT-PCR result showed that total RNA was fit for the next research. [Conclusion] Modified CTAB method had the best effect on extracting the total RNA from grape inflorescence.

Key words Grape inflorescence; Total RNA; Extraction; Modified CTAB method; RT-PCR

从植物中提取高质量的 RNA 是进行 Northern 杂交、RT-PCR、cDNA 文库构建等各种分子生物学研究的关键^[1]。不同植物和同一植物的不同组织, 同一组织的不同发育时期, 运用同一种提取方法的结果也不相同^[2]。葡萄是世界性的重要水果, 开展葡萄成花的分子生物学研究, 为从分子水平揭示葡萄花发育的本质以及为葡萄基因组的研究提供重要的资料^[3], 而总 RNA 的提取是从事这方面研究的基本环节之一。葡萄中含有大量的酚类和多糖物质, 酚类化合物很容易被氧化成醌类物质, 从而与 RNA 不可逆地结合, 影响 RNA 的分离与纯化; 多糖的许多性质与 RNA 相似, 很容易在提取过程中与 RNA 形成共沉淀, 很难将它们分开。这些都影响到 RNA 最终的提取质量^[4]。在这些特点的基础上, 笔者比较了 CTAB 法^[5]、SDS/酚法^[6]对藤稔葡萄花序总 RNA 的提取效果, 并对 CTAB 法进行了适当地改良, 并针对其不同的提取效果进行了比较与分析。

1 材料与方

1.1 材料 供试材料为藤稔 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca* 'Fujiminori') 葡萄的花序, 采自延吉葡萄园。液氮速冻后, 于 -70 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取。比较 CTAB 法^[5]、SDS/酚法^[6]; 并对 CTAB 法^[5]进行改良, 主要改良策略为: 在前期的抽提过程中增加 5 mol/L 低 pH 醋酸钾, 以去除多糖; 为防止 RNA 因提取时间长而导致降解, 仅在最后采取一次 LiCl 沉淀, 减少沉淀次数; 沉淀用 75% 乙醇洗涤 3 次后, 用无水乙醇干燥沉淀。

具体方法为: 取 200 mg 左右样品, 在液氮中研磨成粉末, 加入 600 μl 65 °C 预热的提取缓冲液 [1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH=8.0), 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 2% PVP, 1% β-巯基乙醇(用前加入)], 涡旋 2~3 min, 65 °C 水浴 20~30 min, 中途涡旋 2~3 次; 加 0.6 倍体积氯仿, 涡旋 1 min; 4 °C, 13 000 r/min 离心 10 min; 向上清液中加入 1/5 体积的醋酸钾 (5 mol/L, pH=4.8), 涡旋 1 min, 冰浴 20 min; 加等体积氯仿, 充分混合, 4 °C, 13 000 r/min 离心 10 min; 向上清液中加入等体积酸酚与氯仿 (1:1), 涡旋 1 min; 4 °C, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加等体积氯仿抽提 1 次。取上清, 加 1/3 体积预冷的 10 mol/L LiCl 沉淀 RNA, -20 °C 放置 2 h, 4 °C, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集 RNA; 75% 乙醇洗涤 3 次, 无水乙醇洗涤 1 次, 待沉淀干燥后加 30 μl DEPC-H₂O 溶解 RNA。

1.2.2 葡萄花序总 RNA 的电泳检测。分别取用以上方法提取的总 RNA 2 μl, 经 1% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μg/ml) 电泳检测其完整性, 120 V 恒压电泳 15 min。

1.2.3 cDNA 第一链的合成。用宝生物工程 (大连) 有限公司 (Takara) M-MLV (RNase H⁻) 反转录酶合成 cDNA 第一链, 以 Oligo (dT)₁₈ 为反转录引物, 起始 RNA 为 1 μg 改良 CTAB 法提取的总 RNA, 具体操作按反转录酶说明书进行。

1.2.4 RT-PCR 反应。

1.2.4.1 引物设计。根据从葡萄 EST 数据库拼接的一个新的 MADS-box 基因全长, 设计 1 对特异引物, 扩增编码区全长, 引物序列为 (*Vv* 为葡萄拉丁名的缩写):

*Vv*SVPF; 5' ATGGCTAGAGGAAAGATTGAGAT3'

*Vv*SVPR; 5' CTACTCGAGCAAAGTAAAGGTCA3'

1.2.4.2 PCR 反应体系。25 μl 总反应体积中含模板第一链 cDNA 1 μl, 上下游引物各 1.5 μl (10 μmol/L), dNTP Mixture 1.5 μl (2.5 mmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μl (5 U/μl),

基金项目 延边大学科技发展计划项目 (延大科合字 2008-11)。

作者简介 赵巍巍 (1984 -), 女, 吉林白城人, 硕士研究生, 研究方向: 果树生物技术。* 通讯作者, E-mail: zongchengwen@yahoo.com.cn。

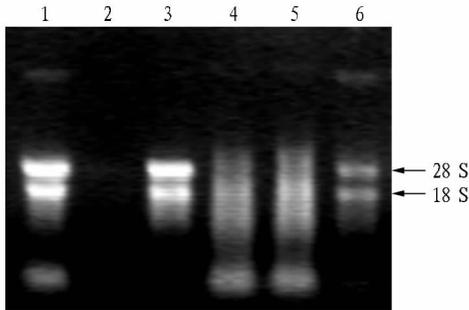
收稿日期 2009-10-09

10 × Buffer 2.5 μl, 其余用重蒸馏水补充。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 扩增产物的克隆和测序。将得到的 PCR 产物用 Genscript 公司胶回收试剂盒回收后, 与 PMD19-T 载体 (Taka-ra) 连接, 转化大肠菌 DH5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 菌液 PCR 筛选带有目的片段长度的克隆, 送至南京基天生物公司测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 电泳检测 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性及其质量, 结果如图 1、2 所示。从图 1 可以看出: CTAB 法所提取的葡萄花序的总 RNA 质量不稳定, 泳道 4~6 RNA 质量较好, 但有较多的 DNA 残留, 泳道 2 的 RNA 未提取出来, 泳道 4、5 的 RNA 明显降解。在试验过程中还发现, 多糖残留严重, 造成 RNA 得率低; 在排除了操作的因素外, 经过多次试验证明, 该方法提取 RNA 的效果很不稳定。由图 2 可知, SDS/酚法所提取的 RNA 降解严重, 还有大量的蛋白质和多糖污染, 杂质去除不彻底。



注: 1~6 为 6 个平行样。下同。

Note: 1-6 stand for six parallel samples. The same as follows.

图 1 CTAB 法提取葡萄花序总 RNA 的检测

Fig. 1 Test of total RNA extraction of grape inflorescence by CTAB method

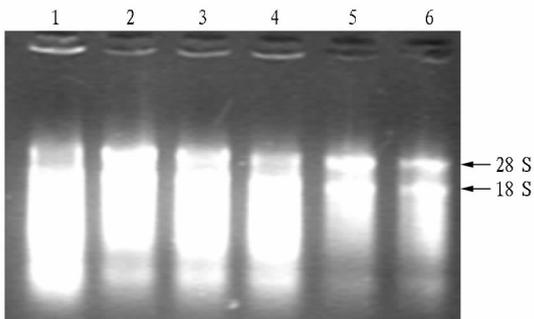
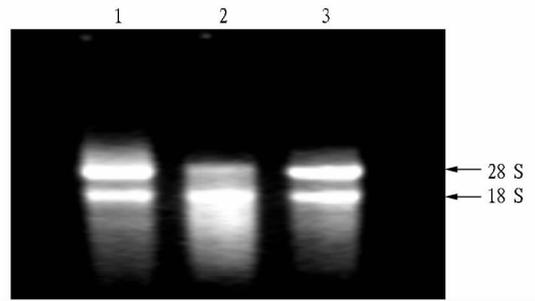


图 2 SDS/酚法提取葡萄花序总 RNA 的检测

Fig. 2 Test of total extraction of grape inflorescence by SDS/Phenol method

用改良后的 CTAB 法提取葡萄花序总 RNA, 电泳结果如图 3 所示。从图 3 可以看出: 28S、18S 条带清晰可见, 边缘清晰, 带型规则整齐, 且二者荧光亮度接近 2:1, 说明 RNA 较完整。泳道上方只有微量的 DNA 残留, 这说明改良 CTAB 法适合葡萄花序总 RNA 提取。

2.2 RT-PCR 分析 为了进一步确定所提取的 RNA 的完整性, 对改良 CTAB 法提取的 RNA 进行了反转录, 使用特异



注: 1~3 为 3 个平行样。

Note: 1-3 stand for three parallel samples.

图 3 改良 CTAB 法提取葡萄花序总 RNA 的检测

Fig. 3 Test of total RNA extraction of grape inflorescence by modified CTAB method

引物对 RNA 进行了检测, 结果得到了特异扩增的目的片段, 其大小大约为 700 bp (M 为 2 000 bp), 与预计的片段大小基本一致 (图 4)。序列分析表明, 该片段全长 684 bp, 包含一个完整的编码, 227 个氨基酸的 ORF (开放阅读框), 得到了正确的葡萄 SVP 同源基因。

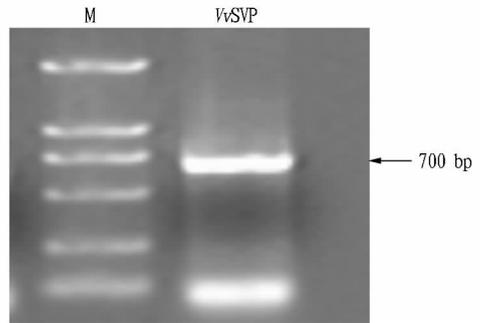


图 4 RT-PCR 扩增葡萄 SVP 同源基因编码区全长 cDNA

Fig. 4 Full length cDNA of SVP homolog amplified by RT-PCR from grape

3 讨论

由于葡萄组织中酚类和多糖物质较多, 而且随着花序的不断成熟, 其体内代谢中的降解大于合成, 包括 Rnase 在内的各种水解酶大量积累, 同时多酚和多糖也随之增加^[7]。这些都对 RNA 的提取效果造成了很大的影响。王壮伟等^[6]应用 SDS/酚法从苹果属组织培养苗中得到了高质量、完整性好的总 RNA, 但笔者应用该方法并未得到质量合格的 RNA, 这可能与材料不同有关。CTAB 法^[5]和 SDS/酚法^[6]相比, 虽然得到了总 RNA, 但提取效果很不稳定, 经多次试验证明 RNA 降解现象反复出现。改良后的 CTAB 法在原有方法的基础上, 减少了沉淀的步骤, 只在最后采用 LiCl 进行沉淀, 缩短了 RNA 提取时间, 避免了内源和外源因素对 RNA 造成的降解, 解决了因多次沉淀带走 RNA, 从而造成产率低的问题。KANNING K 等^[8]在研究中曾发现, 使用 LiCl 沉淀 RNA 对逆转录和体外翻译不利。但在该试验中, 所提取总 RNA 的质量通过 RT-PCR 的验证完全符合下一步试验的进行, 对扩增的基因序列没有影响。此外, CTAB 法虽然为传统的 RNA 提取方法^[9], 但在提取富含多糖物种 RNA 时, 提取缓冲液中溶解了大量的多糖^[10], 改良 CTAB 法和原方法相比, 在前期

(下转第 16176 页)

疏密表示。学生的实验报告,教师要仔细批阅并写出评语。不规范的报告要指出问题的所在以便于及时改正,对于普遍存在的问题可在课堂上集中讲解。

3 完善考核评价体系

采取切实有效的措施,规范实验教学的评价体系,是提高实验课教学质量的根本保证,也是提高学生对实验课重视程度,激发学生实验兴趣和学习积极性的有效手段。实验课考试成绩根据每次实验课学生的实验态度,操作技能和完成实验报告的情况等记录考试成绩而定,缺做实验或实验不及格者,都要重新补做。实验课考察总成绩不及格者,不得参加该课程的理论课考试。根据新修订的教学大纲及植保专业本科培养目标的要求,编制了《果树病害防治题库》,总共300题。试题内容覆盖果树病害防治的基本概念、基本理论和基本技能,难度适中,既能反映学生对知识的接受和掌握程度,又能反映他们对知识的综合运用水平,突出教学重点,体现考核内容的综合性、灵活性及实践性。通过在植保05级、06级和07级果树病害防治实验考试中的应用,试卷分析结果表明,由该题库中抽样组成的试卷有一定难度、效度、信度和区分度,能较客观地反映学生对知识掌握的实际水平。课程考试命题符合教学大纲要求,严格执行考试规定,实行试题审批制度,备有A、B卷、标准答案和评分标准,严格考纪,做到阅卷认真,评分和成绩计算规范,每门课程考试都有试卷分析。通过实验课评价体系的建立健全,不但可以客观而真实地反映学生实验课的学习情况,同时也能反映授课老师的教学水平和教学效果。坚持实验教学的考核手段多种形式并存,是巩固和提高教学质量必不可少、行之有效的措施之一。

4 改革效果

从植保2003级起,在植保专业本科课程的《果树病害防治》实验教学中进行了改革后的教学方法的应用实施。在完成该实验的学习后,学生学会了植物病原菌的常规分离、菌种移植、纯化等无菌操作技术,加深了对病原菌形态识别及其所致病害特点的认识,掌握了病原菌观察方法及常规鉴定技术。经过教学实践的检验,证明这套教学方法切实可行,在传授知识、启发思维、培养能力等方面都取得了显著成效。①实验室教学和现场教学的应用,激发了学生兴趣,调动了

学生的积极性和主动性。07级部分学生自发成立“植物病虫害”兴趣小组,有10名同学申报了学校大学生创新基金项目。②增强了学生的动手能力。学生独立地完成各项实验操作,动手能力得到增强。学生的临时玻片制备、显微镜操作和无菌操作等基本技能也得到强化训练。通过完成实验项目,学生学会植物病原菌的常规分离、菌种移植、纯化等无菌操作技术,拥有独立开展科学实验、分析和解决生产实际问题的能力。③提高了实验课整体教学质量。对各届学生的实验课考试结果分析表明,学生对该门课程的知识掌握较好,且考试成绩有逐届递增的趋势。学生上课的出勤率、考试及格率以及考研率都有了明显提高。在对授课班级进行的课程教学质量随机测评中,学生对本实验教学质量评价成绩为优秀。学生测评反映,该课程教学信息量大、形式活泼,效果好;实验规范,开放实验室可以独立设计、完成实验,有利于提高动手能力,培养综合素质。

5 结语

在植保专业本科课程的实验教学中进行教学内容和教学方法的改革和应用实施后,实践证明改革后的教学方法切实可行,在传授知识、启发思维、培养能力等方面取得显著成效。通过改革后的实验课教学,学生的动手能力得到增强(如临时玻片制备、显微镜操作等),学生独立分析、解决问题的能力得到提高。培养了学生严谨的科学态度和严格的实验作风,为学生将来从事果树病害的防治及相关科研工作打下坚实基础。今后,教师还应不断学习掌握新的知识,提高自身的理论认知水平,对课程实验教学改革继续进行探索,在教学实践中将课程教学体系不断改进,充实完善,以进一步提高《果树病害防治》学科教学质量。

参考文献

- [1] 宛晓春,方明.坚持“大别山道路”,在新农村建设中发扬办学特色[J].高等农业教育,2008,2(2):7-10.
- [2] 李保同.植物生产类专业复合型人才培养模式的探索与实践[J].高等农业教育,2002(2):53-55.
- [3] 高智谋,陈方新,吴慧平,等.普通植物病理学实验教学方法的探索与实践[J].中国农业教育,2005(3):53-54.
- [4] 高智谋,丁克坚,檀根甲,等.略论普通植物病理学教学目标与教学方法[J].中国教育理论杂志,2003,30(3):69-70.
- [5] 董宇艳,刘胜,任喜枫.多媒体CAI对教育的影响及应用[J].中国高教研究,2001(1):36-37.
- [6] 王壮伟,渠慎春,章镇,等.苹果属RNA高效快速提取新方法[J].果树学报,2004,21(4):385-387.
- [7] 张今今,王跃进,王西平,等.葡萄总RNA提取方法的研究[J].果树学报,2003,20(3):178-181.
- [8] MANNING K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 195:45-50.
- [9] 沙伟,郑海洋,柴华,等.玉米RNA提取方法的比较研究[J].玉米科学,2009,17(2):145-148.
- [10] 黄雪梅,张守涛,杨超,等.玉米花粉总RNA提取方法的比较和分析[J].河南农业科学,2009(4):34-37.

(上接第16162页)

的匀浆上清液中加入1/3体积5 mol/L的醋酸钾的方法,有效地去除了多糖的干扰,这与张今今等^[7]在提取葡萄叶片及果实时得出的结论一致。

参考文献

- [1] 陈弟,符贤英,殷晓敏,等.几种果实总RNA提取方法的评价[J].广东农业科学,2007(11):30-33.
- [2] AINSWOTRH C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12:198-203.
- [3] 宗成文. 葡萄花发育相关基因的克隆与表达特性研究[D]. 南京:南京农业大学,2007:1-5.
- [4] LOGEMANN J, SCHELL J, WILLMITZER L. Improved method for isolation