园 艺 学 报 2011，38（6）：1191－1196
Acta Horticulturae Sinica

http: // www. ahs. ac. cn
E-mail: yuanyixuebao@126.com

快速高效提取荔枝幼果和离区组织 RNA 的新方法

吴建阳[1,*], 彭 刚[1,*], 李彩琴[1], 陆旺金[2], 王泽槐[1], 李建国[1,**]

（[1] 华南农业大学中国荔枝研究中心，广州 510642；[2] 华南农业大学园艺学院，广东省果蔬保鲜重点实验室，广州 510642）

摘 要：以荔枝幼果和离区为材料，以 N－十二烷基肌氨酸钠（LSS）为 RNA 提取液的主要成分，建立了一种简单快速高效适合于荔枝幼果和离区总 RNA 提取的新方法，简称 LSS 法。该法提取 RNA 的过程只需 2 h，且质量高，幼果和果柄 RNA 的 28S/18S 值分别为 1.7 和 1.9，RNA 完整性（RIN）值分别为 9.7 和 10.0，分别为 380 和 450 μg · g^{-1}，A_{260}/A_{280} 值分别为 1.80 和 1.89。将提取的 RNA 经 DNA 酶消化后反转录成 cDNA 进行 PCR，扩增出预期长度的目的片段，满足进行后续基因表达的要求。LSS 法操作简单快速，对微量组织样品是一种有效的 RNA 提取方法。

关键词：荔枝；幼果；离区；RNA 提取；N－十二烷基肌氨酸钠（LSS）

中图分类号：S 667.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2011）06-1191-06

A New Rapid and Effective Method for RNA Isolation from Litchi Tissues of Fruitlet and Abscission Zone

WU Jian-yang[1,*]，PENG Gang[1,*]，LI Cai-qin[1]，LU Wang-jin[2]，WANG Ze-huai[1]，and LI Jian-guo[1,**]

（[1]*China Litchi Research Center*，*South China Agricultural University*，*Guangzhou* 510642，*China*；[2]*Guangdong Provincial Key Lab of Postharvest Physiology and Technology of Fruits and Vegetables*，*College of Horticulture*，*South China Agricultural University*，*Guangzhou* 510642，*China*）

Abstract：A new simple，rapid and effective LSS（N-lauroyl-sarcosine sodium）-based protocol for RNA isolation from litchi tissues of fruitlet and abscission zone was developed. This LSS method gave high-quality RNA in about 2 h. The ratios of 28S/18S，A_{260}/A_{280}，RNA integrity（RIN）and yield of the total RNA from tissues of fruitlet and abscission zone were 1.7 and 1.9，1.80 and 1.89，9.7 and 10.0，380 and 450 μg · g^{-1}，respectivetly. In addition，reverse transcription-PCR confirmed that the isolated RNA was of appropriate quality and integrity for gene expression studies. Therefore，LSS method is particularly useful for processing large numbers of samples and for isolation of RNA from minute quantities of tissue samples.

Key words：litchi；fruitlet；abscission zone；RNA isolation；LSS（N-lauroyl-sarcosine sodium）

荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.）组织细胞中含有大量的多酚、多糖、单宁等次生代谢产物（Newbury

收稿日期：2011－03－26；**修回日期**：2011－05－16

基金项目：国家自然科学基金项目（30871694）；教育部博士点基金项目（200805640003）；国家现代荔枝产业技术体系项目（nycytx-32-03）

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence（E-mail：jianli@scau.edu.cn）

& Possingham，1977；彭永宏，1998）。其中酚类化合物在细胞破碎时会得到释放，其氧化产物与RNA 不可逆结合，产生褐化效应，导致 RNA 降解和丧失活性（Schneiderbauer et al.，1991）；多糖能与 RNA 共沉淀形成难溶胶状物，抑制许多酶的活性（Fang et al.，1992）；其他一些次生物质也会严重影响 RNA 提取的质量与产量（李宏和王新力，1999）。目前荔枝 RNA 的提取方法分为 4 类：（1）改良热硼法（陆旺金和蒋跃明，2003）；（2）改良 SDS 法（张以顺 等，2004；杨转英 等，2008；印华 等，2009）；（3）改良 CTAB 法（王家保 等，2006）；（4）CTAB + CBS 法（刘兴地和郑学勤，2008；禤维言和郑学勤，2009）。这些方法可以提取的荔枝组织包括叶片、花蕾、幼果、果皮、果肉、胚。但在这 4 种方法中均未涉及荔枝离区样品。离区虽然是研究果实脱落机制的一个重要部位，但在以往研究荔枝果实脱落的生理生化机制中均未涉及离区样品，其重要原因之一就是离区样品微量，要采集足够生理生化分析的样品量较为困难。而上述 4 种提取方法中所需的样品量一般需要 1 g 以上，如此大的取样量对于离区来说相当困难。以 4 mm 果柄（离区溢痕上下 2 mm 处切取样品）样品为例，1 g 样品大约需要 300 个果柄，1 个熟练工人切取这些样品用时 3 h，因此，获取足够量的离区样品是一个非常费时费工的问题。寻求一种微量快速简便的适合离区样品的总 RNA 提取方法，是决定在现代分子生物学研究中能否涉及离区这一部位的关键所在。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 4 月在华南农业大学荔枝园内 3 株 9 年生‘陈紫’荔枝上取样，样品以果穗形式（花后 30 d）在田间采集后立即放入冰壶，回实验室后在冰上分离幼果和离区（离区溢痕上下约 2 mm 处切取的果柄），3 株树的样品先混合再用液氮速冻，最后存放于 − 80 ℃冰箱中备用。

1.2 总 RNA 提取步骤

（1）提取液的配制：100 mmol · mL^{-1} Tris、200 mmol · mL^{-1} KCl、15 mmol · mL^{-1} EDTA、4%（kg · L^{-1}）N − 十二烷基肌氨酸钠（LSS），用 KOH 调 pH 值到 9.0；使用前加入 2%（kg · L^{-1}）PVP，以及按 1 mL 提取液加入 15 μL 的 DTT（10 mmol · mL^{-1}）的比例向提取液中加入 DTT。（2）用电子天平称取离区样品约 0.1 g，幼果样品约 0.2 g，用液氮研磨成干粉后装入 2 mL 离心管，再加入 1 mL 已预热到 70 ℃的提取液。剧烈摇晃离心管使得样品混合均匀，随后室温轻轻摇晃 5 min。25 ℃，12 000 r · min^{-1} 离心 15 min 后把上清液转入新的离心管。（3）向装有上清液的离心管中加入 200 μL 3 mol · L^{-1} NaAc（pH 5.2），剧烈摇晃离心管，混合完全后 25 ℃，12 000 r · min^{-1} 离心 5 min。把上清液转入新的离心管中。（4）向装有上清液的离心管中加入 1 mL（存放于 − 30 ℃）异丙醇，摇匀后 25 ℃，12 000 r · min^{-1} 离心 10 min，弃上清液。（5）用 400 μL Tris-HCl（pH 7.5）溶解沉淀，再加入 100 μL 3 mol · L^{-1} NaAc（pH 5.2），25 ℃，12 000 r · min^{-1} 离心 5 min，把上清液转入新离心管中。（6）向新离心管中加入 1.2 mL（− 30 ℃预冷）无水乙醇，轻轻上下颠倒离心管混匀后，− 30 ℃放 30 min，25 ℃，12 000 r · min^{-1} 离心 10 min，收集沉淀。（7）用 1.5 mL − 30 ℃预冷的 75%乙醇洗涤沉淀，25 ℃，10 000 r · min^{-1} 离心 10 min，弃上清液。重复 1 遍，抽真空后用 30 μL 无菌水溶解即为 RNA 液。

1.3 RNA 纯度、产量和完整性的检测

将 RNA 样品适当稀释后，先用紫外分光光度计进行初步检测，记录在紫外光 260 和 280 nm 的吸收值 A_{260} 和 A_{280}，并以 A_{260}/A_{280} 值鉴定所提取 RNA 的纯度。再用 1%琼脂糖电泳，溴化乙锭染色，凝胶成像系统观察 RNA 有无出现降解，并拍照。最后，用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整

性（RIN 值）以及 28S 和 18S 的比值，计算 RNA 的产量。

1.4　RT-PCR 检测

以 DNA 酶消化后的荔枝幼果和果柄 RNA 为模板，按 Promega 公司 M-MLV 反转录酶操作手册进行 cDNA 的合成。PCR 检测所用引物（由上海生工公司合成）根据荔枝 *Actin* 基因序列设计上游引物 P1：5′-GTATCGTGCTGGATTCTGGT-3′，下游引物 P2：5′-TGAGAGATGCGAGGATTGAT-3′。PCR 反应程序为：95 ℃变性 2 min；95 ℃ 30 s，53 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min 扩增 35 个循环；最后 72 ℃保温 10 min。用 DNA 酶消化后的荔枝幼果和果柄 RNA 以及灭菌后的超纯水为模板作为对照进行 PCR。扩增结束后于 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2　结果与分析

2.1　RNA 纯度和完整性

紫外分光光度计检测结果表明，从荔枝幼果和离区中提取 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值分别为 1.80 和 1.89（表 1），说明用本方法提取的 RNA 纯度较高，无蛋白质污染。

表 1　幼果和离区总 RNA 质量参数

Table 1　The total RNA quality from fruitlet and abscission zone

样品 Sample	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	28S/18S	RIN	产量/（μg · g^{-1}） Yield
幼果 Fruitlet	0.385	0.213	1.80	1.7	9.7	380
离区 Abscission zone	0.562	0.297	1.89	1.9	10.0	450

从图 1 的电泳结果可以清楚地看出 28S 和 18S 条带带型完整，边沿清晰锐利，且 28S 条带的亮度和宽度至少为 18S 的 1.5 倍以上，没有降解现象发生。Agilent 2100 生物分析仪所得结果的进一步证实，如幼果和离区中 28S/18S 值分别为 1.7 和 1.9，RIN 值则分别为 9.7 和 10.0（表 1）。

从 RNA 完整性峰图（图 2，图 3）也可以看出整个峰形图除了有 28S 和 18S 两个主峰外，几乎没有杂峰，且 28S 峰值和峰面积都比

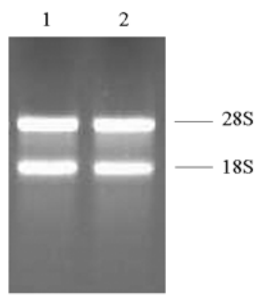

图 1　荔枝幼果和离区 RNA 电泳图

1：幼果；2：离区。

Fig. 1　Electrophoresis results of the total RNA from litchi fruitlet and abscission zone

1：Fruitlet；2：Abscission zone.

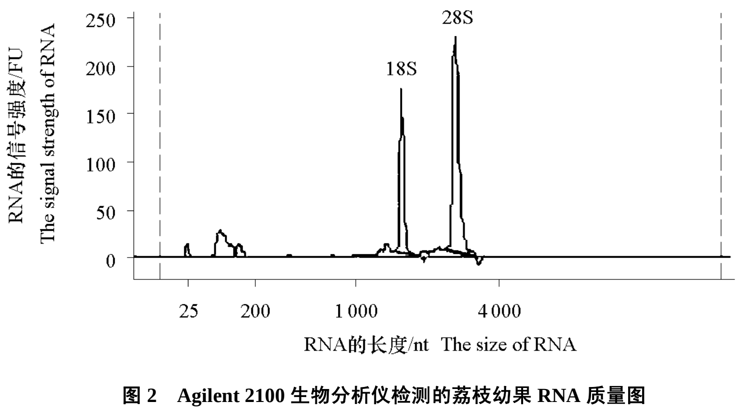

图 2　Agilent 2100 生物分析仪检测的荔枝幼果 RNA 质量图

Fig. 2　The litchi fruitlet RNA quality as assessed by Agilent 2100 Bioanalyzer

18S 的大，说明用本方法提取的 RNA 完整性很高，没有出现 RNA 的降解，可以进行下一步的试验。此外，用本方法提取 RNA 的产量也很高，在幼果中为 380 μg · g^{-1}，在果柄中为 450 μg · g^{-1}。

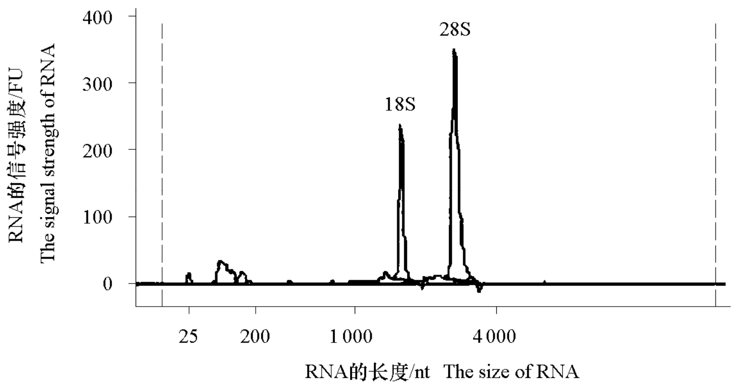

图 3 Agilent 2100 生物分析仪检测的荔枝离区 RNA 质量图

Fig. 3 The litchi abscission zone RNA quality as assessed by Agilent 2100 Bioanalyzer

2.2 RT-PCR 结果

以提取的荔枝幼果和离区 RNA 反转录成 cDNA 为模板，用荔枝 *Actin* 基因特异引物 P1、P2 进行 PCR，扩增出预期的 600 bp 左右的片段，而用 DNA 酶消化后的 RNA 和加水为模板的对照中没有扩增出条带（图 4）。由此进一步说明用本方法提取的 RNA 质量好，可以用于后续试验。

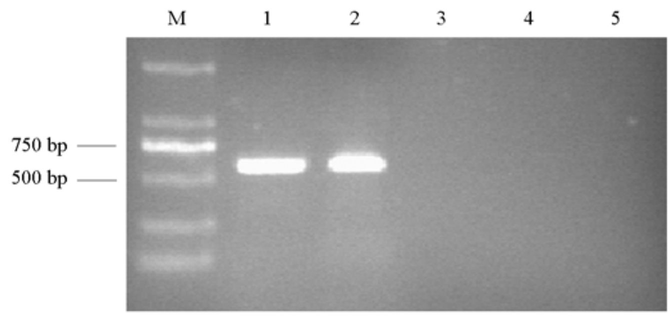

图 4 不同样品 RT-PCR 产物电泳图

M：Marker 2000；1：幼果 cDNA；2：离区 cDNA；3：水；4：幼果 RNA；5：离区 RNA。

Fig. 4 Electrophoresis results of RT-PCR products from different samples

M：Marker 2000；1：Fruitlet cDNA；2：Abscission zone cDNA；3：H_2O；4：Fruitlet RNA；5：Abscission zone RNA.

3 讨论

前人在命名 RNA 提取方法时一般都是根据提取液中起关键作用的试剂来命名的，如改良 SDS 法、改良 CTAB 和异硫氰酸胍法等。根据这一原则，本研究中 RNA 提取液中起关键作用的药剂为 LSS（N－十二烷基肌氨酸钠，N-lauroyl-sarcosine sodium），因此笔者将此 RNA 提取方法命名为 LSS 法。虽然之前也有文献报道提取液中含有 LSS 的成分（梁德勇 等，1999；伍国强 等，2008），但都与异硫氰酸胍（GIT）一起联用，用量也较小（0.5%左右）。而本研究中首次在提取液中把 LSS 作为唯一的关键试剂，且使用量也扩大到 4%。之所以在提取液中只选用 LSS，是基于两方面的原因：（1）LSS 是一种常用的蛋白变性剂，对 RNA 酶也有一定的抑制作用（梁德勇 等，1999；伍国

强 等，2008）；（2）相对于毒性较强的 CTAB、异硫氰酸胍、苯酚，其毒性很低，而相对于 SDS，其在高盐离子溶液中又有很好的溶解性。

在沉淀 RNA 方式上，前人主要是用 LiCl，因而整个提取过程一般 36 h 左右，而本方法用异丙醇沉淀 RNA 整个提取过程只要 2 h 左右，大大缩短 RNA 的提取时间，而且可以减小内源或外源 RNA 酶降解 RNA 的几率。

在除酚方面，前人的方法中大多都有使用 β–巯基乙醇，但 β–巯基乙醇在防止酚类物质褐化时也会带走部分的 RNA，因此本研究为防止植物材料中酚类物质的褐变而采用 PVP 和 DTT 联用的方式（李宏和王新力，1999）。

在除去多糖方面，虽然本研究和其他大多方法一样都是用 NaAc，但不同之处在于作者采用 NaAc 分步沉淀多糖的方式（Sharma et al.，2003），以减小多糖对提取 RNA 质量以及数量的影响。

或许正是由于以上这些原因，用 LSS 法提取的 RNA 产量较其他方法都高，在幼果和离区中分别达到 380 和 450 $\mu g \cdot g^{-1}$。LSS 法相对于其它的方法还有一个优点就是可以用于微量样品 RNA 的提取，运用 LSS 法进行 RNA 提取时样品可以只用 0.1 g。但是用 LSS 法提取的 RNA 存在 DNA 污染，因此用 LSS 法提取的 RNA 在使用前应进行 DNA 的消化处理。本研究用紫外分光光度计、凝胶电泳、RT-PCR 以及 Agilent 2100 生物分析仪等 4 种方法对用 LSS 法提取的 RNA 进行检测，RIN 值在 9.7 ~ 10.0 之间、28S/18S 值在 1.7 ~ 1.9 之间、产量在 380 $\mu g \cdot g^{-1}$ 以上、A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 1.9 之间、28S 和 18S 条带带型完整，边缘清晰锐利，满足高质量 RNA 的标准，因此 LSS 法是一种适合于荔枝幼果和离区总 RNA 提取的新方法。

目前最为常用的核酸分析技术是板状凝胶电泳技术，主要是用琼脂糖凝胶电泳来进行 RNA 质量的检测，虽然比较经济简便，但是肉眼所得的结果可能有偏差，往往需结合荧光或紫外分光光度计作进一步的定量分析。Agilent 2100 生物分析仪是基于生物芯片实验室的核酸分析系统，可克服传统的板状凝胶电泳的局限性（Nachamkin et al.，2001；刘翠华 等，2003；Brena et al.，2006），与常规的琼脂糖凝胶电泳分析方法相比除了准确度高、重复性好和灵敏度好外，Agilent 2100 生物分析仪无需进行凝胶制备、电泳、染色和脱色、成像及结果分析等步骤，因而操作更为简便省力，且所需的核酸样品和试剂用量少并可减少与危害物质（如 EB）的接触，减少废物量（景建洲 等，2009）。基于以上这些优点，笔者认为在进行诸如转录组、基因芯片、RNA 表达谱需要高质量的 RNA 试验中，采用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的质量将会替代常规的 RNA 检测方法。

用 Agilent 2100 生物分析仪评判 RNA 完整性良好的标准为：对于哺乳动物总 RNA 要求 RNA 28S/18S > 1.0，RIN ≥ 7；对于植物总 RNA 样本要求 RNA 28S/18S > 1.0，RIN 值不考虑。而运用本方法提取的 RNA 28S/18S 值都大于 1.7，且 RIN 值在 9.7 以上，所以本方法提取的 RNA 质量很高。本方法最大的优点是可以针对微量的样品进行 RNA 的提取，且在离心过程中对仪器没有要求，运用本方法可以一次性对多个的样品进行 RNA 提取。因在沉淀 RNA 时用异丙醇而不用 LiCl，推测本方法还可以用于小分子 RNA 的提取。

References

Brena R M，Auer H，Kornacker K. 2006. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. Nucleic Acids Res，34 (3)：e17.

Fang G，Hammar S，Grumet R. 1992. A quick and in expensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques，13：52–56.

Jing Jian-zhou，Zhao Pei-pei，Wang Yun-long，Chen Xiao-ke. 2009. Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in detection of foodborne *Pathogens salmonella*. Acta Agriculturae Boreali-occi-dentalis Sinica，18 (3)：296–299. (in Chinese)

景建洲，赵培培，王云龙，陈小科. 2009. 利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测食源致病性沙门氏菌. 西北农业学报，18 (3)：296 – 299.

Li Hong，Wang Xin-li. 1999. The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies. Biotechnology Bulletin，(1)：36 – 39. (in Chinese)

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.

Liang De-yong，Xu Guo-heng，Cui Zhen-zhong，Wang Xiao-min，Zhu Li-xia，Han Ji-sheng. 1999. Establishment one-step rapid extraction of RNA. Jouranl of Beijing Medical University，31 (5)：461 – 463. (in Chinese)

梁德勇，徐国恒，崔振中，王晓民，朱丽霞，韩济生. 1999. RNA 快速提取一步法的建立. 北京医科大学学报，31 (5)：461 – 463.

Liu Cui-hua，Ma Wen-li，Shi Rong. 2003. Agilent 2100 Bioanalyzer in the detection of human papillomavirus. Journal of First Military Medical University，23 (3)：213 – 215. (in Chinese)

刘翠华，马文丽，石 嵘. 2003. Agilent 2100 Bioanalyzer 在人乳头瘤病毒检测中的应用. 第一军医大学学报，23 (3)：213 – 215.

Liu Xing-di，Zheng Xue-qin. 2008. An effective method for extracting total RNA from young embryo of seedless litchi. Agricultural Science & Technology，9 (1)：29 – 31. (in Chinese)

刘兴地，郑学勤. 2008. 一种有效提取无核荔枝幼胚总 RNA 的方法. 农业科学与技术，9 (1)：29 – 31.

Lu Wang-jin，Jiang Yue-ming. 2003. Cloning and sequence analysis of expansin genes in *Litchi chinensis* Sonn. fruits. Scientia Agricultura Sinica，36 (12)：1525 – 1529. (in Chinese)

陆旺金，蒋跃明. 2003. 荔枝果实两个膨大素基因的克隆与序列分析. 中国农业科学，36 (12)：1525 – 1529.

Nachamkin I，Panaro N J，Li M. 2001. Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. Journal of Clinical Microbiology，39 (2)：754 – 757.

Newbury H J，Possingham J V. 1977. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compound. Plant Physiol，60 (2)：543 – 547.

Peng Yong-hong. 1998. Advances in the studies on mechanism of postharvest pericarp browning and technology of protection from browning of litchi. Journal of Tropical and Subtropical Botany，6 (1)：81 – 86. (in Chinese)

彭永宏. 1998. 荔枝采后果皮褐变机理与保鲜技术研究进展. 热带亚热带植物学报，6 (1)：81 – 86.

Schneiderbauer A H，Sandermann J，Ernst D. 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. Analytical Biochemistry，197：91 – 95.

Sharma A D，Gill P K，Sigh P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. Analytical Biochemistry，314 (2)：319 – 321.

Wang Jia-bao，Xu Bi-yu，Du Zhong-jun，Lai Jian-xun，Jin Zhi-qiang. 2006. Extracting total RNA from pericarp of postharvest litchi fruit by improved CTAB method. Journal of Agricultural Biotechnology，14 (6)：998 – 999. (in Chinese)

王家保，徐碧玉，杜中军，赖建勋，金志强. 2006. 改良 CTAB 法从采后荔枝果皮中提取总 RNA. 农业生物技术学报，14 (6)：998 – 999.

Wu Guo-qiang，Xi Jie-jun，Zhou Xiang-rui，Ma Qing，Wang Suo-min. 2008. An improved method for extracting total RNA from leaves and roots of the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. Molecular Plant Breeding，6 (1)：197 – 200. (in Chinese)

伍国强，席杰军，周向睿，马 清，王锁民. 2008. 一种改进的多浆旱生植物霸王叶和根总 RNA 提取方法. 分子植物育种，6 (1)：197 – 200.

Xuan Wei-yan，Zheng Xue-qin. 2009. A practical method for extracting total RNA from flower and fruit of *Litchi*. Guihaia，29 (1)：59 – 61. (in Chinese)

禤维言，郑学勤. 2009. 一种适于提取荔枝花与幼果组织总 RNA 的方法. 广西植物，29 (1)：59 – 61.

Yin Hua，Zhou Zhao-de，Wu Zhi-xiang. 2009. Comparison of two methods for extracting RNA from litchi. Tropical Agricultural Engineering，33 (2)：1 – 3. (in Chinese)

印 华，周兆德，吴志祥. 2009. 2 种荔枝 RNA 提取方法的比较. 热带农业工程，33 (2)：1 – 3.

Yang Zhuan-ying，Hu Gui-bing，Wang Hui-cong，Ouyang Ruo，Chen Hou-bin. 2008. Total RNA extraction and mRNA differential display analysis of litchi pericarps at different coloring stages. Journal of Fruit Science，25 (2)：281 – 285. (in Chinese)

杨转英，胡桂兵，王惠聪，欧阳若，陈厚彬. 2008. 不同着色期荔枝果皮总 RNA 的提取及 mRNA 差显分析. 果树学报，25 (2)：281 – 285.

Zhang Yi-shun，Xiang Xu，Fu Jia-rui. 2004. A method for extraction of total RNA from litchi embryo. Plant Physiology Communications，40 (2)：226 – 228. (in Chinese)

张以顺，向 旭，傅家瑞. 2004. 一种提取荔枝胚中总 RNA 的方法. 植物生理学通讯，40 (2)：226 – 228.