

- Shuangyou *Vitis amurensis* Rupr. Journal of Jilin Agricultural University, 2001, 23 (4): 47~50 (in Chinese)
- 7 葡萄研究协作网. 葡萄营养特性及施肥技术研究. 辽宁农业科学, 1993 (5): 4~8
The web of investigation and cooperation of grape. Studies on nutrition characteristics and fertilization technique of grape. Liaoning Agricultural Sciences, 1993 (5): 4~8 (in Chinese)
- 8 葡萄研究协作网. 葡萄营养积累、分布及专用肥料研究. 磷肥与复肥, 1994 (2): 69~75
The web of investigation and cooperation of grape. Study on the nutrition accumulation, distribution and special fertilizer for grape. Phosphate and Compound Fertilizer, 1994 (2): 69~75 (in Chinese)
- 9 张淑玲, 何尚仁, 杨建国, 王小芹. 葡萄营养与施肥. 北方园艺, 2000 (3): 19~20
Zhang S L, He S R, Yang J G, Wang X Q. Nutrition and fertilization in grape. Northern Horticulture, 2000 (3): 19~20 (in Chinese)
- 10 司聿政. 葡萄对营养元素的要求及其施肥技术. 湖北农业科学, 1994 (4): 46~47
Si Y Z. The nutrient elements demand and fertilization techniques of grape. Hubei Agricultural Sciences, 1994 (4): 46~47 (in Chinese)
- 11 罗国光. 酿酒葡萄产量与质量的关系及其调控. 中国果树, 1999 (2): 47~48
Luo G G. The relation of production and quality and its regulation for wine grape. China Fruits, 1999 (2): 47~48 (in Chinese)

室温离心 SDS法快速提取苹果等植物组织 RNA

成建红 张玉刚 李天忠* (中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

Quick SDS Method for RNA Isolation from Apple and Other Plant Tissues with Room Temperature Centrifugation

Cheng Jianhong, Zhang Yugang, and Li Tianzhong* (Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

关键词: 室温; 快速; RNA提取; 植物组织; SDS

中图分类号: S 66; Q 78 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0470-01

植物 RNA 提取常用的有异硫氰酸胍法、盐酸胍法、SDS-酚法、CTAB 法、酸酚法、一步法以及 TRIzol 等商品化的试剂盒等, 大都因为实验试剂昂贵, 需要至少 5 h 到 3 d 的操作时间, 效果良莠不齐。作者在试验过程中发现快速短时操作是提取完整 RNA 的关键。我们在夏季 32℃ 室温条件下, 采用冰上操作的方法, 用普通离心设备 (上海安亭科学仪器厂, TGL-16G 台式离心机), 采用缩短抽提和沉淀时间的快速 SDS 法在苹果和甜樱桃的多个组织中提取了质量较好的 RNA。

现以苹果叶片为例: 取 -70℃ 保存的叶片约 0.1 g, 用液氮预冷的研钵冷冻研样至白色粉末状; 加样至预冷的 1.5 mL 的离心管; 依次迅速加入配好的 750 μL 的 PCI (酚 氯仿 异戊醇 = 25:24:1) 和 750 μL 的 SDS buffer (NaCl, 100 mmol·L⁻¹; Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8.0; EDTA 10 mmol·L⁻¹; SDS 1%); 涡悬震荡 30 s, 冰浴 2~3 min; 普通离心机室温离心, 保持 15 000 rpm 最高转速 10 s; 转移上清液至新管, 加等体积 CI (氯仿 异戊醇 = 24:1), 上下颠倒混匀; 室温 15 000 rpm 离心 5 min; 取上清液至新管, 加入 0.7~1.0 倍的 -20℃ 保存的异丙醇, 颠倒混匀; 室温 15 000 rpm 离心 5 min; 去上清液, 加入 300 μL 70% 乙醇轻微摇洗沉淀, 倒去洗液; 再加入 300 μL 70% 乙醇将沉淀弹起, 15 000 rpm 离心 30 s; 去上清液, 用未污染的吸水纸条吸去残液; 风干沉淀 5~10 min; 根据沉淀多少取 20~50 μL 无核酸酶水至沉淀完全溶解; 电泳检测 RNA 质量; 加入 1/20 体积的核酸酶抑制剂混匀, -70℃ 保存备用。

整个试验从研样至电泳检测需 2.5 h, 比 SDS 低温常规操作节省约一半时间, 是 CTAB 法时间的 1/5 左右。提取效果与 SDS 常规低温操作纯度接近, 产率增大, 较 CTAB 法纯度偏低, 产量增大。

对甜樱桃 3 个组织 RNA 进行反转录, 获得了可视片段大小在 250~3 000 bp 的较好的双链 cDNA 弥散带。以双链 cDNA 为模板, 内参基因 *Actin* 在 3 个组织中均有明亮的 1 100 bp 的 PCR 扩增条带, 表明 3 个组织的 cDNA 具有良好的可用性。*PaSFB* 基因仅在花粉中获得了大小近 500 bp 的特异性扩增片段, 而花柱和叶片 cDNA 中无扩增产物, 表现出 *SFB* 家族基因花粉组织特异性表达的特征。与内参基因 *Actin* 相比, *PaSFB* 的表达量较低。

试验结果表明, 室温快速 SDS 法提取植物组织 RNA 在蔷薇科一些种的多个组织中完全可行, 并获得了较好的结果, 尽管获得的 RNA 纯度偏低, 但并未影响到对表达量较低的 *PaSFB* 基因的克隆及其表达分析。该方法比 SDS 法和 CTAB 法能获得较高的 RNA 产率, 在一定程度上为克隆丰度较低的基因提供了保证。对要求较高的 RNA 样品, 建议增加抽提步骤, 纯化 RNA。本方法提取植物组织 RNA 用时短, 室温操作简单易行, 获得的 RNA 较完整, 产量高, 并可用于常规分子试验研究, 尤其在 Northern 杂交大量提取 RNA 时有效节约了时间, 具有较强的实用性和可操作性。

收稿日期: 2005-09-06; 修回日期: 2006-06-06

基金项目: 北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室资助项目; 国家留学基金会留学基金资助项目 (21162446)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: litianzhong1535@163.com)