

# 干种子高质量总 RNA 的快速提取方法

胡群文<sup>1,2</sup>, 陈晓玲<sup>1</sup>, 张志娥<sup>1</sup>, 辛霞<sup>1</sup>, 卢新雄<sup>1</sup>, 刘旭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081;

<sup>2</sup>安徽省安庆市种植业管理局, 安庆 246001)

**摘要:** 高效快速提取高质量的种子 RNA 是种子分子生物学研究的基础。现有的提取方法难以高效快速地从种子中得到高质量的总 RNA。本试验有机地将改进 SDS 法和异硫氰酸胍法相结合, 采用改进的酸性 SDS 提取液、不溶性 PVPP(聚乙烯聚吡咯酮)阻止酚类氧化、KAc 去除多糖、异丙醇沉淀 RNA, 可以高效地从 0.01~0.1 g 水稻、大豆、蚕豆、芸豆、花生等干种子中提取到高质量总 RNA。此法提取的总 RNA, 能够满足分子生物学研究的要求, 可以进行反转录和 RT-PCR 反应, 用于基因表达研究, 并为从具相似成分的其他物种干种子提取总 RNA 提供参考方法。

**关键词:** 种子; 总 RNA 提取; SDS; 异硫氰酸胍; RNA 反转录; RT-PCR

## A Rapid Extraction Method of High Quality Total RNA from Dry Seeds

HU Qun-wen<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-ling<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-e<sup>1</sup>, XIN Xia<sup>1</sup>, LU Xin-xiong<sup>1</sup>, LIU Xu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Germplasm Resources & Biotechnology,

Ministry of Agriculture / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>2</sup> Bureau of planting management of Anqing City, Anqing 246001)

**Abstract:** Extraction of high-quality RNA is the base for seeds molecular biology research. Rapid isolation of high-quality total RNA from dry seeds is difficult by the extraction methods reported previously. In this new protocol, SDS and guanidinium thiocyanate methods were combined for RNA extraction and high-quality of total RNA was obtained in about 3.5h. Extraction at low pH, precipitation of polysaccharides with potassium acetate, usage of phenol blocker polyvinylpyrrolidone (PVPP) yielded high-quality RNA from rice, soybean, broad bean, kidney bean and peanut with a small number of samples of 0.01-0.1g. The extracted RNA was suitable for RNA reverse transcription and RT-PCR. This method can provide some references for isolating total RNA from dry seeds of other species with similar chemical composition.

**Key words:** Seed; Total RNA isolation; SDS; Guanidinium thiocyanate; RNA reverse transcription; RT-PCR

人类食物的 70% 是直接来自于植物种子, 种子还是植物遗传资源的主要载体。在种子发育形成、休眠、萌发和幼苗建成等领域研究中, 基因动态表达、cDNA 文库构建、基因克隆、体外翻译等以 RNA 分子为基础的分子生物学研究需要足够量和高质量的 RNA, 高效、快速的 RNA 提取方法成为关键技术。

RNA 分子的种类和数量具有鲜明的时间性和空间性, 研究中常常必须使用特定的研究材料。植物材料中的多糖、蛋白质、脂肪和一些次生代谢物会在很大程度上干扰 RNA 的提取质量和回收率。种子中含有大量的多糖、贮藏蛋白、脂肪, 多数还含有酚(如棉花种子)、酮(如一些林木种子)、甾(如油菜种子)等次生代谢物, 高质量的 RNA 提取难度较

收稿日期: 2009-05-25

修回日期: 2009-11-10

基金项目: 农作物基因资源安全保存评价关键技术研究(2006BAD13B10); 农业部农作物种质资源保护利用项目(2130135)

作者简介: 胡群文, 在读博士, 研究方向为种质资源保存与种子生物学。E-mail: huqw@mail.caas.net.cn

通讯作者: 卢新雄, 研究员, 研究方向为种质资源保存与种子生物学。E-mail: xxlu@caas.net.cn

刘旭, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向为种质资源保存与种子生物学

大。目前种子 RNA 提取方法主要有纤维柱法<sup>[1]</sup>、SDS 法<sup>[2-3]</sup>、CTAB 法<sup>[4-5]</sup>、十二烷基肌氨酸钠/盐酸胍法<sup>[6-7]</sup>、高盐法<sup>[8]</sup>、尿素/LiCl 法<sup>[9-10]</sup>等。这些方法或是费用昂贵,或是操作步骤多、提取耗时长。由于不同植物或不同组织材料的有机物成分差别很大,合适的 RNA 提取方法也可能不一样。因而对于特定的研究材料来说,RNA 的提取需要通过多种方法和多次试验来检验<sup>[11]</sup>。

本试验以 SDS/酚法<sup>[2,12]</sup>为基础,改进提取液组分,从小量干种子样品中高效提取高质量 RNA,操作步骤少,时间较短,回收率较高,适用于淀粉类、蛋白质类和脂肪类种子。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料包括淀粉类的水稻(分成胚和胚乳两部分)(*Oryza sativa* L.),蛋白质类的大豆(*Glucine max* L. merr)、蚕豆(*Vicia faba* L.)、芸豆(*Phaseolus vulgaris* L.)以及脂肪类的花生(*Arachis hypogaea* L.)种子。种子去除种皮或颖壳,先经简单破碎,液氮研磨成细末后装入 2ml 离心管,样品均称重。

### 1.2 主要试剂

提取试剂均经 DEPC 处理灭活 RNA 酶,提取过程中全部使用无 RNA 酶或经 RNA 酶灭活处理的耗材、器具。

RNA 反转录、除 DNA 等步骤所用生物制剂 RNase-free DNase I、RNA 酶抑制剂、M-MLV 反转录酶、Oligo(dT)<sub>15</sub>引物均为 Promega 产品。

SDS 提取液 I<sup>[12]</sup>:50mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 200 mmol/L NaCl, 1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 2% 不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVPP), 1% 2-巯基乙醇(2-ME, 使用前加入)。

改进 SDS 提取液 I: 100mmol/L NaAc-HAc, pH 5.2, 200mmol/L NaCl, 1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 2% PVPP, 1% 2-ME(使用前加入)。

提取液 II: 38% 水饱和酚(V/V), 1mol/L 异硫氰酸胍, 1mol/L 硫氰酸铵, 总体积 1/30 倍的 3mol/L NaAc, pH 5.0。

### 1.3 总 RNA 提取步骤

(1) 干种子样品 0.01~0.1g 加 PVPP 充分悬浮的 1ml SDS 提取液 I(或改进 SDS 提取液 I), 涡旋混匀 3min。60℃ 水浴 10min, 其间涡旋 2~3 次。

(2) 加总体积 1/3 的 5mol/L KAc(pH 4.8), 混匀后冰浴 10min。

(3) 4℃ 下 13000g 离心 15min, 取上清加 1 倍体积的提取液 II, 涡旋 3min, 室温放置 5min。1ml 液体加 0.3ml 氯仿:异戊醇(24:1), 涡旋 1min, 室温放置 3min。4℃ 下 12000g 离心 15min, 取上清加 1 倍体积的水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 涡旋 1min, 室温放置 3min。

(4) 4℃ 下 12000g 离心 15min。重复水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 直至上下两相界面处没有白色沉淀。

(5) 取上清液加 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc, pH 5.0, 混匀后加 1 倍体积的异丙醇, 室温放置 10min。4℃ 下 12000g 离心 15min。弃上清液, 75% 乙醇洗 2~3 次。

(6) 短时真空干燥后溶于适量 DEPC 处理的水中, 可以 50℃ 水浴助溶 10min。分装成小份, 70℃ 保存备用, 用于质量检测和下一步实验。

### 1.4 RNA 质量检测

1.4.1 RNA 非变性凝胶电泳分析 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡电泳用具 30min。1.2% 琼脂糖凝胶, 1×TAE 缓冲液, 电压 5V/cm, 电泳 30min, EB 显色。

1.4.2 紫外分光光度计检测 测定 OD<sub>230</sub>、OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 值, 计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值, 分析和计算 RNA 浓度和纯度。

### 1.5 RNA 反转录和 RT-PCR

在进行 RNA 反转录之前, 应考虑先去除微量 DNA 残留物。例如, 水稻胚提取的总 RNA 4μg, 加 RNase Inhibitor 80 单位, 60℃ 水浴 10min, 冷却后加 DNase I 4 单位和缓冲液(10×)4μl, 37℃ 水浴 30min 后, 氯仿抽提 1 次, 1 倍体积异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗 2~3 次后干燥, 溶于适量 DEPC 处理的水中。紫外检测和琼脂糖电泳检测 RNA 浓度和质量后, 取 1μg 去除 DNA 的总 RNA, 按 M-MLV 反转录酶制造商说明书操作, 采用 Oligo(dT)<sub>15</sub>引物进行 RNA 反转录, 合成第一链 cDNA。稀释 10 倍后进行 RT-PCR, 或 -70℃ 放置待用。

所扩增的水稻持家基因<sup>[13]</sup>是  $\beta$ -TUB、UBC、UBQ-5 和 UBQ-10, 目的片段长度分别为 82bp、76bp、69bp 和 81bp。PCR 程序: 95℃ 4min; 95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 延伸 4min。5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 琼脂糖电泳结果

未改进的 SDS 法提取液含 Tris-HCl, pH 9.0, 其提取的水稻胚总 RNA 的 18SrRNA 和 28SrRNA 主条

带较清晰,但是 DNA 带也明显可见(图 1-A)。表明基因组 DNA 残留较多。改进 SDS 方法提取液含 NaAc-HAc,pH 5.2,用此方法提取的大豆、芸豆、花生和蚕豆种子以及水稻胚乳、水稻胚总 RNA 的 18SrRNA 和 28SrRNA 主条带清晰,表明 RNA 降解少、完整性好(图 1-B)。点样孔看不到蛋白质污染,28SrRNA 上方也没有 DNA 污染带,表明 RNA 纯度也较好。

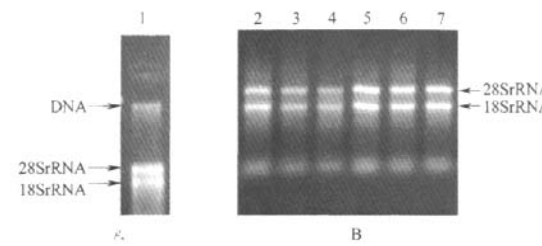


图 1 干种子总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from dry seeds

1:未经改进的 SDS 法提取的干水稻种子胚总 RNA;2~7:分别是改进的 SDS 法提取的大豆种子、芸豆种子、水稻胚乳、水稻胚、花生种子和蚕豆干种子总 RNA

2.2 紫外分光光度计检测结果

较纯净 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$ ,  $OD_{260}/OD_{230} = 2.0 \sim 2.8$ <sup>[14]</sup>。SDS 改进法提取的干种子总 RNA 紫外分光光度计检测,除水稻胚乳外,其他样品  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.9~2.1,表明 SDS 改进方法提取的 RNA 样品纯度较好,酚类和蛋白质等杂质少。各类干种子 RNA 回收率在 378.4~1 485.6  $\mu\text{g/g}$ 。表明种子种类或组织不同,总 RNA 的提取回收率差异较大。

表 1 SDS 改进法提取的干种子总 RNA 质量和回收率  
Table 1 The quality and yield of total RNA isolated with advanced SDS method

样品 Sample	$OD_{260}/OD_{230}$	$OD_{260}/OD_{280}$	回收率( $\mu\text{g/g}$ ) Yield
大豆	1.95	1.93	838.7
芸豆	2.22	2.10	580.7
水稻胚乳	2.14	1.60	378.4
水稻胚	2.74	2.12	1485.6
花生	1.87	2.00	690.8
蚕豆	2.27	2.08	1258.1

2.3 RNA 反转录及 RT-PCR 扩增结果

取水稻胚总 RNA 反转录的 cDNA 第一链为模板,用 4 个水稻持家基因为内参基因设计引物进行扩增。从图 2 可以看到,扩增的条带单一而且清晰,片

段长度与目的片段长度一致。表明此法提取的 RNA 质量好,可以进行 RNA 反转录和 PT-PCR 等试验。

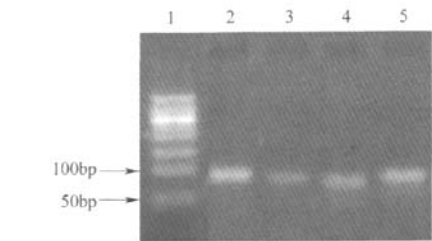


图 2 水稻种子胚 4 个内参基因的 RT-PCR 结果  
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified from 4 pairs of primers from rice embryo reference genes  
1:DNA marker 50 bp ladder;2~5:分别是水稻持家基因  $\beta$ -TUB、UBC、UBQ-5 和 UBQ-10,目的片段长度为 82bp、76bp、69bp 和 81bp

3 讨论

Trizol 试剂一步法集裂解组织细胞并去除蛋白质于一步操作之中,是目前提取植物总 RNA 速度最快的方法。本试验曾试图用 Trizol 试剂和异硫氰酸胍法提取种子总 RNA。但是提取液和样品混合后即呈凝胶状,不能分层,也不能继续进行下一步操作,导致无法提取种子 RNA。为提取到较理想的干种子材料总 RNA,考虑采用 SDS 法、CTAB 法等分步提取方法,即细胞裂解后,尽可能先去除多糖、蛋白质等有机物质,再进一步用酸性酚氯仿抽提。

本试验对种子总 RNA 提取方法进行了改进:以 NaAc-HAc 取代 Tris-HCl 调节缓冲液 pH 值,保持提取液呈酸性。后继步骤中的提取体系溶液呈酸性,使 RNA 更多地溶于水相中,提高了 RNA 的回收率和去除 DNA 的效率。RNA 提取过程中,提取体系的 pH 值对提取效果影响很大。特别是酚-氯仿抽提时,不同 pH 值下 DNA 和 RNA 在水相和有机相中的溶解度有差异<sup>[15]</sup>,pH8.0 时,DNA 和 RNA 均溶解于水相;pH=5.3,DNA 溶于有机相,RNA 溶于水相。水相 pH 6.4 时,水相中溶有 DNA;水相 pH 5.2 时,水相中无 DNA。酚-氯仿液的缓冲能力有限,即使是用酸性酚-氯仿(pH 值为 5.0),由于上步提取液的 pH 值较高,如 pH 8.0~9.0,提取体系也不能维持适宜 DNA/RNA 分相的 pH 值。未改进的 SDS 法提取种子总 RNA 回收率较高<sup>[12]</sup>,但是 pH 9.0 的提取液使得总 RNA 粗提液中 DNA 残留多(图 1-A),必须再经纯化步骤才能得到高质量的 RNA,这样增加了操作步骤,延长了操作时间。较原 SDS 法

的另一改进之处是在提取液中增加了不溶性 PVPP 以去除酚类物质、KAc 除多糖,在沉淀 RNA 之前尽可能去除影响提取质量的有机物杂质,利于提高提取 RNA 的纯度。

RNA 分子稳定性远不如 DNA,提取步骤多、耗时长会大大影响提取 RNA 的回收率和质量。经过上述提取液的改进,除多糖、除蛋白质效率较高,采用异丙醇沉淀 RNA,可以避免采用一般需要长时间甚至过夜的 LiCl 沉淀 RNA 法,从而减少了操作步骤,缩短了提取时间。对于 10 个左右的样品,约 3.5h 可从样品得到 RNA。

本方法提取干种子总 RNA 的回收率较高,适合高效地从 0.01 ~ 0.1g 小量样品中提取干种子总 RNA,产量可以满足 RT-PCR 的需要。同一植物不同组织材料或由于同一组织不同植物有机物成分有时差别很大,合适的 RNA 提取方法也可能不一样。因而对于特定的研究材料来说,RNA 的提取需要通过多种方法和多次试验来检验<sup>[11]</sup>。本方法成功地从淀粉类、蛋白质类和脂肪类的水稻、大豆、蚕豆、芸豆、花生等干种子中提取到高质量的总 RNA,表明此方法具有一定的广泛适用性,可为具有相似成分的其他物种提取干种子总 RNA 时提供参考。

#### 参考文献

- [1] Pramanik S K, Reynolds T L, MacIsaac S A, et al. Rapid and efficient purification of seed messenger RNA without phenol: chloroform extraction[J]. Seed science research, 1993, 3: 137-139
- [2] Gao J W, Liu J Z, Li B, et al. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and foavonoids[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 185a-185i
- [3] Hosein F. Isolation of high quality RNA from seeds and tubers of the Mexican yam bean (*Pachyrhizus erosus*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 19: 65a-65e
- [4] 沈文彪, 汪仁, 王益华, 等. 从水稻种胚中提取 RNA 的新方法[J]. 遗传, 2003, 25(2): 208-210
- [5] 温小杰, 张桂寅, 王省芬, 等. 棉花组织总 RNA 的快速提取方法[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 147-150
- [6] Sharma A D, Gill P K, Singh P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 314: 319-321
- [7] Singh G, Kumar S, Singh P. A quick method to isolate RNA from wheat and other carbohydrate-rich seeds[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21: 93a-93f
- [8] Suzuki Y, Kawazu T, Koyama H. RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana* [J]. Bio Techniques, 2004, 37: 542-544
- [9] 姚红艳, 赵双官, 夏光敏. 改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总 RNA[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 86-88
- [10] Tai H H, Pelletier C, Beardmore T. Total RNA isolation from *Picea mariana* dry seed[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22: 93a-93e
- [11] 李宏, 王新力, 彭学贤, 等. 香蕉不同组织中总 RNA 的有效分离[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(5): 384-388
- [12] 李浩, 张平平, 查向东, 等. 高质量的小麦种子总 RNA 的快速提取方法[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 877-881
- [13] Jain M, Nijhawana A, Tyagi A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345: 646-651
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第 3 版)[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 2002
- [15] 袁明珠, 温柔, 刘吉升, 等. 几种植物材料中总 RNA 的提取[J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 285-292

# 干种子高质量总RNA的快速提取方法

作者: [胡群文](#), [陈晓玲](#), [张志娥](#), [辛霞](#), [卢新雄](#), [刘旭](#), [HU Qun-wen](#), [CHEN Xiao-ling](#),  
[ZHANG Zhi-e](#), [XIN Xia](#), [LU Xin-xiong](#), [LIU Xu](#)

作者单位: [胡群文, HU Qun-wen\(中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点  
开放实验室, 北京, 100081; 安徽省安庆市种植业管理局, 安庆, 246001\)](#), [陈晓玲, 张志娥, 辛  
霞, 卢新雄, 刘旭, CHEN Xiao-ling, ZHANG Zhi-e, XIN Xia, LU Xin-xiong, LIU Xu\(中国农业科  
学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京, 100081\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC PKU**

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11(3)

## 参考文献(15条)

1. [姚红艳;赵双宜;夏光敏](#) [改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总RNA](#)[期刊论文]-[中国生物过程杂志](#) 2003(04)
2. [Suzuki Y;Kawazu T;Koyama H](#) [RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of Arabidopsis thaliana](#) 2004
3. [Singh G;Kumar S;Singh P](#) [A quick method to isolate RNA from wheat and other carbohydrate-rich seeds](#) [外文期刊] 2003(1)
4. [Sharma A D;Gill P K;Singh P](#) [RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides](#) 2003
5. [温小杰;张桂寅;王省芬](#) [棉花组织总RNA的快速提取方法](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2004(01)
6. [沈文飏;汪仁;王益华](#) [从水稻种胚中提取RNA的新方法](#)[期刊论文]-[遗传](#) 2003(02)
7. [袁明珠;温柔;刘吉升](#) [几种植物材料中总RNA的提取](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2005(02)
8. [萨姆布鲁克·J;拉塞尔 D W;黄培堂;王嘉玺, 朱厚础](#) [分子克隆实验指南](#) 2002
9. [Jain M;NijhawanA;Tyagi A K](#) [Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR](#)[外文期刊] 2006(2)
10. [李浩;张平平;查向东](#) [高质量的小麦种子总RNA的快速提取方法](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2006(06)
11. [李宏;王新力;彭学贤](#) [香蕉不同组织中总RNA的有效分离](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 1999(05)
12. [Tai H H;Pelletier C;Beardmore T](#) [Total RNA isolation from Picea mariana dry seed](#)[外文期刊] 2004(1)
13. [Hosein F](#) [Isolation of high quality RNA from seeds and tubers of the Mexican yam bean\(Pachyrhizus erosus\)](#) [外文期刊] 2004
14. [Gao J W;Liu J Z;Li B](#) [Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids](#)[外文期刊] 2001
15. [Pramanik S K;Reynolds T L;MacIsaac S A](#) [Rapid and efficient purification of seed messenger RNA without phenol:chloroform extraction](#) 1993

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201003018.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201003018.aspx)