

寒地水稻优质 RNA 提取技术优化

刘华明,董志博,隋晓凯,王春雷,王 阳,周运泽,孙晓丹

(黑龙江大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 15000)

摘要:空育 131 和稻花香是黑龙江省很有代表性的寒地栽培品种,也是育种研究的重要材料。为了获取此品种的优质 RNA,以经低温避光处理 3 d 的空育 131 及稻花香水稻的 10 日龄水稻苗叶为材料,利用优化的 UNIQ-10 柱式 Total RNA Extractor(Trizol)试剂盒法提取 RNA。之后,进行 RT-PCR 反应,并对 RT-PCR 的结果进行琼脂糖凝胶电泳的检测。结果表明:通过优化,改进了 UNIQ-10 柱式 Total RNA Extractor(Trizol)试剂盒法,提取的 RNA 纯度较高, A_{260}/A_{280} 均接近 1.8,并且 RT-PCR 的条带清晰。

关键词:水稻;RNA;Trizol;RT-PCR

中图分类号:S511 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)07-0009-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.07.0009

水稻(*Oryza sativa*, $2n=24$)禾本科、稻属的典型代表作物,原产于温热带地区。水稻作为世界上最重要的粮食作物之一,在全球的粮食生产和消费中具有举足轻重的地位,在黑龙江省更是农民增收的主要作物。

近年来,随着生物技术的不断进步和发展,基因的克隆和表达已成为常规分子生物学研究手段。水稻基因工程研究需要从水稻材料中提取高纯度的 RNA。RNA 分离纯化是基因表达分析的前提,纯化后的 RNA 可应用于 cDNA 合成、反转录 PCR(RT-PCR)、定量 RT-PCR 等。与 RNA 相关的技术还有 SELEX 技术、RNA 干扰技术、引诱物技术、核酶技术^[1-2]等。因此,如何分离到高纯化的 RNA,对于后续试验至关重要。但由于 RNA 很容易被 RNase 降解,而且 RNase 广泛存在不易变性失活,因此,高质量 RNA 的分离已经成为关键的分子生物学技术之一。目前水稻 RNA 提取方法主要有:①试剂盒法,采用的 Trizol 具有超强的裂解能力和抽提灵敏度,结合试剂盒采用特殊的吸附膜,大大增强了 RNA 的得率。得到的 RNA 纯度好,完整性高。提取的 RNA 没有 DNA 和蛋白污染,可用于 Northern blot, Dot blot, polyA 筛选,体外翻译, Rnase 保护^[3-4];②异硫氰酸胍-超速离心法,异硫氢酸胍(GITC)是一类解偶联剂,与细胞作用后,蛋白

质空间结构消失,蛋白质迅速与核酸解离,细胞结构降解,释放出 RNA^[5];③异硫氰酸胍-酚-氯仿法,这种方法包括用含异硫氰酸胍和酚的一种单相液来裂解细胞。加入氯仿产生第二相(有机相),DNA 和蛋白质在有机相中被抽提,酸性苯酚可促使 RNA 进入水相,离心后可形成水相层和有机层,这样 RNA 与仍留在有机相中的蛋白质和 DNA 分离开;④CTAB 法^[6],CTAB 是一种阳离子去污剂,在低离子强度溶液中 CTAB 可以将核酸与酸性多聚糖沉淀出来,而蛋白质和中性多聚糖仍留在溶液里。在离子强度较高的溶液中,CTAB 会与蛋白质、大多数酸性多聚糖以外的多聚糖形成复合物,不能沉淀出来核酸。然后用有机溶剂酚和氯仿抽提去除酚类、蛋白质、多糖等杂质,异丙醇/无水乙醇等沉淀即可使核酸分离出来。

本研究主要用采用改进的 UNIQ-10 柱式 Torzol 总 RNA 提取试剂盒对水稻叶 RNA 进行提取,并对试验方法进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻品种空育 131 及稻花香,均由黑龙江大学生命科学学院寒地水稻分子研究室李荣田教授提供。试验所用仪器设备有 UNIQ-10 柱式 Torzol 总 RNA 提取试剂盒(生工生物工程股份有限公司生产)、Eppendorf 分光光度计(型号:BioSpectrometer, Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 试验前处理及设计 配置 0.1% DEPC 水,将试验用的 Tip 头,离心管,PCR 管放入 DEPC 水过夜浸泡,然后将其取出甩干分别放入

收稿日期:2015-03-02

基金项目:国家“863”资助项目(2014AA10A603)

第一作者简介:刘华明(1992-),男,海南省海口市人,在读学士,从事细胞分子生物学研究。

通讯作者:孙晓丹(1974-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,讲师,从事细胞分子生物学研究。E-mail:sunxiaodan2013@outlook.com。