

杨 昭,何春兰,李芬芳,等. 改良热硼酸法提取青香蕉果肉总 RNA 的条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):49-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.012

改良热硼酸法提取青香蕉果肉总 RNA 的条件优化

杨 昭¹,何春兰¹,李芬芳²,陈 娇²,李奕星²,陈文学³,袁德保²

(1. 广东食品药品职业学院,广东广州 510520;

2. 中国热带农业科学院海口实验站海南省香蕉遗传改良重点实验室,海南海口 570102;3. 海南大学食品学院,海南海口 570228)

摘要:针对青香蕉果肉组织富含多糖、多酚类物质的特点,采用改良热硼酸法提取青香蕉果肉组织中的总 RNA,探讨提取缓冲液 pH 值、离子浓度、CaCl₂ 浓度、处理温度、处理时间、LiCl 沉淀时间对总 RNA 提取质量的影响,并用异丙醇简化 LiCl 沉淀总 RNA 过程。结果表明,获得了 1 种快速提取青香蕉果肉组织中总 RNA 的方法,经逆转录 PCR (RT-PCR) 验证,该方法适用于黄香蕉果肉、黄香蕉果皮、香蕉花、青香蕉果肉、青香蕉果皮中总 RNA 的提取。

关键词:热硼酸法;青香蕉;异丙醇沉淀;总 RNA

中图分类号:S668.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)15-0049-05

香蕉是世界上贸易量很大的水果,被联合国粮农组织定位为发展中国家的第 4 大粮食作物^[1],也是我国南方的五大名果之一,是国内重要的消费和出口资源。由于香蕉重要的经济价值,各国科学家关于香蕉功能基因的研究成为一个热点。特别是 2012 年法国科学家领导的国际小组对二倍体香蕉 DH-Pahang 基因组序列进行了测定^[2],吸引了更多的研究人员关注香蕉功能基因的研究。香蕉组织总 RNA 的提纯是进行香蕉功能基因研究的必要前提,在进行 RNA 分析、逆转录 PCR (RT-PCR)、cDNA 合成、Northern 杂交、cDNA 文库构建、功能基因筛选过程中都需要有高质量、高纯度、完整性好的总 RNA。

目前已有多篇文献报道香蕉组织总 RNA 的提取方法,这些方法主要是十二烷基硫酸钠 (SDS) 法^[3-8]、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[9-12]、TRIzol 法^[13]。这些报道仅研究单一提取方法或对几种提取方法的提取效果进行比较,并未对影响香蕉组织总 RNA 提取的关键因素进行分析。一旦提取过程中出现 RNA 纯度低、质量差的情况则很难分析其原因。因此,有必要了解在提取过程中影响 RNA 质量的详细因素,以便有针对性地解决提取总 RNA 过程中的问题。

笔者所在课题组在进行香蕉多酚氧化酶基因克隆研究中,须从青香蕉果肉中提取总 RNA 用于研究。但是青香蕉果肉的硬度、果胶含量、多酚含量均高于成熟香蕉^[14-15],采用 RNA 提取试剂盒和相关文献报道的方法,均不能获得合格的 RNA。香蕉组织细胞内的多糖、多酚及色素等次生物质,在 RNA 提取过程中很难去除干净^[16]。多糖等杂质的存在不仅会使 RNA 的溶解度降低,还可以抑制许多工具酶的活性,且多酚、色素等物质在提取过程中很容易被氧化而导致 RNA 变

性,影响 RNA 用于进一步的分子操作,因此,能否在提取过程中尽可能多地去除这些干扰物质是获得高质量 RNA 的关键^[17-19]。

热硼酸法提取植物组织总 RNA 已被多次改良,应用于富含多酚的不同作物、组织总 RNA 的提取^[20-21]。但是目前,未有关于热硼酸法提取青香蕉果肉组织总 RNA 过程中影响其质量的因素研究。在本研究中,笔者对热硼酸法提取青香蕉果肉总 RNA 全过程中的各种影响因子进行了分析,拟摸索出一种既快速又高效地提取青香蕉果肉总 RNA 的方法,以期为深入开展香蕉功能基因的研究奠定良好的基础,同时为其他富含多糖、多酚类植物的总 RNA 提取提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

巴西香蕉果实、花采摘于中国热带农业科学院海口实验站实验基地(福山实验基地)。将采收的香蕉花、青香蕉、黄香蕉的果肉、果皮分离后分别用液氮速冻,置于 -70 ℃ 冰箱保存。

1.2 试验仪器

SuperRT cDNA Kit (CW0741),北京康为世纪生物科技有限公司;超微量分光光度计 (Nanodrop 2000),美国 Thermo 公司;PCR 仪 (Tpersonal 48),德国 Biometra 公司;凝胶成像系统 (G:BOX/EF²),美国 Syngene 公司;核酸电泳仪 (DYCP-31F),北京市六一仪器厂。

1.3 香蕉果肉总 RNA 提取条件优化

1.3.1 RNA 常规提取方法 参照 Asif 等的方法^[12]进行优化。首先将玻璃器皿、铁勺、研钵等清洗干净,然后用锡箔纸包裹,于 180 ℃ 烘烤 8 h 以上,离心管等塑料制品均用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水浸泡过夜,并于 121 ℃ 高压灭菌 30 min,60 ℃ 烘干备用。具体操作如下:

(1) 提取缓冲液 [2% CTAB, 100 mmol/L Tris-硼酸 (pH 值 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 值 8.0), 2% PVP-K30] 用前加入 β-巯基乙醇至终浓度为 2%, 将其预热至 60 ℃; (2) 果肉用液氮速冻后研磨成粉末, 每 0.2 g 果肉加

收稿日期:2016-06-15

基金项目:广东食品药品职业学院自然科学青年项目(编号:2015YZ021)。

作者简介:杨 昭(1987—),男,陕西商洛人,硕士,助教,主要从事食品生物技术研究。E-mail:153183602@qq.com。

通信作者:袁德保,博士,助理研究员,主要从事农产品贮藏与加工研究。E-mail:1278529811@qq.com。

入 1 mL 提取缓冲液,涡旋混匀,于 60 ℃ 放置 30 min,每隔 5~10 min 颠倒混匀 1 次;(3)将提取液冷却至室温,用等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)抽提,混匀,静置分层,室温下于 12 000 r/min 离心 5 min;(4)取上清液,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)抽提,混匀,静置分层,室温、12 000 r/min 离心 5 min;(5)在上清液中加 10 mol/L LiCl 至终浓度为 3 mol/L, -20 ℃ 放置 4 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min;(6)小心倒掉上清,沉淀用 0.5 mL 3 mol/L LiCl 洗涤至少 3 次;(7)沉淀用 0.3 mL DEPC 处理水溶解,再用等体积的水饱和酚、三氯甲烷顺序抽提;(8)吸取上清液,加入 1/15 体积的 3 mol/L NaAc(pH 值 5.2)、1/5 体积无水乙醇,冰上放置 0.5 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,沉淀多糖;(9)在上清液中加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 值 5.2)、3 倍体积无水乙醇,于 -70 ℃ 的冰箱沉淀 2 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,沉淀物用 0.5 mL 75% 乙醇洗涤 2 次,0.5 mL 无水乙醇洗涤 1 次,每次都于 12 000 r/min 离心 1 min,室温干燥后溶于 RNase-free 水中。

1.3.2 RNA 提取条件优化 考察提取缓冲液 pH 值、离子浓度、CaCl₂ 浓度、处理温度、处理时间、LiCl 沉淀时间对总 RNA 提取质量的影响,并用异丙醇简化 RNA 沉淀过程。

1.3.3 RNA 质量检测 RNA 纯度及含量检测:取 1 μL RNA 溶液,通过微量分光光度计检测得到的 RNA 含量、 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值。纯 RNA $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值应为 1.8~2.2, $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值应为 2.0~2.4。RNA 回收率计算:RNA 回收率(μg/g)=($D_{260\text{ nm}}$ ×40×原液体积)/提取样品质量(g)。

RNA 完整性检测:用 1.8% 琼脂糖凝胶检测。完整的 RNA 电泳结果应是 28S RNA 与 18S RNA 亮度值比约为 2:1,且这 2 条条带之间、条带上方和条带下方几乎没有弥散现象。

1.3.4 RT-PCR 分析 选用 NCBI 上登录的香蕉 MaActin1 (GenBank 登录号:AF285176)片段为内参,设计上、下游引物分别为 MaActin1 (5'-CGAGGCTCAATCAAAGA-3')、MaActin2(5'-ACCAGCAAGGTCCAAAC-3')^[22]。RNA 逆转录合成 cDNA 第 1 链采用北京康为世纪生物科技有限公司的 SuperRT cDNA 第 1 链合成试剂盒。

PCR 反应体系:12.5 μL 2×ES Master Mix,1 μL MaActin1 (10 μmol/L),1 μL MaActin2 (10 μmol/L),2 μL cDNA 第 1 链,8.5 μL RNase-free Water。反应程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。扩增结束后,取 5 μL 产物,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.5 RNA 提取方法验证 将优化的 RNA 提取方法应用于香蕉花、青香蕉果肉、青香蕉果皮、黄香蕉果肉、黄香蕉果皮 5 种香蕉组织总 RNA 的提取,并进行 RT-PCR 分析。

2 结果与分析

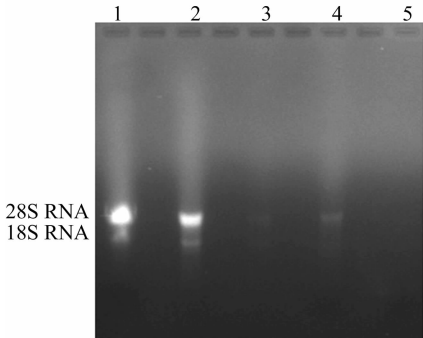
2.1 缓冲液 pH 值、离子浓度对 RNA 提取质量的影响

针对香蕉组织富含酚类物质的特点,采用硼酸缓冲体系的 RNA 提取液,有利于去除组织中的酚类物质。其中的硼酸可以与酚类化合物依靠氢键形成复合物,从而抑制酚类物质的氧化及它们与 RNA 的结合^[23]。由表 1 可见,Tris-硼酸缓

冲液 pH 值对香蕉果肉 RNA 质量、得率影响较大;Tris-硼酸缓冲液 pH 值为 6、7、8、9 时, $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值,但 RNA 的得率差异较大;pH 值为 9 时,得率最高,为 18.14 μg/g。图 1 显示,Tris-硼酸缓冲液 pH 值为 8、9 时,28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2:1,完整性较好。因此,选择缓冲液最优 pH 值为 9。

表 1 提取缓冲液 pH 值对 RNA 提取纯度、得率的影响

pH 值	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率(μg/g)
5	1.62±0.03	1.31±0.04	0.28±0.00
6	2.03±0.04	2.17±0.01	2.32±0.03
7	2.02±0.02	2.06±0.04	2.63±0.00
8	2.07±0.01	2.26±0.01	8.40±0.04
9	2.09±0.00	2.29±0.01	18.14±0.01

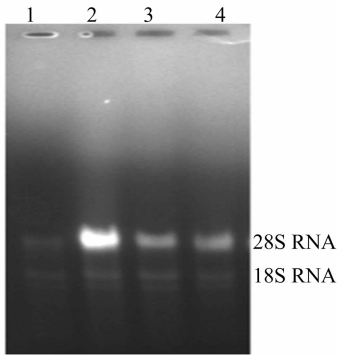


1~5 分别对应 pH 值为 9、8、7、6、5
图 1 提取缓冲液 pH 值对 RNA 完整性的影响

由表 2 可见,Tris-硼酸缓冲液离子浓度为 100、200、300 mmol/L 时, $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值;Tris-硼酸缓冲液离子浓度为 100 mmol/L 时,得率最高,为 26.97 μg/g。图 2 显示,Tris-硼酸缓冲液离子浓度为 100、200、300 mmol/L 时,28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2:1,完整性较好。因此,选择 Tris-硼酸缓冲液离子浓度为 100 mmol/L。

表 2 提取缓冲液离子浓度对 RNA 提取纯度、得率的影响

离子浓度 (mmol/L)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 (μg/g)
50	2.03±0.01	1.87±0.06	5.27±0.09
100	2.07±0.04	2.35±0.07	26.97±1.78
200	2.04±0.00	2.34±0.01	12.45±0.13
300	2.07±0.00	2.27±0.03	12.49±0.26



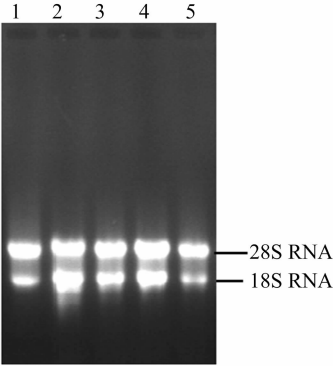
1~4 分别对应离子浓度为 50、100、200、300 mmol/L
图 2 提取缓冲液离子浓度对 RNA 完整性的影响

2.2 CaCl₂ 浓度、处理温度、处理时间对 RNA 提取质量的影响

钙离子在 RNA 提取过程中可以有效去除组织中的高分子果胶^[24]。由表 3 可见, CaCl₂ 浓度为 0、50、100、150、200 mmol/L 时, 提取的香蕉果肉 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值; 不同 CaCl₂ 浓度所提取的 RNA 得率相差很小, 当浓度为 150 mmol/L 时, 得率最大, 为 32.44 μg/g; 当不加 CaCl₂ 时, 得率最低, 为 21.94 μg/g。图 3 显示, CaCl₂ 浓度为 0、100、200 mmol/L 时, 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1, 完整性最好; CaCl₂ 浓度为 50、150 mol/L 时, 28S RNA : 18S RNA 小于 2 : 1, 完整性不好。综合考虑, 选取 CaCl₂ 浓度为 100 mmol/L。

表 3 CaCl₂ 浓度对 RNA 提取纯度、得率的影响

CaCl ₂ 浓度 (mmol/L)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 (μg/g)
0	2.07 ± 0.00	2.29 ± 0.00	21.94 ± 0.17
50	2.12 ± 0.00	2.36 ± 0.01	27.07 ± 0.07
100	2.14 ± 0.02	2.37 ± 0.01	26.36 ± 1.11
150	2.12 ± 0.02	2.36 ± 0.01	32.44 ± 0.53
200	2.13 ± 0.01	2.37 ± 0.01	24.62 ± 1.56



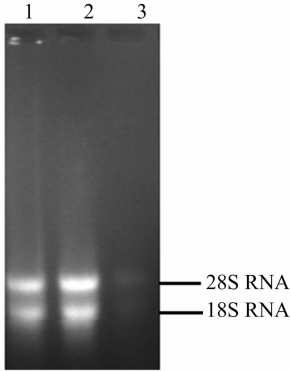
1~5 分别对应 CaCl₂ 浓度为 200、150、100、50、0 mmol/L
图3 CaCl₂ 浓度对 RNA 完整性的影响

由表 4 可见, CaCl₂ 加入后放置在 0、25、60 ℃, 所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值; 不同放置温度所提取的 RNA 得率相差很大, 当放置在 25 ℃ 时, 得率最大, 为 20.57 μg/g。图 4 显示, CaCl₂ 加入后放置在 25、60 ℃, 所提取 RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1, 完整性较好。所以, 选择 CaCl₂ 加入后的放置温度为 25 ℃。

表 4 CaCl₂ 加入后放置温度对 RNA 提取纯度、得率的影响

CaCl ₂ 加入后放置 温度(℃)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 (μg/g)
25	2.10 ± 0.01	2.30 ± 0.01	20.57 ± 1.79
0	2.10 ± 0.00	2.26 ± 0.01	4.75 ± 0.05
60	2.12 ± 0.01	2.33 ± 0.03	14.52 ± 0.01

由表 5 可见, CaCl₂ 加入后放置 10、20、30 min, 所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值; 当放置 20 min 时, 得率最大, 为 37.25 μg/g。图 5 显示, CaCl₂ 加入后放置 10、20 min, 所提取

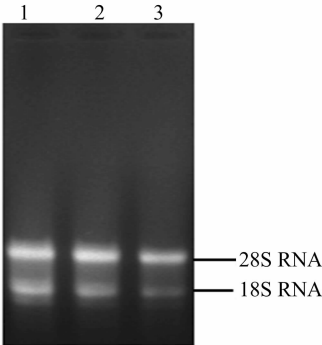


1~3 分别对应放置温度为 60、25、0 ℃
图4 CaCl₂ 加入后放置温度对 RNA 完整性的影响

RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1, 完整性较好; 放置 30 min, 所提取 RNA 的 28S RNA、18S RNA 的亮度比, 比放置 10、20 min 时的低。所以, 选择 CaCl₂ 加入后的放置时间为 20 min。

表 5 CaCl₂ 加入后放置时间对 RNA 提取纯度、得率的影响

CaCl ₂ 加入后的 放置时间(min)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 (μg/g)
10	2.12 ± 0.01	2.31 ± 0.05	26.33 ± 0.08
20	2.14 ± 0.01	2.36 ± 0.02	37.25 ± 0.40
30	2.11 ± 0.01	2.27 ± 0.01	20.98 ± 0.02



1~3 分别对应放置时间为 30、20、10 min
图5 CaCl₂ 加入后放置时间对 RNA 完整性的影响

2.3 LiCl 沉淀时间对 RNA 提取质量的影响

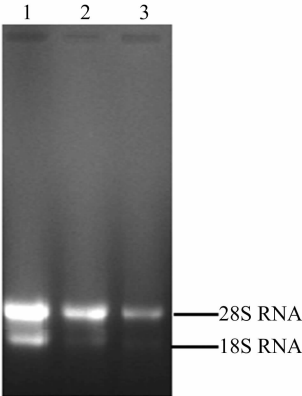
由表 6 可见, LiCl 加入后沉淀 4、8、12 h, 所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值; 随着沉淀时间的延长, 所提取 RNA 的得率逐渐增大, LiCl 沉淀 12 h, 得率最大, 为 37.21 μg/g。图 6 显示, LiCl 加入后沉淀 4、8、12 h, 所提取 RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1, 完整性较好。所以, 选择加入 LiCl 后的沉淀时间为 12 h。

表 6 LiCl 沉淀时间对 RNA 提取纯度、得率的影响

LiCl 沉淀时间 (h)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 (μg/g)
4	2.12 ± 0.01	2.31 ± 0.05	26.33 ± 0.08
8	2.14 ± 0.01	2.35 ± 0.01	35.19 ± 0.79
12	2.17 ± 0.01	2.36 ± 0.01	37.21 ± 0.49

2.4 异丙醇简化 RNA 沉淀

尽管 LiCl 沉淀 12 h 可以达到较好的提取效果, 但耗时费



1~3 分别对应 LiCl 沉淀时间为 12、8、4 h
图6 LiCl 沉淀时间对 RNA 完整性的影响

间长。缩短 RNA 提取时间对于下一步的分子生物学试验是非常重要的。由表 7 可见,在香蕉果肉 RNA 提取过程中,用异丙醇替代 LiCl 沉淀 RNA 是可行的,但是必须用低浓度 LiCl 洗涤 RNA 沉淀;当未用 3 mol/L LiCl 洗涤时,所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值非常低,分别为 1.39、1.65,均低于纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值;当用 3 mol/L LiCl 洗涤 3 次时,所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值分别为 2.15、2.25,均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值。

表 7 LiCl 洗涤方式对 RNA 提取纯度、得率的影响

LiCl 洗涤方式	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 ($\mu\text{g/g}$)
不洗	1.39 ± 0.03	1.65 ± 0.03	11.60 ± 0.33
洗 3 次	2.15 ± 0.01	2.25 ± 0.01	9.65 ± 0.02

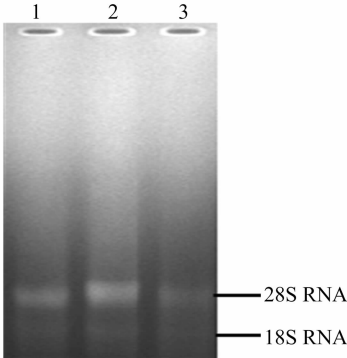
由表 8 可见,异丙醇加入后沉淀 10、20、30 min,所提取 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值;随着沉淀时间的延长,所提取 RNA 的得率并未有明显的变化。图 7 显示,异丙醇加入后沉淀 10、20、30 min,只有异丙醇沉淀 20 min 所提取 RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1,完整性较好。所以,选择加入异丙醇后沉淀时间为 20 min。

表 8 异丙醇沉淀时间对 RNA 提取纯度、得率的影响

异丙醇沉淀时间 (min)	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 ($\mu\text{g/g}$)
10	2.15 ± 0.01	2.25 ± 0.05	9.65 ± 0.02
20	2.15 ± 0.01	2.27 ± 0.00	8.40 ± 0.04
30	2.14 ± 0.00	2.27 ± 0.00	8.82 ± 0.19

2.5 青香蕉果肉 RNA 优化提取方法验证

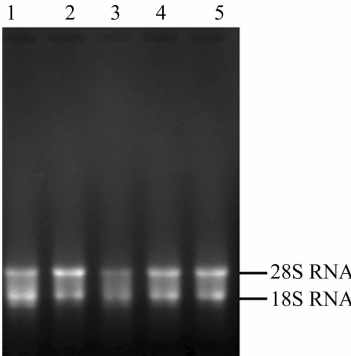
由表 9 可见,异丙醇沉淀法提取的黄香蕉果肉、黄香蕉果皮、香蕉花、青香蕉果肉、青香蕉果皮 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值均符合纯 RNA 的 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值。图 8 显示,香蕉花 RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 1 : 1,完整性较差;青香蕉果肉、青香蕉果皮、黄香蕉果皮和黄香蕉果肉 RNA 的 28S RNA、18S RNA 亮度比约为 2 : 1,完整性较好。图 9 RT - PCR 试验结果显示,用异丙醇沉淀法从香蕉花、黄香蕉果肉、黄香蕉果皮、青香蕉果肉和青香蕉果皮中提取的 RNA 进行 RT - PCR,均能扩增出 380 bp 的 MaActin 片段。



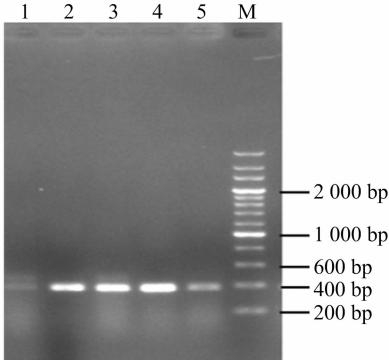
1~3 分别对应异丙醇沉淀时间为 10、20、30 min
图7 异丙醇沉淀时间对 RNA 完整性的影响

表 9 异丙醇沉淀法对香蕉组织 RNA 提取纯度和得率的影响

香蕉组织	$D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值	得率 ($\mu\text{g/g}$)
黄香蕉果肉	2.10 ± 0.01	2.28 ± 0.02	8.62 ± 0.09
黄香蕉果皮	2.10 ± 0.01	2.10 ± 0.01	19.00 ± 0.02
香蕉花	2.13 ± 0.00	2.22 ± 0.04	13.61 ± 0.27
青香蕉果肉	2.16 ± 0.02	2.32 ± 0.02	24.93 ± 0.39
青香蕉果皮	2.13 ± 0.00	2.26 ± 0.03	25.14 ± 0.42



1—黄香蕉果肉; 2—黄香蕉果皮; 3—香蕉花; 4—青香蕉果肉; 5—青香蕉果皮
图8 异丙醇沉淀法对 RNA 完整性的影响



1—香蕉花; 2—青香蕉果皮; 3—青香蕉果肉; 4—黄香蕉果皮; 5—黄香蕉果肉; M—2 000 bp DNA ladder marker
图9 异丙醇沉淀法 RNA 的 RT-PCR 电泳结果

3 讨论与结论

针对青香蕉果肉组织富含果胶、多酚等次生物质,详细考察各因素对总 RNA 提取质量的影响,得出 1 种快速提取青香

蕉果肉总 RNA 的方法,耗时约 4 h,相比于传统氯化锂沉淀法(−20 ℃放置 4 h 或过夜放置),具有快速、操作简单、总 RNA 质量高等优点,该方法可用于黄香蕉果肉、黄香蕉果皮、香蕉花、青香蕉果肉、青香蕉果皮中总 RNA 的提取。从青香蕉果肉组织中提取的总 RNA,可应用于香蕉多酚氧化酶的基因克隆研究中,笔者所在课题组已成功获得香蕉多酚氧化酶的基因^[25]。

改良热硼酸法提取青香蕉果肉总 RNA 的优化提取方法:提取缓冲液内含 2% CTAB、100 mmol/L Tris - 硼酸(pH 值 9.0)、1.4 mol/L NaCl、20 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)、2% PVP - K30,用前加入 β -巯基乙醇至终浓度为 2%,将其预热至 60 ℃;组织用液氮速冻后研磨成粉末,每 0.2 g 果肉加入 1 mL 提取缓冲液,涡旋混匀,于 60 ℃放置 30 min,每隔 5 ~ 10 min 颠倒混匀 1 次;向提取混合液中添加 0.5 mol/L CaCl_2 ,使其浓度为 100 mmol/L,25 ℃放置 20 min;冷至室温,用等体积的三氯甲烷、异戊醇(24:1)抽提,混匀,静置分层,室温、12 000 r/min 离心 5 min;取上清液,加入等体积的三氯甲烷、异戊醇(24:1)抽提,混匀,静置分层,室温、12 000 r/min 离心 5 min;上清液加入等体积的异丙醇,−20 ℃沉淀 20 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min;小心倒掉上清,沉淀用 0.5 mL 3mol/L LiCl 洗涤至少 3 次;沉淀用 0.3 mL DEPC 水溶解,再用等体积的水饱和酚、三氯甲烷顺序抽提;吸取上清液,加入 1/15 体积的 3 mol/L NaAc(pH 值 5.2)、1/5 体积无水乙醇,冰上放置 0.5 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min;在上清液中加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 值 5.2)、3 倍体积无水乙醇,在 −70 ℃冰箱中沉淀 2 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,沉淀物用 0.5 mL 75% 乙醇洗涤 2 次、0.5 mL 无水乙醇洗涤 1 次,每次都于 12 000 r/min 离心 1 min,室温干燥后将沉淀溶于 RNase-free 水中。

参考文献:

- [1]夏勇开. 中国香蕉生产技术的经济研究[D]. 海口:海南大学,2011.
- [2]D'Hont D, Denoeud F, Aury J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants[J]. Nature, 2012, 488(7410): 213–217.
- [3]柴娟,冯仁军,史后蕊,等. 一种快速提取香蕉叶片总核酸、总 RNA 和总 DNA 的新方法[J]. 热带作物学报, 2014, 35(1): 104–109.
- [4]王尉,梁国鲁,谢江辉. 香蕉不同组织中总 RNA 提取方法的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2007, 32(1): 62–67.
- [5]王甲水,张建斌,贾彩虹,等. 一种适合香蕉根系总 RNA 提取的方法[J]. 热带生物学报, 2010, 1(3): 202–205, 209.
- [6]冯斗,张春发,张颖. 一种适用于提取香蕉果肉 RNA 的方法[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 249–251.
- [7]刘海,林德球,徐杰,等. 一种适合于富含多糖和酚类物质的香蕉果实 RNA 提取方法[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 136–137.
- [8]Liu J J, Goh C J, Loh C S, et al. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16(1): 87.
- [9]涂国英,漆艳香,蒲金基,等. 改良 CTAB 法提取高质量香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009(7): 192–195.
- [10]张妙霞,赖钟雄,赵巧阳. 野生香蕉叶片总 RNA 提取方法研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 51–54.
- [11]陈弟,殷晓敏,张荣意. 一种适合于提取香蕉果实总 RNA 的简便方法[J]. 广西热带农业, 2008(2): 3–5.
- [12]Asif M H, Dhawan P, Nath P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18(2): 109–115.
- [13]孙德权,郭启高,胡玉林,等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009(5): 162–164.
- [14]李健. 蕉类果实中多酚含量及酚酶特性的研究[D]. 南宁:广西大学, 2010.
- [15]杨昭,王军,仇厚媛,等. 青香蕉多酚氧化酶的提取工艺研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41(7): 92–96, 100.
- [16]吴坤林. 香蕉的生物学特性及其组织培养技术[J]. 生物学通报, 2006, 41(10): 5–7, 封四.
- [17]李宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999(1): 36–39.
- [18]张涛,韩梅,刘翠晶,等. 人参总 RNA 提取方法及反转录酶的比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 34–37.
- [19]刘波,张晓明,郭巧生,等. 百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 44–46.
- [20]Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Analytical Biochemistry, 1994, 223(1): 7–12.
- [21]吴田,蓝增全. 茶梅花瓣总 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(28): 129–133.
- [22]张丽丽,徐碧玉,刘菊华,等. 香蕉谷胱甘肽过氧化物酶基因 *MaGPX* 的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1471–1481.
- [23]武耀廷,刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总 RNA 的热硼酸改良法[J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 67–71.
- [24]Dal C V, Danesin M, Rizzini F M, et al. RNA extraction from plant tissues the use of calcium to precipitate contaminating pectic sugars[J]. Molecular Biotechnology, 2005, 31(2): 113–119.
- [25]陈娇,孙长君,杨昭,等. 香蕉多酚氧化酶成熟蛋白的原核表达[J]. 热带作物学报, 2015, 36(12): 2198–2203.