

# 一种棉花细胞质雄性不育系线粒体 RNA 的提取方法

巩养仓<sup>1</sup>, 张兴平<sup>1</sup>, 邢朝柱<sup>2</sup>, 王洪<sup>1</sup>, 吴建勇<sup>2</sup>, 郭立平<sup>2</sup>, 彭凡嘉<sup>1</sup>

(1. 湖南省棉花科学研究所, 湖南常德 415101; 2. 中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳 455000)

**摘要** [目的] 获得高质量的棉花细胞质雄性不育系线粒体 RNA。[方法] 以哈克尼西棉细胞质雄性不育系黄化苗为研究对象, 对棉花线粒体 RNA 的提取方法进行探讨。[结果] 采取先分离出棉花线粒体再提取 RNA 的方法, 最终获得了质量较好的线粒体 RNA (mtRNA)。[结论] 成功获得了质量较高的 mtRNA。

**关键词** 棉花; 线粒体 RNA 提取; 方法

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)29-10097-02

## A Method for Mitochondrial RNA Isolation of Cytoplasmic Male Sterility in Cotton

GONG Yang-cang, ZHANG Xing-ping, XING Chao-zhu et al (Hunan Cotton Research Institute, Changde, Hunan 455000; Cotton Research Institute, CAAS, Anyang, Henan 455000)

**Abstract** [Objective] The aim was to obtain high quality mitochondrial RNA isolation of cytoplasmic male sterility in cotton. [Method] Taking CMS line of *G. harknessii* as material, a method of mitochondrial RNA isolation was constructed. [Result] The protocol was that cotton mitochondrion was isolated firstly and then mtRNA was extracted using an improved CTAB method. And finally the higher quality mtRNA was obtained. [Conclusion] The study successfully obtain higher quality mtRNA.

**Key words** Cotton; mtRNA extraction; Method

RNA 作为遗传和表达的媒介, 是目前分子生物学实验中重要的研究对象。线粒体是动植物及人类细胞重要的细胞器, 具有半自主性, 含有少量的 DNA 遗传物质, 且有一套相对独立的转录翻译系统, 合成自身所需要的特异蛋白。研究发现, 线粒体基因组与植物细胞质雄性不育密切相关<sup>[1-4]</sup>, 并推测线粒体基因组重组或重排以及 RNA 编辑现象可能是导致植物细胞质雄性不育的重要原因<sup>[5-8]</sup>。因此, 对线粒体基因组的研究成为细胞质雄性不育研究的热点。提取高质量的线粒体 DNA 及 RNA 是进行这些研究的第一步, 也是关键的一步。关于线粒体 RNA 的提取, 在玉米<sup>[9]</sup>、马铃薯<sup>[10]</sup>、油菜<sup>[11]</sup>等作物上已经相当成熟, 而在棉花上, 虽有关于棉花线粒体 DNA 提取方法的介绍<sup>[12-13]</sup>, 但关于棉花线粒体 RNA 提取方法尚未见报道。为此, 笔者对此进行了初步探讨。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 哈克尼西棉 (*Gossypium harknessii*) 细胞质雄性不育系种子 (由中国农科院棉花研究所杂种优势利用课题组提供)。

## 1.2 方法

**1.2.1 材料准备。** 将哈克尼西棉细胞质雄性不育系种子经温水浸泡 4 h, 种植于无菌沙中, 30 °C 暗培养 7 d 左右, 培养成黄化苗备用。

**1.2.2 试剂准备。** 缓冲液 A: 0.05 mol/L Tris-Cl, 0.5 mol/L Sucrose, 0.005 mol/L EDTA·Na<sub>2</sub>, 0.1% BSA, 1% ~ 2% PVP, 0.005 mol/L 巯基乙醇, pH 7.5; 缓冲液 B: 0.05 mol/L Tris-Cl, 0.3 mol/L Sucrose, 0.01 mol/L 氯化镁, 1% PVP, pH 7.5; 缓冲液 C: 0.05 mol/L Tris-Cl, 0.3 mol/L Sucrose, 0.01 mol/L 氯化镁; 缓冲液 D: 0.01 mol/L Tris-Cl, 0.6 mol/L Sucrose, 0.002 mol/L EDTA·Na<sub>2</sub>, pH 7.5; RNA 抽提液: 2% CTAB, 2%

PVP, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.025 mol/L EDTA·Na<sub>2</sub> (pH 8.0), 2.0 mol/L NaCl。混匀, 加 0.1% DEPC 处理过夜, 灭菌, 用前加入终体积为 2% 的巯基乙醇。

氯仿: 异戊醇 (24: 1, V/V); DEPC 处理水; 10 mol/L LiCl, 加 0.1% 的 DEPC 处理过夜, 灭菌, 室温保存; 100% 乙醇; 70% 乙醇用 DEPC 水配制, -20 °C 保存; 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2), 加 0.1% 的 DEPC 处理过夜, 灭菌。

**1.2.3 线粒体制备。** 线粒体制备主要是将线粒体从细胞中分离出来并保证其完整性。由于低温能够减缓线粒体氧化, 为保证线粒体在提取过程中的稳定状态, 整个操作都在冰上完成, 并在无菌通风橱内进行。步骤如下: ① 收集黄化苗, 弃根, 用灭菌水洗涤 2 次, 置于研钵中; ② 加入约 4 倍体积的缓冲液 A, 将组织研磨成糊状; ③ 通过 8 层纱布过滤入 50 ml 离心管中, 离心 (2 400 r/min, 4 °C, 10 min), 以除去大的细胞碎片; ④ 取上清, 2 500 r/min 冷冻离心 10 min, 以除去质体; ⑤ 将上清液转入新的离心管中, 8 000 r/min 离心 35 min, 弃上清; ⑥ 沉淀用缓冲液 B 悬浮后, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃上清; ⑦ 沉淀用 20 ml 缓冲液 C 悬浮, 再用长针头注射器向管底缓缓注入 20 ml 缓冲液 D, 形成一个 step 梯度, 冰浴 30 min, 然后 8 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液; ⑧ 沉淀再用 20 ml 缓冲液 D 悬浮, 8 000 r/min 离心 20 min, 重复 2 ~ 3 次, 得到的沉淀即为线粒体。

**1.2.4 mtRNA 提取。** mtRNA 的提取主要参照 MA 等<sup>[14]</sup> 提取棉花总 RNA 的改良 CTAB 法, 略有改动, 具体步骤如下: ① 向沉淀中加入适量体积的提取液, 65 °C 水浴 10 min, 剧烈振荡; ② 加入等体积氯仿/异戊醇 (24: 1, V/V) 抽提, 剧烈振荡, 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 重复 1 ~ 2 次; ③ 取上清, 加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl, 混匀, 4 °C 过夜沉淀; ④ 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 沉淀溶于 DEPC 处理水中; ⑤ 加入等体积酚/氯仿抽提 1 次; ⑥ 取上清, 加入 1/10 体积醋酸钠, 2.5 倍体积的无水乙醇, -70 °C 沉淀至少 30 min; ⑦ 离心

**作者简介** 巩养仓 (1981 - ), 男, 河南淮阳人, 助理研究员, 硕士, 从事棉花遗传育种研究。

**收稿日期** 2014-08-27

(12 000 r/min, 4 °C, 15 min), 70% 乙醇洗涤沉淀, 在超净工作台上风干 mtRNA, 用 10 μl DEPC 处理水溶解, 储存于 -70 °C 冰箱。

**1.2.5 mtDNA 检测。**采用琼脂糖凝胶电泳检测。使用 1.2% 琼脂糖凝胶, 取 2 μl mtRNA 样品在小型电泳槽中进行电泳, 电压 70 V, 电泳时长 30 min, 用 0.01% 溴化乙锭 (EtBr) 溶液浸泡 20 min, 然后置于紫外灯下观察并拍照保存。

## 2 结果与分析

由图 1 可知, 没有降解的 mtRNA 能够看见 2 条清晰的核糖体 RNA 带 (26S 和 18S), 且 26S 的亮度约是 18S 的 2 倍。由此可知, 该方法所提取的 mtRNA 基本达到此标准, 质量可以满足进一步的分子生物学试验。

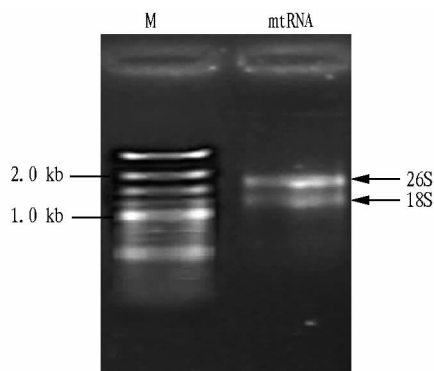


图 1 mtRNA 检测结果

## 3 讨论

获得高质量的核酸是进行分子生物学相关研究的关键环节, 对下一步试验的进行和结果都有很大的影响。RNA 质量好坏主要体现在两点: 一是完好性, 所提取的核酸能否体现在动植物体内的自然长度, 是否发生了降解; 二是纯度, 即是否有其他非核酸物质及 DNA 的污染, 而对 mtRNA 而言, 又要去除基因组 RNA 的污染。所以 mtRNA 的抽提, 一方面要利用合适的方法去除杂质, 另一方面要提供合适的环境, 避免对核酸的损伤。

该试验首先从细胞中分离出完整的线粒体, 然后再提取 RNA。该方法避免了基因组 DNA 和 RNA 的污染, 但如何分离出完整的线粒体是试验成败的关键。线粒体是细胞中最为活跃的细胞器之一, 极易发生氧化破裂, 该研究参考国内外相关文献并经过多次试验, 成功分离出棉花完整的线粒体。

针对 RNA 的抽提, 前人已经做了大量的研究<sup>[15-17]</sup>。相对于其他植物而言, 棉花 RNA 抽提具有其特殊性, 棉花各组织特别是花药、胚珠、纤维细胞内常含有丰富的多糖、脂类以及酚类等次生物质, 如果这些物质不能有效地去除, 会严重

影响核酸的纯度, 进而影响后续试验的进行, 所以棉花 RNA 的抽提比其他植物更困难。该试验采用提取棉花总 RNA 较为成熟的改良 CTAB 法提取线粒体中的 RNA, 获得了质量较高的 mtRNA。但该方法由于操作较繁琐, 造成 mtRNA 的严重流失, 该试验中, 应用约 20 g 新鲜材料最后只得到了约 0.5 μg 的 mtRNA, 虽然质量能够满足一般试验的要求, 但数量不足, 很难完成对 RNA 数量要求较多的分子试验, 如 Northern 杂交。所以如何提取出高质量高产出比的 mtRNA, 还需要进一步地探讨。

## 参考文献

- [1] AKAGI H, SAKAMOTO M, SHINJO C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility[J]. *Curr Genet*, 1994, 25: 52 - 58.
- [2] ASHUTOSH, KUMAR P, DINESH, K V, et al. A novel *orf108* co-transcribed with the *atpA* gene is associated with cytoplasmic male sterility in *Brassica juncea* carrying *Moricandia arvensis* cytoplasm [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(2): 284 - 289.
- [3] 李小明, 郑用璠, 张方东, 等. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析[J]. *遗传*, 2000, 22(4): 201 - 204.
- [4] HUANG W, WANG L, YI P, et al. RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS - rice [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(4): 330 - 338.
- [5] ARAYA ALEXANDRE, ZABALETA EDUARDO, BLANC VALERIE, et al. RNA editing in plant mitochondria, cytoplasmic male sterility and plant breeding[J]. *Plant Biotechnology*, 1998, 1(1): 31 - 39.
- [6] HEAZLEWOOD J L, WHELAN J, MILLAR A H. The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are  $F_0$  components in the plant  $F_1F_0$  ATP synthase[J]. *FEBS*, 2003, 540: 201 - 205.
- [7] 巩养仓, 邢朝柱. 植物细胞质雄性不育分子机理研究进展[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(S2): 51 - 56.
- [8] HOWAD W, TANG H V, PRING D R, et al. Nuclear genes from T × CMS maintainer lines are unable to maintain *atp6* RNA editing in any anther cell - type in the *sorghum bicolor* A3 cytoplasm[J]. *Curr Genet*, 1999, 36: 62 - 68.
- [9] GALLAGHER L J, BETZ S K, CHASE C D. Mitochondrial RNA editing truncates a chimeric open reading frame associated with S male - sterility in maize[J]. *Curr Genet*, 2002, 42: 179 - 184.
- [10] NUNZIA S, TEODORO C, LAURENCE M. Mitochondrial DNA and RNA Isolation from Potato Tissue[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19(3): 67.
- [11] 陈德富, 陈喜文, 邹卫国, 等. 一种有效的花粉线粒体 RNA 分离技术[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(3): 211 - 214.
- [12] 刘少林, 靖深蓉, 严根土, 等. 棉花线粒体和线粒体 DNA 的分离与纯化[J]. *棉花学报*, 1996, 8(6): 316 - 317.
- [13] 胡建斌, 黄碧玲, 郭三堆. 一种棉花线粒体 DNA 的提取方法[J]. *生物技术通报*, 2005(6): 88 - 90.
- [14] MA X D, XING C Z, GUO L, et al. Analysis of differentially expressed genes in genic male sterility cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using cDNA - AFLP[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(6): 536 - 543.
- [15] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA[J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166 - 167.
- [16] 温小杰, 张桂真, 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.
- [17] 史公军, 侯喜林, 王彦华. 植物组织 RNA 的几种提取方法[J]. *西南农业学报*, 2005, 18(2): 225 - 227.