



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103013984 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310010059. 4

(22) 申请日 2013. 01. 11

(73) 专利权人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区农大路 1 号

(72) 发明人 李勤 刘仲华 黄建安 林海燕 刘硕谦 李娟

(74) 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所 43008 代理人 赵洪 杨斌

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

C07K 1/30(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102140447 A, 2011. 08. 03, 全文.

李娟等. 一种改良的茶树高质量 RNA 快速提取方法. 《福建茶叶》. 2007, 摘要、1. 1、1. 2. 2、

2. 4、3.

李娟等. 一种改良的茶树高质量 RNA 快速提取方法. 《福建茶叶》. 2007, 摘要、1. 1、1. 2. 2、2. 4、3.

张立明等. 茶树叶绿体及其蛋白的奋力研究. 《激光生物学报》. 2011, 第 20 卷 (第 6 期), 802-808.

life technologies. TRIzol Reagent 产品说明书. 《life technologies》. 2012, 全文.

李勤等. 茶树蛋白质双向电泳样品制备技术研究. 《茶叶科学》. 2011, 摘要、第 174-175 页 1. 2-2. 1、第 176-177 页 2. 3、第 177-178 页 3.

审查员 罗洋

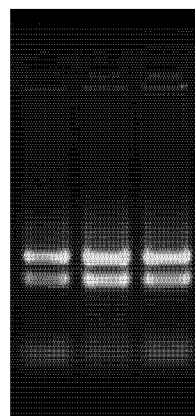
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 及同时提取总蛋白质的方法、叶绿体总蛋白质的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法, 先对植物材料进行粗提、纯化, 再将得到的叶绿体材料加入交联聚乙烯吡咯烷酮, 经过冻融处理、抽提、离心弃上清液, 沉淀经洗涤、分离后得到叶绿体总 RNA。本发明还公开了一种从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法, 先按照前述步骤得到叶绿体总 RNA; 然后向抽提液分层后保留的中间层和下层有机相中加入无水乙醇, 孵育、离心后弃沉淀; 再将上清液加入到含醋酸铵的甲醇溶液中, 沉淀, 洗涤, 得到叶绿体总蛋白质。本发明的方法工艺效率高, 产品纯度好, 得到叶绿体总蛋白质可在二硫苏糖醇-聚丙烯凝胶电泳分析、蛋白质免疫印迹或双向电泳等分析中进行应用。



1. 一种从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,其特征是,包括以下步骤:

(a) 从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,包括以下步骤:

(1) 叶绿体纯化:将所述木本植物材料的叶片破碎,置入 3~6 倍于其体积且 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 预冷后的粗提缓冲液中,经匀浆、过滤后所得的叶片匀浆滤液再进行离心处理, $100\sim 300\times\text{g}$ 、 $0^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5min~10 min,弃沉淀;离心后的上清液再进行二次离心处理, $1000\sim 3000\times\text{g}$ 、 $0^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10min~20min,弃上清,所得沉淀即为叶绿体粗提物;将所述叶绿体粗提物加入 Percoll 母液和氯化钠溶液构成的密度梯度体系中, $2000\sim 4000\times\text{g}$ 、 $0^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min~20min,收集密度梯度分界面的绿色条带,再用 1~3 倍于其体积且预冷后的纯化缓冲液重悬, $2000\sim 4000\times\text{g}$ 、 $0^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min~20min,所得沉淀即为纯化后的叶绿体材料;所述粗提缓冲液含有 0.33 mol/L 的山梨醇、0.1 w/v % 的牛血清白蛋白、10 mmol/L 的二硫苏糖醇、5 mmol/L 的 EDTA、50 mmol/L pH 为 8.0 的 Tris-HCl 和 5 w/v % 的交联聚乙烯吡咯烷酮;所述纯化缓冲液包含 150 mmol/L 的 NaCl、25 mmol/L 的乙二胺四乙酸、50 mmol/L pH 为 8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐;

(2) 冻融处理:将上述纯化后的叶绿体材料加入交联聚乙烯吡咯烷酮,所述叶绿体材料与交联聚乙烯吡咯烷酮的质量比为 1:1~3,然后于 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 温度下进行冻融处理;

(3) 抽提总 RNA:将经过冻融处理后的叶绿体材料加入冰浴预冷的 Trizol 试剂中,并加入冰浴预冷的氯仿,剧烈振荡后室温静置,再高速离心使抽提液分层,取分层后的上层水相加入冰浴预冷的异丙醇中,室温放置;再高速离心,弃去上清液,离心后的沉淀经洗涤、离心分离后,即得到所述木本植物材料的叶绿体总 RNA;所述 Trizol 试剂按照每 0.05g~0.10g 叶绿体材料加入 1.0 mL 的添加量进行添加;所述氯仿按照每 1.00 mL Trizol 试剂添加 0.15 mL~0.20 mL 氯仿的添加量进行添加;所述异丙醇按照每 1ml Trizol 试剂添加 0.30 mL~1.50 mL 异丙醇的添加量进行添加;

(b) 沉淀 DNA:向所述抽提液分层后保留的中间层和下层有机相中加入无水乙醇,无水乙醇按每 1ml Trizol 试剂加入 1.0 mL~1.5mL 无水乙醇的添加量添加,室温孵育,离心后弃沉淀;

(c) 沉淀蛋白质:将上述步骤(b)后的上清液加入 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 预冷后含醋酸铵的甲醇溶液中, $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 条件下沉淀, 1h~5h,再经高速离心后弃上清液;得到的沉淀分别用甲醇溶液、丙酮溶液洗涤,得到所述木本植物材料的叶绿体总蛋白质;

所述步骤(b)中,离心的条件为 $1000\sim 3000\times\text{g}$ 、 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 3 min~10min;所述步骤(c)中,高速离心的条件为 $10000\sim 20000\times\text{g}$ 、 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15min~30min;所述含醋酸铵的甲醇溶液中含有 0.05 mol/L~0.25 mol/L 醋酸铵、10mmol/L~25 mmol/L 的二硫苏糖醇和 2.0%~4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂;所述甲醇溶液和丙酮溶液中均含 10mmol/L~25 mmol/L 的二硫苏糖醇和 2.0%~4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂;

所述木本植物为茶树。

2. 根据权利要求 1 所述的从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,其特征在于:从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法中,所述步骤(3)中,高速

离心时的条件为 $10000 \sim 30000 \times g$ 、 $0^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 $10\text{min} \sim 30\text{min}$ ；所述离心分离时的条件为 $5000 \sim 10000 \times g$ 、 $0^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 $3\text{min} \sim 10\text{min}$ 。

3. 一种用权利要求 1 所述方法获得的叶绿体总蛋白质制备双向电泳分析样品的方法，其特征在于：该方法所用的蛋白质样品通过以下步骤制备得到：将所述叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中，每 1mg 叶绿体总蛋白质添加 $5\mu\text{L} \sim 20\mu\text{L}$ 的蛋白质裂解液，混合均匀后冰浴上裂解 $1\text{h} \sim 3\text{h}$ ，高速离心后的上清液即为双向电泳分析的蛋白质样品；

所述蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分：

$6\text{mol/L} \sim 8\text{mol/L}$ 尿素、 $1\text{mol/L} \sim 2\text{mol/L}$ 硫脲、 $30\text{mmol/L} \sim 65\text{mmol/L}$ 三羟甲基氨基甲烷、 $2\% \sim 5\%$ 质量分数的 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸、 $2\text{mmol/L} \sim 5\text{mmol/L}$ 三丁基膦、 $0.1\% \sim 0.2\%$ 体积分数的两性电解质和 $2\% \sim 4\%$ 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂。

4. 一种用权利要求 1 所述方法获得的叶绿体总蛋白质制备二硫苏糖醇-聚丙烯凝胶电泳分析或蛋白质免疫印迹分析样品的方法，其特征在于：该方法所用的蛋白质样品通过以下步骤制备得到：将所述叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中，每 1mg 叶绿体总蛋白质添加 $10\mu\text{L} \sim 30\mu\text{L}$ 的蛋白质裂解液，所述蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分：

$30\text{mmol/L} \sim 80\text{mmol/L}$ pH 为 6.8 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、 $50\text{mmol/L} \sim 150\text{mmol/L}$ 二硫苏糖醇、 $1.0\% \sim 5.0\%$ 质量分数的十二烷基硫酸钠、 $0.05\% \sim 0.30\%$ 质量分数的溴酚蓝和 $5\% \sim 15\%$ 体积分数的甘油。

从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 及同时提取总蛋白质的方法、叶绿体总蛋白质的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物中有机成分的提取和应用,尤其涉及一种植物中叶绿体总 RNA 和总蛋白质的提取以及总蛋白质的具体应用。

背景技术

[0002] 我国作为茶树发源地,其品种资源非常丰富,种植规模也在逐年扩大,现已成为我国重要的经济作物。随着茶叶所具有的各种保健功能逐步被人们所发现,茶叶作为世界三大饮料之一,愈来愈受到消费者的青睐,茶叶消费量也在逐步提高,如何提高茶叶产量以满足快速增长的市场需求,已成为茶叶种植户及科技工作者的共同目标和重要课题。

[0003] 叶绿体是绿色植物进行光合作用重要场所,植物通过光合作用吸收光能将二氧化碳和水合成有机物,光合作用的效率与植物产量密切相关。开展茶树叶绿体发育和作用机制的研究是提高茶树产量的有效途径之一;另一方面,对于茶树品种的遗传改良等也具有非常积极的意义。

[0004] RNA 和蛋白质一直是分子生物学研究的主要内容。叶绿体作为植物的亚细胞器,往往仅能从植物材料中获得少量完整的叶绿体样品。因此,如何从少量珍贵茶树样品中获得高品质、高纯度、完整的叶绿体 RNA 和蛋白质,对于茶树分子生物学研究显得尤为重要。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种步骤简单、操作方便、成本低、且产品纯度高无污染的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,还提供一种步骤简单、材料利用率高、工艺效率高、成本低、产品纯度质量较好的从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,还提供提取的叶绿体总蛋白质样品在二硫苏糖醇-聚丙烯凝胶电泳分析、蛋白质免疫印迹或蛋白质双向电泳等分析中的具体应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提出的技术方案为一种从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 叶绿体纯化:按照常规方法从木本植物材料的叶片中进行粗提、纯化,得到叶绿体材料;

[0008] (2) 冻融处理:将上述纯化后的叶绿体材料加入交联聚乙烯吡咯烷酮中,所述叶绿体材料与交联聚乙烯吡咯烷酮的质量比为 1 : 1 ~ 3,然后于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 温度下进行冻融处理(重复 2 ~ 3 次即可);

[0009] (3) 抽提总 RNA:将经过冻融处理后的叶绿体材料加入冰浴预冷的 Trizol 试剂中,并加入冰浴预冷的氯仿,剧烈振荡后室温静置,再高速离心使抽提液分层,取分层后的上层水相加入冰浴预冷的异丙醇中,室温放置;再高速离心,弃去上清液,离心后的沉淀经洗涤、离心分离后,即得到所述木本植物材料的叶绿体总 RNA。

[0010] 上述的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,优选的,所述 Trizol 试剂按

照每 0.05g ~ 0.10g 叶绿体材料加入 1mL 的添加量进行添加;所述氯仿按照每 1mL Trizol 试剂添加 0.15mL ~ 0.20mL 氯仿的添加量进行添加;所述异丙醇按照每 1ml Trizol 试剂添加 0.30 mL ~ 1.50 mL 异丙醇的添加量进行添加。

[0011] 上述的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,优选的,所述高速离心时的条件为 10000 ~ 30000×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 10min ~ 30 min;所述离心分离时的条件为 5000 ~ 10000×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 3min ~ 10 min。

[0012] 上述的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,所述步骤(1)中的粗提优选包括以下步骤:将所述木本植物材料的叶片破碎,置入 3 ~ 6 倍于其体积且 -20℃ ~ -80℃ 预冷后的粗提缓冲液中,经匀浆、过滤后所得的叶片匀浆滤液再进行离心处理,100 ~ 300×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 5min ~ 10 min,弃沉淀;离心后的上清液再进行二次离心处理,1000 ~ 3000×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 10min ~ 20min,弃上清,所得沉淀即为叶绿体粗提物。

[0013] 上述的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,所述步骤(1)中的纯化包括以下步骤:将所述叶绿体粗提物加入 Percoll 母液和氯化钠溶液构成的密度梯度体系中,2000 ~ 4000×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 10min ~ 20min,收集密度梯度分界面的绿色条带,再用 1 ~ 3 倍于其体积且预冷后的纯化缓冲液重悬,2000 ~ 4000×g、0℃ ~ 10℃条件下离心 10 min ~ 20min,所得沉淀即为纯化后的叶绿体材料。

[0014] 上述的从木本植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,所述木本植物优选为茶树。

[0015] 作为一个总的技术构思,本发明还提供一种从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0016] (a) 按照上述的方法先提取得到所述叶绿体总 RNA;

[0017] (b) 沉淀 DNA:向所述抽提液分层后保留的中间层和下层有机相中加入无水乙醇,无水乙醇按每 1ml Trizol 试剂加入 1.0mL ~ 1.5mL 无水乙醇的添加量添加,室温孵育,离心后弃沉淀;

[0018] (c) 沉淀蛋白质:将上述步骤(b)后的上清液加入 -20℃ ~ -80℃ 预冷后含醋酸铵的甲醇溶液中,-20℃ ~ -80℃ 条件下沉淀,1h ~ 5h,再经高速离心后弃上清液;得到的沉淀分别用甲醇溶液、丙酮溶液洗涤,得到所述木本植物材料的叶绿体总蛋白质。

[0019] 上述的从木本植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,所述步骤(b)中,离心的条件为 1000 ~ 3000×g、0 ~ 10℃条件下离心 3 min ~ 10min;所述步骤(c)中,高速离心的条件为 10000 ~ 20000×g、0 ~ 10℃条件下离心 15min ~ 30min。更优选的,所述含醋酸铵的甲醇溶液中含有 0.05 mol/L ~ 0.25 mol/L 醋酸铵、10mmol/L ~ 25 mmol/L 的二硫苏糖醇和 2.0% ~ 4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂;所述甲醇溶液和丙酮溶液中均含 10mmol/L ~ 25mmol/L 的二硫苏糖醇和 2.0% ~ 4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂。

[0020] 作为一个总的技术构思,本发明还提供一种用上述方法获得的叶绿体总蛋白质制备双向电泳分析样品的方法,该方法所用的蛋白质样品主要通过以下步骤制备得到:将所述叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中,每 1 mg 叶绿体总蛋白质添加 5 μL ~ 20 μL 的蛋白质裂解液,混合均匀后冰浴上裂解 1h ~ 3h,高速离心后的上清液即为双向电泳分析的蛋白质样品;

[0021] 所述蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分：

[0022] 6mol/L ~ 8mol/L 尿素、1mol/L ~ 2 mol/L 硫脲、30mmol/L ~ 65mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、2.0% ~ 5.0% 质量分数的 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸、2mmol/L ~ 5mmol/L 三丁基膦、0.1% ~ 0.2% 体积分数的两性电解质和 2% ~ 4% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂。

[0023] 作为一个总的技术构思,本发明还提供一种用上述方法获得的叶绿体总蛋白质制备二硫苏糖醇-聚丙烯凝胶电泳分析或蛋白质免疫印迹分析样品的的方法,该方法所用的蛋白质样品主要通过以下步骤制备得到:将所述叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中,每 1 mg 叶绿体总蛋白质添加 10 μ L ~ 30 μ L 的蛋白质裂解液,所述蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分：

[0024] 30mmol/L ~ 80mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH6.8)、50mmol/L ~ 150mmol/L 二硫苏糖醇、1.0% ~ 5.0% 质量分数的十二烷基硫酸钠、0.05% ~ 0.30% 质量分数的溴酚蓝和 5% ~ 15% 体积分数的甘油。

[0025] 与现有技术相比,本发明的优点在于：

[0026] (1) 在本发明提取叶绿体总 RNA 的方法中,通过在叶绿体分离和裂解过程中采用交联聚乙烯吡咯烷酮,可有效去除木本植物(尤其是像优选方案中的茶树)富含的酚类、多糖等杂质,显著提高制备 RNA 和蛋白质样品的质量；

[0027] (2) 在本发明的同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法中,本发明仅利用一份试验材料即可同时制备高质量、高纯度的茶树叶体 RNA 和蛋白质样品,有效提高了试验材料的利用率,特别是对珍贵的试验材料具有重要意义；

[0028] (3) 在本发明的同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法中,通过优选采用含有 0.05 mol/L ~ 0.25 mol/L 醋酸铵、10mmol/L ~ 25 mmol/L 的二硫苏糖醇和 2.0% ~ 4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂的甲醇溶液沉淀蛋白质,可有效克服蛋白质沉淀后复溶困难的问题,同时显著提高了蛋白质沉淀效率；

[0029] (4) 在本发明叶绿体总蛋白质的具体分析应用中,通过在蛋白质裂解液中添加三羟甲基氨基甲烷盐酸盐增加了叶绿体总蛋白质样品的溶解性;还通过采用还原性强的三丁基膦代替带负电荷的二硫苏糖醇,有效减少了由于二硫苏糖醇所带负电荷引起的双向电泳图碱性端的拖尾现象并增加了蛋白点数量,便于后续的质谱鉴定分析。

[0030] 综上所述,本发明的方法操作简单、实施容易,且提取、获得的样品质量较好;采用本发明方法制备的叶绿体 RNA 和叶绿体总蛋白质样品的质量完全满足实时荧光定量 PCR、蛋白质免疫印迹、蛋白质双向电泳等分析应用要求,这为茶树叶体分子生物学研究奠定了坚实的基础,同时对其它木本植物叶绿体 RNA 和蛋白样品的制备具有重要意义。

附图说明

[0031] 图 1 为本发明实施例中对制备提取的茶树叶体 RNA 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱。

[0032] 图 2 为本发明实施例中对制备的茶树叶体蛋白质样品进行免疫印迹杂交的图谱。

[0033] 图 3 为本发明实施例中对制备的茶树叶体蛋白质样品进行双向电泳的图谱。

具体实施方式

[0034] 以下结合说明书附图和具体优选的实施例对本发明作进一步描述,但并不因此而限制本发明的保护范围。

[0035] 实施例:

[0036] 一种本发明的从茶树植物材料中提取叶绿体总 RNA 的方法,具体包括以下步骤:

[0037] 1. 叶绿体纯化:从茶树的叶片中进行粗提、纯化,得到叶绿体材料。

[0038] 1.1 粗提:取新鲜茶树叶片剪碎,置于 3 倍其体积且 -20°C 预冷后的粗提缓冲液 [含 0.33 mol/L 的山梨醇、 0.1% 的牛血清白蛋白(w/v)、 10 mmol/L 的二硫苏糖醇(w/v)、 5 mmol/L 的 EDTA、 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)和 5% 的交联聚乙烯吡咯烷酮(w/v),蒸馏水为溶剂]中,匀浆 3 次,每次 10s,4 层灭菌纱布过滤,经匀浆、过滤后所得的叶片匀浆滤液在 $200\times g$ 、 4°C 条件下离心 5 min,弃沉淀;离心后的上清液在 $1000\times g$ 、 4°C 条件下离心 10min,弃上清,所得沉淀即为叶绿体粗提物。

[0039] 1.2 纯化:将上述获得的叶绿体粗提物加入 Percoll 母液 [Percoll : 0.85% 质量分数的氯化钠溶液= $1 : 9$ (v/v)] 和 0.85% 质量分数的氯化钠溶液构成的密度梯度体系中 [上部 : 30% (w/v);下部 : 60% (w/v)],在 $3000\times g$ 、 4°C 条件下离心 15 min,收集密度梯度分界面的绿色条带,再用 3 倍于其体积且预冷后的纯化缓冲液 [包含 150 mmol/L 的 NaCl、 25 mmol/L 的乙二胺四乙酸、 50 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 8.0),蒸馏水为溶剂]重悬, $3000\times g$ 、 4°C 条件下离心 10 min,重复 2 ~ 3 次,所得沉淀即为纯化后的叶绿体材料。

[0040] 2. 冻融处理:将上述纯化后的叶绿体材料加入交联聚乙烯吡咯烷酮中,叶绿体材料与交联聚乙烯吡咯烷酮的质量比为 $1 : 1$,然后于 -20°C 温度下进行冻融处理,重复冻融 3 次。

[0041] 3. 抽提总 RNA:将经过冻融处理后的叶绿体材料加入冰浴预冷后的 Trizol 试剂中,每 $0.05\text{g} \sim 0.1\text{g}$ 叶绿体材料加入 1mL Trizol 试剂,振荡混匀,室温静置 5 min;然后按照 1mL Trizol 试剂加入 0.2mL 的添加量加入冰浴预冷后的氯仿,剧烈振荡 15s,室温静置 15 min,再在 $12000\times g$ 、 4°C 条件下离心 15min 使抽提液分层,取分层后的上层水相于新的离心管中(中间层和下层有机相保存备用),按每 1mL Trizol 试剂添加 0.5mL 的添加量加入冰浴预冷后的异丙醇中,室温放置 15min;再在 $12000\times g$ 、 4°C 条件下离心 15 min,弃去上清液,离心后的沉淀加入 1mL 75% 的乙醇溶液洗涤 2 次,再在 $7500\times g$ 、 4°C 条件下离心 5min,即得到该茶树的叶绿体总 RNA。

[0042] 一种本发明的从茶树植物材料中同时提取叶绿体总 RNA 和叶绿体总蛋白质的方法,具体包括以下步骤:

[0043] 1. 提取叶绿体总 RNA:按照本实施例上述的方法先提取得到叶绿体总 RNA;

[0044] 2. 沉淀 DNA:向上述抽提液分层后保留的中间层和下层有机相中加入无水乙醇,以沉淀中间层和下层酚相中的 DNA,无水乙醇的添加量按每 1mL Trizol 试剂加入 1.5mL 计,室温孵育 3min,再在 $2000\times g$ 、 4°C 条件下离心 5min,离心后弃沉淀;

[0045] 3. 沉淀蛋白质:将上述步骤 2 后的上清液转移至新离心管中,加入 5 倍其体积且经 -20°C 预冷后含醋酸铵的甲醇溶液 [含有 0.1mol/L 醋酸铵、 10mmol/L 的二硫苏糖醇和 4.0% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂], -20°C 条件下沉淀 1h,再在 4°C 、 $15000\times g$ 条件下

离心 15min, 弃上清液; 得到的沉淀分别用甲醇溶液 [含 10mmol/L 的二硫苏糖醇和 2% 的 Cocktail 蛋白抑制剂(v/v)]、80% 质量分数的丙酮溶液 [含 10mmol/L 的二硫苏糖醇和 2% Cocktail 蛋白抑制剂(v/v)] 各洗涤一次, 得到茶树材料的叶绿体总蛋白质。

[0046] 上述本实施例的方法获得的叶绿体总蛋白质可进行双向电泳分析, 该分析所用的蛋白质样品主要通过以下步骤制备得到: 将叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中, 每 1 mg 叶绿体总蛋白质添加 20 μ L 的蛋白质裂解液, 混合均匀后冰浴上裂解 2h, 4 $^{\circ}$ C、15000 \times g 条件下离心 15 min, 离心后的上清液即为双向电泳分析的蛋白质样品;

[0047] 上述用到的蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分:

[0048] 7mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、50mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、4% 质量分数的 3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1- 丙磺酸、3mmol/L 三丁基膦、0. 2% 体积分数 Bio-Lyte 的两性电解质(pH 4 ~ 7) 和 4% 体积分数的 Cocktail 蛋白抑制剂。

[0049] 上述本实施例的方法获得的叶绿体总蛋白质可进行二硫苏糖醇 - 聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE)分析或蛋白质免疫印迹(Western blot)分析, 该分析所用的蛋白质样品主要通过以下步骤制备得到: 将叶绿体总蛋白质加入到蛋白质裂解液中, 每 1 mg 叶绿体总蛋白质添加 10 μ L 的蛋白质裂解液, 该蛋白质裂解液中包含以下浓度的组分:

[0050] 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH=6. 8)、100 mmol/L 二硫苏糖醇、2. 0% 质量分数的十二烷基硫酸钠、0. 1% 质量分数的溴酚蓝和 10% 体积分数的甘油。

[0051] 对上述本实施例提取的 RNA 进行检测, 参照《分子克隆实验指南(第二版)》说明进行 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。由图 1 可见, 本发明方法提取的 RNA 琼脂糖凝胶电泳显示 5S、18S、28S 条带清晰可见, 28S 为 18S 条带浓度的 2 ~ 3 倍, 条带之间无明显拖尾现象, 这表明 RNA 完整无降解, 且无 DNA 污染。RNA 样品的 A260/A280 比值为 1. 9 左右, 在 1. 8 ~ 2. 0 之间, 这说明 RNA 样品中无蛋白质、酚类等杂质污染, 纯度较高。

[0052] 对上述本实施例提取的叶绿体蛋白质样品进行免疫印迹杂交, 参考《分子克隆实验指南(第二版)》说明进行蛋白质免疫印迹杂交实验检测 β -actin 蛋白, 鉴定提取蛋白质质量, 结果如图 2。由图 2 可见, 蛋白质样品的 A280/A260 比值为 1. 85 左右, 在 1. 8 ~ 2. 0 之间, 说明蛋白质样品中无核酸污染, 纯度较高。

[0053] 对上述本实施例提取的叶绿体蛋白质样品进行蛋白质双向电泳检测, 参照《蛋白质技术手册》进行蛋白质双向电泳试验, 结果见图 3。由图 3 可知, 本发明方法提取的茶树叶叶绿体总蛋白样品进行双向电泳试验能获得分辨率高、重复性好的双向电泳图谱。

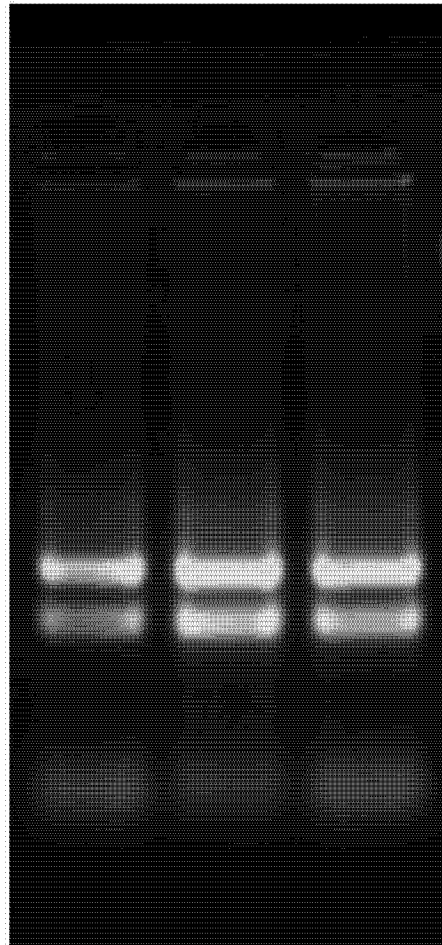


图 1

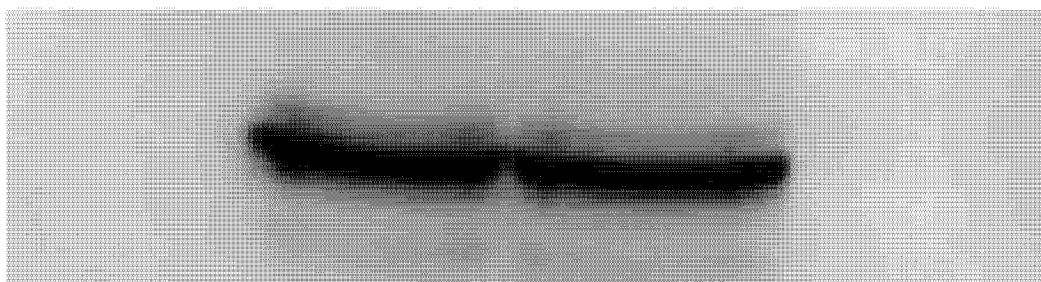


图 2

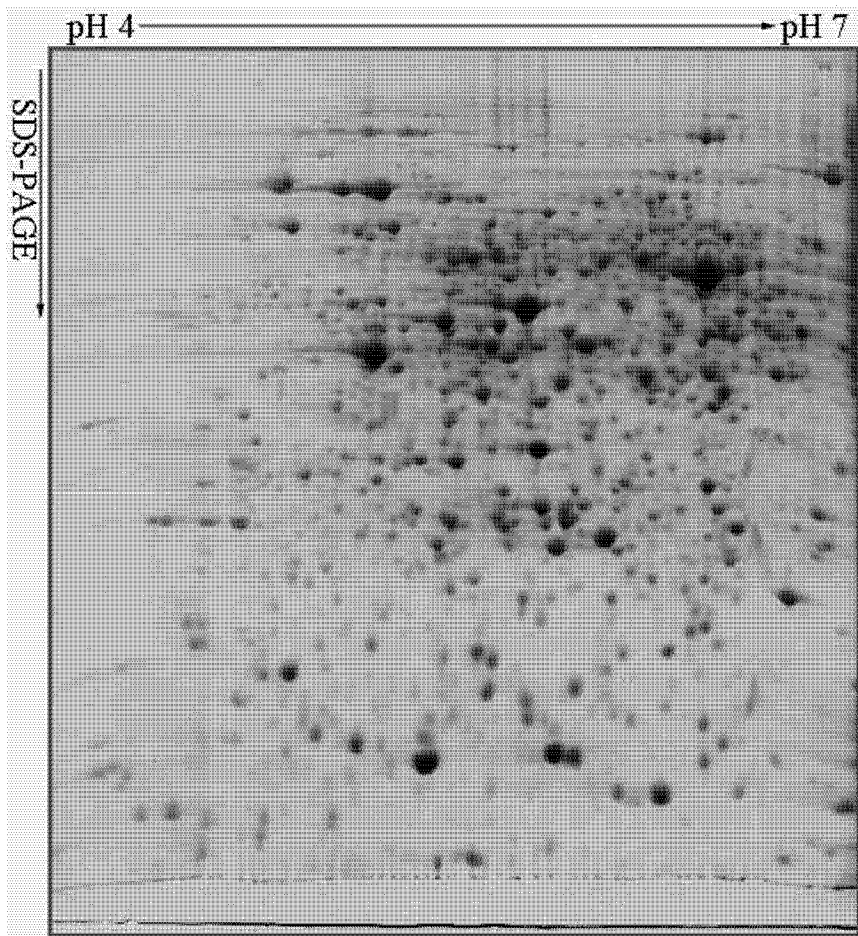


图 3

专利名称(译)	从木本植物材料中提取叶绿体总RNA及同时提取总蛋白质的方法、叶绿体总蛋白质的应用		
公开(公告)号	CN103013984B	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201310010059.4	申请日	2013-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
[标]发明人	李勤 刘仲华 黄建安 林海燕 刘硕谦 李娟		
发明人	李勤 刘仲华 黄建安 林海燕 刘硕谦 李娟		
IPC分类号	C12N15/10 C07K1/30 G01N1/28 G01N33/531		
代理人(译)	赵洪 杨斌		
审查员(译)	罗洋		
其他公开文献	CN103013984A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种从木本植物材料中提取叶绿体总RNA的方法，先对植物材料进行粗提、纯化，再将得到的叶绿体材料加入交联聚乙烯吡咯烷酮，经过冻融处理、抽提、离心弃上清液，沉淀经洗涤、分离后得到叶绿体总RNA。本发明还公开了一种从木本植物材料中同时提取叶绿体总RNA和叶绿体总蛋白质的方法，先按照前述步骤得到叶绿体总RNA；然后向抽提液分层后保留的中间层和下层有机相中加入无水乙醇，孵育、离心后弃沉淀；再将上清液加入到含醋酸铵的甲醇溶液中，沉淀，洗涤，得到叶绿体总蛋白质。本发明的方法工艺效率高，产品纯度好，得到叶绿体总蛋白质可在二硫苏糖醇-聚丙烯酰胺电泳分析、蛋白质免疫印迹或双向电泳等分析中进行应用。

