

毛尖紫萼藓总 RNA 的提取方法研究

沙伟, 王艳丽, 滕兆岩

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 介绍一种提取苔藓植物毛尖紫萼藓 (*Grimmia pilifera* P. Beauv) 总 RNA 的方法。以新鲜的紫萼藓为材料, 采用改良的 SDS 的方法, 以氯化锂为沉淀试剂, 成功地提取了该植物的总 RNA。并与其他方法作了对比, 结果发现该方法获得的 RNA 条带清晰、完整性好、纯度高、DNA 污染小。可满足反转录及 RT-PCR 等实验要求。

关键词: 毛尖紫萼藓; SDS; 总 RNA; RT-PCR

中图分类号: Q752; Q949.35

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0310-03

The Method Study of Extracting Total RNA from *Grimmia pilifera* P. Beauv

SHA Wei, WANG Yan-Li, TENG Zhao-Yan

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: A method of extracting total RNA from *Grimmia pilifera* P. Beauv of moss was introduced. The fresh *Grimmia pilifera* was used as the main materials. The improved SDS method was implied, and the reagent of RNA precipitation was LiCl. The total RNA were successfully isolated from this plant. At the same time, the method was compared with others, it could be find that the total RNA of *G. pilifera* extracted by the method had clear bands, good completeness, high purity and less DNA contamination. The total RNA is suitable for Reverse Transcription, RT-PCR.

Key words: *Grimmia pilifera* P. Beauv; SDS; Total RNA; RT-PCR

RNA 是分子生物学研究的重要对象之一, 高质量的 RNA 是进行反转录、RT-PCR、DDRT-PCR、Northern 杂交分析、cDNA 文库构建等的重要前提。因此, 在对苔藓植物进行 mRNA 差异显示筛选抗旱基因的过程中, 高质量的总 RNA 的提取至关重要。常用的提取总 RNA 的方法有 SDS 法^[1]、CTAB 法^[2]、异硫氰酸胍法^[3]、苯酚法^[4]、氯化锂沉淀法^[5]等。但由于藓类植物普遍含有萜类、固醇类、酚类等次生代谢产物而影响 RNA 提取。结果显示, 萜类化合物会造成 RNA 的化学降解和酶解, 而藓类中经常含有的黄酮醇类物质也是影响 RNA 提取的物质, 使提取的 RNA 易于降解^[6]。因此, 藓类总 RNA 的提取更显得困难。

本研究以毛尖紫萼藓 (*Grimmia pilifera* P. Beauv) 为材料, 采用改良的 SDS 法, 以氯化锂为沉淀试剂, 成功地提取了该植物的总 RNA。并与其他方法对比后发现, 该方法获得的 RNA 条带清晰, 完整性好, 纯度高, DNA 污染小, 可满足反转录、RT-

PCR 等实验要求, 为深入开展苔藓植物抗旱基因筛选任务奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

毛尖紫萼藓 (*Grimmia pilifera* P. Beauv) 是紫萼藓科 (Grimmiaceae) 一种旱生性藓类植物。本材料采于五大连池石面上, 选取长势较好的进行培养, 待其恢复生长, 选取一定量自然生长的材料, 保存于 -80℃ 冰箱中待用。

试剂: SDS 提取液 (0.18 mol/L Tris, 0.09 mol/L LiCl, 4.5 mmol/L EDTA, 1.4% SDS, 调 pH 至 8.2), 3 mol/L 醋酸钠 (用冰乙酸调节 pH 至 5.2), 5 mol/L 醋酸钾 (pH 5.2), 氯仿 : 异戊醇 (C : I = 24 : 1), 无水乙醇。

1.2 总 RNA 提取方法

1.2.1 改良的 SDS 法

(1) 取 0.2 g 新鲜材料, 放入预先在 -80℃ 冰

收稿日期: 2006-11-01, 修回日期: 2006-12-29。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470144); 黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目 (1151hz022) 资助。

作者简介: 沙伟 (1963-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔人, 汉族, 博士, 教授, 从事植物学、植物遗传学、遗传生态学研究。(E-mail: shw1129@263.net)。

箱中冷却的研钵中,迅速加入液氮充分研磨。

(2) 将研磨好的样品迅速转到1.5 mL的离心管中,依次加入600 μL的SDS提取液、60 μL的巯基乙醇、400 μL苯酚,用漩涡震荡器震荡3 min,冰上放置15 min后加入100 μL的KAc,150 μL的无水乙醇,200 μL的氯仿,然后于4℃、12 000 r/min离心15 min。

(3) 取上清移入1.5 mL的离心管中,加入300 μL的Tris苯酚和300 μL的氯仿,震荡2 min后于4℃、12 000 r/min离心15 min。

(4) 将上清移入另一新的离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)重复步骤(3)。

(5) 再向上清液中加入1/3体积的氯化锂过夜(8 h左右),沉淀RNA,取出离心管4℃、12 000 r/min离心15 min,收集沉淀。

(6) 用75%的乙醇洗涤沉淀2次,洗涤后于4℃、12 000 r/min离心5 min。

(7) 把沉淀溶于200 μL的DEPC水,加入30%的无水乙醇,100 μL苯酚和100 μL的氯仿抽提1次,再加入1/10体积的NaAc和2.5倍体积的无水乙醇,于-80℃冰箱中放置1 h。

(8) 取出后4℃、12 000 r/min离心15 min,用75%的乙醇洗涤沉淀1次,然后加适量的DEPC水溶解,-80℃保存备用。

1.2.2 适用范围广的总RNA提取方法

作为对照,采用一种适用范围广泛的总RNA提取方法对毛尖紫萼藓总RNA进行提取,具体方法见参考文献^[1]。

1.3 总RNA的完整性及纯度检测

(1) 取5 μL总RNA,经1.5%的琼脂糖凝胶电泳(电压6 V/cm)30 min,用紫外凝胶成像系统(UVP GDS-8000)照像记录总RNA的完整性。

(2) 取1 μL总RNA溶液,加DEPC处理水至50 μL,用GeneSpec I紫外分析仪测定OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值,并进行纯度分析。

1.4 RNA的反转录和RT-PCR扩增对改良的SDS法提取的总RNA的验证

1.4.1 RNA的反转录

反转录酶采用宝生物工程(大连)有限公司(TakaRa)的Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H)并按其操作程序,取改良的SDS法提取的总RNA进行反转录,合成cDNA第一条链。反转录所用的锚定引物为5'-T₁₃A-3'(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

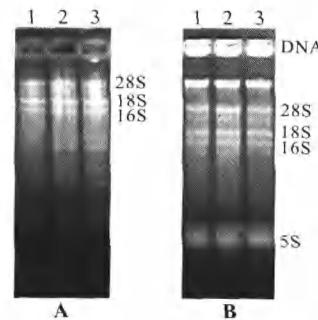
1.4.2 RT-PCR扩增

PCR扩增采用与反转录相同的锚定引物,随机引物(购自上海生工生物工程技术服务有限公司)序列分别为:HAP25(AAGCTTCCCTGGA),HAP26(AAGCTTGCCATGG),HAP27(AAGCTTCTGCTGG),HAP28(AAGCTTACGATGC),HAP29(AAGCTTACGAGCA),HAP30(AAGCTTCGTACGT),HAP31(AAGCTTGGTGAAC)。PCR程序:94℃5 min,40℃2 min,72℃1.5 min 1个循环,94℃45 s,42℃2 min,72℃1.5 min 40个循环,72℃延伸5 min,扩增产物于2.0%琼脂糖胶上电泳。

2 结果与分析

2.1 总RNA的完整性检测

总RNA的琼脂糖凝胶电泳见图1。图1:A为改良的SDS法提取的总RNA电泳结果,从图中我们可以看见5条带,28S、18S和16S条带清晰,且28S亮度高于18S,并且下面有弥散的条带,各带之间有类似Smear现象,此即不同分子量的mRNA。因此,该方法提取的总RNA条带多而清晰无降解,完整性好。但5S很少,在电泳图中几乎看不见。图1:B为用王玉成等^[1]的方法提取的总RNA电泳结果,该图中虽也能看见RNA的几条带,且5S清晰,但存在明显的DNA污染,且孔中有蛋白滞留。后续RNA纯化发现其中的DNA污染很难去除,而影响后面的反转录。由于5S的缺失,不会影响反转录及后面的RT-PCR实验,因此,改良的SDS法适合毛尖紫萼藓总RNA的提取。



A. 改良的SDS法提取总RNA电泳图;B. 适用范围广的总RNA提取电泳图。1,2,3为3个重复

A. Electrophoresis picture of total RNA by the improved SDS method;
B. Electrophoresis picture of total RNA by a widely applied total RNA extraction method. 1, 2 and 3 are three repetition

图1 两种方法总RNA的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pictures of total RNA by two methods

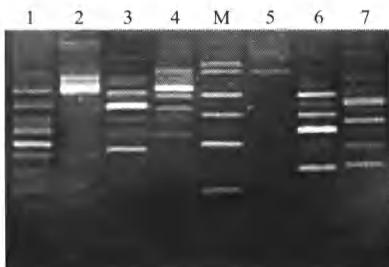
2.2 总RNA的纯度检测

经GeneSpec I紫外分析仪测定,使用改良的

SDS 法获得的总 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.9 到 2.1 之间, 平均在 2.0 左右, 表明获得的 RNA 纯度好。同一样品重复 3 次, 所得结果基本相同。而采用王玉成等^[1]的方法提取的总 RNA OD_{260}/OD_{280} 值在 1.4 左右。由此可见用改良的 SDS 法所获得的总 RNA 纯度较高。

2.3 改良的 SDS 法提取总 RNA 的反转录和 RT-PCR 扩增

选用锚定引物 5'-T₁₃A-3' 对改良的 SDS 法提取总 RNA 进行反转录, 之后以此为模板选用同一锚定引物与上述 7 个随机引物组合进行 PCR 扩增。从图 2 可以看出, 每对引物组合都可以扩增出带来, 并且 1、3、4、6、7 孔道都可以扩增出很多条带, 说明该 RNA 能满足反转录及 RT-PCR 的实验要求, 因此, 改良的 SDS 法是获得高质量毛尖紫萼藓总 RNA 的理想方法。



1. 引物 HAP25; 2. 引物 HAP26; 3. 引物 HAP27; 4. 引物 HAP28; 5. 引物 HAP29; 6. 引物 HAP30; 7. 引物 HAP31; M. DNA 标准分子量
1. Primer HAP25; 2. Primer HAP26; 3. Primer HAP27; 4. Primer HAP28; 5. Primer HAP29; 6. Primer HAP30; 7. Primer HAP31; M. DGL 2000 DNA maker

图 2 同一锚定引物和 7 个随机引物的 RT-PCR 结果
Fig. 2 The result of RT-PCR by the same anchor primer and 7 random primers

3 讨论

目前对苔藓植物 RNA 提取的研究还很少, 因此, 寻找一种有效的、适合苔藓植物的方法十分必要。好的提取方法要求 RNA 没有降解, 同时有较高的产量, 特别是 mRNA 不能在提取过程丢失。这是进行基因克隆之必须。本实验采用改良的 SDS 方法提取总 RNA, 利用 SDS 去污剂来分离核蛋白与核酸; 并与巯基乙醇、苯酚、氯仿共同抑制 RNA 酶的活性、变性蛋白; 用醋酸钾与低浓度的乙醇共同作用来沉淀多糖^[7]; 最后通过 10 mol/L LiCl 来沉淀 RNA。通过比较、验证实验, 我们认为改良的 SDS 方法是适合毛尖紫萼藓总 RNA 提取的较好方法, 该方法不但重复性好, 而且可获得高质量的 RNA, 为下一步实验奠定基础。但本方法仍存在一定的局限性, 由于用氯

化锂沉淀, 使 Li^+ 存在会影响反转录^[8], 但可通过用 70% 的乙醇充分洗涤 RNA 沉淀 2 次, 可有效洗去残存的 Li^+ 。在藓类植物中, 欧阳浩森等^[6]对仙鹤藓 (*Atrichum undulatum*) RNA 的提取也进行了研究, 主要得出了热硼酸法能得到很好的效果, 该方法主要通过 $LiCl$ 多次润洗获得 RNA 沉淀。但考虑到 Li^+ 的影响^[8], 所以改良的 SDS 法仅用 $LiCl$ 沉淀 1 次, 再采用酚、氯仿、醋酸钾等抽提去除糖、蛋白的影响。

本方法不仅适用于毛尖紫萼藓总 RNA 的提取, 还对紫萼藓科砂藓 (*Racomitrium canescens*) 作了尝试, 结果发现也能提取总 RNA, 因此, 该方法对藓类植物及次生代谢产物丰富的植物总 RNA 的提取具有一定的借鉴意义。

完整性好、纯度高的毛尖紫萼藓总 RNA 的提取关键是避免 RNase 的污染, RNase 的污染包括内源 RNase 的污染和外源 RNase 的污染。RNase 的污染几乎无处不在, 因此操作过程中应尽量避免外源 RNase 的污染, 抑制内源 RNase 的活性。所以应首先将 RNA 操作中的器皿、耗材等浸泡于 0.1% DEPC 溶液中 12 h, 121℃ 高压灭菌 15 min, 再在 70~80℃ 下烘干备用。其次整个提取过程要迅速, 研钵和实验材料应预先放在 -80℃ 冰箱中预冷, 以便于研磨, 并有利于对总 RNA 的保护。并且操作过程应尽量在低温条件下进行。有些方法要求提取液要预热, 这样可以充分地破裂细胞, 使内含物大量释放出来, 但由于本实验材料自身的特点, 在提取液预热的情况下提取极易降解, 所以, 应尽量在低温下进行。

参考文献:

- 王玉成, 张国栋, 姜静. 一种适用范围广的总 RNA 提取方法 [J]. 植物研究, 2006, 26(1): 84~87.
- Zheng Y, Yang T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. Plant Mol Bio Rep, 2002, 20: 417a~417e.
- Chomezynski P, Brar A K, Frohman L A. Single step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-pheolechloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156.
- Kirby K S. Methods in Enzymology [M]. New York: New York Academic Press, 1968. 87~99.
- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 穆尔 D D, 塞德曼 J G, 史密斯 J A, 斯特拉尔 K. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 126~127.
- 欧阳浩森, 夏桂先, 刘祥林. 仙鹤藓 RNA 提取不同方法比较 [J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2004, 25(2): 57~60.
- 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.
- 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 1~4.