

技术与方法

提取蕨类植物蜈蚣草总 RNA 的一种有效方法^①

何振艳 徐文忠 杨学习 麻 密^②

(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学院重点实验室 北京 100093)

摘要 介绍了一种提取蕨类植物蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)总RNA的有效方法。由于蜈蚣草富含多酚和多糖,用普通的RNA提取方法很难获得高质量的RNA。本方法通过优化提取缓冲液的条件来抑制多酚氧化,并利用RNA与多酚、多糖在不同浓度的2-丁氧乙醇中溶解度不同的特性来去除多酚和多糖。本方法简便、快速,所提取的RNA质量较高,可直接用于cDNA合成、cDNA文库的构建以及RACE等分子生物学操作。

关键词 蜈蚣草, 蕨类植物, 多酚, 多糖, RNA提取

An Effective Method of Total RNA Isolation from a Fern Plant — *Pteris vittata* L.

HE Zhen-Yan XU Wen-Zhong YANG Xue-Xi MA Mi^②

(Key Laboratory of Plant Photosynthesis and Molecular Environmental Physiology, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract Here we reported on an effective method for total RNA isolation from a fern plant, *Pteris vittata* L. This method inhibits the oxidation of polyphenols by optimizing the conditions of the extraction buffer. Most of the polysaccharides and polyphenols extracted with nucleic acids are removed by taking advantage of differences in solubility of these compounds in the solvent 2-butoxyethanol. The whole process can be completed with a convenient manipulation in less than 2 hours. Isolated RNA has high purity and yield, and can be used for molecular manipulation such as the cDNA synthesis, cDNA library construction and RACE.

Key words *Pteris vittata* L., Fern, Polysaccharides, Polyphenols, RNA isolation

2001年,《Nature》报道了世界上发现的第一种砷超富集植物(hyperaccumulator)——蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)(Ma *et al.*, 2001)。蜈蚣草属蕨类植物门、凤尾蕨科、凤尾蕨属,广布于我国长江以南各地区。最近越来

越多的研究显示,蜈蚣草和其他一些蕨类植物所具有的特性对于土壤砷污染的治理和植物砷抗性机制的研究都具有十分重要的意义(陈同斌等, 2002; Raab *et al.*, 2004)。

然而到目前为止,国内外尚无蜈蚣草砷

①国家自然科学基金(30170086, 30370127)、863计划(2001AA645010-5)和转基因植物专项(JY03-A-20-01)资助。

②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: mami@ibcas.ac.cn

收稿日期: 2004-05-17 接受日期: 2004-07-19 责任编辑: 白羽红

抗性分子机制研究的报道。其他蕨类植物有关分子生物学的研究资料也很少。RNA 提取是进行分子生物学的必要前提。由于蜈蚣草富含多酚和多糖,普通的 RNA 提取方法(如盐酸胍法和 TRIZOL 法等)很难获得高质量的 RNA。在对多种 RNA 提取方法进行比较和改进的基础上(Manning, 1991; Schneider *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), 我们摸索出一种提取蕨类植物蜈蚣草总 RNA 的有效方法。用该方法提取的 RNA 可直接用于 cDNA 合成、cDNA 文库构建以及 RACE 等分子生物学操作。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

蜈蚣草(*Pteris vittata* L.)采自我国湖北矿区,移栽在温室培养。取幼嫩叶片作为 RNA 提取材料。

各种试剂均为 RNA 实验专用。TRIZOL 购于 Invitrogen 公司; Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 和 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司。

1.2 RNA 提取

1.2.1 改进的 RNA 提取法 将 0.5 mL 提取缓冲液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 500 mmol·L⁻¹ EDTA, 500 mmol·L⁻¹ NaCl; 2% SDS; 5 mmol·L⁻¹ DTT, pH 8.3)加入到 1.5 mL 离心管中,加入 1.5%(V/V) β-巯基乙醇。将 100 mg 新鲜的蜈蚣草叶片用液氮冷冻研磨后,迅速转到温浴的缓冲液中,剧烈震荡离心管,使组织与提取液充分混匀; 70 °C 温浴 6 分钟,迅速置于冰上。待冷却后,12 000 g 离心 10 分钟,小心取出上清液;向上清液中加入 0.1 mL 5 mol·L⁻¹ NaCl,混匀后,加入 1/2 体积的水饱和酚和 1/2 体积的氯仿,在漩涡振荡器上剧烈振荡 2 分钟,12 000 g 离心 10 分钟,小心取出上清液。向上清液中加入 1/4 体积的 2-丁氧乙醇和 1.5%(V/V)的 β-巯基

乙醇,混匀,冰浴 10 分钟;12 000 g 离心 10 分钟,小心取出上清液;向上清液中加入 1 体积的 2-丁氧乙醇和 1.5%(V/V) β-巯基乙醇,充分混匀后静置 10 分钟,12 000 g 离心 10 分钟,倒掉上清液。用 50% 的 2-丁氧乙醇洗涤沉淀 2 次,加入适量的 DEPC 处理水溶解 RNA。

1.2.2 硫氰酸胍一步法提取总 RNA 参考《分子克隆实验指南》的方法(Sambrook *et al.*, 1992)。

1.2.3 TRIZOL 法提取总 RNA TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 RNA 质量检测

用紫外分光光度计检测 RNA 纯度和浓度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性。

1.4 cDNA 文库构建

以 1.2.1 节中所述方法分别制备经砷诱导的对照和处理的 RNA,并构建差异表达的 SSH(suppressive subtraction hybridization) cDNA 文库(按试剂盒提供的方法操作)。合成的 cDNA 质量可以验证 RNA 的质量。

1.5 RACE

用 1.2.1 节中所述的 RNA 提取法制备的 RNA 进行 RACE (rapid amplification of cDNA ends)实验(按试剂盒提供的方法操作),对蜈蚣草 ABC Transporter 基因进行克隆。以 RACE 结果来验证 RNA 的质量。

2 实验结果

2.1 RNA 质量的检测

首先用琼脂糖凝胶电泳检测所制备的 RNA 的质量。图 1 中 3~7 泳道为以 1.2.1 节所述的改进方法提取的不同样本的蜈蚣草 RNA。各个样本质量均一,28s rRNA 亮度高于 18s rRNA 或者与之相当,说明提取过程中没有降解现象发生。在电泳检测中看不到

表 1 不同方法提取的蜈蚣草总 RNA 的纯度及含量

Table 1 The purity and concentration of the total RNA isolated by different methods

	Improved method	Guanidinium thiocyanate	Method of TRIZOL
OD ₂₆₀	0.3061 ± 0.005	0.1124 ± 0.002	0.1004 ± 0.003
OD ₂₈₀	0.1551 ± 0.004	0.1034 ± 0.008	0.9792 ± 0.004
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.97 ± 0.01	1.09 ± 0.02	1.03 ± 0.02
Total RNA(mg RNA·g ⁻¹ FW)	453.00 ± 5.92	166.35 ± 2.96	148.591 ± 4.44

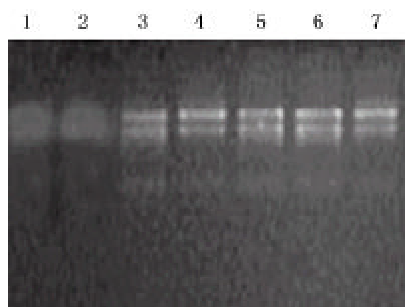


图 1 不同方法提取的蜈蚣草总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

1. 硫氰酸胍法提取的 RNA; 2. TRIZOL 法提取的 RNA; 3~7. 改进方法(如 1.2.1 节所述)提取的 RNA

Fig. 1 Agarose eletrophoresis of the total RNA isolated by different methods

1. RNA extracted by the method of guanidinium thiocyanate; 2. RNA extracted by the method of TRIZOL; 3~7. RNA extracted by the described method in 1.2.1

DNA 污染,说明 RNA 较纯净。表 1 为不同方法提取的蜈蚣草总 RNA 的纯度及含量。改进方法提取的蜈蚣草 RNA 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.97 ± 0.01, 说明 RNA 纯度较高。硫氰酸胍一步法和 TRIZOL 法提取的蜈蚣草 RNA 有凝胶状沉淀, 很难溶于水, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别为 1.09 和 1.03, 表明 RNA 不纯, 有很多杂质, 多酚多糖类去除不干净。电泳结果呈弥散状, 无明显条带(图 1 的 1 和 2 泳道), 表明 RNA 已降解。

2.2 不同方法提取的 RNA 合成的 cDNA 比较

图 2 分别是不同方法提取的 RNA 合成的 cDNA 电泳图。泳道 1 是用改进方法(如 1.2.

1 节所述)提取的 RNA 合成的 cDNA, 其大小在 0.5~2 kb 以上; 而在凝胶检测中几乎看不到用硫氰酸胍法提取的 RNA 合成的 cDNA 以及用 TRIZOL 法提取的 RNA 合成的 cDNA。说明改进方法提取的 RNA 质量高, 有较高转录活性。

2.3 改进方法提取的蜈蚣草 RNA 用于 RACE 方法克隆基因

用 1.2.1 节中所述的 RNA 提取法制备的 RNA 进行 RACE 实验, 对蜈蚣草 ABC

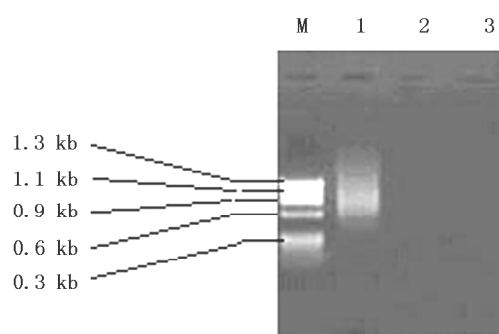


图 2 cDNA 的凝胶检测

M. Marker, Φ x174/HaeIII(1.3 kb, 1.1 kb, 0.9 kb, 0.6 kb, 0.3 kb)

1. 用改进方法(如 1.2.1 节所述)提取的 RNA 合成的 cDNA; 2. 用硫氰酸胍法提取的 RNA 合成的 cDNA; 3. 用 TRIZOL 法提取的 RNA 合成的 cDNA

Fig. 2 Agarose eletrophoresis assay of cDNA

M. Marker, Φ x174/Hae III (1.3 kb, 1.1 kb, 0.9 kb, 0.6 kb, 0.3 kb); 1. cDNA synthesized from RNA isolated by the described method in 1.2.1; 2. cDNA synthesized from RNA isolated by the method of guanidinium thiocyanate; 3. cDNA synthesized from RNA isolated by the method of TRIZOL

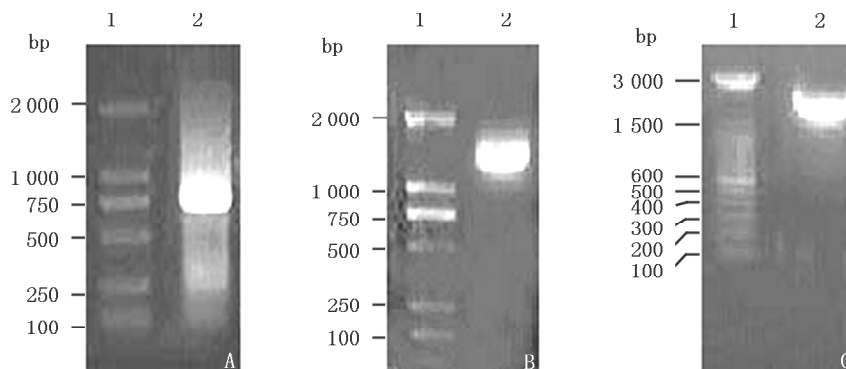


图3 RACE 实验结果

A. 3'RACE电泳结果 1. Marker DL2000; 2. 3'RACE片段, 800 bp; B. 5'RACE电泳结果 1. Marker DL2000; 2. 5'RACE片段, 1 500 bp; C. 全长基因克隆的电泳结果 1. Marker 100 bp DNA Ladder; 2. 全长基因 2 300 bp

Fig.3 The results of RACE

A. The result of 3'RACE 1. Marker DL2000; 2. The 3'cDNA fragment of gene, 800 bp; B. The result of 5'RACE 1. Marker DL2000; 2. The 5'cDNA fragment of gene, 1 500 bp; C. The result of the cloning of the full length gene 1. Marker, 100 bp DNA Ladder; 2. The full length cDNA of gene, 2 300 bp

Transporter 基因进行克隆。3'RACE 和 5'RACE 以及全长基因的克隆(图3)都取得了成功。这证明 RNA 质量较高, 可以满足 RACE 技术的要求。

3 讨论

3.1 防止酚类化合物被氧化的对策

多次实验结果表明, 硫氰酸胍提取液以及 TRIZOL 试剂不适合于蜈蚣草 RNA 的提取。因为这类强变性剂会使蕨类植物蜈蚣草细胞破碎后释放出大量的多酚和多糖。多酚类物质在酸性 pH (pH 4~6) 条件下极易氧化使匀浆液变为褐色。被氧化的多酚化合物(如醌类)能与 RNA 稳定地结合, 导致 RNA 活性丧失, 在用苯酚、氯仿抽提时会导致 RNA 的丢失, 或形成不溶性复合物(Schneider *et al.*, 1991)。

针对蜈蚣草 RNA 提取中的困难, 本改进方法提高了研磨缓冲液的 pH 值(8.3), 同时加入了还原剂二硫苏糖醇(DTT)和 β -巯基乙醇, 有效地防止了多酚类物质的氧化。在用硫氰酸胍和 TRIZOL 等方法提取蜈蚣草的

RNA 时, 会出现极为严重的褐化现象, 而应用本方法却很少发生此现象。

聚乙烯吡咯烷酮(PVP)中的 CO-N=基有很强的结合多酚化合物的能力, 本研究也曾尝试使用这种多酚的螯合剂。在 1.2.1 节中所述的 RNA 提取缓冲液中加入 PVP, 但无明显的作用。在硫氰酸胍提取液以及 TRIZOL 试剂中加入 PVP, 一定程度上可以减轻褐化效应, 但不能彻底去除这类化合物。硫氰酸胍提取液以及 TRIZOL 试剂都是酸性溶液, 而改进的提取缓冲液是碱性溶液, 这说明用 PVP 去除多酚时 pH 值可能是一个重要的影响因素。也有研究表明在 pH 8.0 以上时 PVP 结合多酚的能力会迅速降低(Loomis *et al.*, 1966)。

3.2 多糖及多酚的去除

多糖的污染是提取蜈蚣草 RNA 时遇到的另一个棘手的问题。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似, 因此很难将它们分开。在去除多糖的同时 RNA 也会被除去, 造成 RNA 产量的减少; 在沉淀 RNA 时, 产生多糖的凝胶状沉淀, 这种含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水, 或

溶解后产生黏稠状的溶液。由于多糖可以抑制许多酶的活性, 因此污染了多糖的RNA样品无法用于进一步的分子生物学研究(李宏和王新力, 1999)。

LiCl 可以选择性地沉淀 RNA, 获得的 RNA 较纯, 并能去除大部分多糖, 但实验周期较长, 沉淀 RNA 一般都需要至少 2 小时以上的冰浴。Manning(1991)曾报道多酚和多糖以及 RNA 在 2- 丁氧乙醇中有不同溶解度的特性。而各种材料中所含有的多酚和多糖种类千差万别, 具体的使用条件需要摸索。本方法利用高浓度钠盐可以沉淀多糖的特性并结合使

用 2- 丁氧乙醇来去除多酚和多糖。首先, 在高浓度钠盐条件下, 加入低浓度(1/4 体积)的 2- 丁氧乙醇来沉淀多糖。在含有 RNA 的上清液中加入高浓度的 2- 丁氧乙醇(50%)来沉淀 RNA, 同时多酚溶解于 2- 丁氧乙醇中被除去。然后再用含 50% 2- 丁氧乙醇洗涤 RNA 沉淀以去除残留的多酚。

随着更多的蕨类植物被发现在环境修复领域中具有重要用途, 蕨类植物的分子生物学研究也会不断深入。本文所报道的这种简便有效的 RNA 提取方法, 可以为今后蕨类植物的分子生物学研究提供借鉴。

参 考 文 献

- 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 黄后飞, 鲁全国, 范稚莲 (2002) 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征. *科学通报*, **47**: 207-210
- 李宏, 王新力 (1999) 植物组织 RNA 提取的难点及对策. *生物技术通报*, **1**: 36-39
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 著(金冬雁, 黎孟枫等译) (1992) 分子克隆实验指南(第 2 版). 科学出版社, 北京, 352-355
- Loomis WD, Battaile J (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, **5**: 423-438
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, **409**: 579
- Manning K (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential. *Analytical Biochemistry*, **195**: 45-50
- Raab A, Feldmann J, Meharg AA (2004) The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiology*, **134**: 1113-1122
- Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D (1991) Isolation of functional RNA from plant tissue rich in phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*, **197**: 91-95
- Sharma AD, Gill PK, Singh P (2003) RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, **314**: 319-321
- Zhang H, Chen HT, Glisina V (2003) Isolation of DNA-free RNA, DNA, and proteins by cesium trifluoroacetate centrifugation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **312**: 131-137