

# 藓类植物 RNA 提取方法研究

闫苗苗<sup>1</sup>, 魏光成<sup>1</sup>, 沙伟<sup>2\*</sup>, 吕凤香<sup>2</sup>

(1. 滨州医学院, 山东烟台 264003; 2. 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:** 根据提取 RNA 质量等方面比较了 4 种 RNA 提取方法提取东亚砂藓正常生长和干燥处理后的组织的总 RNA 的效果。结果表明改良的 SDS 法能提取高质量的 RNA。该方法还可用于紫萁藓等藓类植物 RNA 的提取。

**关键词:** 藓类; 东亚砂藓; RNA; 提取

**中图分类号:** Q94-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0329-03

## Study on extraction methods of bryophytes genomic RNA

YAN Miao-Miao<sup>1</sup>, WEI Guang-Cheng<sup>1</sup>, SHA Wei<sup>2\*</sup>, Lü Feng-Xiang<sup>2</sup>

(1. Department of Basic Medical Science, Binzhou Medical College, Yantai 264003, China; 2. Department of Biology, College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

**Abstract:** 4 methods for RNA extraction from normal and dried *Racomitrium japonicum* tissues were evaluated upon time consumption, yield and quality of RNA isolation. A modified SDS method was found to be the best one among the 4 methods evaluated. The method was found to be also suitable for extracting RNA from bryophytes such as *Grimmia pilifera* etc.

**Key words:** moss; *Racomitrium japonicum*; RNA; extraction

耐旱藓类植物强大而特别,甚至有极端的抗旱能力,使耐旱藓成为研究抗旱机理和相关基因克隆的模式植物。提取多种处理耐旱藓的高质量的总 RNA 是进行点杂交、Northern 杂交分析、RT-PCR 和 cDNA 文库构建等许多分子生物学研究的必要前提。

藓类植物 RNA 提取的难点在于藓类植物含有较多的酚类、萜类等次生化合物(吴鹏程,1998),在匀浆的过程中,酚类物质会释放出来,氧化后与 RNA 稳定的结合,形成难溶的胶状物;同时萜类化合物和 RNase 会分别造成 RNA 的化学降解和酶解。本文选用的东亚砂藓(*Racomitrium japonicum*)经干燥处理后除酚类物质大量增加外,还有大量的其它次生代谢物,使提取高质量的东亚砂藓 RNA 变得更困难。本实验针对这些难题,对现有的几种方法进行改良,并在此基础上综合比较不同方

法对不同处理东亚砂藓中 RNA 提取的效果,以期为针对不同植物材料选择 RNA 提取方法提供指导。

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 实验材料

材料为采自五大连池的东亚砂藓,选取长势较好的用蒸馏水洗净后进行培养,室温培养待其恢复生长,对其进行不同时间的自然干旱处理后,迅速保存于-80℃冰箱中。

#### 1.2 实验方法

(1) Trizol RNA 一步法:应用北京鼎国生物技术有限公司生产的植物总 RNA 提取试剂盒提取植物总 RNA。

(2) 改良 CTAB 法:取 0.5 g 材料,迅速放入-80

收稿日期: 2006-11-14 修回日期: 2007-03-16

基金项目: 黑龙江省教育厅海外学人合作项目(1151hz022)[Supported by Overseas Scholar Cooperation Project of Education Department of Heilongjiang Province (1151hz022)]

作者简介: 闫苗苗(1981-),女,山东省蓬莱市人,硕士研究生,助教,主要从事植物遗传方面的研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: shw1129@263.net)

℃冷冻研钵中并加入适量 PVP, 研成粉末; 迅速转入含有 2~6 mL 65 ℃预热的 CTAB 提取缓冲液和 120 μL β-巯基乙醇的 10 mL 离心管中, 浸提 20 min; 冷却至室温, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 4 ℃, 12 000 g, 10 min; 取上清, 再加入等量的氯仿: 异戊醇(24:1), 混匀, 4 ℃, 12 000 g, 10 min, 并重复此步骤 1~2 次; 取上清, 加 1/4 体积 10 mol/L LiCl, -20 ℃, 过夜; 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 15 min; 去上清, 沉淀用 2 mol/L LiCl 洗涤; 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 10 min; 沉淀溶于 DEPC 处理水中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇(-20 ℃预冷), -80 ℃沉淀 1 h; 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 15 min; 沉淀用 75% 乙醇清洗, 干燥, 适量 DEPC 处理水溶解, 用普通非变性琼脂糖凝胶检测其浓度、纯度和完整性(曲桂芹, 2001; 侯义龙等, 2003; Chang 等, 1993)。

(3) 改良 SDS 法(Frederick 等, 1999): 1.5 mL 的无菌离心管中加 600 μL SDS 提取液, 200 μL 水饱和酚和 40 μL β-巯基乙醇, 65 ℃预热 5 min。取 0.5 g 材料, 迅速放入-80 ℃冷冻的研钵中并加入适量的 PVP 研成粉末, 迅速分装于步骤(1)的离心管中, 混匀后放入 65 ℃水浴中浸提 15 min, 期间不时轻轻的颠倒混匀。冷却至室温, 依次加入 100 μL 3 mol/L KAc, 150 μL 无水乙醇, 混匀后加入 400 μL 氯仿混匀, 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 15 min。取上清液, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)混匀, 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 10 min; 取上清, 加 1/4 体积 10 mol/L LiCl, -20 ℃, 过夜; 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 15 min; 沉淀用 75% 乙醇清洗, 干燥, 100 μL DEPC 处理水溶解; 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇(-20 ℃预冷), -80 ℃沉淀 1 h 左右。4 ℃, 12 000 r/min, 离心 15 min。沉淀用 75% 乙醇清洗, 干燥, 适量 DEPC 处理水溶解, 用普通非变性琼脂糖凝胶检测其浓度、纯度和完整性。

上述提取过程除了浸提在 65 ℃下进行外, 其它步骤均在冰浴条件下进行。

(4) Tris-硼酸法(略): 具体参照文献(史公军, 2004; Lopez & Lim, 1992)。

### 1.3 两种藓类植物总 RNA 的纯化

提取的 RNA 中经常有核 DNA 的存在, 为了防止核 DNA 干扰随后的 cDNA 扩增, 必须对其进行 DNaseI 处理, 彻底除去 RNA 中的 DNA。程序如下: (1) 将下列成分混合, 37 ℃水浴 30 min; RNA: 约 50~80 μg; DNaseI (10 U/μL): 2 μL; 10× buff-

er: 10 μL; 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>: 4 μL; RNase inhibitor (40 U/μL): 0.5 μL; 加水补足 100 μL; (2) 加等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 混匀, 立即放冰上 10 min; 4 ℃, 12 000 g, 10 min; (3) 取上清, 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 2 倍体积无水乙醇, -70 ℃ 1 h; 4 ℃, 12 000 g, 5 min; (4) 去掉上清液, 75% 乙醇洗沉淀, 晾干, 适量的 DEPC 处理水溶解, 用普通非变性琼脂糖凝胶检测纯度、浓度和完整性, -20 ℃保存。

### 1.4 反转录和 RT-PCR 实验

在 cDNA 第一链的合成过程中, 本实验用了 M-MLV 反转录酶来自于鼠源, 所用的锚定引物为 T13A。具体步骤按试剂盒说明提示的方法进行, 但转录时间由 30 min 增加到 2 h。然后用不同方法提取的总 RNA 为模板合成 cDNA, 利用相同锚定引物, 随机引物 (HAP28 AAGCTTACGATGC) 和 Taq 酶等进行 PCR 反应, 通过合成的片段数量间接检测所提取的总 RNA 质量。

## 2 实验结果分析

### 2.1 RNA 质量分析

Trizol 试剂一步法是一种常用总 RNA 提取方法, 由于它的简便、快捷(整个提取过程在两小时内完成), 已经成为许多实验室常用的方法, 并已成功从动物组织、人体组织和许多植物(如小麦)组织、细胞中获得了高质量的总 RNA。我们用 Trizol 试剂分别提取正常生长的以及自然干燥的东亚砂藓的总 RNA。但不论是正常生长的还是自然干燥的, Gene Spec 检测和琼脂糖凝胶电泳检测结果都很不理想。Gene Spec 检测的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.0 左右。琼脂糖凝胶检测, EB 染色根本检测不到。因此, Trizol 一步法不适合东亚砂藓总 RNA 的提取。

相比于 Trizol 试剂一步法, 改良 CTAB 提取法、改良 SDS 提取法和 Tris-硼酸提取法都提出了总 RNA, 但提取的效果相差较大。Tris-硼酸提取法提取的总 RNA 电泳检测时降解严重。用改良 CTAB 提取法和改良 SDS 提取法提取的总 RNA, Gene Spec 检测的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.8 以上。但改良 CTAB 提取法虽然提取的总 RNA, 在 EB 染色的琼脂糖凝胶检测时发现, 提取的总 RNA 中有较多的 DNA, 为后续实验中 DNA 的去除带来了不便。改良 SDS 提取法提取的总 RNA, 不但 Gene Spec 检测的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值在 1.8 以上, 而且 EB 染色的

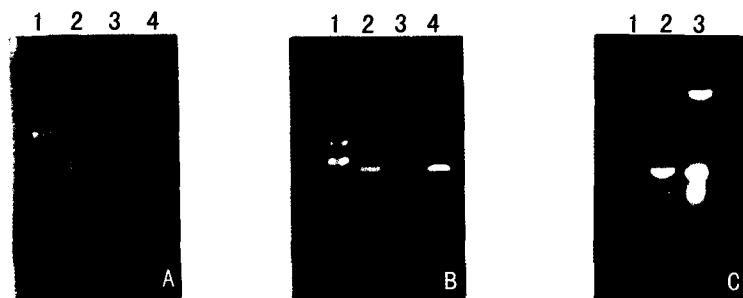


图 1 不同提取法提取的东亚砂藓总 RNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of *Racomitrium japonicum* total RNA isolated by different methods

A. Tris-硼酸提取法(1,2 泳道为正常生长条件下的; 3,4 泳道为干燥处理 3 d 和 5 d 的); B. 改良 SDS 法(1 泳道为 Marker; 2 泳道是正常生长条件下的; 3,4 泳道为干燥处理 3 d 和 5 d); C. 改良 CTAB 法(2 泳道为正常生长条件下的; 1,3 泳道为干燥处理 3 d 和 5 d 的)。

A. Tris-method(Lane 1,2; Normal; Lane 3,4; dried 3 d and dried 5 d); B. Modified SDS(Lane 1; Marker; Lane 2; Normal; Lane 3,4; dried 3 d and dried 5 d); C. Modified CTAB(Lane 2; Normal; Lane 1,3; dried 3 d and dried 5 d)。

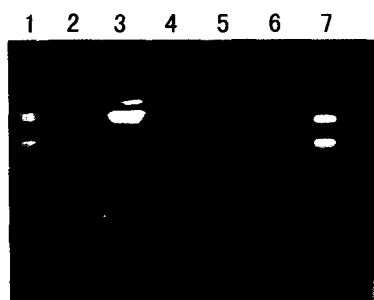


图 2 DNaseI 消化后的 RNA(1 泳道为干燥处理 5 d 的; 3 泳道为 Marker; 7 泳道为正常生长条件下的)

Fig. 2 RNA digested by DNaseI(Lane 1; dried 5 d; Lane 3; Marker; Lane 7; Normal)

琼脂糖凝胶检测时可以看出 DNA 的含量相对较低,而且 RNA 两条带都较为清晰且无降解。

## 2.2 RNA 纯化

从图 1 看出,改良 SDS 提取法提取的总 RNA 有较好的 28S 和 18S 两条带,基本上保证了 cDNA 的完整性,各组 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7 以上,表明 RNA 质量已达到要求。但从图中也可看出,提取的 RNA 中混有一定量的 DNA,为了后续实验的顺利进行,需进行 RNA 纯化,即用 DNaseI 去除 RNA 中的 DNA。

从图 2 看出,去除 DNA 后的用品仍保留了两条 RNA 带,基本上无降解。在去除 DNA 的同时,进一步用氯仿抽提掺杂在 RNA 中的蛋白质。此外,用 75% 的乙醇洗几次沉淀,可以减少其它杂质的含量。去除 DNA 的过程都有不同程度的 RNA 损失,反转录时将模板浓度调到相同,以便后续实验的顺利进行。

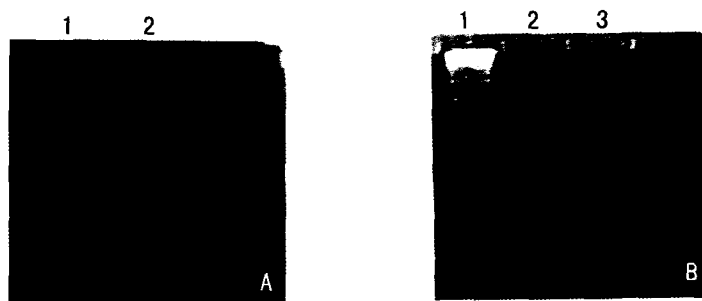


图 3 RT-PCR 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of RT-PCR

A. 改良 SDS 法(1 泳道为正常生长条件下; 2 泳道为 Marker); B. 改良 CTAB(1 泳道为正常生长条件下; 3 泳道为 Marker)。

A. Modified SDS (Lane 1; Normal; Lane 2; Marker); B. Modified CTAB (Lane 1; Normal; Lane 3; Marker)。

## 2.3 cDNA 第一链的合成

cDNA 第一链的合成按照试剂盒中的说明操作。

本实验中用的 M-MLV 反转录酶来自于鼠源,该酶的  
(下转第 294 页 Continue on page 294)

2006. 'illici folius' syn. nov. Type: China (中国): Longhai (龙海), Fujian (福建), May 31, 1984, R. T. Zhang (张尧挺) 707 (holotype, AU!)

Specimens examined:

China, Fujian (福建): Longhai (龙海), H. B. Chen (陈恒彬) 24 (paratype of *A. xiamenensis*, AU); ibid, R. T. Zhang (张尧挺) 708 (paratype of *A. xiamenensis*, AU); ibid, X. L. Hou & W. Q. Wang (侯学良和王文卿) 9294 (AU); ibid, P. Lin (林鹏) 8008 (AU); Yunxiao (云霄), 276—6 1160 (PE); ibid, R. T. Zhang (张尧挺) 1746 (AU); ibid, Z. X. Lin 55 (AU); ibid, P. Lin (林鹏) 8001 (AU). Zhangpu (漳浦), H. B. Chen (陈恒彬) 21 (paratype of *A. xiamenensis*, AU). Guangdong (广东): Dongguan (东莞), Z. F. Wei (卫兆芬) 122075 (PE); Longfeng (隆丰), Z. F. Wei (卫兆芬) 121180 (PE); Gao-dian (高店), M. X. Huang (黄茂先) 110203 (PE); Pak. Shaan Village, Honam, F. A. McIure 1657 (PE); Yangjiang (阳江), anonymous 490 (PE). Guangxi (广西): Fangcheng (防城), Hepu Exped. of the Chinese Academy of Sciences (中国科学院合浦调查队) 2575 (PE); Dongxing (东兴), Hepu Exped. of the Chinese Academy of Sciences (中国科学院合浦调查队) 2337 (PE). Hainan (海南): Haikou (海口), X. L. Hou & W.

Q. Wang (侯学良和王文卿) 994 (AU); Wenchnag (文昌), X. L. Hou & W. Q. Wang (侯学良和王文卿) 9100 (AU), 9101 (AU). Hong kong (香港): New Territory, Y. Tsiang (蒋英) 169 (PE); S. Y. Hu (胡秀英) 12782 (PE), 13544 (PE).

致谢 在标本查阅和野外调查中得到中国科学院植物标本馆和海南东寨港国家级自然保护区的支持和帮助,深表谢意。

## 参考文献:

- 胡嘉琪. 2002. 老虎筋属 [M] // 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 70 卷). 北京: 科学出版社: 44—48
- Deng YF (邓云飞), Xia NH (夏念和), Chen HB (陈恒彬). 2006. A new combination in Chinese *Acanthus* (Acanthaceae) (中国爵床科老鼠筋属一新组合) [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 14(6): 530—531
- Lin P, Fu Q. 2000. Environmental Ecology and Economic Utilian-tion of Mangroves in China [M]. Beijing & Verlag Berlin Heidelberg: China Higher Education Press & Springer: 1—109
- Tomlinson P B. 1986. The Botany of Mangroves [M]. Cambridge: Cambridge University Press: 67—375
- Wang BS, Liang SC, Zhang WY, et al. 2003. Mangrove flora of the world [J]. *Acta Bot Sin*, 45(6): 644—653
- Zhang RT (张尧挺). 1985. A new species of *Acanthus* Linn. from Fujian (Family Acanthaceae) (福建老鼠筋属植物 (爵床科) 一新种) [J]. *Wuyi Sci J (武夷科学)*, 5: 237—239

.....

(上接第 331 页 Continue from page 331)

特点是转录过程中转录比较稳定,得到的 cDNA 片段比较完整,但是转录结合性能弱,因此在实验过程中将反应时间由 1 h 增加到 3 h,得到了很好的结果。

## 2.4 RT-PCR

在相同的条件下四种方法中的 Trizol RNA 一步法和 Tris-硼酸法提取的 RNA 进行 PT-PCR,没有看到条带,而剩下的两种方法进行 RT-PCR,结果如图 3 所示,用 SDS 法提取的 RNA 在琼脂糖凝胶上得到了较为清晰的 7 条带,而 CTAB 法得到了 2 条带。

综上所述,本研究的 4 种 RNA 提取方法中,总体而言以改良的 SDS 法最优。我们用该方法还成功地提取了紫萼藓、塔藓等藓类植物的总 RNA。

## 参考文献:

- 吴鹏程. 1998. 苔藓植物生物学 [M]. 北京: 科学出版社: 171—177
- Chang SJ, Puryear J, et al. 1993. A simple and efficient method

for isolating RNA from pine tree [J]. *Plant Mol Biol Report*, 11(2): 113—116

Frederick M, Ausubel, Roger Brent, et al. (Yan ZH, Wang HL translation). 1999. Short protocols in molecular biology [M]. Peking: science Press: 120—130

Hou YL (侯义龙), Cao T (曹同), Cai LN (蔡丽娜), et al. 2003. Study on extraction methods of bryophytes genomic DNA (苔藓植物 DNA 提取方法研究) [J]. *Guihaia (广西植物)*, 23(5): 425—428

Lpez Gmez R, Lim MA. 1992. A method for extracting RNA with modified Gomez method [J]. *Hortscience*, 27: 440—442

Qu GQ (曲桂芹). 2001. Study on molecular ecology of heat shock response in *Betula platyphylla* (白桦热激反应的分子生态学) [D]. Doctoral dissertation (博士学位论文)

Shi GJ (史公军), Hou XL (侯喜林), Yi JX (易金鑫). 2004. RNA isolation and analysis from anthers of non-heading Chinese Cabbage (白花菜药组织总 RNA 提取方法比较及其分析) [J]. *Acta Agric Boreal-Occident Sin (西北农业学报)*, 13(3): 97—99