

蒙古沙冬青总 RNA 提取与 mRNA 分离方法的研究

林清芳, 王存芳, 赵欢欢, 刘佳杰, 王茅雁
(内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 蒙古沙冬青是分布于我国西北荒漠区的常绿旱生阔叶灌木, 因其富含多糖和多酚等次生代谢物质, 用常规 RNA 提取方法难以从中获得高质量总 RNA。本研究通过在热酚法的 RNA 提取液中加入高浓度的 KAc 和 β -巯基乙醇, 从该植物的不同样品中提取到高质量总 RNA, 并用筛选到的合适试剂盒分离到高纯度的 mRNA。所得到的总 RNA 和 mRNA 已被成功应用于基因克隆和 SMART 全长 cDNA 文库的构建。

关键词: 蒙古沙冬青; 总 RNA 提取; mRNA 分离

Methods for Total RNA Extraction and mRNA isolation from *Ammopiptanthus mongolicus*

LIN Qing-fang, WANG Cun-fang, ZHAO Huan-huan, LIU Jia-jie, WANG Mao-yan
(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract: *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.) is an evergreen broad-leaf shrub in the northwest desert of China. Because of the high content in polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolites, it is difficult to extract high-quality total RNA from the plant with conventional methods. In this research, by adding high concentration of potassium acetate and β -mercaptoethanol into the extraction buffer of Hot Phenol Method, we successfully extracted high-quality total RNA from different samples of the plant. We also obtained high-purity mRNA with suitable mRNA isolation kit. Both the total RNA and mRNA have been successfully applied to gene cloning and SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) cDNA library construction.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.) Cheng f.; Total RNA extraction; mRNA isolation

获得完整、高纯度的总 RNA 和 mRNA 对于构建全长 cDNA 文库, 进行基因克隆和体外翻译等分子生物学实验至关重要。蒙古沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.) Cheng f.] 是主要分布于内蒙古西部、宁夏和甘肃荒漠区的唯一常绿阔叶灌木, 具有很强的抗寒、抗旱和耐盐碱特性^[1-3]。近几年来, 随着基因克隆技术的日趋成熟和广泛应用, 对其抗逆基因的克隆和研究已成为不少研究者关注的课题, 但因该植物属于旱生灌木, 体内多糖、酚类和其他次生代谢物质含量较高, 使 RNA 的提取和纯化较为困难, 有时甚至得不到 RNA。针对这一问题,

有人将常规 RNA 提取方法做了改进, 使所提 RNA 在得率和质量上有了明显改善^[4-5]。但经实践发现, 这些方法对于来自冬季植株样品 RNA 的提取效果较好, 而对于夏季植株的样品仍存在多糖等干扰严重、RNA 纯度不高和得率低的问题。本研究在参照前人方法^[4-8]和反复试验的基础上, 将热酚法^[9]加以改进, 建立了一种适合于蒙古沙冬青不同样品总 RNA 提取的方法。用该方法提取的总 RNA 具有完整性好、纯度高及可进行大量提取等优点。此外, 还筛选到纯度和得率都比较理想的 mRNA 分离试剂盒。

收稿日期: 2010-05-28 修回日期: 2010-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960158); 内蒙古科技计划项目 (K32227); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009zx08009-019B)

作者简介: 林清芳, 在读硕士, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: wokeyi1234@163.com

通讯作者: 王茅雁, 博士, 教授, 研究方向为植物抗逆分子生物学。E-mail: wangmaoyan@163.com

1 材料与方 法

1.1 植物材料

为夏、秋、冬季采自塑料大棚内栽培 1.5~2 年的蒙古沙冬青幼叶及其室内培养 4 个月、在 25℃ 干燥 48h 和 4℃ 低温处理 48h 的幼苗。采样后立即投入液氮中速冻,然后在 -76℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与纯化

器皿和用具的处理及试剂的配制均按照分子克隆实验指南(第三版)^[10]方法进行。

总 RNA 的提取采用周春娥等^[4]从木本植物老根老叶中提取总 RNA 的方法、朱昀等^[8]从富含多糖的玉米幼穗中提取总 RNA 的方法以及本研究改进的热酚法和 Trizol 法(在 Trizol 试剂中加 2% β-巯基乙醇)。

改进的热酚法以经典热酚法^[9]为基础,在 10ml RNA 抽提液中含 DEPC 处理水 2.01ml、1mol/L Tris·HCl (pH9.0) 0.33ml、4mol/L NaCl 0.16ml、10% SDS 1.30ml、5 mol/L KAc (pH6.5) 2.5ml、水饱和酚 (pH5.2) 3.50ml、β-巯基乙醇 0.2ml,在研样前由母液或原液现配现用,65℃ 水浴预热。具体操作步骤是:(1)取 -76℃ 保存的蒙古沙冬青叶片 2g,置研钵中加液氮研磨成粉末并转入 50ml 离心管中;(2)加入已预热到 65℃ 的 RNA 提取液 10ml,剧烈摇动 10min,置冰上 10min;(3)加入氯仿 4ml,摇动 10min,在 4℃、4500 r/min 离心 20min;(4)取上清液于新的 50ml 离心管中,加入等体积氯仿,摇动 10min,于 4℃、4500r/min 离心 15min,此步骤重复 2 次;(5)取上清液于新的 50ml 离心管中,加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl,混匀,于 4℃ 放置 8h 左右沉淀 RNA;(6)在 4℃、12000r/min 离心 20min,小心倒掉上清液;(7)将 RNA 沉淀转移到 1.5ml 离心管中,用 1ml 75% 乙醇和无水乙醇各漂洗 1 次,每次在 4℃、12000r/min 离心 5min,弃上清液,留沉淀;(8)吹干沉淀,加 100μl DEPC 处理水溶解。取 0.5μl RNA 溶液在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

其他 3 种方法除 Trizol 法将体积和所用样品量缩小为改进热酚法的 1/4 外,其余 2 种方法所用样品量、RNA 抽提液及溶解 RNA 沉淀所用 DEPC 处理水的量和电泳检测的上样量都与改进的热酚法相同。

总 RNA 的纯化:(1)在 RNA 溶液中加入 RNasin 1μl、10 × RNase-free DNase buffer 15μl、RQ1 RNase-

Free DNase (Promega) 2 μl、DEPC 处理水 32.5μl,混匀,置 37℃ 水浴中 30min,去除 DNA 污染;(2)用等体积的水饱和酚与氯仿(1:1)和氯仿各抽提 1 次,每次摇动 10min,在 4℃、12000 r/min 离心 10min,取上清液于新的 1.5ml 离心管中;(3)加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH5.2) 和 3 倍体积的无水乙醇,混匀,于 -76℃ 过夜沉淀 RNA;(4)在 4℃、12000 r/min 离心 20min,弃上清液,留沉淀;(5)用 75% 乙醇和无水乙醇漂洗沉淀各 1 次,每次在 4℃、12000 r/min 离心 5 min,弃上清液,留沉淀;(6)吹干沉淀,加 30~50μl DEPC 处理水溶解。用紫外分光光度法检测样品纯度。RNA 溶液于 -76℃ 保存。

1.2.2 mRNA 的分离

将总 RNA 用 QIAGEN 公司 Oligotex mRNA Mini Kit (12) (Cat no. 70022) 和 Promega 公司 PolyAtract[®] mRNA Isolation System III (15) (Cat no. Z5300) 分离 mRNA,具体操作按照试剂盒说明进行。

1.2.3 总 RNA 质量的验证

以总 RNA 作模板,用 Promega 公司 M-MLV 逆转录酶催化合成 cDNA。根据 GenBank 数据库中已公布的沙冬青脱水素基因编码区两侧非翻译区序列设计引物。

正向引物为 5'-TATCTAGATACATAATGGCACACATTCAGAGT-3',反向引物为 5'-TACCCGGGTC-TATACGTCGCGGTG-3',进行 RT-PCR。25μl PCR 体系中含 10 × PCR buffer 2.5μl、10mmol/L dNTP mix 0.75μl、正向与反向引物 (10μmol/L) 各 0.75μl、cDNA 模板 1μl、Taq 酶 (5U/μl) 0.25μl、ddH₂O 19μl。PCR 扩增程序为 94℃ 3min;94℃ 30s、60℃ 30s、72℃ 45s,30 个循环;72℃ 7min;4℃ 保温。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳和回收,然后与 pMD19-T 载体连接并转化大肠杆菌,挑选阳性克隆由北京三博公司测序。

2 结果与分析

2.1 用不同方法对总 RNA 的提取效果

电泳结果(图 1)显示,用改进的热酚法所提总 RNA(泳道 1)条带清晰明亮,表明其完整性好、得率高;用改进的 Trizol 法所提 RNA(泳道 3)条带清晰但亮度中等,表明其完整性好但得率不高;用其他 2 种方法提取的 RNA(泳道 2 和 4)完整性尚可,但得率较低,其中泳道 4 还可见明显的基因组 DNA 条带,其 RNA 沉淀在溶解时略呈胶质状,表明也有多糖污染。纯化后泳道 1、2、3、4 所对应的 RNA 样品

OD_{260/280} 依次为 1.98、2.07、2.11 和 1.98, OD_{260/230} 依次为 2.03、1.98、2.25 和 2.46, 表明其纯度均比较高, 彼此间无明显差异。综合 RNA 的完整性、得率和纯度而言, 4 种方法以改进的热酚法较适于蒙古沙冬青幼叶总 RNA 的提取。

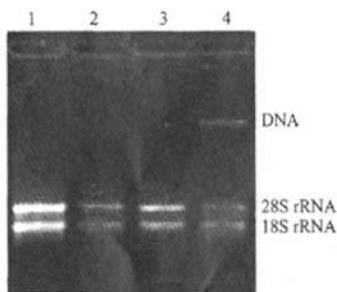


图 1 4 种 RNA 提取方法的比较

Fig. 1 Comparation of 4 RNA isolation methods

1-4: 依次为改进的热酚法、朱韵法、改进的 Trizol 法和周春娥法

1-4: Showed the improved Hot Phenol Method, Zhu Yun's method, the improved Trizol method and Zhou Chun'e's method, respectively

2.2 用改进的热酚法对不同样品总 RNA 的提取

电泳检测(图 2)表明, 5 种样品的总 RNA 条带清晰, 加样孔和泳道中均无杂质残留。其纯化样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 分别为 1.88~2.07 和 1.95~2.36。进一步表明, 改进的热酚法适用于蒙古沙冬青不同样品总 RNA 的提取, 用该方法提取的总 RNA 无降解、纯度较高, 可用于后续试验。

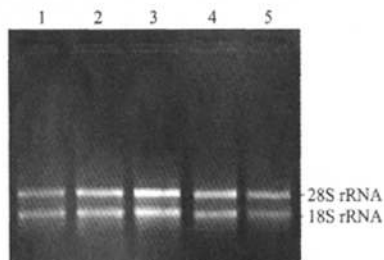


图 2 用改进的热酚法所提不同样品总 RNA 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of total RNAs extracted from different samples using the modified Hot Phenol Method

1-5: 依次为塑料大棚内栽培的蒙古沙冬青夏、秋、冬季幼叶及分别经干燥和低温处理的室内培养幼苗总 RNA

1-5: Showed the total RNAs from young leaves of *Ammopiptanthus mongolicus* cultivated in plastic shed in summer, autumn and winter and from its young seedlings cultivated indoor and treated under desiccative and cold conditions, respectively

2.3 mRNA 的分离

将用改进的热酚法所提总 RNA, 首先用 QIAGEN 公司的 mRNA 分离试剂盒分离 mRNA, 结果经

多次试验发现分离产物中均有明显的 rRNA 条带(图 3), 表明其纯度不高, 故又选择 Promega 公司的 mRNA 分离试剂盒进行试验, 结果获得了纯度高、大小分布在 500~3000bp 的 mRNA(图 3), 表明后者较适合于蒙古沙冬青 mRNA 的分离。

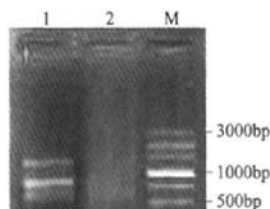


图 3 mRNA 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis patterns of mRNA

1, 2: 分别为用 QIAGEN 公司和 Promega 公司试剂盒分离的 mRNA; M: DL3000 DNA Marker

1, 2: Showed the purified mRNAs using the Kits of QIAGEN and Promega companies, respectively; M: DL3000 DNA Marker

2.4 总 RNA 质量的验证

用改进的热酚法所提总 RNA 作模板合成 cDNA, 用沙冬青脱水素基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 获得预期 700bp 的扩增片断(图 4)。将该片断进行克隆和测序, 证明其确实为目的基因的编码框 cDNA, 也进一步证明用改进的热酚法提取的总 RNA 序列完整无降解, 可用于后续分子生物学试验。

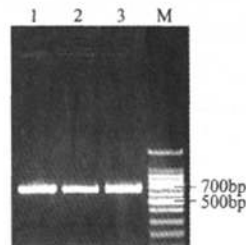


图 4 沙冬青脱水素基因的 RT-PCR 产物

Fig. 4 RT-PCR products of *Ammopiptanthus mongolicus* dehydrin gene

1-3: 分别为夏、秋、冬季幼叶样品的 RT-PCR 产物; M: 100bp DNA ladder

1-3: RT-PCR products of summer, autumn and winter samples respectively; M: 100bp DNA ladder

3 讨论

沙冬青属于旱生豆科小灌木, 根据文献报道其酚类、多糖和黄酮类等次生代谢物质含量较高^[11-12], 会影响其 RNA 的提取。所以, 本研究最初尝试用木本植物老根老叶 RNA 提取方法^[4]和富含多糖的玉米幼穗总 RNA 提取方法^[8]对其总 RNA 进

行了提取。结果用第 1 种方法提取的部分样品(尤其夏季嫩叶)总 RNA 沉淀呈透明浅黄色凝胶状,虽然沉淀量较多但水溶性较差,导致 RNA 得率不高且在电泳图谱中可见明显的基因组 DNA 污染(如图 1 泳道 4)。推测可能与夏季嫩叶生长旺盛,多糖和次生代谢物质含量高而不易去除有关。第 2 种方法是在经典酚法的 RNA 提取液中增加了 KAc 以去除多糖,用此方法得到的 RNA 提取液及其沉淀呈浅褐色且得率低(如图 1 泳道 2),表明有酚类物质干扰^[6,13]。这 2 种方法都不适用于蒙古沙冬青嫩叶,尤其是夏季嫩叶总 RNA 的提取。

Trizol 法因操作简单而得到广泛应用。本研究通过在 Trizol 试剂中增加 β -巯基乙醇而抑制了酚类物质的干扰^[6,13],但可能因为多糖等物质未能有效去除,使得 RNA 提取量依然不高(如图 1 泳道 3),故该方法也不能满足对高质量蒙古沙冬青总 RNA 提取的要求。

热酚法的优点是适用于大量提取且 RNA 纯度较高,可在乙醇中长期保存而不降解。本研究针对蒙古沙冬青的特点对其主要加以 2 点改进:一是在提取液中增加了 2% 的 β -巯基乙醇,以抑制多酚氧化酶的活性而排除酚类物质干扰^[6,13];二是在提取液中加入 1.25 mol/L KAc,以去除多糖污染^[6,13-14]。对于 β -巯基乙醇的用量和 KAc 的浓度及 pH 值无需十分精确,如果是冬季嫩叶和低温驯化的幼苗,二者浓度均可减少,KAc 母液的 pH 值可调在 4.8 ~ 6.5。此方法适用于蒙古沙冬青不同季节嫩叶和不同胁迫处理幼苗总 RNA 的提取,不仅得率高、完整性好,而且多糖、酚类和蛋白质等基本去除干净,已成功应用于蒙古沙冬青 SMART 全长 cDNA 文库的

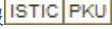
构建(另有全文发表)和基因扩增。

在构建全长 cDNA 文库时需要高质量的 mRNA 作模板。本试验所用 Promega 公司的 mRNA 分离试剂盒(磁珠法)比 QIAGEN 公司的 mRNA 分离试剂盒(纤维素柱)更能有效地去除 rRNA,使 mRNA 纯度更高。另外,前者价格也较便宜,至少在分离沙冬青 mRNA 时不失为一种较理想的选择。

参考文献

- [1] Cheng S H. *Ammopiptanthus* Cheng f. A new genus of Leguminosae from central Asia [J]. *J Bot, USSR*, 1959, 44: 1381-1386
- [2] 李慧卿, 马文元, 李慧勇. 沙冬青抗逆性及开发利用前景分析研究[J]. *世界林业研究*, 2000, 13: 67-71
- [3] 王华, 贾桂霞, 丁琼. 沙冬青抗逆性研究进展与应用前景[J]. *中国农学通报*, 2005, 21: 121-125
- [4] 周春娥, 段红英, 齐力旺. 木本植物老根老叶总 RNA 的提取方法[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(22): 1831-1832
- [5] 王丹丹, 尹伟伦, 夏新莉. 沙冬青 cDNA-AFLP 体系的建立及引物筛选[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(24): 446-449
- [6] 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
- [7] 杜中军, 徐兵强, 黄俊生, 等. 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 202-205
- [8] 朱昫, 王猛, 贾志伟, 等. 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法[J]. *植物学通报*, 2007, 24(5): 624-628
- [9] 王茅雁. 玉米类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 ZmCBL1 与 ZmCBL4 基因的克隆与功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2007
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *分子克隆实验指南(第三版)*[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Selenge D, Batsuren D, Batriov E Kh, et al. Chemistry study of the flora of mongolic isoflavones of *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. *Khim Prirodn Soedin*, 1986, 2: 242
- [12] 田晓明, 陈世忠, 屠鹏飞, 等. 沙冬青地上部分的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(19): 10
- [13] 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
- [14] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, 12: 198-203, 212-215
- [15] (上接第 459 页)
- [10] 陈荣敏. 普通小麦 Myb 和 Dof 转录因子家族基因的克隆和表达研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [11] 向琦, 曹家树, 叶纹芝, 等. 白菜 OguCMS 相关 MYB 家族新基因 BcMYBogu 的克隆与特征分析[J]. *遗传*, 2007, 29(5): 621-628
- [12] 乔孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用[J]. *生命科学*, 2009, 21(1): 145-150
- [13] Robin D M, Lan T T, Michael B P, et al. The Wound-, Pathogen-, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(2): 924-941
- [14] Mehrrens F, Kranz H, Bednarek P, et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 1083-1096
- [15] Butelli E, Hill L, Parr A, et al. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol [J]. *Plant J*, 2008, 56(2): 316-326
- [16] Akagi T, Ikegami A, Tsujimoto T, et al. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(4): 2028-2045
- [17] Kranz H D, Denekamp M, Greco R, et al. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(2): 263-276
- [18] Zhu J K, Verma P E, Zheng X W, et al. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9966-9971
- [19] Kirik V, Kölle K, Wohlfarth T, et al. Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the Arabidopsis inflorescence [J]. *Plant J*, 1998, 13(6): 729-742
- [20] Vaillau F, Daniel X, Tronchet M, et al. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 10179-10184

蒙古沙冬青总RNA提取与mRNA分离方法的研究

作者: [林清芳](#), [王存芳](#), [赵欢欢](#), [刘佳杰](#), [王茅雁](#), [LIN Qing-fang](#), [WANG Cun-fang](#),
[ZHAO Huan-huan](#), [LIU Jia-jie](#), [WANG Mao-yan](#)
作者单位: [内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特, 010018](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) 
英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)
年, 卷(期): 2011, 12(3)

参考文献(14条)

1. [Ainsworth C](#) [Isolation of RNA from floral tissue of Rumex acetosa \(sorrel\)](#) [外文期刊] 1994
2. [王玉成](#); [杨传平](#); [姜静](#) [木本植物组织总RNA提取的要点与原理](#) 2002(02)
3. [田晓明](#); [陈世忠](#); [屠鹏飞](#) [沙冬青地上部分的化学成分研究](#) 2008(19)
4. [Selenge D](#); [Batsuren D](#); [Batriov E Kh](#) [Chemistry study of the flora of mongolicus isoflavones of Ammopiptanthus mongolicus](#) 1986
5. [Sambrook J](#); [Lasel D W](#); [黄培堂](#) [分子克隆实验指南](#) 2002
6. [王茅雁](#) [玉米类钙调磷酸酶B亚基蛋白ZmCBL1与zmCBL4基因的克隆与功能分析](#) 2007
7. [朱昀](#); [王猛](#); [贾志伟](#) [一种从富含多糖的玉米幼穗中提取RNA的方法](#) 2007(05)
8. [杜中军](#); [徐兵强](#); [黄俊生](#) [一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总RNA提取方法](#) 2005(02)
9. [李宏](#); [王新力](#) [植物组织RNA提取的难点及对策](#) 1999(01)
10. [王丹丹](#); [尹伟伦](#); [夏新莉](#) [沙冬青cDNA-AFLP体系的建立及引物筛选](#) 2009(24)
11. [周春娥](#); [段红英](#); [齐力旺](#) [木本植物老根老叶总RNA的提取方法](#) 2007(22)
12. [王华](#); [贾桂霞](#); [丁琼](#) [沙冬青抗逆性研究进展与应用前景](#) 2005
13. [李慧卿](#); [马文元](#); [李慧勇](#) [沙冬青抗逆性及开发利用前景分析研究](#) 2000
14. [Cheng S H](#) [Ammopiptanthus Cheng f. A new genus of Leguminome from central Asia](#) 1959

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201103021.aspx