

用改良 CsCl 密度梯度离心法提取石蒜叶片和鳞茎总 RNA

江玉梅, 汪仁, 束晓春, 佟金凤, 彭峰, 夏冰^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

Total RNA extracted from leaf and bulb of *Lycoris radiata* by an improved method of CsCl density gradient centrifugation JIANG Yu-mei, WANG Ren, SHU Xiao-chun, TONG Jin-feng, PENG Feng, XIA Bing^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(3): 78-80

Abstract: The total RNA is extracted from leaf and bulb of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. by an improved method of CsCl density gradient centrifugation. The suitable amount of initial sample is 1.0 g. In order to remove impurities and purify the total RNA, the crude extract of RNA dissolved in lysis buffer is extracted with the mixed solution of chloroform and isoamyl alcohol (V: V, 24: 1), then the total RNA is precipitated. The purity, integrity and quality of the total RNA are detected by ultraviolet spectrophotometer, agarose gel electrophoresis and RT-PCR method, respectively. The results show that polysaccharide can be removed effectively from the total RNA extract by the improved method of CsCl density gradient centrifugation. The purity and integrity of the total RNA of *L. radiata* are better, and the ratio of A_{260}/A_{280} is 1.85-2.00. It is concluded that the total RNA of *L. radiata* bulb extracted by the improved method can satisfy the demand of molecular biology experiments.

关键词: 石蒜; RNA; CsCl 密度梯度离心法; RT-PCR

Key words: *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.; RNA; CsCl density gradient centrifugation; RT-PCR

中图分类号: Q946-33; Q522 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)03-0078-03

石蒜 [*Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.] 是重要的药用植物, 其次生代谢产物加兰他敏 (galantamine) 在临床上的应用非常广泛, 是治疗阿尔茨海默氏病的首选药物之一^[1]。尽管有关加兰他敏化学合成途径已有许多报道, 但由于纯化学合成的成本太高, 目前仅限于实验室合成, 尚不能用于工业化生产^[2]。提高石蒜本身的加兰他敏含量是获得加兰他敏最为经济和环保的方法。因此, 研究加兰他敏生物合成的分子机制对于提高其含量具有重要意义。

植物次生代谢是一系列基因表达和内外环境因子相互作用的过程。对植物次生代谢分子机制的研究有利于对其生长发育进行调控, 以满足人类的需求。探讨植物次生代谢的分子机制, 必须以功能基因的分离、表达和调控为基础。目前, 相关的技术手段已经成熟, 如利用差异显示进行基因克隆、建立缩减文库分离基因以及基因芯片等, 但这些分子生物学技术都要以获得完整的高质量 RNA 为前提。

石蒜, 尤其是石蒜鳞茎富含多糖类物质, 用一般的方法很难获得高质量 RNA, 因此, 迄今未见成功提取石蒜总 RNA 的报道。很多研究者尝试采用不同的方法从含多糖的植物组织中提取 RNA。Glisin 等^[3]通过 CsCl 密度梯度离心法分离得到 RNA, 该方法利用各成分在 CsCl 梯度液中的密度差异, 有效分离 RNA、DNA 与蛋白和多糖等大分子。其后, 尽管不断有新试剂和新方法用于 RNA 分离, 但对于多糖含量较高的植物 RNA 的分离仍然比较棘手。细胞破碎后, 多糖与提取 RNA 所用的变性剂形成难溶的胶状物, 并与 RNA 共

同沉淀, 而且多糖对许多酶的活性有抑制作用, 不利于后续的生物分子生物学实验^[4]。有研究者用氯化锂选择性沉淀 RNA^[5-7]和醋酸钾沉淀多糖^[7]等改进方法从富含多糖的植物组织中提取 RNA, 但这些改进方法并不能完全克服多糖的影响, 所提取的 RNA 中仍混杂有一定量的多糖^[8]。

在石蒜鳞茎总 RNA 提取过程中, 作者预先采用醋酸钾和氯化锂等方法去除多糖干扰^[5-7], 但 RNA 的提取效果欠佳, 进而改用 CsCl 密度梯度离心法提取石蒜叶片和鳞茎 RNA, 并针对石蒜鳞茎富含多糖的特点, 对该提取方法加以改进, 利用改进的 CsCl 密度梯度离心法能够获得质量较好的 RNA, 可满足后续 RT-PCR 实验的需要。该方法也适用于其他多糖含量高的植物 RNA 的提取。

1 材料和方法

1.1 材料

供试石蒜 [*Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.] 均栽培于江苏省·中国科学院植物研究所内, 2月份采集鳞茎, 10月份

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700057); 江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金项目(KF07001)

作者简介: 江玉梅(1979-), 女, 江苏南通人, 硕士, 研究实习员, 主要从事植物分子生物学研究。

^① 通讯作者 E-mail: bingxia@mail.cnbg.net

新叶萌发时采集叶片。另取发芽 2 周的水稻 (*Oryza sativa* L.) 叶片作为对照。

实验中所用的玻璃器皿与用具均于 180 °C 烘烤 4 h, 塑料器皿在 37 °C 下用体积分数 0.1% 的 DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液浸泡 12 h, 经高温灭菌后备用; 电泳槽及加样梳用 0.4 mol · L⁻¹ NaOH 溶液浸泡过夜; 用体积分数 0.1% 的 DEPC 水溶液配制 TAE 电泳缓冲液 (pH 8.0)。主要仪器有超速冷冻离心机 (Sorvall ComBi Plus, Beckman 公司)、台式高速冷冻离心机 (1-15K, Sigma 公司)、低速离心机 (DL6000B, 安亭公司) 和 PCR 扩增仪 (Gene Amp 9700, ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取方法

为了确定样品的承载量, 用多糖含量相对较高的石蒜鳞茎进行预实验。分别称取 1.0、1.5 和 2.0 g 鳞茎, 经液氮研磨成细粉后, 加入到 10 mL 65 °C 预热的裂解液 (含 6 mol · L⁻¹ 异硫氰酸胍、质量体积分数 5% 十二烷基肌氨酸钠、0.25 mol · L⁻¹ 柠檬酸三钠、体积分数 1% β-巯基乙醇和质量体积分数 0.33% antiform) 中, 剧烈涡旋 1 min, 65 °C 温浴 15 min, 再剧烈涡旋 1 min 后于 25 °C、5 000 r · min⁻¹ 离心 30 min。在 13 mL 超速离心管中加入 3 mL 5.7 mol · L⁻¹ CsCl 溶液, 将上清液缓缓转到 CsCl 溶液上, 保持分界面平整, 于 4 °C、35 000 r · min⁻¹ 离心 22 h。小心吸除上清液; 用 500 μL 裂解液将沉淀溶解, 移至 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿-异戊醇 (V:V, 24:1) 混合液, 充分混匀后静置 15 min, 于 4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。吸取上清液, 移入另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, 放入 -20 °C 冰箱静置 1 h 后于 4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用体积分数 75% 的乙醇洗涤、吹干, 用 50 μL DEPC 水溶液溶解。

根据预实验结果, 分别取水稻叶片、石蒜鳞茎和石蒜叶片各 1.0 g 用于 RNA 提取, 提取步骤同上。将获得的 RNA 按 DNase I (RNase-free, Takara, D2210) 配置消化体系, 37 °C 温育 30 min 后加入等体积氯仿, 剧烈混合振荡, 静置片刻, 于 4 °C、10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 上清液用无水乙醇沉淀, -20 °C 放置 30 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液; 用体积分数 75% 的乙醇洗涤沉淀, 真空抽干后, 用 20 μL DEPC 水溶液溶解沉淀。

1.2.2 RNA 纯度和完整性的鉴定方法

取 1 μL 总 RNA 溶液, 加 dH₂O 至 200 μL, 分别在 260 和 280 nm 测定吸光值, 根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值判断 RNA 的纯度。用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 得率和完整性进行分析, RNA 点样量 1 μL, 电压 120 V, 电泳 15 min, EB 染色。用 BIO-RAD Gel Doc 2000 型一次成像仪进行观察和拍照。

1.2.3 RT-PCR 方法

参照文献 [2] 选择 RT-PCR 引物, 选用引物 F (5'-CCCAAACAAGCAAATCAAC-3') 和引物 R (5'-GCATGGAAGTTGCGTACAAG-3')。取 500 ng 石蒜鳞茎总 RNA, 选用 oligo dT primer, 按照 Takara 公司 DRR012A

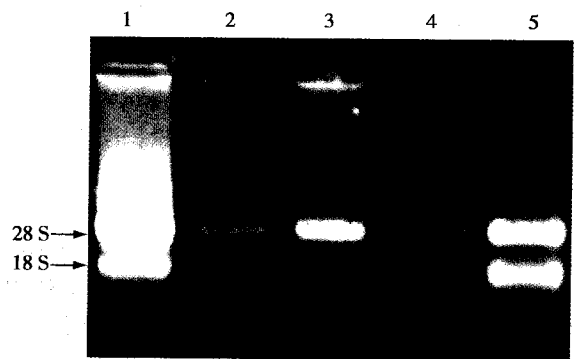
试剂盒的操作说明配置 10 μL 反转录体系, 充分混匀后, 进行反转录扩增。扩增程序为: 45 °C, 30 min; 99 °C, 5 min; 4 °C 保存。

反应结束后, 取 5 μL 获得的 cDNA, 加入 2.0 μL 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ free)、1.5 μL 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂、0.125 μL 5 U · μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶、10 pmol · μL⁻¹ F 和 R 引物各 0.5 μL, 加水至 25 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。取扩增产物 5 μL, 用质量体积分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 70 V, 电泳 45 min, EB 染色。用 BIO-RAD Gel Doc 2000 型一次成像仪进行观察和拍照。

2 结果和分析

2.1 RNA 纯度和完整性分析

利用上述改良的 CsCl 密度梯度离心法提取的石蒜叶片、石蒜鳞茎和水稻叶片 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值均在 1.85 ~ 2.00, 说明提取获得的 RNA 纯度较高。在琼脂糖凝胶电泳谱上 (图 1), 石蒜鳞茎 RNA 的 28 S rRNA 与 18 S rRNA 带型整齐、无拖尾现象, 而且 28 S rRNA 条带的亮度明显高于 18 S rRNA 条带, 说明 RNA 未发生降解、完整性较好。对于有少量 DNA 污染的 RNA 样品, 可用 DNase (RNase free) 消化后再进行电泳检测。另外, 由图 1 可见, 水稻叶片 RNA 的得率明显高于石蒜, 且石蒜叶片的 RNA 得率高于鳞茎, 这与不同种类和不同组织间细胞的代谢差异有关。

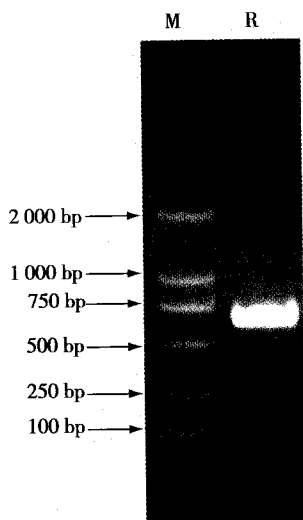


1: 水稻叶片总 RNA Total RNA from rice leaf; 2: 石蒜鳞茎总 RNA Total RNA from *Lycoris radiata* bulb; 3: 石蒜叶片总 RNA Total RNA from *L. radiata* leaf; 4: 经 DNase (RNase free) 消化的石蒜鳞茎总 RNA DNase-digested (RNase free) total RNA from *L. radiata* bulb; 5: 经 DNase (RNase free) 消化的石蒜叶片总 RNA DNase-digested (RNase free) total RNA from *L. radiata* leaf.

图 1 CsCl 密度梯度离心法提取的水稻和石蒜总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳谱
Fig. 1 The agarose gel electrophoretogram of total RNA extracted from rice and *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. by CsCl density gradient centrifugation

2.2 RT-PCR 检测结果

从石蒜鳞茎总 RNA 中扩增石蒜凝集素基因, 相应的 PCR 反应产物片段长度介于 500 ~ 750 bp 之间(图 2), 且片段较长, 与已报道的石蒜凝集素基因长度(669 bp)^[2] 相吻合, 表明用改良的 CsCl 密度梯度离心法提取的石蒜鳞茎总 RNA 的质量可满足进一步的分子生物学实验的要求。



M: DNA 分子标记(DL2000)·DNA marker (DL2000); R: RT-PCR 产物 Product of RT-PCR.

图 2 石蒜鳞茎总 RNA 的 RT-PCR 扩增结果
Fig. 2 RT-PCR amplification result of total RNA from *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. bulb.

3 讨 论

石蒜鳞茎富含多糖, 很难提取出高质量 RNA, 作者曾尝试过多种去除多糖的方法, 但效果均不理想。若利用 LiCl 沉淀 RNA 去除多糖, 则必须首先将混有多糖的 RNA 溶解, 然而由于石蒜鳞茎的多糖含量太高, RNA 沉淀后仍有多糖包裹, 不易溶解。杜中军等^[9] 利用 LiCl 沉淀芒果 (*Mangifera indica* L.) 果肉组织 RNA 时, 也出现类似的结果。另外, 如果 RNA 浓度太低, 也很难沉淀。因此, 如果采用 LiCl 沉淀法提取 RNA 则必须有足够量的样品。采用醋酸钾沉淀多糖的方法不能彻底去除多糖, 且多次沉淀会造成 RNA 的损失。上述两种方法均是利用多糖和 RNA 的理化性质去除多糖, 限制因素较多, 并不适用于所有的植物种类。而采用改良的 CsCl 密度梯度离心法分离 RNA, 可以有效地将 RNA 与其他大分子物质分开, 特别是分离多糖的效果较好。

根据石蒜鳞茎和叶片的特性, 作者对 CsCl 密度梯度离心法进行了一定的改良, 使其适用于石蒜鳞茎和叶片总 RNA 的提取。由于 CsCl 密度梯度离心法对裂解起始用量要求严格, 因而, 经过实验摸索, 确定石蒜鳞茎的裂解起始样品量上限为 1.0 g。超过这一上限, 则离心后的沉淀呈胶状, 不易溶解; 电泳时加样孔内的杂质较多, DNA 污染严重, 且 RNA 条带模糊不清。另外, 提取过程也进行了改良: 将超速离心获得的 RNA 粗样用裂解液溶解后, 用氯仿-异戊醇(V:V, 24:1) 混合液抽提, 然后再沉淀 RNA, 达到去杂纯化的目的。提取过程中应避免直接用体积分数 75% 的乙醇洗涤沉淀, 防止离心管壁上的多糖形成沉淀包裹住 RNA, 使 RNA 沉淀极难溶解。通过 CsCl 密度梯度离心法获得的石蒜鳞茎总 RNA 的完整性较好, RT-PCR 反应结果也进一步证明用该方法提取的 RNA 完整性好, 可完全满足 cDNA 反转录、基因表达分析等实验的需要。

总之, 利用改良的 CsCl 密度梯度离心法提取石蒜总 RNA, 实验原理简单、操作方便, 获得的总 RNA 质量较高, 能够满足后续分子生物学实验的要求, 对于富含多糖的药用植物总 RNA 的提取尤为适用。

参考文献:

- [1] 阮龙喜. 石蒜科植物生物碱的一些研究进展[J]. 药学通报, 1988, 23(8): 453.
- [2] Marco-Contelles J, Carreiras M C, Rodríguez C, et al. Synthesis and pharmacology of galantamine[J]. Chem Rev, 2006, 106: 116-133.
- [3] Glisin V R, Crkvenjakov R, Byus C. Isolation of RNA by CsCl centrifugation[J]. Biochemistry, 1974, 13: 2633-2637.
- [4] Yao J H, Sun X F, Tang K X. Molecular cloning of lectin gene from *Lycoris radiata* [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2002, 41(1): 102-105.
- [5] Vries S D, Hoge H, Bisseling T. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues[J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, B6: 1-13.
- [6] Zhou J H, Thomas C P, Brown R C. RNA isolation without gel formation from oligosaccharide-rich onion epidermis[J]. Plant Mol Biol Rep, 1999, 17: 397-407.
- [7] Liu J J, Goh C J, Loh C S, et al. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana[J]. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 87.
- [8] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 198-203.
- [9] 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): 202-204.