

经验交流

用低浓度硫氰酸胍提取高质量植物 RNA^{*}

何军贤 梁厚果

(四川大学生物系, 成都 610064)

摘要 目前分离 RNA 的方法很多, 但大多是基于动物材料建立的方法, 而针对植物材料的方法并不多见. 建立了一种从植物材料中分离高质量 RNA 的硫氰酸胍/氯化锂/热酚法. 与其他硫氰酸胍的方法相比, 该方法所用硫氰酸胍的浓度仅为现有方法的 1/40 (0.1 mol/L), 降低了实验成本, 且所得 RNA 质量令人满意. 用该方法分离的 RNA 在琼脂糖凝胶电泳上可清晰分出 4 条核糖体 RNA (rRNA) 带; 用此 RNA 进行 RNA 印迹或分离 mRNA 进行体外翻译试验, 均获得很好效果.

关键词 RNA 分离, 硫氰酸胍, 氯化锂, 植物

学科分类号 Q781

分离 RNA 的困难主要是由于 RNA 很易被 RNA 酶降解, 而此酶又很稳定, 因而不易得到完整的 RNA 分子. 因此, 在分离 RNA 时, 需要在样品裂解的起始步骤就加入强有力的蛋白质变性剂以抑制来自内外源的 RNA 酶活性. 硫氰酸胍及其氯化物被证明是最有效的蛋白质变性剂之一^[1,2], 前人利用这种变性剂已建立了多种有效的 RNA 分离方法, 如氯化胍法^[3,4], 硫氰酸胍/热酚法^[5], 氯化铯/硫氰酸胍法^[6], 氯化锂/硫氰酸胍法^[7], 酸性硫氰酸胍/酚/氯仿一步法^[8]等. 然而这些方法都有一个共同的缺点, 即所用的硫氰酸胍(盐)浓度均很高 (4~8 mol/L), 而硫氰酸胍(盐)的价格又比较昂贵, 并非所有的实验室都能采用. 我们在实验中建立了一种用低浓度硫氰酸胍(仅 0.1 mol/L)结合氯化锂/热酚的 RNA 分离方法, 所得 RNA 纯度和完整性均较理想, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 植物材料

为室内培养的小麦 (*Triticum aestivum* L.) 幼苗叶片.

1.2 主要试剂

硫氰酸胍为 Fluka 产品; 琼脂糖、焦碳酸二乙脂 (DEPC) 为 Sigma 产品, SDS 为 Serva 产品, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

样品裂解液: 参照 Ausubel 等^[9]的 TLE 缓冲液 (0.2 mol/L Tris-HCl pH 8.2, 0.1 mol/L LiCl, 0.005 mol/L EDTA, 1% SDS) 有所改进: 补加 0.1 mol/L 的硫氰酸胍.

RNA 提取中所用的所有溶液除含 Tris 者外, 均用 0.1% DEPC 处理并高压灭菌; 含 Tris 的溶液用经高压灭菌的 DEPC-H₂O 直接配制. 玻璃器皿于 160℃干热灭菌 6 h 以上. 塑料离心管、吸头等均用 DEPC-H₂O 浸泡过夜后高压灭菌.

1.3 RNA 提取步骤

基本参照 Ausubel 等^[9]的方法略有改进.

1.4 RNA 完整性的检测与 RNA 印迹

RNA 的完整性用甲醛变性琼脂糖电泳检测^[10]; RNA 印迹按 Sambrook 等^[10]的方法进行.

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39770446).

收稿日期: 1997-06-23, 修回日期: 1998-01-19

1.5 Poly (A)⁺-RNA 的分离及体外翻译

Poly (A)⁺-RNA 按 mRNA 分离试剂盒说明书 (Promega 产品) 的方法, 用 oligo (dT) 层析柱从总 RNA 中分离. mRNA 的体外翻译用 BRL 公司生产的兔网织红细胞系统按产品说明书进行.

2 结果与讨论

2.1 方法的建立

在植物 RNA 的分离方法中, 目前普遍采用的硫氰酸胍/热酚法^[5]及其一步法^[8], 包括了硫氰酸胍、酚、氯仿、Sarkosyl (或 SDS) 以及 β -巯基乙醇等多种蛋白质变性剂. 这些方法由于采用了高的硫氰酸胍浓度 (4~5 mol/L), 大大增强了对 RNA 酶的抑制效果, 因而成为近年来最为流行的 RNA 分离方法. 但高浓度的硫氰酸胍无疑增加了实验成本, 特别是当分离的 RNA 量大而样品数又多时, 所需费用更为可观. 为此, 我们试图建立一种实验成本低而效果又好的 RNA 分离方法. 我们的做法是以 Ausubel 等^[8]的酚/SDS 法为基础, 对它作如下改进: a. 在其提取介质——TLE 缓冲液中补加 0.1 mol/L 的硫氰酸胍; b. 液氮研磨成粉的样品用提取介质悬浮后, 立即加入等体积的酚/氯仿进一步抑制内源 RNA 酶活性; c. 采取更严格的措施防止外源 RNA 酶的污染. 试验结果表明: 通过上述改进可明显改善 RNA 分离效果.

2.2 RNA 质量检测

用本实验改进方法分离的 RNA 在甲醛变性琼脂糖凝胶上可清晰分出 4 条 rRNA 带 (分别是 25 S, 23 S, 18 S 和 16 S rRNA) (图 1). 显然, 改进后的方法所得的 RNA 完整度提高, 且无或很少有 DNA 污染. RNA 纯度检验表明, A_{260}/A_{280} 可达 2.0 以上, 且在不同样品提取中重复性很好, 表明 RNA 的纯度也很理想.

用上述改进方法提取的 RNA 进行 RNA 印迹试验, 也得到满意的结果. 图 2 是从经不同程度干旱胁迫的小麦叶片中分离的 RNA 同

叶绿体 psbA 基因进行 RNA 印迹的结果, 可见印迹信号清晰而少拖尾, 说明 RNA 未发生明显降解.

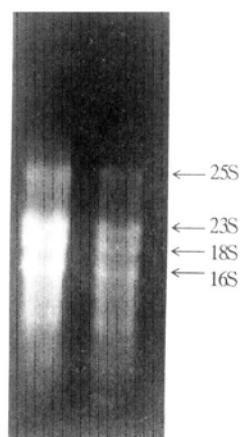


图 1 改进方法提取的 RNA 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

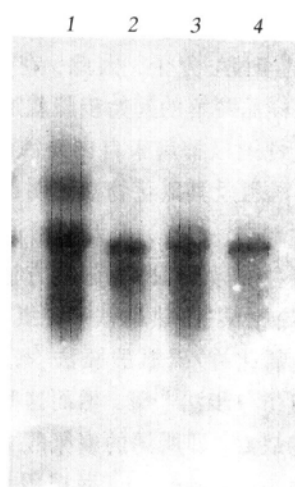


图 2 小麦叶片总 RNA 与叶绿体 psbA 基因的 RNA 印迹结果

1, 2, 3, 4: 分别为小麦叶片经水分胁迫不同时间.

进一步用上述 RNA 分离 poly (A)⁺-RNA, 用兔网织红细胞系统进行体外翻译试验, 同样获得理想效果. 从体外翻译产物的放射自显影结果 (图 3) 可以看出, 所得蛋白质谱带丰富而清晰, 说明用此 RNA 进行的 mRNA 提取完全且结构完整, 可翻译活性强.

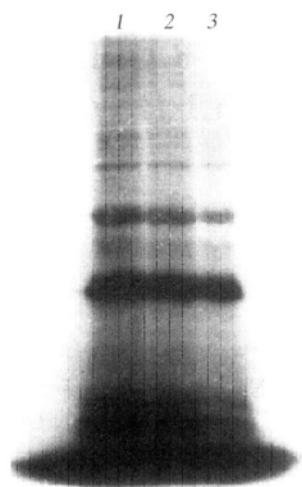


图3 poly (A)⁺-RNA 体外翻译产物的 SDS PAGE 及放射自显影结果

1, 2, 3: 分别为小麦叶片经水分胁迫不同时间。

2.3 小结

本方法有二个明显的优点。一是所得 RNA 质量令人满意, 在琼脂糖凝胶电泳上可清晰显出 4 条 rRNA 带, 说明在该方法中 RNA 很少发生降解。RNA 印迹以及 mRNA 体外翻译试验表明, 该方法提取的 RNA 结构完整性好, 完全可满足基因表达分析、cDNA 逆转录及 cDNA 文库构建等的需要。第二个优点是实验费用大大降低。本文采用的 RNA 酶抑制剂, 除硫氰酸胍和 DEPC 外, 其余均为价格较为低廉的常规试剂 (如 LiCl, SDS, 酚, 氯仿等)。DEPC 是抑制外源 RNA 酶活性必需的, 不能省去。但使用的硫氰酸胍浓度仅为其他常用方法的 1/40, 仅此一项可使实验成本大为降低。本实验结果也表明, 在分离植物 RNA 时, 用低浓度的硫氰酸胍结合其他的蛋白质变性剂并严格控制实验条件, 同样能获得理想的 RNA 分离效果。

参 考 文 献

- 1 Nozaki Y, Tanford C. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem*, 1970, **245** (7): 1648~ 1652
- 2 Gordon J A. Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry*, 1972,

11 (10): 1862~ 1870

- 3 Cox R A. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol*, 1968, **12** (partB): 120 ~ 129
- 4 Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 1987, **163** (1): 16~ 20
- 5 Feramisco J R, Helfman D M, Smart J E *et al.* Isolation of cellular total RNA with guanidium/ hot phenol method. In: Maniatis T eds, *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 194~ 195
- 6 Chirgwin J M, Przybyla A E, Macdonald R J *et al.* Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979, **18** (24): 5294~ 5299
- 7 Cathala G. A method for isolation of intact, translationally active RNA. *DNA*, 1983, **2** (4): 329~ 335
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 159
- 9 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Boston: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987. 4.3.1~ 4.3.4
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7.43~ 7.52

Preparation of High Quality Plant RNA With Low Concentration of Guanidinium Thiocyanate. HE Jun-xian, LIANG Hou-guo (*Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China*).

Abstract The guanidinium thiocyanate-LiCl hot phenol method for high purity and high integrity RNA isolation from plant tissues was established. Comparing with other methods that involved guanidinium thiocyanate, this method costs less and produces RNA molecules with better quality. The working concentration of guanidinium thiocyanate used was reduced more than 40 times compared with previous methods. The isolated RNA with this method gave 4 ribosomal RNA (rRNA) bands when analysed by formaldehyde agarose gel electrophoresis. Northern hybridization, mRNA isolation and following *in vitro* translation experiments performed with this RNA also gave good results.

Key words RNA isolation, guanidinium thiocyanate, LiCl, plant tissues