

# 裙带菜配子体总 RNA 提取的比较研究

李世国, 佟少明, 侯和胜

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁省植物生物技术重点实验室, 辽宁 大连 116029)

**摘要:** 以裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体为材料对比分析了 4 种方法, 改进 SDS 法、CTAB 法、Trizol 试剂盒、RNAiso Reagent 试剂盒法提取 RNA 的质量和纯度, 并采用 RT-PCR 对 mRNA 反转录, 对 mRNA 的可用性进行了检测。结果表明, 两种试剂盒 Trizol 和 RNAiso Reagent 及其改进的方法无法得到完整的裙带菜配子体总 RNA; CTAB 法提取的总 RNA 条带清晰完整但有明显的基因组 DNA 残留并有多糖和蛋白质污染; 改进 SDS 法提取的总 RNA 三条带清晰, OD 值介于 1.8~2.0 之间, 可应用于后续的 RT-PCR 实验, 是一种较为理想的裙带菜等褐藻类配子体 RNA 提取的方法。该方法用于其他大型海藻的总 RNA 提取, 效果也比较好。

**关键词:** 裙带菜(*Undaria pinnatifida*); 配子体; RNA 提取; RT-PCR

中图分类号: S917.3; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)04-0021-05

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)是我国重要的养殖经济海藻之一, 年产量仅次于海带和紫菜居第三位。裙带菜分类地位隶属于褐藻门(Phaeophyta)、海带目(Laminariales)、翅藻科(Alariaceae)、裙带菜属(*Undaria*), 为温带性海藻, 野生种类主要分布于中国、韩国和日本等亚洲北部地区<sup>[1]</sup>。裙带菜具有二倍的孢子体和单倍的配子体所组成的异型世代交替的生活史, 具有独立的生殖器官和简单的根茎叶分化, 因此被认为是较高等的大型海藻。由于裙带菜配子体个体微小, 细胞壁较薄, 黏液腺等分泌结构不发达, 种质保存技术成熟等特殊的优势, 近些年来被作为首选的大型海藻研究材料应用于遗传育种、细胞工程化育苗和分子生物学等相关研究领域<sup>[2]</sup>。

裙带菜及其配子体富含多糖、多酚和次生代谢物质, 它们易与核酸结合形成不溶于水的复合物, 同时在提取过程中这些物质也是多种酶类的抑制剂, 因此裙带菜 RNA 的提取是广泛开展裙带菜分子生物学研究的主要难点之一。目前一些商业化的试剂盒(如 Trizol 等)被广泛应用于植物总 RNA 的提取纯化, 但专门用于大型海藻总 RNA 提取的试剂盒还没有被开发应用。本文以裙带菜配子体为材料, 对几种常见的总 RNA 提取方法进行了比较研究, 优化了提取过程, 为大型海洋藻类分子生物学研究的开展提供了基本技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

裙带菜(*U.pinnatifida*)配子体由本实验室自行保存, 扩大培养方法: 温度 20℃, 光照强度 20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 光周期 12 h : 12 h, 培养液 PES 每 7 天更换一次。

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)丝状体由辽宁省植物生物技术重点实验室海洋藻类研究室提供, 培养条件: 温度 20℃, 光照强度 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 光周期 14 h : 10 h, 培养液 PES 每 7 天更换一次。

海带(*Laminaria japonica*)配子体为实验室自行保存, 扩大培养方法: 温度 18℃, 光照强度 20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 光周期 12 h : 12 h, 培养液 PESI 每 7 天更换一次。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 裙带菜配子体总 RNA 提取

##### 1.2.1.1 改进 SDS 法

取材料 0.1g 用蒸馏水冲洗 2 次, 灭菌滤纸吸干水分, 液氮研磨, 转移至离心管中, 加入 80℃ 预热

收稿日期: 2010-01-10; 修回日期: 2010-04-12

基金项目: 中国科学院实验海洋生物学重点实验室开放基金项目

作者简介: 李世国(1982-), 男, 辽宁沈阳人, 博士研究生, 从事海藻发育与分子生物学研究, 电话: 0411-84259152, E-mail: shigli@126.com; 侯和胜, 通信作者, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: Hesheng\_hou@126.com

的 SDS 提取液 1 mL (100 mmol/L LiCl, 100 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, 2% SDS, 使用前加 16% PVP 和 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 充分振荡混匀, 置冰上 5 min。4 °C、12 000 g 离心 10 min。取上清, 加 200  $\mu$ L 3 mol/L KAc (pH 5.5), 匀冰上放置 5 min。4 °C、12 000 g 离心 10 min。取上清, 加 200  $\mu$ L 氯仿, 充分振荡抽提, 冰上放置 5 min。4 °C、12 000 g 离心 15 min。小心吸取上层水相于新离心管中, 加 600  $\mu$ L 预冷的异丙醇, 混匀后 -20 °C 沉淀 20 min。4 °C、12 000 g 离心 10 min。1 mL 75% 乙醇 (DEPC 处理) 洗涤 2 次, 室温干燥, 20  $\mu$ L DEPC 水溶解, -80 °C 保存。

#### 1.2.1.2 CTAB 法

取液氮研磨好的材料 0.1 g 于离心管中, 加入 CTAB 提取液 1 mL (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl, 2% CTAB, 使用前加 1% DTT), 充分混匀, 置冰上 5 min。4 °C、12 000 g 离心 10 min。取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇 (24:1), 充分振荡抽提, 冰上放置 5 min。4 °C、12 000 g 离心 15 min。小心吸取上层水相于新离心管中, 加 1/4 体积 10 mol/L LiCl, 混匀后 -20 °C 沉淀过夜。4 °C、12 000 g 离心 10 min。弃上清, 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 处理) 洗涤 2 次, 室温干燥, 20  $\mu$ L DEPC 水溶解, -80 °C 保存。

#### 1.2.1.3 Trizol 试剂盒法

根据 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒提供的操作流程提取。每 0.1 g 液氮研磨的材料加 1 mL Trizol 试剂, 充分混匀室温放置 5 min, 加 200  $\mu$ L 氯仿, 用力震荡混匀, 室温放置 5 min。4 °C、12 000 g 离心 15 min。小心吸取上层水相于新离心管中, 加 500  $\mu$ L 预冷的异丙醇, 混匀后室温沉淀 5 min。4 °C、12 000 g 离心 10 min。弃上清, 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 处理) 洗涤两次, 室温干燥, 20  $\mu$ L DEPC 水溶解, -80 °C 保存。

#### 1.2.1.4 RNAiso Reagent 植物总 RNA 提取试剂盒

实验方法根据宝生物公司 (TAKARA) RNA 提取试剂盒 (RNAiso Reagent) 操作流程。每 0.1 g 液氮研磨的材料加 1 mL RNAiso Reagent, 混匀室温静置 5 min。12 000 g 4 °C 离心 5 min。取上清, 加入氯仿 (RNAiso Reagent 的 1/5 体积量), 用力震荡, 室温静置 5 min。12 000 g 4 °C 离心 15 min。取上清液转移至另一离心管中, 加入等体积的异丙醇, 充分混匀后在室温静置 10 min。12 000 g 4 °C 离心 10 min。弃上清, 75% 乙醇 (DEPC 处理) 洗涤 2 次, 室温干燥,

20  $\mu$ L DEPC 水溶解, -80 °C 保存。

#### 1.2.2 RNA 样品中 DNA 的去除

按照下列反应体系在离心管中依次加入 RNA 20  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 10  $\mu$ L, DNaseI 4  $\mu$ L, RNase Inhibitor 1  $\mu$ L, DEPC-H<sub>2</sub>O 65  $\mu$ L。37 °C 反应 30 min, 然后加入等体积氯仿抽提, 4 °C、12 000 g 离心 15 min。取上层水相, 加 1/5 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积无水乙醇, -80 °C 沉淀 2 h。75% 乙醇 (DEPC 处理) 洗涤两次, 室温干燥, 20  $\mu$ L DEPC 水溶解, -80 °C 保存。

#### 1.2.3 RNA 纯度的检测

1  $\mu$ L RNA 样品于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 1 $\times$ TAE 缓冲液中 120 V 电泳 20 min。EB 浸泡胶后凝胶成像系统成像。取 1  $\mu$ L RNA 样品稀释 100 倍后于紫外分光光度计测定  $A_{260}$  和  $A_{280}$  的值, 计算  $A_{260}/A_{280}$  确定 RNA 纯度。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测

将消化处理后的 RNA 样品用 AMV 反转录酶 (TAKARA) 按常规的方法进行反转录反应, 以 GST (谷胱甘肽硫转移酶) 基因设计引物进行 PCR 反应。20  $\mu$ L PCR 反应体系组成如下: 10 $\times$ buffer 2  $\mu$ L; Taq 酶 0.2  $\mu$ L; dNTP 3.2  $\mu$ L; 模板 5  $\mu$ L; 上下游引物各 0.2  $\mu$ L; DEPC-H<sub>2</sub>O 9.2  $\mu$ L。反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 30 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 RNA 电泳检测

各种方法提取获得的总 RNA 电泳结果见图 1。其中图 1-A 为改进 SDS 法提取总 RNA 的电泳图谱, 可见 28s、18s rRNA 条带分离明显清晰, 28s、18s 条带亮度比 5s 大, 表明其完整性良好; 点样孔中无 DNA 残留痕迹, 28s 条带上方无弥散拖尾现象, 没有多糖、蛋白等杂质的污染;  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.98, 表明这种方法获得的 RNA 纯度较高; 但电泳图谱中可见有少许的基因组 DNA 残留, 用 DNaseI 消化处理后再电泳结果见图 2-A, 基因组 DNA 消失, rRNA 条带保持完整,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.85。从图 1-B 泳道可见 CTAB 法提取的总 RNA 明显有降解, 18s 带亮度很大, 向下呈现弥散状态; 总 RNA 中有蛋白和多糖污染; 基因组 DNA 残留非常明显。用两种试剂盒提取则没有能够得到完整的 RNA (见图 1-C 和 1-D), 只有少量的 5s 条带存在。

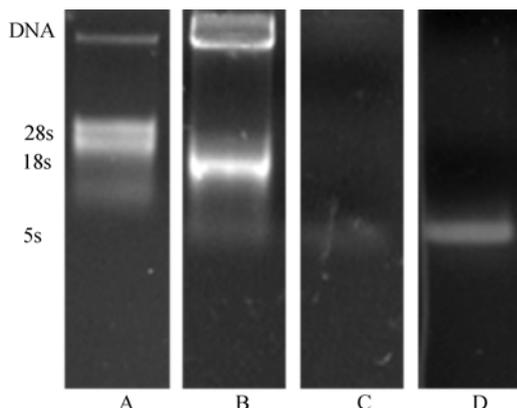


图 1 裙带菜配子体总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of Total RNAs from *U. pinnatifida* gametophyte

A: 改进 SDS 法; B: CTAB 法; C: Trizol 试剂盒法; D: RNAiso Reagent 试剂盒法

A: Modified SDS method; B: CTAB method; C: Trizol kit; D: RNAiso Reagent kit

## 2.2 RT-PCR 检测

选择改进 SDS 法提取的总 RNA 用 DNaseI 消化处理后, 进行反转录和 PCR 扩增反应, 结果见图 2-B。扩增结果特异性强, 无非特异性条带出现, 说明提取的总 RNA 质量较好, 可用于基因克隆等后续实验研究。

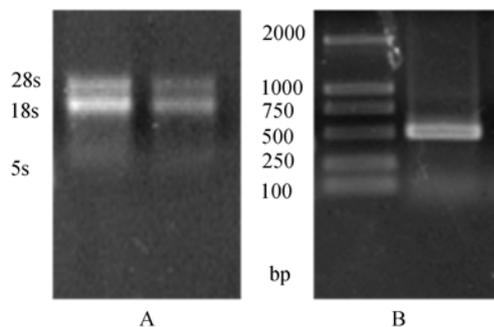


图 2 DNaseI 消化处理后的总 RNA 及 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of DNaseI digested total RNA and RT-PCR products

A: RNA; B: RT-PCR, DL2000 marker; 扩增片段长度 544bp

A: RNA; B: RT-PCR, DL2000 marker; Length of product fragment is 544 bp

## 3 分析与讨论

近几年来已经有了一些关于大型海藻 RNA 提取的报道, 但裙带菜等褐藻类的研究报道数量有限(表 1)。很多研究表明, 大型海藻总 RNA 提取所采用的方法主要是 CTAB 法, 多用于基因克隆、文库构建和提

取方法的比较等。CTAB 和 SDS 是比较常用的蛋白质变性剂, 能有效地裂解细胞膜并抑制核酸酶的活性, 释放出细胞内容物并使核酸-蛋白复合物分解以便释放核酸。韩峰等<sup>[3]</sup>认为 CTAB 去除海藻多糖效果显著, 结合有效的抽提和纯化方法能得到高纯度的 DNA。杨婧等<sup>[4]</sup>利用几种不同的方法提取绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)总 RNA, 比较分析后认为 CTAB-酚法最为适合。但作者在实验中发现, CTAB 法提取的总 RNA 含有基因组 DNA 的量普遍比 SDS 方法高, 且实验耗时较长, 一次提取实验需两天才能完成。

改进的 SDS 法采用 16% PVP 和 1%β-巯基乙醇相结合的方法来抑制酚类物质的氧化作用并将其有效的去除。PVP 是多酚的螯合剂, β-巯基乙醇则是高效的还原剂, 为 PVP 和酚的结合提供了良好的环境, 二者结合防止多酚氧化的效率大大提高<sup>[5]</sup>。高浓度的盐能够沉淀多糖, 3 mol/L KAc(pH5.5)沉淀多糖的同时能提供偏酸性的环境, 这时 RNA 稳定而 DNA 则容易变性沉淀下来, 利用后续的抽提即可将其除去, 从而分离得到较高质量的 RNA。虽然仍有少量基因组 DNA 残留, 但利用 DNaseI 可有效去除 DNA 污染。该方法耗时短, 约 5~6 h 即可完成总 RNA 提取。为检验该方法有效性的适应范围, 作者用这种方法提取了海带配子体、条斑紫菜丝状体的总 RNA, 均获得了较好的结果(见图 3-A 和 3-B)。

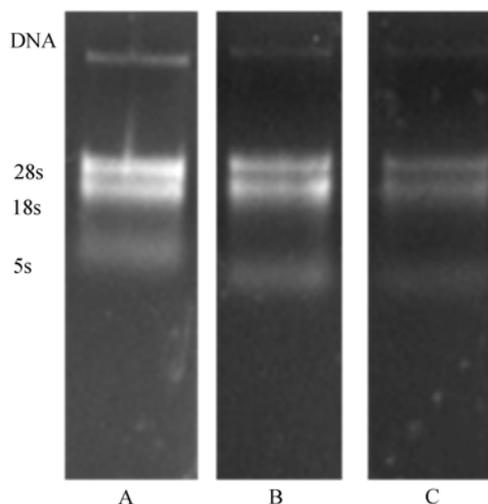


图 3 海带配子体和条斑紫菜丝状体总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis for total RNA extracted from *L. japonica* gametophyte and *P. yezoensis* conchocelis

A: 海带配子体改进 SDS 法; B: 条斑紫菜丝状体改进 SDS 法; C: 条斑紫菜丝状体 Trizol 试剂盒法

A: Modified SDS method for *L. japonica* gametophyte; B: Modified SDS method for *P. yezoensis* conchocelis; C: Trizol kit for *P. yezoensis* conchocelis

表 1 大型海藻总 RNA 提取主要方法及其用途  
Tab. 1 Methods to extract total RNA from seaweeds

海藻种类	提取方法	RNA 用途	参考文献
红藻类	SDS 法、CTAB 法、Trizol 法、RNAplant 法	提取方法比较研究	[6]
	Trizol 法	构建文库	[7-8]
	紫菜 改进一步法	构建文库	[9]
	QuickPrep <i>Micro</i> mRNA Purification Kit	构建文库	[10]
	SDS 法	构建文库	[11]
	江蓠 盐酸胍和 Trizol 法	提取方法比较研究	[12]
褐藻类	异硫氰酸胍法、SDS 法、CTAB 法	提取方法比较研究	[13]
	龙须菜 RNeasy Plant Mini Kit	构建文库	[14]
	海带 Trizol 法	基因克隆、构建文库	[15-16]
	海带 CTAB 法	提取方法比较研究	[17]
绿藻类	墨角藻 CTAB 法	提取方法比较研究	[17-18]
	马尾藻 CTAB 法	基因克隆	
	巨藻 CTAB 法	构建文库	[19]
	裙带菜 DNA 和 RNA 提取方法的比较研究	[20]	
绿藻类	裙带菜 CsCl 密度梯度离心法	发育时期特异表达基因克隆分析	[21]
	石莼 LiCl-胍盐法	基因克隆	[22]
	绿藻类 RNeasy Plant Mini Kit	基因克隆	[23]
	杉叶蕨藻 SDS 法	提取方法比较研究	[24]

Trizol 和 RNAiso Reagent 是基于异硫氰酸胍法的原理而设计配制的高效 RNA 提取试剂盒, 更适用于动物组织和细胞总 RNA 提取, 也适用于某些植物总 RNA 提取。我们的实验结果表明这 2 种试剂盒对条斑紫菜 RNA 提取效果很好(图 3-C)。而对裙带菜配子体总 RNA 提取效果不佳。

研究表明, 改进的 SDS 法是裙带菜配子体总 RNA 提取行之有效的方法, 并将该方法应用于褐藻类和其他大型海藻的 RNA 提取。该方法表现出提取过程耗时少, 得到的 RNA 质量较高等明显优势, 获得的 RNA 可以用于基因克隆、差异显示分析、分子杂交等各种分子生物学研究。

参考文献:

[1] 钱树本, 刘东艳, 孙军. 海藻学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2005.  
 [2] 胡晓燕. 褐藻配子体培养的应用研究及意义[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 30-31.  
 [3] 韩峰, 宫倩红, 史晓翀, 等. 海藻核酸提取的难点及对策[J]. 海洋科学, 2004, 28(10): 71-74.  
 [4] 杨婧, 牛艳, 张可炜, 等. 一种适用于 RT-PCR 的微藻总 RNA 提取方法[J]. 海洋科学, 2010, 01, 34(1): 6-10.  
 [5] 张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总 RNA 提取方法

的研究[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178-181.  
 [6] 胡晓静, 何培民. 条斑紫菜丝状体总 RNA 提取方法比较[J]. 生物技术通讯. 2007, 18(4): 604-607.  
 [7] 徐民俊, 茅云翔, 庄筠昀, 等. 条斑紫菜孢子体 cDNA 文库构建及表达序列标签的初步分析[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 7-12.  
 [8] 杨官品, 刘永健, 孙雪, 等. 条斑紫菜丝状孢子体 cDNA 文库构建及抗病相关基因鉴定[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 47-52.  
 [9] 庞国兴, 王广策, 胡松年, 等. 坛紫菜丝状孢子体 EST 的获取、生物信息学分析[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(5): 452.  
 [10] Kakinuma M, Kaneko I, Coury D A, et al. Isolation and identification of gametogenesis-related genes in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) using subtracted cDNA libraries[J]. Journal of Applied Phycology, 2006, 18: 489-496.  
 [11] Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, et al. Generation of 10154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis*[J]. DNA Research, 2000, 7: 223-227.  
 [12] Falcão V D R, Tonon A P, Oliveira M C, et al. RNA Isolation method for polysaccharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology. 2008, 20(1): 209-212.  
 [13] Chan C X, Ho C L, Othman R Y, et al. Total RNA Ex-

- traction for the Red Seaweed *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. Asia-Pacific Conference in Marine Science and Technology, 2002, 5: 12-16.
- [14] 孙雪, 张学成. 龙须菜四分孢子体 cDNA 文库的构建 [J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(5): 727-732.
- [15] 史西志, 毕艳会, 周志刚. 海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 666-669.
- [16] 胡乐琴, 陆广琴, 刘士成, 等. 利用 SMART 技术构建海带配子体 cDNA 文库[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(13): 2975-2976, 2979.
- [17] Graeth P, Asuncion L L, Marta V, et al. Simple and rapid RNA extravtion from freeze-dried tissue of brown algae and seagrass[J]. European Journal of Phycology, 2006, 41: 97-104.
- [18] Morris C A, Nicolaus B, Sampson V, et al. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*[J]. Biochemistry Journal, 1999, 338: 553-560.
- [19] Wong T K M, Ho C L, Lee W W, et al. Analyses of expressed sequence tags from *Sargassum binderi*[J]. Journal of Phycology, 2007, 43: 528-534.
- [20] Kirk E A, Stephanie K C, Dennis A P, et al. The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*[J]. Molecular and General Genetics, 1995, 246: 455-464.
- [21] Hou H S, Li N, Wu C Y. Identification and sequence of a cDNA clone corresponding to a gene involved in development of *Undaria pinnatifida*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1998, 16: 25-29.
- [22] Kang S E, Jin L G, Choi J S, et al. Isolation of pollutant (pine needle ash)-responding genes from tissues of the seaweed *Ulva pertusa*[J]. Journal of Applied Phycology, 2006, 18: 483-487.
- [23] Kakinuma M, Coury D A, Itoh S, et al. Isolation and characterization of a single-copy actin gene from sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) [J]. Gene, 2004, 334: 145-155.
- [24] La Claire J W, Herrin D L. Co-isolation of high-quality DNA and RNA from coenocytic green algae[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15: 263-272.

## Comparison of methods for total RNA extraction from *Undaria pinnatifida* gametophyte

LI Shi-guo, TONG Shao-ming, HOU He-sheng

(College of life sciences, Liaoning Normal University, Liaoning Provincial key laboratory of Plant Biotechnology, Dalian 116029, China)

Received: Jan., 10, 2010

Key words: *Undaria pinnatifida*; gametophyte; RNA extraction; RT-PCR

**Abstract:** In this paper, modified SDS method, CTAB method, and Trizol and RNAiso Reagent kits were applied to extract total RNA from *Undaria pinnatifida* gametophyte. We compared the quality and purity of the extracted RNAs and used RT-PCR to examine whether the RNAs were functionally active. The results showed that the Trizol and RNAiso Reagent kits were not suitable to seaweed RNA isolation, because there was no clear band detected on the gel. The RNA isolated by the CTAB method showed smear bands and also was contaminated by genomic DNA. However, the modified SDS method could give birth to good quality RNAs, although there was a little genomic DNA contamination. The OD260/OD280 ratio of the RNA was between 1.8 and 2.0. These RNAs could be used for RT-PCR. So the modified SDS method is a very good method for extracting total RNAs from gametophyte of *U. pinnatifida* and some other seaweeds.

(本文编辑: 张培新)