

海藻核酸提取的难点及对策

Difficulties and countermeasures in extraction of nucleic acids from marine algae

韩峰, 官倩红, 史晓, 于文功

(中国海洋大学海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q52

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)10-0071-04

海带、紫菜等养殖海藻不但经济价值高, 而且还有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、降血脂等重要药理作用^[1-3], 已成为中国水产养殖业的支柱产品。随着养殖规模的不断扩大, 近年来面临着养殖品种退化和病害频发的严重局面。因此, 从基因、基因组水平研究海藻生长发育规律以及优良性状形成的分子基础, 是培育高产、优质、抗逆新品种的最佳途径, 而且将带动我国海藻养殖业的深入发展。然而目前海藻的分子生物学研究还比较落后, 其主要制约因素是海藻核酸的提取, 也是一个世界性的难题。这主要是由于海藻富含多糖、多酚、蛋白、核酸酶、次级代谢产物等物质, 容易与核酸结合形成不溶于水的复合物或造成核酸的降解^[4], 用传统方法难以提取到高质量的核酸, 严重阻碍了海藻分子生物学研究的深入开展。作者综述了影响海藻核酸提取的主要因素, 并结合目前的最新研究进展和作者的工作经验提出了一些解决方法。

1 多糖

海藻中多糖的含量很高, 主要是硫酸多糖 (sulfated polysaccharides)、羧基多糖 (carboxylic polysaccharides) 等, 这些多聚物的密度和离子结合性质与核酸相似, 很难与核酸分开^[5], 它们比陆生植物的中性多糖更易溶于水, 形成的溶液也更加粘稠。由于多糖可以抑制许多酶的活性, 如限制性内切酶、Taq 酶、逆转录酶等, 影响了后续的 DNA 酶切、克隆、cDNA 合成等, 使测序、RAPD、RFLP、RT-PCR、基因文库构建等工作无法进行, 所以必须除去多糖。传统的苯酚抽提等方法并不能将多糖和核酸完全分开, 在除去多糖的同时也将丢弃部分核酸, 并且得到的核酸样品中也经常含有多糖, 这种含有多糖的核酸沉淀溶于水后往往

产生粘稠的溶液, 或者很难溶于水。因此, 去除多糖是海藻核酸提取的关键所在。

1.1 乙基黄原酸钾法

乙基黄原酸钾能够与多糖结合, 形成可溶性复合物, 使海藻的细胞壁破裂, 释放出核酸。此复合物在铵离子存在的条件下可转变为水不溶性, 并可通过简单的离心除去, 不需要苯酚或氯仿抽提。另外, 乙基黄原酸钾能够结合金属离子, 从而抑制 DNase 的活性。该方法的优点是操作简便, 不需要机械匀浆, 从而减少了污染的机会, 而且产生的气雾剂最少 (如果样品中含有人类病原菌, 这是很重要的); 匀浆液中含不含胍盐、 β -巯基乙醇, 也不需要液氮研磨, 所以费用较低, 而且对人体没有毒害作用。Tillett 和 Neilan^[6]利用该方法从蓝细菌、微生物、环境样品中提取到高质量的核酸, DNA 可以用于酶切、克隆、PCR, RNA 可以用于 RT-PCR, Northern 杂交等反应, 并且样品中不含核酸酶, 温育 16 h 没有发生降解。

1.2 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法

CTAB 是一种阳离子型表面活性剂, 当溶液中 NaCl 浓度大于 0.5 mol/L 时, 它可以选择性地同细胞

收稿日期: 2002-12-27; 修回日期: 2003-04-29

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863计划)资助项目(2001AA626010)

作者简介: 韩峰(1975-), 男, 山东昌邑人, 讲师, 理学硕士, 从事海洋微生物学及分子生物学研究, 电话: 0532-2032067, E-mail: qdhanf@sina.com

碎片、变性的蛋白质和多糖结合形成不溶性复合物，而核酸仍处于溶解状态，通过等体积的氯仿/异戊醇(24:1, 体积分数)抽提可除去多糖。值得注意的是，当NaCl浓度小于0.5 mol/L时，DNA将在室温下与CTAB形成沉淀^[7]。该方法去除多糖的效果非常明显，以往多用于植物基因组DNA的提取^[8,9]，近来逐渐用于微生物^[10]、海洋生物核酸的提取中。1996年Kitale在提取条斑紫菜基因组DNA时，先经CsCl密度梯度离心除去蛋白质后，再用CTAB处理，获得的DNA分子量在25~166 kb之间，产率平均为17.7 μg/g组织。Phillips^[11,12]利用改进的CTAB法从马尾藻中提取到高分子量的DNA样品，可用于基因库的构建。De Clerck^[13]结合使用CTAB和Sephadex Bandprep Kit，从褐藻门*Dictyota*属的7个种中提取到高质量的DNA用于PCR扩增及RFLP分析。因CTAB处理多糖大多在65℃进行，所以CTAB溶液中一般加有体积分数为1%的β-巯基乙醇以增加溶液的还原性，防止核酸酶的降解^[11]。

1.3 LiCl软化组织法

起初人们利用LiCl软化海藻组织，使染色体易于观察；后来又发现50 mmol/L的浓度就可以打破哺乳动物细胞膜，Raha 1990年使用LiCl和苯酚抽提从哺乳动物细胞中提取到了细胞总RNA和DNA。1992年Hong通过实验发现，紫菜在含有0.5~1.0 mol/L LiCl的提取液中55℃处理5 min，再4℃振荡1 h，低速离心除去残渣，存在于上清中的DNA用乙醇沉淀后即可用于酶切或PCR。对该方法进行改进后，Hong^[14]从18个属26个种的海藻中提取到可以进行RAPD分析的高质量DNA；提取液中加入4 mol/L异硫氰酸胍可以用来提取足以进行差异显示的总RNA。Ji等利用LiCl法从*Hizikia fusiformis*中提取到高质量的DNA，用于RAPD分析，研究了从不同海域采集的藻株的遗传多态性。这种方法步骤少，操作简便，不需要液氮研磨、苯酚/氯仿抽提、CsCl密度梯度离心，费用低廉，对人体没有毒害。

1.4 LiCl沉淀法

在高浓度的LiCl(3~4 mol/L)存在下，RNA难以溶于水，可以通过离心沉淀下来，而大部分多糖仍留在上清中，少数与RNA共沉淀的多糖可以在高浓度的K⁺或Na⁺存在下通过苯酚/氯仿抽提除去。Su和Gibor曾将LiCl沉淀与其它方法结合使用，从大型海

藻中提取到高质量的RNA，可用于RT-PCR和cDNA文库的构建。但该方法单独使用去除多糖的效果并不佳^[15]，而且LiCl沉淀一般需要在-20℃过夜，大大延缓了实验的进程，而对于多糖含量较高的海藻及植物，需要与其它方法结合使用才能得到满意的效果。

1.5 钾离子/乙醇法

在提取植物核酸时，研究人员经常使用醋酸钾或低浓度的乙醇来沉淀多糖，杨君等^[16]发现向含有CTAB的提取缓冲液中加入终浓度1.25 mol/L的KAc，能有效去除绿藻、红藻多糖，得到的DNA可用于酶切及RAPD分析。但Su等在提取褐藻的核酸时发现，单独使用这两种试剂效果都不好，只有联合使用(0.5 mol/L K⁺、体积分数20%乙醇)才能较好地除去多糖。他认为K⁺能引起多糖明胶化，更难与RNA分开，而低浓度的乙醇可以抑制明胶化，并促进多糖沉淀，但对去除红藻、绿藻多糖效果不明显。

2 多酚

大型海藻(如褐藻、红藻)中往往富含多酚，匀浆时多酚会释放出来，氧化后使匀浆液变为褐色，这一现象称为褐化效应(browning effect)。多酚的氧化产物(如醌类)能与RNA以氢键或共价键结合^[17]，抑制RNA的活性，并且难以用标准的CsCl密度梯度离心或LiCl沉淀法将其与RNA分开。一般处理策略是先防止多酚氧化或将氧化的多酚还原，然后再将多酚与RNA分开。

2.1 还原剂法

一般在匀浆液中加入β-巯基乙醇(2-ME)、二巯苏糖醇(DTI)、半胱氨酸、还原型谷胱甘肽等还原剂来防止多酚被氧化，然后利用LiCl或CaCl₂沉淀RNA时多酚仍留在上清中的性质将其除去。另外，这些还原剂还可以打断多酚氧化酶的二硫键而使之失活。最常用的是在匀浆液中加入体积分数1%的β-巯基乙醇^[14]，有时浓度甚至高达2%~5%^[12]。NaBH₄是一种醌类还原剂，能够有效地将醌类还原成多酚，处理后的RNA溶液的褐色显著减轻。

2.2 硼酸盐法

硼酸盐可以与多酚以氢键结合，从而抑制了多酚的氧化及与RNA的结合。Su和Gibor在提取褐藻RNA时将该方法(0.15 mol/L, pH7.5)与β-巯基乙醇、NaBH₄结合使用，有效去除多酚，获得了较好的结果。

2.3 螯合剂法

聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和聚乙烯聚吡咯烷酮 (PVPP) 中的 CO-N= 基能与芳香环上的羟基结合^[18], 因此可以和多酚形成稳定的复合物, 并可通过等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提除去。Hong^[14] 在裂解液中加入 0.2% PVPP, 能有效去除紫菜中含有的多酚类物质, 提取到的 DNA 可用于 RAPD 分析, RNA 可用于差异显示。Coyer 在研究中还发现, 褐藻在含有 CTAB 和 PVPP 的裂解液中研磨, 匀浆液室温下可保存 1 周, DNA 不会发生降解。

3 蛋白质

因为核酸酶和多酚氧化酶也是蛋白质, 所以蛋白质也必须尽可能除去。匀浆液中一般含有多种蛋白变性剂, 如胍盐^[19]、十二烷基磺酸钠 (SDS)^[20] 或十二烷基肌氨酸钠 (sarcosyl)^[14, 21]、CTAB^[11-13]、苯酚等, 在破裂细胞释放核酸的同时就抑制核酸酶的活性, 并将蛋白质变性凝聚, 然后通过苯酚/氯仿/异戊醇抽提除去。一般在匀浆液中还含有一定量的乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、 β -巯基乙醇, 它们和胍盐都是核酸酶的抑制剂, 能有效防止核酸酶对核酸的降解。另外, 液氮速冻样品并在 -70℃ 保存, 液氮研磨或在冰浴中匀浆样品, 以及在提取过程中低温操作, 都能有效抑制核酸酶的活性。但 Brasch 指出, 液氮研磨紫菜通常会释放出大量可溶性粘多糖, 并且难以与 DNA 分开。有人在提取 DNA 时先用蛋白酶 K 消化蛋白质^[22], 再用苯酚/氯仿/异戊醇抽提, 也能获得较好的结果。但由于蛋白酶 K 活性的最适温度是 56℃, 而且作用时间比较长, 所以一般不用于 RNA 的提取。

4 小结

以上对海藻核酸提取过程中经常遇到的问题进行了分析并提出了相应解决的方法, 可以说多糖的去除是海藻核酸分离纯化中最普遍而又最不容易克服的难题。笔者在研究中发现, CTAB 去除多糖效果非常显著, 结合 LiCl、PVPP、苯酚抽提, 蛋白酶 K 处理条斑紫菜能获得大于 50 kb 的高纯度 DNA, 至少可保持 1 个月以上而无降解, 可以直接用于测序、酶切、RFLP、基因组文库构建等工作 (数据未列出)。在实际工作中应针对样品的特性选择适当的实验方案, 尽量简化操作步骤。随着现代分子生物学研究新技术的不断出现和人们对海洋资源研究开发的日益重视, 相信不久科研工作者必将彻底解决海

藻核酸的提取这一难题, 而且向着自动化、快速化和高通量的方向发展。

参考文献

- [1] 刘成玉, 纪新强, 段建华, 等. 蔗糖酯对脂质过氧化损伤红细胞变形能力和膜收缩蛋白变化的影响 [J]. 中国海洋药物, 2000, 19(2): 11-13.
- [2] Ozaki N, Sakuda S, Nagasawa H. Isolation and some characterization of an acidic polysaccharide with anti-calcification activity from coccoliths of a marine alga *Pleurochrysis carterae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(10): 2330-2333.
- [3] Ruperez P, Ahrazem O, Leal J A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(4): 840-845.
- [4] Armbust E V, Galindo H M. Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3501-3513.
- [5] Farias W R, Valente A P, Pereira M S, et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(38): 29299-29307.
- [6] Tillett D, Neilan B A. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria [J]. *J Phycol*, 2000, 36: 251-258.
- [7] 方福德, 周吕, 丁谦, 等. 现代医学实验技巧全书 (上) [M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996. 595-596.
- [8] 马小军, 汪小全, 蔡美琳, 等. 野山参微量 DNA 提取方法的研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(4): 205-207, 255.
- [9] Jaakola L, Pittila A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 19(2): 201-203.
- [10] Wilson K. Current Protocols in Molecular Biology [M]. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1994. 1-5.
- [11] Phillips N E. Molecular phylogenetic analysis of the pan-pacific genus *Sargassum* [J]. *Diss Abst Int Pt BSci&Eng*, 1998, 59(4): 2-7.
- [12] Phillips N E, Smith C M, Morden C W. An effective DNA extraction protocol for brown algae [J]. *Phycological Research*, 2001, 49(2): 97-102.
- [13] De Clerck O, De Vos P, Gillis M, et al. Molecular

- systematics in the genus *Dictyota* (Dictyotales, Phaeophyta): A first attempt based on restriction patterns of the internal transcribed spacer 1 of the rDNA (ARDRA-ITS1) [J]. **System Geography Plants**, 2001, **71**(1): 25– 35.
- [14] Hong Y K. Molecular characterization of seaweeds using RAPS and differential display[J]. **Bull Fac Biosour Mie Univer**, 1997, **17**(1): 85.
- [15] Naidu R A, Robinson D J, Kimmins F M. Detection of each of the causal agents of groundnut rosette disease in plants and vector aphids by RFLPCR [J]. **J Virol Methods**, 1998, **76**(1): 9– 18.
- [16] 杨君, 王茜, 刘美华, 等. 一种简便的海藻 DNA 提取方法 [J]. **生物技术**, 1999, **9**(4): 39– 42.
- [17] Singh R P, Nie X, Singh M, *et al.* Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RFLPCR [J]. **J Virol Methods**, 2002, **99**(1– 2): 123– 131.
- [18] Nassuth A, Pollari E, Helmezy K, *et al.* Improved RNA extraction and onetube RT- PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts [J]. **J Virol Methods**, 2000, **90**(1): 37– 49.
- [19] Nakajima M, Kitade Y, Iisuka O, *et al.* Rapid extraction of high-quality genomic DNA from *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. **Phycol Res**, 2000, **48**(1): 15– 17.
- [20] Chen Y Q, Wang N, Zhang P, *et al.* Molecular evidence identifies bloomforming *Phaeocystis* (Prymnesiophyta) from coastal waters of southeast China as *Phaeocystis globosa* [J]. **Biochem Syst Ecol**, 2002, **30**(1): 15– 22.
- [21] Chen Z S, Xia L S, Sun S M, *et al.* Isolation and enrichment of plasmidlike DNA in *Porphyra yezoensis* [J]. **Mar Sci Bull**, 2000, **19**(4): 56– 60.
- [22] Guo B T, Bi Y P, Shan L, *et al.* Extraction of plasmidlike DNA and high-quality total DNA from *Porphyra yezoensis* [J]. **Acta Oceanol Sin**, 2000, **22**(2): 87– 91.