

角倍总 RNA 提取方法建立及 *ACTIN* 基因片段克隆

阮桢媛, 陈晓鸣*, 杨子祥

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:角倍总 RNA 的提取是研究角倍蚜虫瘿形成分子机制的基础。本研究针对其多酚、多糖含量高的特点,从各类试剂盒及常规方法改良中优选出 CTAB(异丙醇)沉淀方法,较为简单、经济、有效地提取角倍总 RNA,其得率可达 $60.16 \mu\text{g} \cdot (100 \text{mg})^{-1}$ 。利用该方法提取的 RNA,通过 RT-PCR 克隆肌动蛋白基因 *ACTIN* 片段,碱基序列长度为 934 bp,编码 311 个氨基酸,该序列与 GenBank 中已登录的 *ACTIN* 基因序列比对显示与芒果同源性最高,相似性达到 95%,与其它肌动蛋白的氨基酸序列同源性达到 86% 以上。角倍总 RNA 的提取及看家基因 *ACTIN* 的克隆可为盐肤木和其他蚜虫虫瘿的分子克隆及基因表达分析奠定基础。

关键词:角倍;总 RNA 提取;*ACTIN* 基因

中图分类号:Q966

文献标识码:A

Extraction of Total RNA from Horned-gall and the Cloning of *ACTIN* Gene Fragment

RUAN Zhen-yuan, CHEN Xiao-ming, YANG Zi-xiang

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The extraction of total RNA from the horned-galls of *Rhus chinensis* is the basis of the researches on the molecular mechanism of gall formation. Due to high levels of polyphenol and polysaccharides, the modified CTAB method depositing with isopropanol was selected from different kinds of kits and other improved methods. It is a simple, economic and effective method for the extraction of total RNA, and the yield could get $60.16 \mu\text{g}/100 \text{mg}$. Reverse transcription was conducted on the total RNA extracted by CTAB-isopropanol method, and a 934 bp cDNA sequence of *ACTIN* gene coding a protein of 311 amino acids was obtained. Homology comparison showed that it shared 95% nucleotide sequence homology with *Mangifera indica* and over 86% amino acid sequence similarity with actins in other species. The results laid basis for molecular researches of *Rhus chinensis* and other aphid induced galls.

Key words: horned-gall; total RNA extraction; *ACTIN* gene

角倍是由角倍蚜 (*Schlechtendalia chinensis* Bell.) 刺激盐肤木 (*Rhus chinensis* Mill.) 产生的一种虫瘿,因其单宁酸含量极为丰富而被广泛应用于纺织、化工、轻工业、食品等行业^[1-2]。从分子生物学的角度分析角倍的形成机制将有助于对角倍形成过

程的全面了解。角倍高质量 RNA 提取是对其进行分子克隆以及基因表达分析等分子生物学研究的基础。多糖、多酚类物质是困扰植物总 RNA 提取的难点,多糖类物质由于理化性质与 RNA 有许多相似之处而易于与其共沉淀^[3],而酚类物质易被氧化成醌

收稿日期:2012-04-11

基金项目:国家林业公益性行业专项(201204602);云南省科技创新强省项目(2010CA028)

作者简介:阮桢媛(1983—),女,江西南昌人,博士研究生,主要从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者:陈晓鸣,研究员,博士生导师,主要从事资源昆虫学研究。Email:xmchen@vip.km169.net

类物质,与 RNA 结合后影响 RNA 的分离纯化^[4]。由于成熟角倍中富含多糖、多酚等物质^[5-7],RNA 的有效提取成为其分子生物学研究首要解决的问题。植物组织 RNA 提取常用的方法有 SDS 法、CTAB 法、Trizol 法、苯酚法、LiCl 沉淀法等^[8-10],本试验结合角倍化学组成的特点,通过对不同试剂盒及方法的比较,获得了角倍 RNA 提取的优化方法。

植物肌动蛋白(ACTIN)是真核生物细胞中普遍存在的一种重要蛋白质,构成细胞骨架中的微丝系统,参与细胞分裂、细胞运动、细胞空间形状维持、物质运输等生命活动^[11]。由于肌动蛋白基因表达水平受环境影响较小且在各生长阶段均持续表达,被视为真核细胞生理过程的看家基因,在基因表达调控中被广泛作为分子内标^[12-13]。因此克隆出角倍的内参基因 ACTIN,将为其进行基因表达分析和利用肌动蛋白基因研究植物进化提供资料,为盐肤木属的其它成瘦植物 ACTIN 基因的克隆以及致瘦相关基因的定量分析提供参考。

1 材 料 和 方 法

1.1 试 验 材 料

角倍样品来源于中国林科院资源昆虫研究所温室,采集后立即置于液氮中保存。RNA 提取之前,用灭菌解剖刀将角倍剖开并去除其中的所有蚜虫,以消除蚜虫对角倍 RNA 提取可能造成的影响。

柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒及 RNAsimple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒分别购自上海生工和北京天根公司,TRIzol 试剂购自 MRC 公司,反转录试剂盒购自 Fermentas 公司,胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,pEASY™-T₁ 载体购自北京全式金公司。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 RNA 提取方法 (1)柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒:将 0.05 g 植物组织用液氮研磨成粉末与 450 μL Buffer Rlysis-PG 震荡混匀,室温放置 5 min,而后 12 000 g 4 °C 离心 3 min,将上清移至一新的离心管中;加入 1/2 体积无水乙醇,充分混匀;将吸附柱放入收集管中,将溶液全部加至吸附柱中,静置 1 min,室温 12 000 g 离心 1 min,倒掉收集管中废液;将吸附柱放回收集管中,加入 500 μL GT Solution,静置 1 min,室温 10 000 g 离心 1 min,倒掉收集管中废液;将吸附柱放回收集管中,加入 500 μL NT Solution,静置 1 min,室温 10 000 g 离心 1 min,倒掉

收集管中废液;将吸附柱放回收集管中,12 000 g 离心 2 min;将吸附柱放入离心管中,在吸附膜中央加入 20 μL DEPC-treated ddH₂O₂,静置 2 min,12 000 g 离心 2 min,将所得到的 RNA 溶液置于 -70 °C 保存。

(2)RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒:取 100 mg 植物组织加入 1 mL 裂解液 RZ,充分混匀后将匀浆液在室温放置 5 min,使得核酸蛋白混合物完全分离,12 000 g 4 °C 离心 5 min,将上清移至新离心管中;加入 200 μL 氯仿,盖好管盖,剧烈震荡 15 s,室温放置 3 min,12 000 g 4 °C 离心 10 min,样品会分为 3 层:黄色的有机相,中间层和无色的水相,将 RNA 水相转移到一个新的离心管中进行下一步操作;缓慢加入 0.5 倍体积的无水乙醇,混匀,将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中,12 000 g 4 °C 离心 30 s,弃掉收集管中的废液;向吸附柱中加入 500 μL 去蛋白液 RD,12 000 g 4 °C 离心 30 s,弃废液;向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,12 000 g 4 °C 离心 30 s,弃废液,重复此操作步骤;将吸附柱放入收集管中,12 000 g 4 °C 离心 2 min,去除残余液体,而后转入一个新的离心管中,加入 40 μL DEPC-treated ddH₂O₂,静置 2 min,12 000 g 离心 2 min。

(3)传统 Trizol 法:将 1 mL TRIzol REAGENT RNA 提取试剂和 100 mg 液氮研磨样品加入离心管中充分混匀,室温静置 5 min,12 000 g 4 °C 离心 5 min,将上清移至新离心管中,加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡 15 s,在室温下静置 15 min,然后 12 000 g 4 °C 离心 15 min,将无色水相转入新离心管中;加入 500 μL 异丙醇,室温静置 5~10 min,12 000 g 4 °C 离心 8 min;去除上清,加入 1 mL 75% 乙醇,7 500 g 4 °C 离心 5 min,重复此步骤,去除乙醇洗液,将 RNA 沉淀室温放置 3~5 min,加入 40 μL DEPC-treated ddH₂O₂ 溶解 RNA。

(4)Trizol 改良法:样品在液氮研磨过程中加入 10% PVP,在 1 mL Trizol 提取液中加入 10 μL β-巯基乙醇,使用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)反复抽提直至无白色中间层,而后用氯仿抽提一次,采用 250 μL 异丙醇与 250 μL 高盐溶液(0.8 mol·L⁻¹柠檬酸钠,1.2 mol·L⁻¹ NaCl)共沉淀 RNA,其余步骤与传统 Trizol 法相同。

(5)CTAB 改良法:样品在液氮研磨过程中加入 10% PVP,在 1 mL CTAB 提取缓冲液(2% CTAB,0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH8.0,1.4 mol·L⁻¹ NaCl,

0.025 mol · L⁻¹ EDTA) 中加入 10 μL β-巯基乙醇与 100 mg 研磨样品充分混合,于 65 °C 水浴 40 min,每隔 10 min 混匀一次,室温 12 000 g 离心 10 min;取上清依次加入 1/10 体积无水乙醇,1/10 体积 5 mol · L⁻¹ KAc(pH4.8),1/2 体积水饱和酚和 1/2 体积氯仿/异戊醇(24:1),充分混匀 3 min,冰上静置 3 min,12 000 g 4 °C 离心 10 min,若仍有中间蛋白层可重复此步骤至蛋白质层消失;取上清液加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),充分混匀 15 s,冰上静置 3 min,12 000 g 4 °C 离心 10 min;取上清分别采用 2/3 体积的异丙醇与 1/3 体积 5 mol · L⁻¹ NaCl 于 -20 °C 沉淀 1 h,2.5 体积无水乙醇与 1/10 体积 3 mol · L⁻¹ 乙酸钠(pH5.2) -20 °C 沉淀 2 h,4 mol · L⁻¹ LiCl 于 4 °C 沉淀过夜 3 种沉淀方法,而后异丙醇沉淀 12 000 g 4 °C 离心 10 min,无水乙醇与 LiCl 沉淀离心 20 min,后续步骤与 Trizol 法相同。

1.2.2 RNA 纯化 为了消除提取 RNA 中痕量 DNA 对后续试验造成的影响,用 DNase I 处理 RNA,1 μg RNA 使用 1 U DNase I 消化,37 °C 处理 30 min 后于 65 °C 将 DNase I 灭活。经 DNase I 处理后的 RNA 需要进一步精制。此时将 RNA 总体积增至 100 μL,加入等量酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),充分混匀,离心取上清,加入 100 μL 氯仿/异戊醇(24:1)反复抽提 2 次用无水乙醇沉淀,再经 75% 乙醇洗涤两遍,最后干燥后溶解于 DEPC-treated ddH₂O₂ 中。

1.2.3 总 RNA 纯度及完整性检测 分别取各种方法提取的 2 μL RNA 溶液在 1% 非变性琼脂糖凝胶中电泳,其中试剂盒及 Trizol 法为 RNA 提取原液,CTAB 法为 5 倍稀释液,溴化乙锭染色,而后在凝胶成像系统下观察并拍照。取 2 μL RNA 原液,用 RNase-free 水将其稀释 5 倍用于分光光度计检测。通过测定其 A₂₃₀、A₂₆₀、A₂₈₀ 值,计算 A₂₆₀/A₂₃₀,A₂₆₀/A₂₈₀,用于判断 RNA 纯度,并且得出 RNA 浓度及得率。RNA 浓度 = A₂₆₀ × 样品稀释倍数 × 40。

1.2.4 角倍 *ACTIN* 基因片段的克隆 按照 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书进行 RNA 的反转录,生成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中已知芒果(JF737036.1)、拟南芥(NM_121018.3)肌动蛋白基因序列,运用 Primer 5.0 设计一对简并引物 P1:TGTCATGGTTGCTATGGGTC 和 P2:(C/T)TGGAAAGGTGCTGAGGGA。取 2 μL 反转录产物为模板,用引物 P1,P2 进行 RT-PCR 反应,体系为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性

30 s,52 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.5 目的片段回收克隆和测序 将目的片段按照胶回收试剂盒说明书割胶回收,与 pEASY™-T₁ 载体连接转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,选取带有目的片段的重组质粒,进行 PCR 检测,确认后送上海生工测序。序列运用 NCBI 和 DNAMAN 软件进行比对和分析。

2 结果与分析

2.1 不同 RNA 提取方法比较

由于成熟角倍中多糖、多酚、次级代谢产物含量较高,传统 Trizol 法及 RNA 提取试剂盒(北京天根)中的提取试剂无法有效抑制其作用,未能有效提取到角倍总 RNA,电泳均未见明显条带。经过改良的 Trizol 法所提取的 RNA 不完整,大分子 RNA 降解严重(见图 1)。柱式 RNA 提取试剂盒(上海生工)虽然能够较快速、简单地提取到较完整且纯度较高的 RNA(见图 2),但是得率极低,仅为 0.38 μg · (100 mg)⁻¹(见表 1),无法用于后续的反转录试验。同样使用 CTAB 的方法,分别采用异丙醇、LiCl 与无水乙醇三种方法沉淀 RNA,均能有效得到完整的总 RNA,28S 与 18S rRNA 带型完整且二者亮度之比约为 2:1(见图 3),但异丙醇沉淀得到 RNA 量远高于其它方法,为 60.16 μg · (100 mg)⁻¹(见表 1)。

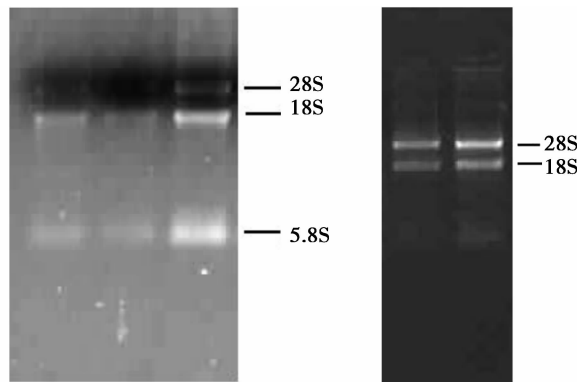
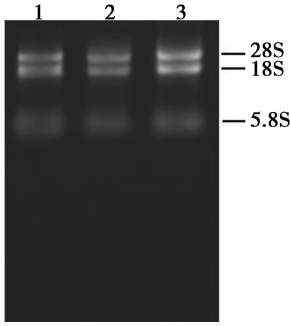


图 1 Trizol 改良法总 RNA 电泳 图 2 生工试剂盒总 RNA 电泳

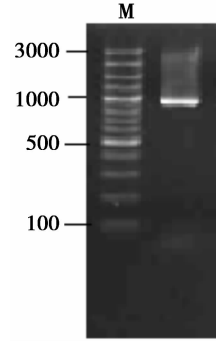
表 1 不同提取方法总 RNA 的得率和纯度比较

方法	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA 得率/ μg · (100 mg) ⁻¹
生工柱式 RNA 提取试剂盒	1.96	2.20	0.38
Trizol 改良法	1.83	2.17	19.44
CTAB 法(异丙醇沉淀)	1.97	2.08	60.16
CTAB 法(LiCl 沉淀)	1.94	2.12	31.30
CTAB 法(无水乙醇沉淀)	1.95	2.16	34.56



1:无水乙醇沉淀 RNA; 2: LiCl 沉淀 RNA; 3:异丙醇沉淀 RNA

图3 CTAB 法总 RNA 电泳



M:100bp Marker

图4 ACTIN 基因特异片段

2.2 RT-PCR 扩增

使用改良 CTAB(异丙醇沉淀)方法提取的总 RNA,通过 RT-PCR 的方法获得大小为 934 bp 的 ACTIN 基因片段,电泳结果见图 4。

2.3 测序结果与分析

阳性克隆测序获得一段长度为 934 bp 的核酸序列,编码 311 个氨基酸(见图 5)。所得序列与 GenBank 中已登录的 ACTIN 基因序列比对显示他们之间同源性均在 86% 以上,其中与芒果(HQ585999.1)、荔枝(HQ588855.1)、杨梅(AB650589.1) ACTIN 基因序列同源性较高,与芒果相似性达到 95%,与荔枝和杨梅相似性达 92%,这表明所克隆片段为 ACTIN 基因片段,在 GenBank 中

的登录号为 JQ964117。将推测的盐肤木肌动蛋白氨基酸序列与谷子(AAG10041.1)、绿豆(AAF31643.1)、夏堇(ABC49392.1)、拟南芥(AAM65657.1)、甘蓝(AAD02328.1)、绿地珊瑚蕨(AAD48334.1)肌动蛋白氨基酸序列进行多重比较分析,此 7 种植物分属于不同科,有 264 个保守氨基酸(见图 6),可见所克隆片段为 ACTIN 基因的高度保守区。盐肤木与谷子 SiACT 同源性最高(97%),与蕨类植物门绿地珊瑚蕨同源性最低,亦达到 91%(见图 7),由此进一步证明肌动蛋白是一种高度保守的蛋白。

```

1      TGTCAATGGTTGGTATGGGTCAGAAAGGATGCCTATGTAGGTGACGAGGCCCAATCCAAAAG
1      V  M  V  G  M  G  Q  K  D  A  Y  V  G  D  E  A  Q  S  K  R
61     AGGTATTCTTACTTTGAAATACCCATTGAGCATGGTATTGTGAGCAACTGGGATGATAT
21     G  T  L  T  L  K  Y  P  I  E  H  G  T  V  S  N  W  D  D  M
121    GGAAGAATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCCCTGAAGAGCATCC
41     E  K  I  W  H  H  T  F  Y  N  E  L  R  V  A  P  E  E  H  P
181    AGTGCTTCTCACTGAGGCACCCTTAAACCCCAAGGCTAACAGAGAGAAGATGACCCCTGAT
61     V  L  L  T  E  A  P  L  N  P  K  A  N  R  E  K  M  T  Q  I
241    TATGTTTGA AACATTCAATGTTCTGCCATGTATGTTGCCATCCAGGCCGTGTTGTCCCT
81     M  F  E  T  F  N  V  P  A  M  Y  V  A  I  Q  A  V  L  S  L
301    GTATGCCAATGTCGTACAACCTGGTATTGTACTGGATTCTGGTGATGGTGTCTCATAC
101    Y  A  S  G  R  T  T  G  I  V  L  D  S  G  D  G  V  S  H  T
361    TGTGCCAATTTACGAGGGTTATGCTCTCCACATGCAATTTCTCGATTGGATCTTGCTGG
121    V  P  I  Y  E  G  Y  A  L  P  H  A  I  L  R  L  D  L  A  G
421    TCGTGATCTCACCGATGCATTGATGAAGATTCTTACCGAGAGAGGTTACATGTTCAACCAC
141    R  D  L  T  D  A  L  M  K  I  L  T  E  R  G  Y  M  F  T  T
481    CACTGCCGAACGGGAAATTGTCCTGACATGAAGGAGAAGCTTGCTTATGTTGCCCTGGA
161    T  A  E  R  E  I  V  R  D  M  K  E  K  L  A  Y  V  A  L  D
541    CTACGAGCAGGAACCTTGAGACTGCCAAGAGCAGCTCTTCTGTTGAGAAGA ACTATGAGCT
181    Y  E  Q  E  L  E  T  A  K  S  S  S  V  E  K  N  Y  E  L
601    GCCCGATGGCCAAAGTCATCACTATTGGAGCTGAGAGATTCCGATGCCAGAGAAGCTCTT
201    P  D  G  Q  V  I  T  I  G  A  E  R  F  R  C  P  E  V  L  F
661    CCAGCCATCACTCATCGGTATGGAAGCTGTCTGGTATCCATGAGACCACCTACAACCTCCAT
221    Q  P  S  L  I  G  M  E  A  A  G  I  H  E  T  T  Y  N  S  I
721    CATGAAGTGTGATGTTGATATCAGAAAGGATCTCTATGGTAACATTGTCCTTAGTGTTG
241    M  A  K  C  D  V  D  I  R  K  D  L  Y  G  N  I  V  L  S  G  G
781    TTCAACTATGTTCCCTGTTATTGCCGACCGTATGAGCAAGGAATCACTGCACTTGCTCC
261    S  T  M  F  P  G  I  A  D  R  M  S  K  E  I  T  A  L  A  P
841    AAGCAGCATGAAGATCAAGGTGTTGCTCCACCAGAGAGAAATACAGTGTCTGGATTGG
281    S  S  M  K  I  K  V  V  A  P  P  E  R  K  Y  S  V  W  I  G
901    AGGATCAATCCTTGCAATCCCTCAGCACCTTCCAA
301    G  S  I  L  A  S  L  S  T  F  Q

```

图5 角倍 ACTIN 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

盐肤木	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
谷子	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
绿豆	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
夏堇	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
拟南芥	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
甘蓝	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
绿地珊瑚蕨	VNVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRWAPPEEHPVLL	63
Consensus	vnvngm qkda vvgdeaqsqrgi ltkypiehg v snwdmeki whhtfy nelrwappee hpvll	
盐肤木	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
谷子	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
绿豆	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
夏堇	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
拟南芥	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI FLDSGDGVSHIVPI YEG	126
甘蓝	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
绿地珊瑚蕨	TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGI VLDSGDGVSHIVPI YEG	126
Consensus	teap lnpk anrekmtqimfetfn panyvai qavlsllyasgrttgi ldsdgdgv h vpiyeg	
盐肤木	YALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYMFTTTAEREIVRDMKEKLAYVALDYEQELETAKE	189
谷子	YALPHAILRLDLAGRDLTDSLMLKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQELETAKE	189
绿豆	YALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDMKEKLAYI ALDYEQELETAKE	189
夏堇	YALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTSAEREIVRDIKEKLAYI ALDYEQEMETTK	189
拟南芥	YALPHAILRLDLAGRDLTDHLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDMKEKLSYI ALDFEQELETSK	189
甘蓝	FSLPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYMFTTTAEREIVRDIKEKLSFVAVDYEQEMETSK	189
绿地珊瑚蕨	NAMPHGILRLDLAGRDLTDCLMKILTERGYTFTTTAEREIVRDMKEKLAYVALDYEQOEIESAK	189
Consensus	ph i rldl agr ltd lmkiltergy ftt aerei vrd kekl a eqe e k	
盐肤木	SSSSVEKNYELPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAAGIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
谷子	TSSSVEKSYELPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSLIGMESP GIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
绿豆	TSSAVEKSYELPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSMIGMESP GIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
夏堇	TSSAVEKNYCLPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSLVGMEAAAGIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
拟南芥	TSSSVEKSFELPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSMIGMENPGIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
甘蓝	TSSSIERNYELPDGCVITIGAERFRCPEVLFQPSLVGMEAAAGIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
绿地珊瑚蕨	NSSSLEKTFELSDGCVITIGSERFRCPEVLFQPSLIGMEAAAGIHETTYSNIMKCDVDIRKDL Y	252
Consensus	ss ek l gqviti g erfrcepevlfqps gme gihettysnimkcdvdirkdly	
盐肤木	GNI VLSGGSTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
谷子	GNI VLSGGSTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
绿豆	GNI VLSGGSTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
夏堇	GNI VLSGGSTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
拟南芥	GNI VLSGGTTFMGGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
甘蓝	GNI VLSGGTTFMFSGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
绿地珊瑚蕨	GNI VLSGGSTMFPGIADRMSKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVVI GGSI L ASLSTFQ	311
Consensus	gnivlsgg tmf gi drmskei talapssmki kvvapperkysvvi ggsilaslstfq	

图 6 盐肤木与其它植物 ACTIN 基因片段氨基酸序列多重比较

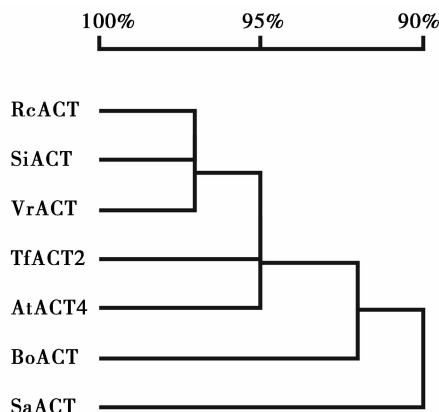


图 7 RcACT 与其他植物 ACTIN 基因的氨基酸序列同源性分析

3 结论与讨论

植物组织总 RNA 的提取是分子生物学研究中的基础,更是研究中的难点。不同的植物种类甚至同一种植物不同生长发育时期的材料都会因为其中化学组成的不同而需要对其总 RNA 提取的方法做出相应调整。多糖、多酚是影响 RNA 提取的主要因素。由于酚类化合物的存在, RNA 提取过程中极易产生褐化效应^[14],氧化的酚类化合物(如醌类)可以与 RNA 不可逆地结合导致 RNA 的降解及 RNA 活性的丧失^[15]。针对此类问题已有许多解决方法,其中使用 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)与 β -巯基乙醇处理多酚类物质较为常见。PVP 是酚的络合物,能与多酚形成一种不溶的络合物,有效去除多酚,减少 RNA 中酚的污染,同时能够防止多酚氧化产物形成对核酸质量影响,多酚被 PVP 络合之后可以通过离心的方式去除,不影响后续的提取过程。 β -巯基乙醇是抗氧化剂,可以有效防止酚氧化成醌,避免褐变,使酚容易去除。由于角倍中单宁酸含量极高,为保证 RNA 不被降解,本试验在研磨时使用高比例 PVP 络合多酚,并在离心过程中除去络合物,提取液中适量 β -巯基乙醇的加入进一步防止多酚氧化,两者结合效果较好。非变性胶电泳结果显示,CTAB 改良法能够获得完整的总 RNA。

成熟的角倍组织多糖含量高是其 RNA 提取面临的另一个问题。多糖能与 RNA 共沉淀形成难溶的胶状物,还可以抑制许多酶的活性。上述用于螯合多酚的 PVP 也能和多糖结合,有效去除多糖。传统的 Trizol 法在遇到有较高含量多糖时,往往采用高盐溶液沉淀的方法,在沉淀的过程中同时加入 1/2 体积的异丙醇与 1/2 体积的高盐溶液。本试验在改良 Trizol 法中尝试使用此法减少多糖对 RNA 提取的影响,与传统方法比较而言,改良之后粘性物质有所减少。高浓度 Na^+ 或 K^+ 或低浓度乙醇存在条件下可部分除去多糖^[16-17]。使用终浓度为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LiCl 沉淀 RNA^[18],无水乙醇与乙酸钠 (pH5.2) 共沉淀^[19],或者综合使用多种方法均能通过选择性沉淀多糖达到 RNA 进一步纯化的效果^[20]。异丙醇可选择性沉淀大分子 rRNA 及 mRNA,所需容积小且速度快,一般不需要在低温条件下长时间放置,但是为了尽可能去除多糖,需要在高盐条件下沉淀以提高 RNA 纯度。LiCl 沉淀 RNA 可除去部分多糖,但沉淀时间过长,造成 RNA 损失。

在低浓度乙醇与高浓度 K^+ 沉淀除多糖的前提下, LiCl 沉淀与改进的异丙醇沉淀能获得相似质量的总 RNA,但异丙醇沉淀产量约为 LiCl 沉淀法的两倍,可能是由于 LiCl 沉淀时间过长造成 RNA 的损失。无水乙醇沉淀法由于需要较大体积的乙醇,不适宜大体积样品的提取。与异丙醇相比,乙醇较为亲水,碳链较短,沉淀 RNA 的效果不如异丙醇,故得率较低。

使用酚:氯仿:异戊醇反复抽提,将水相中 RNA 与中间层和有机相中 DNA、蛋白质以及多糖物质充分分离,但是无论何种方法提取的总 RNA,均需要使用 DNaseI 处理,以保证其无 DNA 对后续试验产生干扰。本研究通过改良 CTAB(异丙醇沉淀)法获得完整且产量较高的总 RNA,并在进一步纯化后用于 RT-PCR。从 ACTIN 基因克隆结果分析,所提取的总 RNA 完全能满足后续试验要求。

肌动蛋白无论是在核酸序列还是在氨基酸序列中都具有高度的同源性^[21],本试验克隆得到的盐肤木 ACTIN 基因片段与其它植物核苷酸序列同源性均在 86% 以上,多序列比对结果亦显示它与其它植物氨基酸序列的高度同源性,进一步证明 ACTIN 基因是高度保守的看家基因。目前尚无有关盐肤木属植物肌动蛋白基因的研究,在整个漆树科植物中, GenBank 中已登录的只有芒果的相关信息,盐肤木 ACTIN 基因的成功克隆不仅能为盐肤木分子生物学研究奠定基础,也为克隆其它近源种 ACTIN 基因提供信息资源。

对基因表达进行定量检测时常使用 β -肌动蛋白基因、28S 和 18S rRNA 等看家基因作为内部参照,这些基因被认为在某些类型细胞中的表达是恒定的^[22-23]。在角倍形成过程中,部分参与其中的基因在表达量上可能与正常的盐肤木叶片存在着差异,盐肤木角倍 ACTIN 基因的克隆或许能够为其它基因的表达和调控提供内标参考,为优良基因筛选提供理论依据。

参考文献:

- [1] 顾人侠. 分光光度法测定倍子单宁酸的研究[J]. 林产化学与工业, 1985, 5 (4): 12-23
- [2] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992
- [3] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 163: 16-20
- [4] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles [J]. Methods Enzymology, 1974, 31: 528-545

- [5] 陈祥, 孙秀芳, 毛群. 五倍子单宁组份分离、鉴定的研究 (I). 低分子量组份和醇解产物的分离鉴定[J]. 林产化学与工业, 1985, 5 (2): 16-23
- [6] 夏定久. 我国的五倍子资源[J]. 林产化学与工业, 1985, 5 (4): 40-46
- [7] 贺近格, 李启基. 林产化学工业全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [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
- [10] 宋蓓, 赵锦, 刘孟军, 等. CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立[J]. 中国农学通报, 2007, 23 (7): 79-83
- [11] 陈颖, 王刚, 赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白[J]. 生物学通报, 2003, 38 (1): 13-15
- [12] Thellin O, Zorzi W, Lakayec B, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 1025-1036
- [13] Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P, *et al.* The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene [J]. *Cell*, 1980, 20: 555-566
- [14] Xing S, Aharon G. A method for RNA isolation from marine macroalgae [J]. *Analytical Biochemistry*, 1988, 174 (2): 650-657
- [15] Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 197 (1): 91-95
- [16] Ainworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12: 198-203
- [17] López-Gómez R, Gómez-Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp [J]. *HortScience*, 1992, 27: 440-442
- [18] 尹慧, 陈莉, 李晓艳, 等. 百合叶片总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13 (4): 41-45
- [19] 谭雪梅, 申彦晶, 赵树进. 提取何首乌不同组织总 RNA 的一种有效方法[J]. 药物生物技术, 2008, 15 (1): 24-27
- [20] 庄军平, 苏菁, 陈维信. 一种从香蕉果实提取高质量 RNA 的方法[J]. 分子植物育种, 2006, 4 (1): 143-146
- [21] 张一弓, 张丽静, 刘永红, 等. 白沙蒿肌动蛋白基因核心片段的克隆和序列分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28 (2): 251-254
- [22] 朱芷葳, 董常生. 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较[J]. 生物技术通讯, 2006, 17 (5): 807-809
- [23] 高志民, 彭镇华, 李雪平, 等. 毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及组织特异性表达分析[J]. 林业科学研究, 2009, 22 (3): 449-453