

大型纤毛虫总 RNA 的提取方法^{*}

刘星吟^① 毛永真^① 陈建欢^① 李甘霖^② 金立培^{①**}

(^①中山大学生命科学院 广州 510275; ^②香港理工大学生化应用系 香港)

摘要:以冠突伪尾柱虫为材料,建立了一种适合于富含 RNase 和多糖的大型纤毛虫总 RNA 的提取方法。该方法采用异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇联合快速变性,酚、氯仿和异戊醇抽提,同时在变性剂存在的条件下两次选择性地沉淀 RNA,从而有效地去除了 DNA、蛋白质和多糖。所得 RNA 样品经电泳、紫外分光光度法检测和 RT-PCR 分析,证实为完整、均一且无基因组污染的总 RNA。这为构建冠突伪尾柱虫有小核系与无小核系之间的削减文库、筛选两细胞系差异表达的基因奠定了基础。

关键词:大型纤毛虫;冠突伪尾柱虫;RNA 提取

中图分类号:Q81 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2004)05-44-04

Total RNA Extraction from Large Ciliates

LIU Xing-Yin^① MAO Yong-Zhen^① CHEN Jian-Huan^① Kam-Len Daniel Lee^② JIN Li-Pei^①

(^①School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275;

^②Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

Abstract: The method for total RNA isolation from *Pseudourostyla cristata* was established using guanidinium isothiocyanate, β -mercaptoethanol for denaturing, and water-sature phenol, chloroform and isoamylalcohol for extracting. The integrity and purification of the isolated total RNA were detected by using gel electrophoresis, RT-PCR and UV spectrophotometer. The quantity and quality of the total RNA extracted by this method is high enough for construct cDNA subtraction library and screen differential expressed genes.

Key words: Large ciliates; *Pseudourostyla cristata*; RNA Extraction

纤毛虫是单细胞真核生物,因具有两种不同功能的细胞核及其高度多样化的生物学特征而被广泛用作探讨细胞衰老与分化、信息传递、大小核的分工和核质关系等领域的研究^[1]。在利用大型肉食性纤毛虫作为分子生物学研究材料时,研究者常常遇到的问题是:这些细胞体积较大,生长分裂速度远低于细胞体积较小的纤毛虫,群体的细胞数量通常仅能维持在 $10^3 \sim 10^4$ 之间,材料十分有限,难以用柱心式法提取纯度较高的 RNA。某些大型腹毛目纤毛虫所含大小核的数量远高于其它纤毛虫,其细胞质内富含 RNA 酶,用 TRIzol 一步裂解法提取, RNA 易降解,有损其完整性,且容易被基因组 DNA 污染。为了解决这一技术难题,提取完整性好、质量高的总 RNA,作者以大型腹毛目纤毛虫——冠突伪尾柱虫 (*Pseudourostyla cristata*) 为材料,在参考多种 RNA 提取方法的基础上^[2-4],对其总 RNA 的微量提

取进行了方法学探讨,获得了较满意的效果,并已成功用于构建有小核细胞系和无小核细胞系之间的削减文库。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 实验选用的冠突伪尾柱虫采自上海,其培养方法参考金立培等^[5],即在解剖镜下,用自制的细玻璃吸管从原始采集液中吸出单个虫体,放入直径 5 cm 塑料培养皿中,内加 1/8 粒小麦和少数草履唇滴虫

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30370210);

** 通讯作者, E-mail: Lsjiplp@zsu.edu.cn;

第一作者介绍 刘星吟,女,27岁,博士研究生;研究方向:发育遗传学;E-mail: Ls67@zsu.edu.cn.

收稿日期:2004-03-10,修回日期:2004-05-20

(*Chilomonas paramecium*) 的 Pringsheim 培养液于 27 ~ 29℃ 培养, 每 2 d 更换部分老化培养液, 并用细玻璃吸管把培养液中小麦粒扩散出的絮状脏物清除。待纤毛虫增殖至几百只时, 根据需要用多个培养皿进行扩大培养。由于纤毛虫对环境要求很高, 群体密度大、培养液老化、食物过多或过少都会导致包裹形成或细胞畸形, 因此大型纤毛虫的培养要在体视显微镜下进行严密的监控, 并经常更换培养液, 才能获得足够的实验材料。

1.2 试剂的配制

① Pringsheim 培养液: 取 2% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 贮存液、0.3% KCl 贮存液、0.4% Na_2HPO_4 贮存液、0.2% MgSO_4 贮存液各 5 ml, 加蒸馏水定容至 500 ml 备用。

② 裂解液: 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.7% 十二烷基硫酸钠、25 mmol/L 柠檬酸钠、0.1 mol/L β -巯基乙醇(使用前根据裂解液的体积按 2% 加入)。

③ 2 mol/L, pH 4.0 的乙酸钠、等体积的水饱和酚(用等体积的 DEPC 处理过的无菌水饱和重蒸酚, 加入 8-羟基喹啉至终浓度 0.1%)、氯仿/异戊醇(24:1)。

④ 盐酸胍匀浆液: 7.4 mol/L 盐酸胍、25 mmol/L 柠檬酸钠、0.5 mmol/L DTT(使用前加入)、1 mol/L 乙酸(使用前加入)。

⑤ 95% 的冰乙醇、75% 的乙醇。

⑥ DEPC 处理的无菌水: 双蒸水加入 DEPC 至终浓度为 0.1%, 于 37℃ 放置 12 h 后高压灭菌。

1.3 实验步骤

1.3.1 虫体的富集 本实验中用 5 个直径 10 cm 的培养皿进行扩大培养, 富集冠突伪尾柱虫约 10^4 个细胞。将虫体移入 50 ml 的离心管中, 4 ~ 8℃ 300 g, 低速离心 3 ~ 5 min, 弃上清液, 余约 2 ml; 分别移入 2 个 1.5 ml, 加预冷的无菌 Pringsheim 培养液, 4 ~ 8℃ 300 g, 低速离心 2 min, 弃上清液; 反复 2 ~ 3 次以去除虫体体表及水中的少数唇滴虫、细菌和杂质; 最后一次离心后余液, 加 100 μl 预冷的 Pringsheim 培养液, 让细胞均匀悬浮。

1.3.2 总 RNA 的提取

① 向富集的样品加入 500 μl 裂解液进行裂解。需用 1 ml 的注射器反复抽打裂解液, 使其充分裂解, 然后迅速转移到一个新的经 DEPC 处理的 2 ml 的 Eppendorf 管中。

② 向裂解液中加入 0.1 体积乙酸钠、等体积的水饱和酚、0.2 体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提液, 混匀后冰上放置 15 min。

③ 4 ~ 8℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 使 RNA 留在水相, 而 DNA 和蛋白质进入有机相。转移上清液到一个

新的经 DEPC 处理的 2 ml 的 Eppendorf 管中。

④ 用等体积的异丙醇初步沉淀水相中的 RNA, -20℃ 放置 1 h 后, 4 ~ 8℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 丢弃上清液。

⑤ 用 0.3 ml 的盐酸胍匀浆液(使用前加 10 μl DTT, 15 μl 1 mol/L 乙酸)、0.2 ml 无水乙醇, 重新悬浮沉淀。-20℃ 放置 2 h, 4 ~ 8℃, 12 000 r/min 离心 20 min 进一步除去残留的 DNA 和蛋白质。

⑥ 75% 乙醇洗涤沉淀 2 ~ 3 次, 以除去残留的盐酸胍, 干燥后将其溶于适量的 DEPC 处理的无菌双蒸水, -70℃ 保存。

1.4 总 RNA 质量检测

1.4.1 总 RNA 完整性的检测 只检测总 RNA 的完整性无需分离 mRNA 时, 可只需进行非变性琼脂糖凝胶电泳, 操作简便而且灵敏度高。以 28S 和 18S rRNA 不出现拖尾为标准, 由于总 RNA 中 rRNA 占 90%, 所以在电泳图上看到的是 28S 和 18S rRNA, mRNA 呈弥散状分布其间^[6]。利用该方法检测所提取的总 RNA 的完整性, 电泳槽和梳子在使用前先用 3% 的双氧水处理 10 ~ 30 min 后, 再用 DEPC 处理的水洗涤 2 次, 所得结果见图 1。



图 1 改进法提取总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

1.4.2 总 RNA 均一性的检测 采用紫外分光光度法检测所提取总 RNA 的均一性。用等体积的浓盐酸: 甲醇浸泡比色杯 1 h, 用 DEPC 处理的无菌水彻底冲洗, 取 2 μl 样品稀释到 80 μl , 分别读出 230、260、280 nm 处的光吸收值。

1.4.3 总 RNA 纯度的检测

① 利用 RT-PCR 方法检测是否存在大核 DNA 污染: 对腹毛目纤毛虫分子生物学研究表明, 细胞内大核基因组是小核基因组的几千倍。小核为二倍体, 具有染色体, 电泳时由于分子量较大, 染色体条带不易分开

为 $2 \sim 4 \mu\text{g}/10^4$ 细胞。

总 RNA 的提取是分子生物学的基本技术之一,所提取的总 RNA 质量高低会直接影响后继实验的结果^[2],Sommerville 用氯化铯离心沉淀法所提取的草履虫的 RNA 纯度高,质量好,但这种方法需要超速冷冻离心机和超低温冰箱^[4],而且该方法提取的 RNA 容易丢失一些短链。酸性异硫氰酸胍,酚-氯仿一步法以及此基础上改进的 TRIzol 试剂法,虽然操作简便,不需要复杂的设备,但将其用于提取大型纤毛虫的 RNA 时,发现不能充分去除残留的 DNA 和蛋白质。成功提取高质量的总 RNA 的关键是抑制 RNase 的活性,因此根据这一原理,在参考多种方法的基础上加以改进。改进之处:1)提高变性液中各成份的浓度,以使在细胞破碎后就强烈抑制了其 RNase 酶活性;裂解时的操作方法是:将 1 ml 枪头改用 1 ml 的注射器进行反复抽打裂解液,使其裂解充分,结束后迅速将裂解液转移到另一干净的经 DEPC 处理的离心管,以避免原离心管壁残留的 RNase 的干扰;2)异丙醇沉淀 RNA 后,改用盐酸胍匀浆液,乙酸和乙醇再沉淀一次,实验结果表明,这一步的确能有效地去除 DNA、多糖和蛋白质。进一步用上述 RNA 做钙调蛋白的 mRNA 表达的 RT-PCR 试验,同样得到了理想效果(图 4),得到的条带清晰无拖尾,表明此方法提取的 mRNA 结构完整,可完全满足基因表达分

析、cDNA 文库构建等实验。另外在实验过程中,研究者还根据纤毛虫细胞体积,适当增加变性匀浆液中乙酸钠的用量。如果样品细胞数小于 10^4 ,可在异丙醇沉淀前加入 $8 \sim 10 \mu\text{g}$ 肝糖原(Glycogen)载体,它能与 RNA 共同沉淀下来以提高 RNA 的产率,而且其在终浓度小于 2 mg/ml 时不会影响 RT-PCR 实验结果。

参 考 文 献

- [1] 宋微波,徐奎栋,施心路等.原生动动物学专论.青岛:青岛海洋大学出版社,1999,362.
- [2] 卢圣栋主编.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993,318 ~ 320.
- [3] 萨姆布南克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.[美](金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1992,463 ~ 469.
- [4] Sommerville J. Isolation and translation of mRNA coding for the variant surface antigens of *Paramecium*. *Nucleic Acids Res*, 1983,11: 7 375 ~ 7 385.
- [5] 金立培,金华中.冠突伪尾柱虫小核对胞口结构稳定性的影响.动物学报,2002,48 (2):258 ~ 263.
- [6] Rohrwild M. DDRT-PCR Manual Book. Hedelberg Springer-Verlag, 1998,56 ~ 58.
- [7] Prescott M. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev*, 1994, 58: 233 ~ 267.