

# 胡枝子高质量 RNA 的提取及 ALMT 基因片段的克隆和表达分析<sup>①</sup>

陈志长<sup>1,2</sup>, 赵学强<sup>1</sup>, 沈仁芳<sup>1\*</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 针对木本植物胡枝子组织中多糖、多酚等次生物质含量高的特点, 采用改良的 CTAB 法, 成功地从胡枝子组织中提取了总 RNA。所提取的胡枝子总 RNA  $OD_{260}/OD_{280}$  值介于 1.9~2.1 之间, 产率介于 100~250  $\mu\text{g/g}$  之间。采用该方法提取的胡枝子总 RNA, 经过 RT-PCR 成功地克隆到了胡枝子 ALMT 基因片段, 克隆得到的胡枝子 ALMT 基因片段序列与已知 ALMT 基因序列之间具有较高同源性, 经半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 表达分析, 证明该基因在根中表达且受铝诱导。试验结果表明利用改良的 CTAB 法提取的胡枝子总 RNA 样品质量较高, 能够用于基因的半定量和定量表达分析。

**关键词:** 胡枝子; 改良 CTAB 法; RT-PCR; ALMT 基因; 铝

**中图分类号:** S541+.5

胡枝子是一种多年生豆科灌木, 耐寒, 耐旱, 广泛适应于酸性土壤<sup>[1]</sup>。胡枝子不仅能够短时间内增加土壤有机质含量, 还能够通过共生固氮的作用增加土壤含氮量, 从而大大增强土壤肥力, 因此常用作土壤改良<sup>[2]</sup>。

由于胡枝子属于木本植物, 具有比动物、微生物以及草本植物更为厚实的细胞壁, 并且组织中多酚、多糖等次生代谢物的含量较高<sup>[3]</sup>, 利用传统的 CTAB 方法来提取胡枝子 RNA 的效果不太理想。RNA 质量的好坏直接影响后期分子试验的进展<sup>[4]</sup>, 因此一个好的提取 RNA 的方法对于胡枝子来说就至关重要。本试验参考胡根海等<sup>[5]</sup>和沈乾等<sup>[6]</sup>的方法, 提出一种高质量提取胡枝子总 RNA 的方法, 比起传统的 CTAB 方法<sup>[7]</sup>和昂贵的 RNA 试剂盒方法, 本方法具有效果好, 成本低, 安全性高的优点。

植物 ALMT (aluminum-activated malate transporter) 基因是编码位于细胞膜上的苹果酸转运蛋白的基因, 该苹果酸转运蛋白具有在铝诱导下将苹果酸从膜内转运到膜外的功能<sup>[8]</sup>, 通过苹果酸与铝在细胞膜外的络合作用, 形成无毒的络合物, 从而使土壤中的铝对植物的毒害大大降低<sup>[9]</sup>。目前国内外学者已经从小麦、拟南芥、油菜和大豆等植物中克隆到了 ALMT 基因<sup>[8,10,11-12]</sup>。胡枝子通过根分泌有机酸来解铝毒, 是胡

枝子最主要的耐铝机制之一<sup>[13]</sup>, 而胡枝子有机酸分泌的分子机制却一直未见报道。本试验尝试采用改良后的 CTAB 法提取的 RNA, 用其逆转录后的 cDNA 来扩增胡枝子 ALMT, 并对其进行初步的半定量和定量表达分析, 由此来检验提取的总 RNA 的质量, 并为进一步扩增胡枝子 ALMT 基因全长和研究其功能, 探讨胡枝子耐铝的分子机制打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料和培养方法

供试材料为中国江西二色胡枝子株系 (*Lespedeza bicolor* Turcz cv. Jiangxi), 取自中国科学院鹰潭生态实验站, 是一种耐铝胡枝子品种<sup>[13]</sup>。种子经浓硫酸处理 10 min 左右, 冲洗数次, 以去除表面附着的硫酸, 放入蒸馏水中浸泡过夜, 选取吸水胀大的种子放入衬有滤纸的培养皿中催芽 2~3 天。幼芽至 2~3 cm 时, 移至盛有 2.5 L  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mmol/L, pH 4.5) 溶液培养 5~7 天后, 选取较为一致的幼苗在含有  $\text{AlCl}_3$  (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mmol/L, pH 4.5) 溶液中处理 3 h, 分别提取根部和地上部总 RNA, 并作无铝对照处理。育苗整个过程在光照培养室中进行。植物生长室条件: 温度为  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 70%, 光强为 375  $\mu\text{mol photon}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 昼夜循环为光 14 h/黑暗 10 h。

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40871144, 30821140538) 和中国科学院南京土壤研究所知识创新工程领域前沿项目 (ISSASIP0706) 资助。

\* 通讯作者 (rfshen@issas.ac.cn)

作者简介: 陈志长 (1985—), 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事分子植物营养研究。E-mail: zcchen@issas.ac.cn

## 1.2 试剂配制

提取液: 2% CTAB (w/v), 4% PVP (w/v), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol/L EDTA (pH 8.0), 2 mol/L NaCl, 0.05% 亚精胺, 2%  $\beta$ -巯基乙醇 (用时加入)。SSTE 缓冲液: 1 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA。

## 1.3 试剂准备

试验中所需的塑料制品均用 0.1% DEPC 水室温过夜处理, 然后高温高压灭菌 1 h 备用, 所需的玻璃和金属物品等则用烘箱 250℃ 烘烤 3 h 以上。

## 1.4 方法

**1.4.1 总 RNA 的提取** ①取样品约 100 mg, 用液氮快速研磨成粉末, 转入 2 ml 离心管, 加入 65℃ 预热的提取液 1 ml, 再加 20  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇, 65℃ 温浴振荡 20 min; ②加入等体积的氯仿:异丙醇 (24:1) 混匀, 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 重复一次; ③转移水相到另一离心管中, 加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 混匀后, 4℃ 沉淀 6 ~ 16 h; ④4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 倒掉上清, 试管倒扣在滤纸上风干 2 ~ 5 min; ⑤向试管中加入 42.5  $\mu$ l 的 DEPC 水溶解沉淀, 再加入 5  $\mu$ l 10 $\times$ DNase I Buffer, 2  $\mu$ l DNase I (5 U/ $\mu$ l, TAKARA) 和 0.5  $\mu$ l RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l, TAKARA), 37℃ 反应 30 min; ⑥加入 500  $\mu$ l SSTE 缓冲液混匀, 再加入等体积的氯仿:异丙醇 (24:1) 抽提一次, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min; ⑦吸取上清, 加入 2 倍体积的无水乙醇, -80℃ 静置 30 min 或 -20℃ 静置 2 h; ⑧4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 弃上清液, 用 1 ml 75% 的乙醇洗涤; ⑨4℃, 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 风干后加入 30 ~ 50  $\mu$ l DEPC 水, -80℃ 保存备用。

**1.4.2 RNA 完整性和纯度分析** 用 1 $\times$ TAE 配制 2.0% 琼脂糖凝胶, RNA 上样量为 3  $\mu$ l, 在 120 V 下恒压电泳 20 min, 经 EB 染色 15 min 后在 Bio-rad 紫外凝胶成像系统中观察分析 RNA 的质量; 吸取 RNA 样品 2  $\mu$ l, 稀释 50 倍到 100  $\mu$ l, 于 Bio-rad Smart Spec3000 紫外分光光度计上检测分析纯度及浓度。

**1.4.3 RT-PCR** 取 RNA 1  $\mu$ g, 用反转录酶 MMLV (TAKARA) 合成第一条 cDNA (20  $\mu$ l 体系), 取 1/10 体积 cDNA 用于 PCR 扩增, 扩增体系为 (25  $\mu$ l): cDNA 2  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 (+Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ l, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 的上游引物 ALMT1 (5'-ATAA-AGGCAAGATATGACTATG-3') 和下游引物 ALMT2 (5'-GAAGCAACCAACTTGTGAA-3') 各 0.5  $\mu$ l, r-Taq 酶 (TAKARA) 1.25 U。利用 ABI-9700 PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s、55℃ 30

s、72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 保温 10 min。反应结束后点样 5  $\mu$ l 于 2.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

**1.4.4 实时荧光定量 PCR** 取 RNA 1  $\mu$ g, 用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent 试剂盒 (TAKARA) 合成第一条 cDNA (10  $\mu$ l 体系), 稀释至 50  $\mu$ l 后再取 5  $\mu$ l 用于定量 PCR, 扩增体系为 (25  $\mu$ l): SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 12.5  $\mu$ l, cDNA 5  $\mu$ l, 引物 ALMT1 和 ALMT2 各 1  $\mu$ l。利用 Cyclex instrument (MJ) 定量 PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。18S rRNA 作为外参 (正义引物: 5'-CCAGGTCCAGACATAGTAAG-3'; 反义引物: 5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3')。样品拷贝数的计算公式为:  $N_N = N_{0(\text{sample})} \times N_{0R} / N_{0(18S \text{ rRNA})}$ , 其中,  $N_N$  代表标准化以后样品的拷贝数;  $N_{0(\text{sample})}$  代表未知样品从标准曲线上得来的拷贝数;  $N_{0R}$  代表参照样品的拷贝数 (我们以没有经过铝处理的样品作为参照样品);  $N_{0(18S \text{ rRNA})}$  代表未知样品中 18S rRNA 的拷贝数。

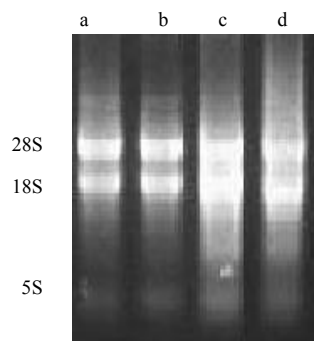
## 1.5 数据处理

数据分析采用 SPSS13.0 软件处理。

## 2 结果分析

### 2.1 胡枝子总 RNA 质量检测

为了检测提取的 RNA 的质量, 将利用改良的 CTAB 方法提取的总 RNA 和利用传统的 CTAB 方法提取的总 RNA 于琼脂糖凝胶上电泳, 结果显示改良的 CTAB 方法提取的总 RNA 呈现 3 条带, 其中 28S 的亮度大约是 18S 的 2 倍, 而传统的 CTAB 法提取的总 RNA 条带不清晰, 呈现弥散状态 (图 1)。紫外分光光度计检测结果得出, 采用改良 CTAB 法所提取的胡枝子根和地上部总 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值分别为 2.06 和 2.03, 产率为 135  $\mu$ g/g 和 170  $\mu$ g/g, 说明 RNA 样品质量较好, 可用于进一步分析。



(a. 改良的 CTAB 法, 根; b. 改良的 CTAB 法, 地上部; c. 传统 CTAB 法, 根; d. 传统 CTAB 法, 地上部)

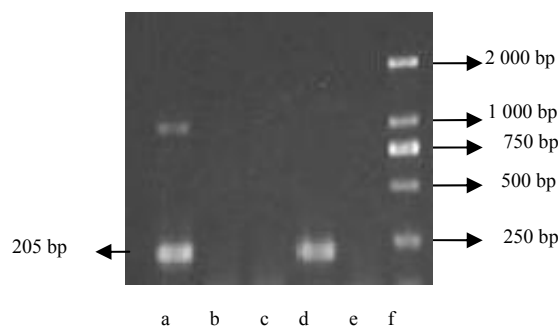
图 1 胡枝子 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA from *Lespedeza bicolor*

## 2.2 胡枝子 ALMT 基因的克隆

本试验以改良的 CTAB 法提取的胡枝子 RNA 为模板, 利用已知物种的 ALMT 基因保守序列设计引物, 经 RT-PCR 扩增出预期的 205 bp 大小的 PCR 片段 (图 2)。该片段条带清晰, 无非特异性扩增。将该条带回收纯化并克隆到 pMD18-T 载体上, 由六合华大基因生物公司进行测序。

为了验证获得的片段是否为胡枝子 ALMT 基因片段, 我们利用与胡枝子亲缘关系最近的大豆的 ALMT 基因序列与本试验克隆到的胡枝子 ALMT 基因片段进行同源性分析, 结果表明该 ALMT 片段与大豆 ALMT 基因的 467-671 区域核酸序列同源性达到 89% (图 3a), 其对应的氨基酸序列同源性达到 88% (图 3b), 表明本试验获得的基因片段属于胡枝子 ALMT 基因片段。



(a. +Al, 根, 未经 DNase I 处理; b. -Al, 根; c. -Al, 地上部; d. +Al, 根; e. +Al, 地上部; f. DL2000 marker)

图2 胡枝子 ALMT 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 Results of RT-PCR amplification of ALMT in *Lespedeza bicolor*

a.

胡枝子ALMT	:	1	TAAAGGCAAGATATGACTATGGAGTGGTGATATTTATATTGACATTCT	48
大豆ALMT	:	467	TCAAGCAAAGATATGATTATGGGATTGTGGTATTTATATTGACATTTT	514
胡枝子ALMT	:	49	GTTTGGTTACTGTGTCGGGGTACAGAGTGGAAAACTCTTTGAGCTTG	96
大豆ALMT	:	515	GTTTGGTCGCTGTCTCGGGTTATAGAGTGGGAAGAACTCTTCGAGCTTG	562
胡枝子ALMT	:	97	CCCATGAGAGACTTTCAACAATTTTACTAGGAGGAGCAGCTTGCAATGG	144
大豆ALMT	:	563	CCCATCAGAGACTTTCAACAATTTTATTAGGAGCAGCAGCTTGCAATGG	610
胡枝子ALMT	:	145	TCACTCTCCATTTTCATTTGTCCAGTGTGGGCAGGTGAAGATCTTCACA	192
大豆ALMT	:	611	TCACTCTCCATTTTCATTTGTCCAGTGTGGGCAGGTGAAGACTTTTCACA	658
胡枝子ALMT	:	193	AGTGGTTGCTTC	205
大豆ALMT	:	659	AGTGGTGGCTTC	671

b.

胡枝子ALMT	:	1	KARYDYGWVIFILTFCLVTVSGYRVEKLFELAHRLSTILLGGAACMV	48
大豆ALMT	:	157	KQRYDYGIVVFILTFCLVAVSGYRVEELFELAHQRLSTILLGAAACMV	204
胡枝子ALMT	:	49	ISIFICPVWAGEDLHKLVA	67
大豆ALMT	:	205	ISIFICPVWAGEDFHKLVA	223

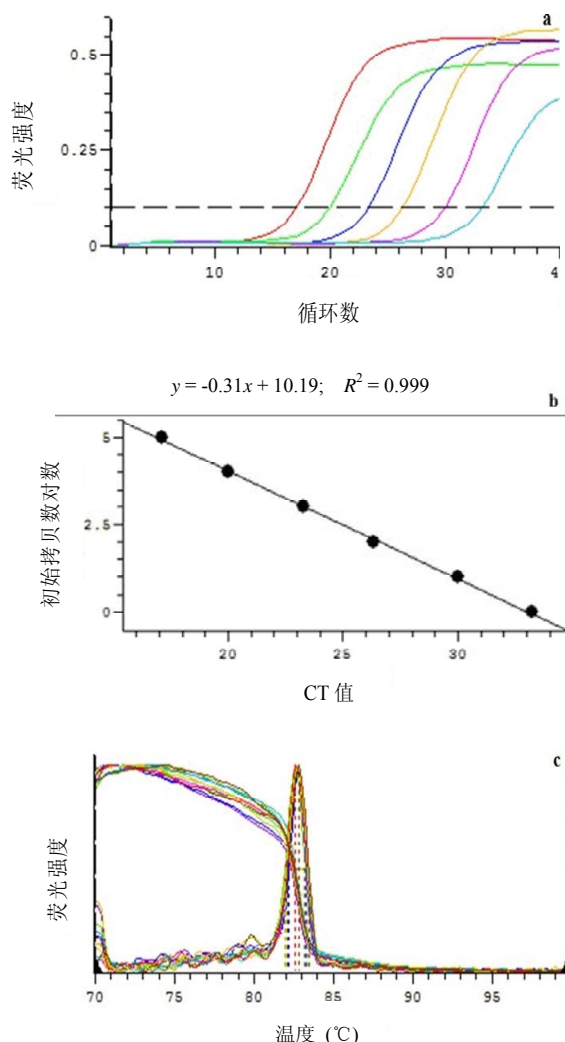
(a. 核酸序列同源性比对; b. 氨基酸序列同源性比对)

图3 胡枝子和大豆 ALMT 基因片段的同源性分析

Fig. 3 Homological analysis of *L. bicolor* ALMT fragment with soybean

### 2.3 胡枝子 ALMT 基因的表达分析

RT-PCR 结果看出, 胡枝子 ALMT 基因只有在铝处理的条件下在根部才能得到表达 (图 2), 说明该基因表达受到铝的诱导, 并具有组织特异性。从表 1 的定量 PCR 结果可以看出, 铝处理后胡枝子根部 ALMT 基因的表达量明显高于未加铝处理的根和地上部以及铝处理的地上部, 并达到极显著差异。图 4 结果表明, PCR 扩增曲线良好 (图 4a), 标准曲线相关性非常高 (图 4b), 溶解曲线图出现单峰曲线 (图 4c), 说明该基因表达特异性很好, 没有非特异性产物或引物二聚体的干扰。荧光定量 PCR 的结果同时也说明了该方法提取的 RNA 的质量和纯度都已经符合后续的 mRNA 的表达分析。



(a. 扩增曲线; b. 标准曲线; c. 溶解曲线)

图 4 胡枝子 ALMT 基因定量 PCR 条件的建立

Fig. 4 Parameters of quantitative real-time PCR amplification of ALMT in *Lespedeza bicolor*

表 1 胡枝子 ALMT 基因的实时荧光定量 PCR 结果

Table 1 Results of quantitative real-time PCR amplification of ALMT in *Lespedeza bicolor*

处理	组织部位	ALMT 基因拷贝数
-Al	地上部	3.35 ± 1.43
	根部	26.9 ± 8.34
+Al	地上部	4.33 ± 0.24
	根部	344 ± 36.2**

注: \*\* 表示加铝根部基因拷贝数极显著高于另外 3 个处理基因拷贝数 ( $p < 0.01$ )。

### 3 结论与讨论

提取木本植物的 RNA 一般比其他植物的 RNA 要困难, 提取过程也相对比较复杂和繁琐, 本实验采用的提取方法主要消除了以下几个因素对 RNA 质量的影响, 从而提高胡枝子总 RNA 的提取质量。

(1) 多酚, 多糖。多酚物质在酸性 pH 条件下 (pH 4~6), 极易被氧化成为多元醌, 这种红褐色的化合物能与核酸不可逆结合, 从而引起核酸的降解或不能溶解于水相中<sup>[14]</sup>。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似, 所以很难将它与 RNA 分开。多糖会形成难溶的胶状物, 与 RNA 共沉淀, 沉淀难溶于水或溶解后产生粘稠状的溶液, 极大影响 RNA 的质量<sup>[15]</sup>, 多糖还可以抑制多种酶的活性<sup>[16]</sup>, 因此污染了多糖的总 RNA 样品对于后期的分子生物学研究会带来麻烦。本方法在提取液中加入 PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇, 用来防止多酚的氧化。 $\beta$ -巯基乙醇不但可以作为强还原剂防止多酚氧化, 还可以打断多酚氧化酶的二硫键使之失活<sup>[17]</sup>。PVP 作为多酚化合物的螯合剂, 具有很强的结合酚能力, 使之不能被氧化成醌类, 减少了 RNA 的损失<sup>[18]</sup>; 二者协同作用, 有效抑制了酚类物质对 RNA 提取的影响。同时在分离过程中利用高浓度的 LiCl 选择性沉淀总 RNA, 使 RNA 与残留的多糖、多酚及蛋白质等杂质分离, 起到了很好的纯化效果<sup>[19]</sup>。

(2) RNA 酶。RNA 酶基本上无处不在, 高温高压灭菌处理也很难将其消除<sup>[20]</sup>, 所以控制 RNA 酶的污染是实验的关键。该方法的提取液中加入的  $\beta$ -巯基乙醇, EDTA 和亚精胺都能够有效地抑制内源 RNA 酶的活性。实验过程中所用的试剂药品和器皿都是专用并且是用 0.1% DEPC 水处理再经高压灭菌后使用。此外, 操作在事先经过紫外杀菌的超净工作台内完成, 并于冰上操作, 尽量缩短实验进程, 从而达到防止 RNA 的降解的目的<sup>[21]</sup>。

(3) 基因组 DNA。所有提取 RNA 的方法都无法避免基因组 DNA 的残留<sup>[20]</sup>, 而要进行严格 mRNA 表达分析如荧光定量 PCR 时, 必须进行去 DNA 的纯化步骤, 因此繁琐的纯化步骤也会带来 RNA 加速降解的危险。本实验方法省去了 RNA 提取后进一步除去 DNA 的纯化步骤, 不仅减少了 RNA 的损失, 而且有效地降低了 RT-PCR 扩增时假阳性条带的出现。本实验以未经 DNase I 处理的 RNA 为模板, RT-PCR 后发现多了 1 000 bp 左右的非特异性条带 (图 3), 说明在步骤 5 进行 DNase I 处理有明显去除 DNA 的效果。

(4) pH。合适的 pH 值是体内各种酶反应的必要条件。本方法采用 pH 值较高的提取缓冲液 (pH = 8.0), 能够抑制多酚氧化酶和 RNA 酶的活性, 从而防止多酚的氧化和 RNA 的降解。

利用传统的 RNA 提取方法, 经多次提取胡枝子总 RNA, 结果都是产率不高, 且降解严重。通过改良的 CTAB 法提取的总 RNA, 多次提取后的 RNA 产率维持在 100 ~ 250 µg/g 之间, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值介于 1.9 ~ 2.1 之间, 且条带清晰。后期的半定量和定量 RT-PCR 结果也证明该方法提取的胡枝子总 RNA 质量已经符合后续分子生物学研究。

植物的 ALMT 蛋白对于酸性土壤上植物抵抗铝毒起到至关重要的作用, 研究者们通过基因工程和分子标记育种等手段, 不仅能有效地提高酸性土壤上作物的产量, 而且可以从植物的角度出发去解决土壤酸化带来的问题<sup>[22]</sup>。因此, 对该基因的深入研究具有重要的意义。目前国内外对该基因的研究已经取得了不小的进展。自从 Delhaize 等<sup>[23]</sup>证明了铝诱导的有机酸分泌与植物抗铝紧密相关以来, 大量的学者对铝调控有机酸的分泌机理进行了深入的研究。2004 年, Sasaki 等<sup>[8]</sup>成功地从小麦中克隆到铝诱导的苹果酸转运蛋白基因 *TaALMT1*, 并通过在蟾蜍卵母细胞、水稻和烟草细胞中的异源表达验证了该基因转运苹果酸的功能。虽然需要铝激活该蛋白才能促进苹果酸的释放, 但 *TaALMT1* 基因表达不受铝的诱导。随后在拟南芥和油菜中也陆续发现了与 *TaALMT1* 相似的基因 *AtALMT1* 和 *BnALMT1/BnALMT2*, 但有趣的是, 铝同时也激活了 *AtALMT1* 和 *BnALMT1/BnALMT2* 基因的表达<sup>[10-11]</sup>。Ma<sup>[24]</sup>根据铝胁迫与有机酸分泌的时间响应关系, 将有机酸分泌分为两类模式: 第一类以小麦、荞麦为代表, 此类植物可快速对铝胁迫作出反应, 在短时间内向介质释放有机酸; 第二类以玉米、决明为代表, 这类植物对铝胁迫的反应有明显的滞后期, 一般需要数小时的铝处理后才会有明显的有机酸分泌。因此, 我们不难

联想到, 铝对 ALMT 基因的两种激活模式可能与有机酸的两种分泌模式有关, 这也是目前国内外学者正在深入探讨的问题。

本研究得到了胡枝子 ALMT 基因片段, 并初步表明其在根系表达且受铝诱导, 说明在胡枝子中确实也存在铝诱导的有机酸跨膜转运的机制, 这为进一步扩增其全长和研究其功能, 阐明胡枝子耐铝的分子机制打下了基础。

## 参考文献:

- [1] 杨艳生, 刘柏根, 沙寄石. 水土资源恢复中的先锋豆科灌木——胡枝子 (*Lespedeza bicolor*) 的栽植研究. 长江流域资源与环境, 1994, 3(4): 330-336
- [2] 李延安, 贾黎明, 杨丽. 胡枝子应用价值及丰产栽培技术研究进展. 河北林果研究, 2004, 19(2): 185-192
- [3] Wilkins TA, Smart LB. Isolation of RNA from plant tissue // Krieg PA. A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis. New York: Wiley-Liss Inc., 1996, 34-38
- [4] Katterman FRH, Shtuck VI. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amount of phenolic terpenoids and tannins. Prep. Biochem., 1983, 13: 347-359
- [5] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA. 棉花学报, 2007, 19(1): 69-70
- [6] 沈乾, 夏国华, 张秋月, 黄有军, 郑炳松, 王正加. 山核桃花芽总 RNA 提取方法研究. 浙江林业科技, 2009, 29(3): 57-60
- [7] Asif MH, Dhawan P, Nath P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. Plant Mol. Bio. Rep., 2000, 18: 109-115
- [8] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. Plant J., 2004, 37: 645-653
- [9] Kochian LV, Piñeros MA, Hoekenga OA. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. Plant Soil, 2005, 274: 175-195
- [10] Hoekenga OA, Maron LG, Cancado GMA, Piñeros MA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T. *AtALMT1* (*At1g08430*) is a novel, essential factor for aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* and encodes an aluminum-activated malate transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 9 734-9 743
- [11] Ligaba A, Katsuhara M, Ryan PR, Shibasaki M, Matsumoto H. The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the

- aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.*, 2006, 142: 1 294-1 303
- [12] Xu W, Zhou LH, Wang YX, Yan XL and Liao H. Molecular mechanisms of organic acid exudation as affected by phosphorus and aluminum interaction in soybean // Liao H, Yan XL, Kochian LV. *Plant-soil interactions at low pH: A nutriomic approach*. Guangzhou, South China University of Technology, 2009: 88-89
- [13] Dong XY, Shen RF, Chen RF, Zhu ZL, Ma JF. Secretion of malate and citrate from roots is related to high Al-resistance in *Lespedeza bicolor*. *Plant Soil*, 2008, 306: 139-147
- [14] Schneiderhaner A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal. Biochem.*, 1991, 197: 91-95
- [15] 孙德权, 郭启, 胡玉林, 谢江辉. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA. *广东农业科学*, 2009, 5: 162-164
- [16] Fang G, Hammar S, Grument R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques*, 1992, 13: 52-56
- [17] Chang S, Puryear J, Caimey J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Repr.*, 1993, 11(2): 113-116
- [18] Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.*, 1974, 31: 528-545
- [19] 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理. *东北林业大学学报*, 2002, 30(2): 1-4
- [20] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 582-583
- [21] 刘晓菊, 洪海波, 李敏, 刘媛, 杨克强. 改良 CTAB 法提取核桃总 RNA 试验. *山东农业科学*, 2008, 1: 97-99
- [22] Emmanuel D, Benjamin DG, Peter RR. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2 255-2 262
- [23] Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.*, 1993, 103: 695-702
- [24] Ma JF. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plants. *Plant Cell Physiol.*, 2000, 44: 383-390

## Extraction of Total RNA and Cloning and Expression of ALMT Gene Fragment in *Lespedeza bicolor*

CHEN Zhi-chang<sup>1,2</sup>, ZHAO Xue-qiang<sup>1</sup>, SHEN Ren-fang<sup>1</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture ( Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The total RNA from the root and shoot of woody plant *Lespedeza bicolor*, which had plenty of polysaccharides and polyphenols were extracted by improved CTAB method. The values of OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> of the extracted RNA were between 1.9-2.1, the yields were between 100-250 µg/g FW. ALMT gene fragment was successfully amplified from cDNAs reverse-transcribed from the total RNA and its expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR. The sequence of the cloned ALMT gene fragment in *Lespedeza bicolor* was highly identical to other species' ALMT gene sequences. This gene was Al-inducing and mainly expressed in roots. These results showed that the total RNA extracted from *Lespedeza bicolor* by this method was of high quality, and could be used for the following study on gene expression.

**Key words:** *Lespedeza bicolor*, Improved CTAB method, RT-PCR, ALMT, Al