

刘 波,张晓明,郭巧生,等. 百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.013

百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化

刘 波,张晓明,郭巧生,王长林

(南京农业大学中药材研究所,江苏南京 210095)

摘要:百蕊草根系富含多糖、多酚和其他次生代谢产物,用传统方法提取总 RNA 难以有效将这些杂质去除。以百蕊草根系为材料,比较 TRIzol 法、CTAB-LiCl 法、SDS/酚法及改进 TRIzol 法 4 种方法对百蕊草根系总 RNA 的提取效果,并以电泳检测、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值测定、RT-PCR 试验等对结果进行分析评价。结果表明,4 种方法均能提取百蕊草根中总 RNA,提取效果差异显著;改进 TRIzol 法提取总 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰,无弥散,28S 亮度比 18S 加倍,完整性好,无明显 DNA 或其他杂质污染, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值为 1.8~2.0, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值大于 2.0,总 RNA 得率仅次于 TRIzol 法;用改进 TRIzol 法提取总 RNA,反转录 cDNA 片段大小分布在 0.2~2.5 kb,可扩增出目的基因片段,提取的总 RNA 完全适用于后续的分子生物学研究。

关键词:百蕊草;总 RNA 提取;多糖;多酚;TRIzol 法;RT-PCR

中图分类号: Q522 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0044-03

百蕊草(*Thesium chinense* Turcz.)为檀香科百蕊草属半寄生植物,全草入药,具有清热解毒、止咳化痰等功效^[1],被称为植物抗生素^[2],具有重要的药用价值。百蕊草根系可形成寄生根侵入寄主植物^[3-4],通过寄生根从寄主植物获得水分和养分。目前,对百蕊草的研究主要集中在药理成分、提取工艺、组织培养等方面^[2,5-9],在分子水平上的研究较少,至今未见有关百蕊草根系总 RNA 提取方面的报道。

植物组织 RNA 的提取是开展后续植物分子生物学研究的必要前提。进行 RT-PCR、cDNA 合成、Northern 印迹杂交、SSH 筛选差异基因等分子生物学相关研究,均需要完整性好、纯度高的 RNA。因此,如何提高 RNA 纯度和经济快捷获得足够量的 RNA 是当前研究人员十分关注的问题。百蕊草根系化学成分复杂,富含多糖及酚类物质^[10]。酚类化合物容易氧化产生褐化效应^[11],在 RNA 提取过程中与 RNA 不可逆结合,导致 RNA 降解或 RNA 活性丧失^[12];多糖能与 RNA 共沉淀形成难溶的胶状物,抑制许多酶的活性^[13]。为此,本试验开展 TRIzol 法、CTAB-LiCl 法、SDS/酚法^[14-16]、优化改进 TRIzol 法提取百蕊草根系总 RNA 研究,以期筛选出一种理想的百蕊草根系 RNA 提取方法,为今后利用分子生物学研究百蕊草寄生机理提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生百蕊草采集于南京市附近,选挖长势良好的植株,清洗根系,立即投入液氮中冷冻保存,备用。原植物经南京农业

大学郭巧生教授鉴定为檀香科植物百蕊草。

1.2 总 RNA 提取方法

1.2.1 TRIzol 法 取 0.1 g 植物组织,在液氮中研磨至粉末状后转移到 1.5 mL 离心管中;加入 1 mL 预冷的 TRIzol,涡旋混匀,室温放置 5 min;加入 200 μL 氯仿,振荡 1 min,室温放置 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min;吸取上层水相至新离心管中,加入 500 μL 预冷的异丙醇,振荡混匀,室温放置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇,振荡,使沉淀浮起,悬浮 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 500 r/min 离心 5 min;弃置上清,空气中干燥 5 min,加入 50 μL ddH₂O 溶解,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 CTAB-LiCl 法 将 2 \times CTAB 提取液于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热;取 0.2 g 样品于液氮中研磨成粉末,转入 2 mL 离心管中,加 700 μL 提取液和 20 μL β -巯基乙醇,剧烈振荡混匀;65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,其间振荡数次,冷却到室温后加等体积比例为 25:24:1 的苯酚-氯仿-异戊醇混合液,充分振荡,冰浴 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;取上清至 2 mL 新离心管中,重复上述步骤,再抽提 1 次;取上清于 1.5 mL 离心管中,加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min;弃上清,沉淀用 500 μL ddH₂O 溶解,加等体积比例为 24:1 的氯仿-异戊醇溶液再抽提 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;上清液中加入 1/10 体积、pH 值为 5.2、浓度 3 mol/L 的乙酸钠和等体积预冷的异丙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 3 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,用 75% 乙醇清洗沉淀,室温干燥,ddH₂O 溶解,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 SDS/酚法 取 0.2 g 样品于液氮中研磨成粉末,加入 80 $^{\circ}\text{C}$ 预热的提取缓冲液 850 μL ;加入 PVP 和 β -巯基乙醇,充分混匀,冰浴 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min;上清液中加入 1/3 体积、pH 值为 4.8、浓度为 5 mol/L 的乙酸钾,冰浴 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min;上清液中加入等体积、比例为 24:1 的氯仿-异戊醇溶液,充分混匀,冰浴 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min;上清液中加入等体积

收稿日期:2014-03-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:81202867)。

作者简介:刘 波(1989—),男,浙江衢州人,硕士,主要从事药用植物栽培生理研究。E-mail:2011104175@njau.edu.cn。

通信作者:郭巧生,博士,教授,主要从事药用植物资源开发。E-mail:gqs@njau.edu.cn。

预冷异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 3 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清液, 用 600 μL 重悬缓冲液重悬沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 75% 乙醇清洗沉淀, 室温干燥, ddH_2O 溶解, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 改进 TRIzol 法 在 TRIzol 法基础上, 在加入 TRIzol 试剂的同时, 加入 20 μL β -巯基乙醇, 用异丙醇沉淀后, 加入 500 μL ddH_2O 溶解沉淀, 加入 1/4 体积的 10 mol/L LiCl 溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 6 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 沉淀用 500 μL ddH_2O 溶解, 加等体积比例为 24 : 1 的氯仿、异戊醇溶液再抽提 1 次, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min; 取上清, 加 1/10 体积 pH 值为 5.2、浓度为 3 mol/L 的乙酸钠和等体积预冷的异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 3 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 用 75% 乙醇清洗沉淀, 室温干燥, ddH_2O 溶解, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 总 RNA 质量检测

1.3.1 总 RNA 完整性检测 分别取由 4 种总 RNA 提取方法获得的百蕊草根系总 RNA, 在 1.2% 非变性琼脂糖凝胶上电泳检测, 3 次重复。

1.3.2 总 RNA 纯度及得率检测 用紫外分光光度计测定所提取 RNA 样品的 $D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 值, 计算 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$, 评价总 RNA 纯度; 同时, 测定总 RNA 浓度并计算得率。

1.4 改进 TRIzol 法提取总 RNA 完整性的 RT-PCR 检验

cDNA 第 1 链的合成参照 Thermo Scientific 公司 Rever-tAid First Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明书进行。采用 25 μL PCR 反应体系: 1 μL 逆转录产物, 1 μL TcActin 正向引物: 5' - ACCACTGCTGAGCGGAAA - 3', 1 μL 反向引物: 5' - CTGCAATGCCAGGGAACA - 3', 15.3 μL 灭菌 ddH_2O , 2.5 μL 10 \times PCR buffer, 2 μL 25 mmol/L MgCl_2 , 2 μL 2.5 mmol/L dNTP, 0.2 μL Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 28 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。反应完毕后取 5 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对总 RNA 完整性的影响

由图 1 可见, 4 种方法提取的总 RNA 完整性和基因组 DNA 残留程度有较大差异; TRIzol 法提取的 RNA 电泳条带清晰, 可见 28S、18S、5S 条带, 且 28S 的亮度较 18S 高, RNA 完整性较好, 但靠近电泳点样孔附近有亮斑, 可能存在蛋白质、糖类杂质残留; CTAB-LiCl 法提取的 RNA 电泳呈弥散分布, 28S 和 18S 处略微可见且亮度较高, 但条带不够清晰, 这说明此方法提取的 RNA 已经有所降解, 提取的 RNA 中可能存在基因组 DNA; SDS/酚法提取的 RNA 电泳弥散最为严重, 存在基因组 DNA 残留; 改进的 TRIzol 法提取的 RNA 电泳可见清晰的 28S 和 18S 条带, 且 28S 比 18S 亮度加倍, 且完整性好, 提取的 RNA 样品中无明显基因组 DNA 残留。

2.2 不同提取方法的总 RNA 纯度和得率

$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 是对提取的核酸纯度和产率进行定量分析的通用方法, 高纯度的 RNA 溶液 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 应介于 1.8~2.0 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 应大于 2.0。由表

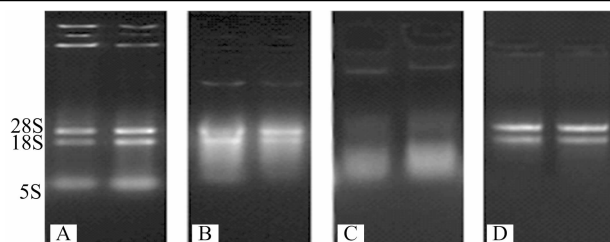


图1 不同方法提取的百蕊草根系总RNA电泳检测结果
A—TRIzol法; B—CTAB-LiCl法; C—SDS/酚法; D—改进TRIzol法

1 可见, TRIzol 法提取的 RNA 溶液 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 仅为 1.582, 可能存在蛋白质和酚等有机物残留, 纯度过低; CTAB-LiCl 法、SDS/酚法、改进 TRIzol 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 分别为 2.081、2.223、1.943, 均有效去除了蛋白质和酚等物质; CTAB-LiCl 法和改进 TRIzol 法 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 均大于 2.0, 即对酚类和糖类有机物有效去除; 4 种方法中, RNA 提取产率最高的为 TRIzol 法, 而 CTAB-LiCl 法、SDS/酚法、改进 TRIzol 法提取 RNA 的产率与 TRIzol 法相比, 依次约能达到 TRIzol 法的 70.3%、43.6%、73.1%。

表1 不同方法提取百蕊草根系总 RNA 纯度及得率

提取方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	得率 ($\mu\text{g/g}$)
TRIzol 法	1.582 ± 0.048	1.082 ± 0.070	189.073 ± 3.963
CTAB-LiCl 法	2.081 ± 0.059	2.332 ± 0.015	132.983 ± 2.455
SDS/酚法	2.223 ± 0.026	1.793 ± 0.007	82.367 ± 9.166
改进 TRIzol 法	1.943 ± 0.049	2.074 ± 0.033	138.168 ± 5.498

2.3 改进 TRIzol 法提取总 RNA 的完整性验证

以改进 TRIzol 法提取的总 RNA 为模板进行反转录, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可看出反转录的 cDNA 片段呈弥散分布, 大小主要集中在 0.2~2.5 kb (图 2)。该结果基本吻合植物 RNA 长度的一般范围, 反映该 cDNA 的模板 mRNA 比较完整, 提取的 RNA 质量较高, 可以满足后续分子生物学试验要求。

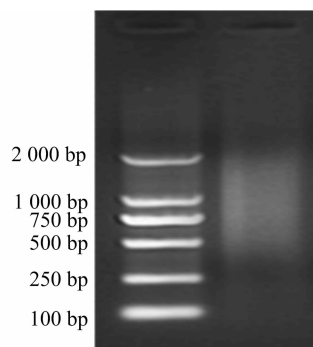


图2 改进 TRIzol 法提取总RNA反转录产物电泳检测结果

对百蕊草 *TcActin* 基因保守区序列进行 RT-PCR 扩增, 以进一步验证改进方法提取 RNA 的完整性。由图 3 可见, 百蕊草 *TcActin* 基因保守区序列能得到片段长度约为 330 bp 的扩增产物, PCR 产物经测序长度为 333 bp, 扩增片段长度与预计的檀香科 *Actin* 基因保守区序列长度一致, 这说明改进的 TRIzol 方法提取总 RNA 保持了表达基因的完整性。

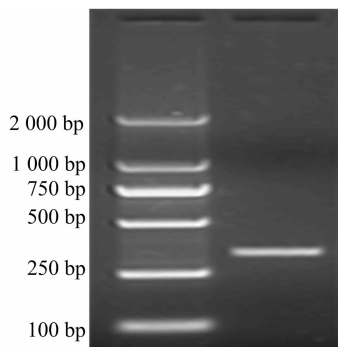


图3 *TcActin* 基因表达片段 RT-PCR 电泳检测结果

3 讨论

纯度高、完整性好的 RNA 是进行分子克隆及基因表达分析的基础^[17]。近年来,关于植物 RNA 提取方法的报道逐渐增多^[18-20]。由于多数植物材料成分复杂,特别是糖类和酚类等有机物质对 RNA 提取的干扰很大^[21-22]。酚类物质容易氧化形成褐色效应,与 RNA 不可逆结合,严重降低了 RNA 的质量和产率;含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水,即使通过加热等方式溶解,溶液也呈黏稠状。目前,去除多糖的方法主要有高浓度 NaCl 沉淀法、LiCl 沉淀法、乙酸钾沉淀法等。

TRIzol 试剂原本用于提取动物组织 RNA,因其操作步骤简便,全程只需 1~2 h,后被开发提取植物组织 RNA,且对多种植物组织 RNA 的提取十分有效^[18]。较高浓度的 CTAB 不仅对植物细胞具有良好的裂解作用,有效形成核蛋白与核酸的复合物,而且还能与 β -巯基乙醇联合作用使蛋白变性,抑制 RNA 酶的活性^[23]。CTAB 作为阳离子表面活性剂成分,从富含多糖、多酚材料中分离出高质量 RNA 已经在多种植物材料中得到验证。

传统 TRIzol 法提取的百蕊草根总 RNA 沉淀呈褐色,且很难溶于水中,稍加热溶解沉淀后有淡黄色的膜状物质,不能有效去除酚类和糖类物质,但是通过凝胶电泳检测发现,TRIzol 法提取的总 RNA 完整性良好,对 RNA 酶的抑制能力强,可有效避免降解;CTAB-LiCl 法获得的 RNA 沉淀沾水即溶,结合凝胶电泳及 OD 值测定,该方法可有效去除蛋白质、酚类、糖类等有机物质,但存在基因组 DNA 污染,且不能有效抑制 RNA 酶的活性,出现 RNA 降解,这意味着提取的失败。

结合 TRIzol 法能够有效抑制 RNA 酶活性和 CTAB-LiCl 法能有效去除蛋白质、酚类、糖类等有机物质的特点,优化百蕊草根总 RNA 提取方法,形成改进的 TRIzol 法,即在提取时加入 β -巯基乙醇,该物质不仅能打开蛋白酶的二硫键使酶失活,从而抑制酚类氧化酶和 RNA 酶的活性,也能与酚类产生竞争性氧化,可有效避免褐色现象^[24]。另外, LiCl 沉淀可去除部分多糖,多次的酚/氯仿抽提也基本去除了蛋白质、酚类、糖类等有机物质。改进 TRIzol 法提取总 RNA,虽然 RNA 的得率有所降低,但获得的 RNA 质量高,可以满足后续分子生物学试验。

参考文献:

[1] 江苏新医院. 中药大辞典上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:866.

- [2] 钟方丽,王晓林,纪萍萍,等. 百蕊草中总黄酮的提取工艺研究[J]. 吉林化工学院学报,2008,25(4):5-7.
- [3] 罗夫来,郭巧生,王长林,等. 百蕊草生物学特性研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):176-180.
- [4] Guo Q S, Luo F L. Comparative studies on the growth, chlorophyll, amino acids and minerals of *Thesium chinense* (Santalaceae) in association with different hosts[J]. Nordic Journal of Botany, 2010, 28(5):632-640.
- [5] 袁艺,龙子江,许霞,等. 百蕊草野生苗与组培苗抑菌抗炎实验比较的研究[J]. 药物生物技术,2006,13(3):219-222.
- [6] 杨军,王静,高美华,等. 百蕊草药理作用的实验研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):47-49.
- [7] 曹明成. 百蕊草提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(1):57-58.
- [8] Jiang Q, Dong L, Ning Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its *in vitro* rooting technique[J]. Agricultural Science and Technology, 2008, 9(5):53-55, 68.
- [9] Luo F L, Guo Q S. Influences of host species on transpiration, photosynthesis, chlorophyll and mineral contents of medicinal hemiparasite *Thesium chinense* Turcz[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2010, 32(6):1093-1102.
- [10] 罗夫来,郭巧生. 百蕊草药材内在品质研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2042-2046.
- [11] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae[J]. Analytical Biochemistry, 1988, 174(2):650-657.
- [12] Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(1):91-95.
- [13] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. BioTechniques, 1992, 13(1):52-54, 56.
- [14] 董占强,翟晓巧,范国强,等. 泡桐叶片 RNA 提取方法的研究[J]. 河南农业大学学报,2009,43(1):40-43.
- [15] 李岩,王铁梅,卢欣石. 根茎型苜蓿根部 RNA 提取方法的比较[J]. 草业科学,2010,27(5):67-71.
- [16] 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.
- [17] 张玉刚,成建红,韩振海,等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J]. 生物技术通报,2005,4(4):50-53.
- [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] 陈高,单雷,周丽侠,等. 花生总 RNA 提取方法比较研究[J]. 中国农学通报,2011,27(1):214-218.
- [20] 冯延芝,袁德义,张琳,等. 枣花蕾总 RNA 提取方法的比较[J]. 经济林研究,2012,30(2):88-90.
- [21] 王暑辉,徐倩,徐筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(1):76-80, 89.
- [22] Wang G F, Wang G, Zhang X W, et al. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch[J]. Phytochemical Analysis, 2012, 23(2):159-163.
- [23] 覃芳,王军民,何海旺,等. 山药组织总 RNA 提取方法的比较与分析[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(4):755-759.
- [24] 黄月琴,徐有明,薛建平. 半夏块茎高质量总 RNA 提取的一种有效方法[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1810-1813.