

易刚强,蔡嘉洛,朱贻霖,等. 适合金银花不同组织总 RNA 提取方法的筛选[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):63-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.016

# 适合金银花不同组织总 RNA 提取方法的筛选

易刚强<sup>1</sup>, 蔡嘉洛<sup>1</sup>, 朱贻霖<sup>1</sup>, 张亚利<sup>1</sup>, 刘 峰<sup>2</sup>, 刘湘丹<sup>1</sup>, 高 昱<sup>1</sup>, 童巧珍<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省农业科学院, 湖南长沙 410000)

**摘要:**对 Trizol 法、CTAB 法、十二烷基磺酸钠(SDS)法、多糖多酚试剂盒法、改良多糖多酚试剂盒法 5 种 RNA 提取方法提取金银花叶片、茎、根、花蕾组织 RNA 的效果进行比较,以期获得质量较好的金银花不同器官的 RNA,为后续分子生物学试验奠定基础。结果表明:改进后的多糖多酚试剂盒法能够克服金银花中 RNA 提取难度大的问题,能够提取到质量、产量都很高的 RNA,且稳定性好、无 DNA 污染,可以满足进一步的半定量反转录 PCR(RT-PCR)等试验需要。

**关键词:**金银花;不同组织;总 RNA;提取方法;改良多糖多酚试剂盒

**中图分类号:** S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0063-03

金银花(*Floe Lonicerae*)别称忍冬花、银花等,为忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera*)植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)以及同属多种植物的干燥花蕾及其初开的花,具有清热解毒、凉散风热等功效<sup>[1]</sup>。当前,随着人们消费水平的提高及对中药材日益增长的需求,提高金银花的绿原酸产量、品质已经具有重大意义。有研究表明,在金银花绿原酸研究中,对控制绿原酸等活性物质相关酶基因在金银花不同部位的表达模式进行分析极其重要;同时,反转录 PCR(RT-PCR)、cDNA 文库构建等都需要高质量的 RNA。目前,金银花总 RNA 提取方法包括 Trizol 法、SDS 法等<sup>[2-4]</sup>。本研究以金银花根、茎、叶、花蕾为材料,通过对 Trizol 法、CTAB 法、SDS、多糖多酚试剂盒法、改良多酚试剂盒法行比较,探索从富含多糖的金银花组织中提取高质量、无 DNA 污染的 RNA 方法,以期金银花分子生物学研究及提高其活性成分含量研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试材料为金银花的叶片、根、茎、花蕾。均取自湖南省隆回县金银花产业化种植基地(均由湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定为正品)。

RNA 提取过程中使用的枪头、枪头盒、离心管等塑料器皿均用 0.1% DEPC 水浸泡 4 h 后高压蒸汽灭菌、烘干,研钵用 75% 乙醇润洗消毒。试验中所用提取液以及各种液态试剂均用 0.1% DEPC 水配制,于 37 ℃ 放置过夜以抑制 RNase

活性。研钵、药匙及玻璃器皿用铝箔纸包好后于 180 ℃ 烘箱中干热灭菌 6~8 h。

各种试剂配制参照《分子克隆实验指南》进行。各种方法提取总 RNA 均定容为 20 μL,重复试验 3 次。

### 1.2 RNA 提取方法

每种材料均比较了 CTAB 法<sup>[5-6]</sup>、SDS 法<sup>[7-8]</sup>、Trizol 法<sup>[9]</sup>、多糖多酚试剂盒法、改良多酚多糖试剂盒法提取 RNA 的效果。

**1.2.1 改良 CTAB 法** 称取 0.2 g 样品,参照孟丽等 CTAB 法<sup>[10]</sup>并略加改进进行提取(改进措施:①尽量采收幼嫩的植物组织作为提取 DNA 的材料;②将采集的样品及时放入液氮中;③在 DNA 缓冲液中加入 β-巯基乙醇的用量达 2.5%~3.0%;④在提取获得的 DNA 样品中加入 RNase)。

**1.2.2 Trizol 法** 称取 0.2 g 样品,参照陈静等的 Trizol 法<sup>[9]</sup>进行提取。

**1.2.3 SDS 法** 称取 0.2 g 样品,参照王暑辉等 SDS 法<sup>[4]</sup>进行提取。

**1.2.4 多糖多酚试剂盒法** 称取 0.2 g 样品,按照 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司)说明书进行规范化操作。

**1.2.5 改良的多糖多酚试剂盒法** 称取 0.2 g 样品,按照浙江 BioFlus 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书,在步骤 3 后添加等体积酚-三氯甲烷抽提这一步骤;同时,每步操作均在冰盒内进行;在最后的 DEPC 处理水定容阶段,将原来的 50 μL 改为 20 μL;其他过程同试剂盒说明书<sup>[11-12]</sup>。

**1.2.6 RNA 完整性检测** 分别取 1 μL 各器官的总 RNA,在 1.0% 质量浓度的凝胶上分析 RNA 的完整性、质量。由于通常情况下,总 RNA 研究中的利用特点与要求,主要依据 28S、18S rRNA 凝胶电泳时所形成的谱带特征。如果带型清晰且亮度高,则表明所提取到的 RNA 样品量大且质量高,而且以 28S rRNA 谱带亮度高于 18S rRNA 更佳。同时,根据电泳结果还可以判断 RNA 样品中是否有 DNA、蛋白污染。

**1.2.7 总 RNA 纯度、浓度测定** 分别取 1 μL 根、茎、叶、花蕾的总 RNA,稀释 50 倍后用核酸测定仪(Eppendorf, Biopho-

收稿日期:2015-06-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:81203007);湖南省自然科学基金(编号:13JJ9010);湖南省教育厅科技创新平台(编号:14K071);湖南省研究生科研创新项目(编号:CX2014B368)。

作者简介:易刚强(1965—),男,湖南岳阳人,硕士,副教授,主要从事中药资源及中药新药研究。E-mail: yigangqiang2005@yahoo.com.cn。

通信作者:童巧珍,博士,教授,主要从事中药资源与质量研究。E-mail: qztong88@126.com。

tometer plus 6132), 分别测量 230、260、280 nm 处的吸光度并计算  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值和 RNA 得率。

1.2.8 半定量 RT-PCR 方法 根据试验中高通量测序中金银花  $\beta$ -actin 序列设计 1 对引物: $\beta$ -actin - F:5'-AGGAAC-CACCGATCCAGACA-3'; $\beta$ -actin - R:5'-GGTGCCTGA GGTCTCTGTT-3'。利用 cDNA 末端快速克隆(rapid-amplification of cDNA ends,RACE)合成金银花  $AGL15$  基因 cDNA 序列,设计目的基因 RT-PCR 反应引物: $AGL15$  - F:5'-AT-GGGTCGAGGGAAGATTGAGA-3'; $AGL15$  - R:5'-TATGC-CCATTTGACTCTCAGAG-3'。

以提取金银花各器官的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,共 25 个循环;72 ℃ 10 min。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度及浓度测定

RNA 提取以  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.8~2.0、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值大于 2.0 为佳;如果  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值 < 2.0,为异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇残留;如果  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值 < 1.8,为蛋白质及酚污染;如果  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值 > 2.0,说明 RNA 有降解, RNA 完整性被破坏。

由表 1 可知:SDS 提取法、Trizol 法的部分  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值 < 1.8,全部  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值 < 2.0,说明蛋白质或酚等去除不完全,有异硫氰酸胍或  $\beta$ -巯基乙醇残留,纯度未达标;改良 CTAB 提取法、多糖多酚试剂盒法、改良的多糖多酚试剂盒法,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值基本能达到标准,能否达到克隆及测序等后续试验要求,需要结合电泳结果、完整性检测结果进行综合分析。

2.2 RNA 完整性分析

用改良 CTAB 法提取的金银花根、茎、叶、花蕾总 RNA,本研究只对花蕾、嫩叶片的 RNA 电泳图进行分析,根、茎、电泳图未列出。

分别取 5  $\mu$ L RNA 样品,在 1.0% 非变性琼脂糖凝胶上进

表 1 不同提取方法对金银花各器官总 RNA 提取结果的比较

提取方法	器官	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/$ $D_{230\text{ nm}}$ 值	浓度 ( $\mu$ g/mL)
SDS 法	根	2.05	0.83	1.11
	茎	1.77	1.76	1.28
	叶	2.01	0.71	1.19
	花蕾	1.61	1.11	1.30
改良 CTAB 法	根	1.75	2.09	1.79
	茎	1.81	1.81	1.91
	叶	1.77	1.98	2.01
	花蕾	1.89	2.25	2.21
Trizol 法	根	1.21	1.74	0.50
	茎	1.91	0.91	0.61
	叶	1.82	0.84	0.59
	花蕾	1.13	0.69	0.65
多糖多酚试剂盒	根	1.85	2.04	2.00
	茎	1.80	1.99	1.93
	叶	1.88	2.01	1.98
	花蕾	1.91	2.06	2.02
改良多糖多酚试剂盒	根	1.85	2.13	2.03
	茎	1.80	2.21	2.08
	叶	1.90	2.10	2.01
	花蕾	1.98	2.18	2.18

行电泳检测。图 1-a 为 SDS 提取法电泳结果,可见 RNA 条带明显,但拖尾严重,且 5S 条带较亮,说明 RNA 存在很大程度的降解;同时,可见样品有较为严重的 DNA 污染。图 1-b 为改良 CTAB 提取法电泳结果,图中 28S、18S 条带清晰,28S 条带的亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍,5S 条带隐约可见,未见 DNA 污染。图 1-c 为 Trizol 法电泳结果,图中未见 RNA 条带。图 1-d 为多糖多酚试剂盒法电泳结果,图中 28S、18S 条带清晰,28S 条带的亮度约为 18S 亮度的 2 倍,5S 条带隐约可见,但可见轻微 DNA 污染。图 1-e 为改良的多糖多酚试剂盒法电泳结果,图中 28S、18S 条带清晰,28S 条带的亮度约为 18S 亮度的 2 倍,未见 DNA 污染。

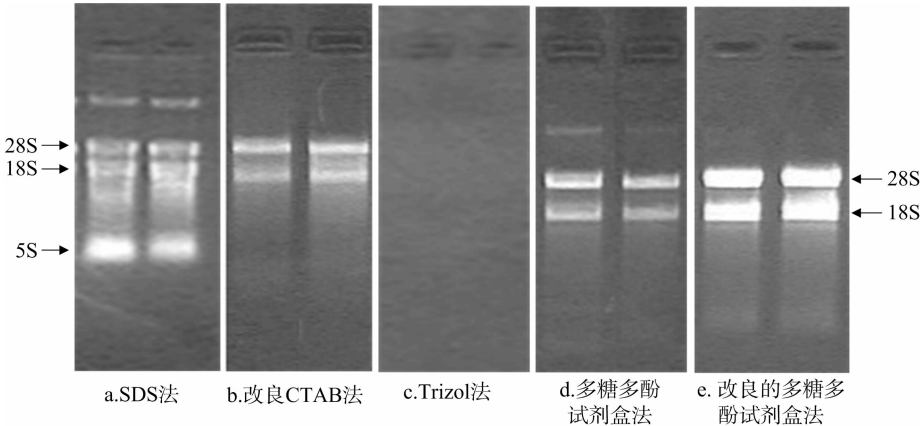


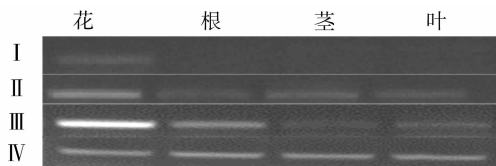
图 1 总 RNA 样品凝胶电泳结果

结合图 1、表 1 分析可知:SDS 法、Trizol 法提取的样品,无法满足后续试验要求;改良 CTAB 法、多糖多酚试剂盒法、改良多糖多酚试剂盒法所提取的样品纯度高、完整性好,基本满足后续试验要求。

2.3 3 种提取法提取各器官总 RNA 半定量 RT-PCR 检测结果

根据笔者所在实验室高通量测序及 RACE 技术得到金银花  $AGL15$  基因设计引物,以改良 CTAB 法、多糖多酚试剂盒

法、改良多糖多酚试剂盒法提取的金银花根、茎、叶、花蕾总 RNA 为模板进行半定量 RT-PCR ( $\beta$ -actin 基因为内参基因)。由图 2 可知,改良多糖多酚试剂盒提取法 PCR 扩增效果最佳,同时也表明 *AGLI5* 基因在金银花各部位中都有表达,在花蕾中表达量最高,在根、叶中的表达量次之,在茎中最低。与已有文献报道的 *AGLI5* 同源基因结果基本一致,说明改良多糖多酚试剂盒提取法提取的金银花各器官的总 RNA 质量较好,可以进行半定量 RT-PCR 等后续分子生物学试验。



I—改良CTAB法结果; II—多糖多酚试剂盒法结果;  
III—改良的多糖多酚试剂盒法结果; IV—内参基因  
 $\beta$ -actin 半定量RT-PCR结果

图2 *AGLI5* 基因半定量 RT-PCR 结果

### 3 讨论

大量研究表明,虽然植物 RNA 的提取方法有多种<sup>[13-15]</sup>,但是所获得的 RNA 质量各有差异。由于不同植物组织成分的差异,其最适用的提取方法也不尽相同。特别是多酚、多糖含量高的植物材料,内源、外源 RNA 酶含量丰富。在完整的植物细胞内,这些物质与核酸是分离的;一旦细胞碎裂,即与 RNA 相互作用,影响高质量 RNA 的提取,导致各组织 RNA 提取过程中常出现产量低、质量差、易降解等问题,有时甚至不能用于相关研究。因此, RNA 提取一直是影响金银花分子生物学研究的难点,在 RNA 提取的整个过程中,除了保证环境的干净、操作过程中不要引入杂质及细菌外,重点要除净细胞里的多糖、多酚、蛋白质及 DNA 等杂质,并不要残留提取过程中所加入的试剂。

从不同提取方法的试验结果比较分析可知,Trizol 法、SDS 法不能提取样品中的 RNA,而广泛应用于多糖多酚样品的改良 CTAB 法能提取出效果较好的 RNA;同时,使用有针对性的高糖多酚试剂盒则能提取出效果最好的 RNA,证明金银花样品多糖多酚类成分含量很高。对于不同植物种类,体内积累的次生代谢产物不同,由于化学组分差异,没有一种适合所有植物核酸的提取方法。因此,在进行植物样品总 RNA 提取前,首先应了解样品的性质,根据其所含相关次生代谢产物,选择适合该样品的有效提取方法,提取出高质量的 RNA,以便继续下一步的试验操作。

本试验中改良 CTAB 法能提取出质量较好的总 RNA,且基本能满足后续试验的要求,但相对多糖多酚试剂盒、改良多糖多酚试剂盒法来说,效果较差。经过分析,可能存在以下几个方面的原因:(1)CTAB 法提取需要 LiCl 沉淀过夜,提取周期长,而多糖多酚试剂盒整个提取过程仅需要 1.5 h 即能完成,避免了长时间的放置,使 RNA 降解;(2)改良 CTAB 法提取所用的所有试剂 (CTAB 提取液、SSTE、LiCl 等)均为笔者所在实验室于使用前配置,需要严格灭菌;(3)改良 CTAB 法提

取全程须在冰上操作,但反复的操作可能导致温度不恒定。改良 CTAB 法提取 RNA 样品过程中须严格控制低温、快速、无污染这 3 点,以上因素即可能成为导致本试验中改良 CTAB 法提取效果差于多糖多酚试剂盒的主要原因。

由此可见,以上 5 种提取方法中,SDS 法提取的样品不合格,Trizol 法未见有 RNA 提出,改良 CTAB 法、多糖多酚试剂盒法、改良多糖多酚试剂盒法提取的金银花总 RNA 样品纯度高、完整性好、降解少,基本都能满足 RT-PCR、分子克隆、高通量测序、实时定量 PCR (q-PCR) 等后续试验要求,其中以改良的多糖多酚试剂盒法最佳,该方法能提取到高质量 RNA。本研究结果为金银花总 RNA 提取指明了方向。同时,高纯度的 RNA 提取也为我们对金银花绿原酸等活性成分合成关键酶基因的相关逆转录过程分析提供了保障,帮助我们了解金银花中活性成分的合成机制,为进一步提高金银花药材中活性成分的积累打下基础。

### 参考文献:

- [1]《中华人民共和国药典》委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:化学工业出版社,2010:160.
- [2]丁勇,范红波,张高磊,等. 麻疯树种子总 RNA 提取方法研究 [J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(3):158-161.
- [3]杨元军,王玉萍,翟红,等. 甘薯块根总 RNA 的高效快速提取方法 [J]. 分子植物育种,2008,6(1):193-196.
- [4]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.
- [5]李志强,李莹,陶建敏,等. 几种果实不同组织总 RNA 提取及质量分析 [J]. 果树学报,2008,25(5):764-768.
- [6]周波,张畅,李玉花. 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进 [J]. 生物技术通讯,2004,15(1):48-50.
- [7]Symons G M, Davies C, Shavrukov Y, et al. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening [J]. Plant Physiology, 2006, 140(1):150-158.
- [8]Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2):113-116.
- [9]陈静,高飞,周宜君,等. 改良 Trizol 法提取高质量蒙古沙冬青总 RNA [J]. 生物技术通报,2013(10):87-92.
- [10]孟丽,周琳,张明珠,等. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法 [J]. 生物技术,2006,16(1):38-40.
- [11]魏琦琦,冯延芝,林青,等. 适于转录组测序的枣不同器官总 RNA 提取方法筛选 [J]. 经济林研究,2015,33(2):63-67.
- [12]龙洪旭,谭晓风,张琳,等. 油桐 delta 8 脱饱和酶基因的全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 中南林业科技大学学报:自然版, 2015, 35(7):12-16.
- [13]杨佳,吴诗杰,王淑萍,等. 发菜总 RNA 提取方法的比较与优化 [J]. 江苏农业科学,2015,43(9):58-60.
- [14]张涛,韩梅,刘翠晶,等. 人参总 RNA 提取方法快捷转录酶的比较 [J]. 江苏农业科学,2015,43(8):34-37.
- [15]刘波,张晓明,郭巧生,等. 百蕊草根总 RNA 提取方法比较及优化 [J]. 江苏农业科学,2015,43(1):44-46.