

青天葵叶片总 RNA 提取方法的比较研究

梁凌玲¹, 邓宇星², 黄琼林¹, 何 瑞¹, 詹若挺¹

(1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006;

2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006)

摘 要:采用 RNeasy Plant Mini Kit 法、RNAiso Plus 法、RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 法、CTAB 法和 SDS 法, 并结合 4 种抽提试剂组合, 分别提取青天葵叶片总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳、紫外检测及 RT-PCR 反应对提取效果进行了比较分析。结果表明:除 RNAiso Plus 法外, 其它方法提取的总 RNA 均有一定程度的 DNA 污染。RNAiso Plus 法组③(1/5 体积 KAC+4/5 体积 PCI)完整性最好, SDS 法组④(1/5 体积 NaCl+4/5 体积 PCI)浓度最高, 为 372.4 ng/ μ L。5 种方法共 20 个处理组获得的 RNA 反转录后均能扩增出 18S rRNA 基因片段。该研究建立起了适用于青天葵叶片的总 RNA 提取方法, 为青天葵的基因克隆、表达及转录组分析奠定了技术基础。

关键词:青天葵; 总 RNA 提取; RT-PCR

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0091-04

青天葵为兰科多年生宿根小草本植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.], 具有清热润肺、解毒消肿、散瘀止痛、健脾消积等功效, 临床上用于治疗肺结核咳嗽、小儿肺炎、咽喉肿痛、疮疡肿毒、跌打损伤及小儿疳积等症^[1]。青天葵是岭南道地药材, 其种子无胚乳, 一般以球茎进行无性繁殖, 并且由于过度采挖, 青天葵野生资源濒临枯竭, 已列入中国南部石灰岩稀有濒危植物名录^[2]。目前, 青天葵的研究多集中在化学成分、药理药效和组织培养方面, 基因组研究鲜有报道。利用植物基因工程等技术来优选改造青天葵品种和形态是缓解其资源严重短缺的可行途径之一。制备高纯度且完整的总 RNA 是进行分子克隆和基因表达分析、转录组学等研究的首要前提。该试验通过比较 CTAB 法、SDS 法和试剂盒法的提取效果, 筛选出适合青天葵叶片总 RNA 的提取方法, 以期为青天葵后续的功能基因的克隆和表达、转录组分析等奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青天葵由广州中医药大学中药资源科学与工

程研究中心实验室栽培, 经詹若挺研究员鉴定为兰科植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.].

试剂: RNAiso Plus、RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue、Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、Premix Ex Taq Version 2.0 (loading dye mix)、RNase-free water、DNA Markers 均购自宝生物工程(大连)有限公司; RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司; RNase-free 吸附柱购自北京百泰克生物技术公司; 柠檬酸钠、氯化钠、醋酸钾、苯酚: 氯仿: 异戊醇(体积比为 25:24:1, 简称 PCI, 其中苯酚为水饱和酚)^[3]、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、焦碳酸二乙酯(DEPC)等均为国产分析纯。CTAB 提取缓冲液^[4]: 20 mmol/L EDTA, 54.9 mmol/L CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 g/L PVP。SDS 提取缓冲液^[5]: 0.05 mol/L EDTA-Na, 0.5 mol/L NaCl, 0.15 mol/L Tris, 4% SDS, 0.575 mol/L 硼酸。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取 改良 RNeasy Plant Mini Kit 法(简称 RNeasy 法): (1)称取青天葵新鲜叶片 500 mg 放入液氮预冷的研钵中, 加入液氮迅速研磨成无明显可见颗粒的粉末。(2)加 4 mL RLT Buffer 裂解液到研钵中进行匀浆, 待裂解液完全溶解后, 继续研磨至匀浆液呈透明状, 室温静置 5 min, 将匀浆液转移至 2 mL EP 管中。(3)4℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液平均分装至 4 个新的 2 mL EP 管中。分别加入以下 4 种试剂

第一作者简介:梁凌玲(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为中药资源的可持续利用研究和开发。E-mail: linglingyzz@126.com.

责任作者:何瑞(1972-), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药资源的可持续利用研究和开发。E-mail: vipruihe@yahoo.cn.

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(30701090); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2009]1001号)。

收稿日期:2012-10-18

组合进行抽提:①等体积氯仿,②等体积 PCI,③1/5 体积 KAc+4/5 体积 PCI,④1/5 体积 NaCl+4/5 体积 PCI (其中,KAc 为 3 mol/L,pH 5.2;NaCl 为 5 mol/L);(4)剧烈振荡 15 s,使溶液充分乳化,室温静置 5 min;(5)4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 后,此时匀浆液分为 3 层:上清液、中间的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。小心吸取上清分别转移至新的 2 mL EP 管中;(6)向上述上清液中加入 1/2 体积的异丙醇和 1/2 体积的高盐溶液(0.8 mol/L 柠檬酸钠和 1.2 mol/L NaCl),用枪头轻轻吹打混匀后,将混匀液转移至 RNase-free 吸附柱中,4℃ 10 000 r/min 离心 2 min,弃废液,吸附柱放回收集管中;(7)加 700 μ L 75%乙醇到吸附柱中,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,弃废液,吸附柱放回收集管中;(8)重复上一步操作;(9)将吸附柱放回空收集管中,4℃ 12 000 r/min 离心 2 min;(10)将吸附柱置于干净的 1.5 mL EP 管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 30 μ L RNase-free 水,室温静置 2 min,4℃ 12 000 r/min 离心 2 min,将 RNA 溶液收集到离心管中,-70℃ 保存备用。改良 RNAiso Plus 法:使用 RNAiso Plus 裂解液匀浆,其余操作同 RNeasy 法。改良 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 法(简称 RNAiso Polysaccharide 法):使用 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 裂解液匀浆,其余操作同 RNeasy 法。CTAB 法:使用 CTAB 提取缓冲液匀浆,其余操作同 RNeasy 法。SDS 法:使用 SDS 提取缓冲液匀浆,其余操作同 RNeasy 法。

1.2.2 RNA 质量检测琼脂糖凝胶电泳检测 取 2 μ L RNA 溶液,加入 3 μ L RNA-free 水进行稀释,与 1 μ L 6 \times Loading Buffer 混合上样,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。紫外分光光度计检测:取 5 μ L RNA 溶液,加

入 45 μ L RNA-free 水进行稀释,分别测定其在 320、280、260、230 nm 处的吸光值,计算 RNA 样品的纯度与浓度。

1.2.3 RT-PCR 采用 Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real time)试剂盒,参照其说明书操作。18S rRNA 基因的扩增:以上述合成的双链 cDNA 为模板,杨锦芬等^[6]设计的 18SF(5'-CGCTCTG-GATAC ATTAGCATGG-3')和 18SR(5'-GACAAATCGCTCCACCAACTAAG-3')分别为上、下游引物进行 PCR 扩增。25 μ L 的反应体系包括:适量 cDNA,0.5 μ L 10 μ M 上游引物、0.5 μ L 10 μ M 下游引物,12.5 μ L Premix Ex Taq,灭菌水补足体积。反应条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,31 个循环;72℃ 延伸 5 min。用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性的比较

不同提取方法对青天葵叶片总 RNA 质量影响见图 1,除 RNAiso Plus 法外,其它方法均存在不同程度的基因组 DNA 污染,说明 RNAiso Plus 裂解液能够有效地去除样品内源性 DNA 的污染。除了改良 RNAiso Polysaccharide-rich 法组④,5 种提取方法的 19 个处理组均获得比较明显的 RNA 主带,即 28S、18S 和 5.8S。但 RNA 完整性和浓度不尽相同,其中以 RNAiso Plus 法组③完整性最好,而且 28S 与 18S 条带的亮度比值在 2:1 左右;SDS 法组④浓度最高。各方法提取所得的较优 RNA 样品所搭配的抽提组合试剂并不相同,说明没有任何一种抽提组合试剂通用于所有方法,在采用不同方法提取青天葵总 RNA 时要进行优化筛选。

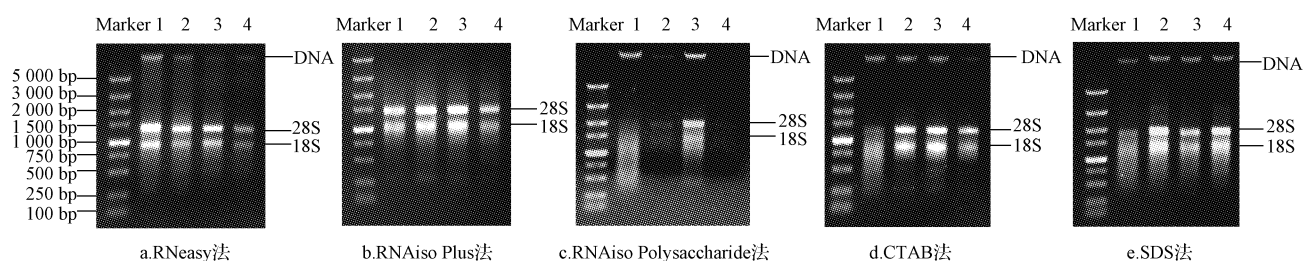


图 1 5 种不同方法提取青天葵叶片总 RNA 电泳图

注:Marker, DL 5 000;1~4 为①、②、③、④组。

Fig. 1 Total RNA extracted from *N. fordii* by five methods

Note:Marker, DL 5 000;1~4 respect ①,②,③,④, respectively.

2.2 RNA 纯度与浓度比较

由表 1 可知,RNeasy 法的 4 种组合 RNA 纯度均不好;RNAiso Plus 法 4 种组合获得的 RNA 均蛋白质污染少,其中①、②组可能有多糖污染。RNAiso Polysaccharide 法组①无多糖和蛋白质等有机物污染,但 RNA 出现严重降解;组②蛋白质、多糖污染严重;组④多

糖污染严重。CTAB 法①、②组提取的 RNA 受到糖、蛋白质等有机物污染。SDS 法①、②组 RNA 已有一定程度的降解,组③蛋白质、多糖等有机物污染严重。经比较,RNAiso Plus 法和 CTAB 法的③、④组,RNAiso Polysaccharide 法的组③,SDS 法的组④可以获得较高纯度的 RNA。

5 种不同方法提取到的总 RNA 浓度从高到低依次为 SDS 法、RNAiso Plus 法、RNeasy 法和 RNAiso Polysaccharide 法,其中 SDS 法④组总 RNA 浓度最高,

浓度值为 372.4 ng/ μ L。并且不同方法提取的总 RNA 浓度差异较大,说明不同的提取缓冲液和不同的抽提试剂对 RNA 浓度均有影响。

表 1 5 种方法提取青天葵总 RNA 纯度及浓度的比较

Table 1 Purity and concentration of total RNA extracted from *N. fordii* by five methods

组别	RNeasy 法			RNAiso Plus 法			RNAiso Polysaccharide 法			CTAB 法			SDS 法		
	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 /ng· μ L ⁻¹	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 /ng· μ L ⁻¹	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 /ng· μ L ⁻¹	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 /ng· μ L ⁻¹	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 /ng· μ L ⁻¹
①组	1.813	1.721	158.0	1.313	2.051	233.2	2.164	2.387	108.4	1.702	1.633	160.0	2.281	2.429	184.0
②组	1.536	1.554	99.2	1.892	1.978	279.6	0.690	1.166	11.6	1.537	1.600	287.6	2.429	2.275	246.8
③组	1.478	1.382	70.8	2.128	1.980	236.4	2.327	2.051	98.0	2.446	2.097	180.0	1.603	1.539	194.0
④组	1.144	1.390	36.8	2.199	1.989	194.4	0.400	1.850	7.6	2.563	2.073	105.2	2.485	2.185	372.4

注:RNA 浓度=(OD₂₆₀-OD₃₂₀) \times 稀释倍数 \times 0.04 μ g/ μ L=(OD₂₆₀-OD₃₂₀) \times 10 \times 40 ng/ μ L。
Note:RNA concentration=(OD₂₆₀-OD₃₂₀) \times Dilution multiple \times 0.04 μ g/ μ L=(OD₂₆₀-OD₃₂₀) \times 10 \times 40 μ g/ μ L。

2.3 RT-PCR 反应

RT-PCR 扩增结果见图 2,分别以各 RNA 样品反转录的 cDNA 为模板,均扩增出了为 500 bp 的目的条带,

除 RNeasy 法 4 个组、RNAiso Plus 法组③条带有轻微弥散外,其余的条带均清晰明亮。由此表明,所获得的 RNA 可用于 RT-PCR 试验及后续研究。

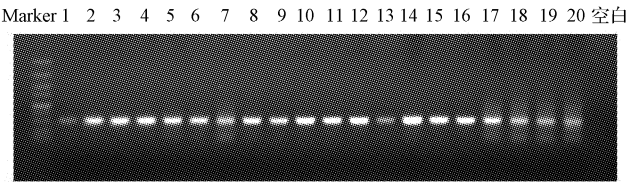


图 2 青天葵叶片总 RNA RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

注:Marker, DL 5 000;1~4. RNAiso Polysaccharide 法①、②、③、④组;5~8. RNAiso Plus 法①、②、③、④组;9~12. CTAB 法①、②、③、④组;13~16. SDS 法①、②、③、④组;17~20. RNeasy 法①、②、③、④组;空白阴性对照。

Fig. 2 The fragments of RT-PCR products using total RNA extracted from *N. fordii* by five methods

Note:Marker, DL 5 000;1~4 respect ①,②,③,④ by RNAiso Polysaccharide method;5~8 respect ①,②,③,④ by RNAiso Plus method;9~12 respect ①,②,③,④ by CTAB method;13~16 respect ①,②,③,④ by SDS method;17~20 respect ①,②,③,④ by RNeasy method;Blank mean control.

3 讨论

青天葵主要含有黄酮类、萜类、氨基酸类、挥发油类、生物碱类、有机酸、酚类、多糖及蛋白质等多种化合物^[7]。在完整的植物细胞中,这些物质是与 RNA 分离的,一旦细胞破碎,这些物质即与 RNA 相互作用,从而影响 RNA 的分离纯化^[8]。因此,为了保证 RNA 的完整性和纯度,在提取 RNA 过程中有效地排除多糖及多酚的干扰、有效地控制蛋白质和 DNA 的污染是必要的。多糖的许多理化性质与 RNA 很相似,沉淀 RNA 时容易产生多糖的凝胶状沉淀,这种沉淀难溶于水或溶解后产生粘稠状的溶液而难与 RNA 分离,并且其存在还抑制多种酶的活性。酚类氧化成酐时能与大分子化合物形成共价键,容易与 RNA 不可逆地结合,导致 RNA 活性丧失,降低 RNA 的质量^[9]。抑制酚类氧化主要有 2 种途径:加入强还原剂如 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)或半胱氨酸等防止酚类氧化或加入络合物如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。蛋白质的存在不仅污染 RNA 样品,而且有些蛋白质如 RNase 普遍存在,是导致 RNA 降解最主要的物质。该试验采用 4 种不同的组合试剂进行

抽提,组③、组④分别运用 1/5 KAc+4/5 PCI 和 1/5 NaCl+4/5 PCI 抽提,PCI 去除酚类、蛋白质的效果好,而高浓度的 KAc 和 NaCl 均有利于去除多糖,因此这 2 组组合试剂去除杂质的效果都较佳。该研究在用高盐溶液沉淀 RNA 后还采用了 RNase-free 吸附柱吸附离心,不仅能减少有机试剂的残留,还能较方便地离心除净乙醇,更好地控制 RNA 中盐离子含量。

不同植物材料中多糖、多酚等含量不同,总 RNA 提取往往需要采用不同的方法。该研究中,RNeasy 法采用 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒中的 RLT+ β -巯基乙醇作为提取缓冲液,效果并不好。虽然 β -巯基乙醇作为强还原剂可以防止多酚氧化,还能破坏多酚氧化酶的二硫键从而使其失去活性,有效地防止其与 RNA 的结合^[10],然而残留的 β -巯基乙醇会影响 RNA 的纯度;RNAiso Polysaccharide 法 DNA 残留量大,且提取率低;CTAB 法已成功地从枣^[11]、香蕉^[12]等富含多糖多酚的植物组织中提取到高质量的 RNA,并且 CTAB 法提取缓冲液中的 PVP 具有很强的结合多酚化合物的能力,但当溶液 pH>8.0 会降低 PVP 结合多酚的能力^[13],因此应严格控制溶液的 pH。而且不同植物物种的理化性质不同,

同一方法不一定对所有植物适用。SDS 法的提取缓冲液中含有 Tris-硼酸(pH 7.5),硼酸通过氢键作用可与酚类化合物形成复合物,可显著提高 RNA 提取效率^[14],但 Tris-硼酸浓度过高(>0.2 mol/L)则会影响 RNA 的回收率^[15]。与其它 4 种方法相比,RNAiso Plus 法提取的 RNA 不含基因组 DNA,尤其是组③完整性、纯度和浓度均较好,能满足转录组分析的要求。综合考虑,采用 RNAiso Plus 作为裂解液,并结合 1/5 KAc+4/5 PCI 组合进行抽提,是提取青天葵叶片总 RNA 的较好方法。若用 CTAB 或 SDS 提取缓冲液作裂解液,1/5 NaCl+4/5 PCI 组合进行抽提,也可获得较好的青天葵叶片总 RNA。提取所获得的完整性最佳的 RNA 并不一定反转录得最优 cDNA,这还与 RNA 的纯度和浓度有关,不过,得到的 RNA 经 Recombinant DNase I(RNase-free)处理后,也可以满足后续分子生物学试验的要求。该研究筛选和建立了适用于青天葵叶片的总 RNA 提取方法,为青天葵的基因克隆和表达、转录组分析奠定了技术基础。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科技出版社, 2006:1731-1732.
- [2] 文和群,许兆然. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J]. 广西植物, 1993,13(2):110-127.
- [3] 周丽侠,张智涛. 不同沉淀方法对花生种子总 RNA 提取的影响试验

研究[J]. 现代农业科技,2010(24):29-30.

- [4] 巩艳明,曹后男,宗成文,等. 三种方法提取不同品种梨叶片总 RNA [J]. 湖北农业科学,2011,50(15):3204-3206.
- [5] 肖洁凝,黄学林,黎茵,等. 富含多糖和次生物质的芒果子叶总 RNA 的提取[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(11):83-86.
- [6] 杨锦芬,阿迪卡利,陈蔚文,等. 阳春砂 1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因的克隆及表达分析[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(5):510-517.
- [7] 邱莉,徐灵源,缪建华,等. 青天葵植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2258-2260.
- [8] 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.
- [9] 苏丹,耿广东,张素勤,等. 辣椒不同组织总 RNA 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2010(2):21-22.
- [10] 李宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报,1999,15(1):36-39.
- [11] 宋蓓,赵锦,刘孟军,等. 改良 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.
- [12] 检国英,漆艳香,蒲金基,等. 改良 CTAB 法提取高质量香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学,2009(7):192-195.
- [13] Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes[J]. Phytochemistry,1966,5:423-438.
- [14] Lopez-Gomez B, Gonlez • Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp[J]. Hort Science,1992,27:440-442.
- [15] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae [J]. Anal Biochem,1988,174:650-657.

Comparison of Total RNA Extraction Methods from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. Leaves

LIANG Ling-ling¹, DENG Yu-xing², HUANG Qiong-lin¹, HE Rui¹, ZHAN Ruo-ting¹

(1. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources from Lingnan, Ministry of Education, Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: Five different extraction methods(RNeasy Blant Miri kit, RNAiso Plus, RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue, CTAB and SDS), combined with four different extraction solutions were used to extract total RNA from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. leaves. The effect and efficiency of extraction was evaluated by agarose gel electrophoresis, ultraviolet spectrophotometry and RT-PCR. The results showed that apart from RNAiso Plus method, total RNA resulted from the other methods all showed genomic DNA pollution. Among these methods, the total RNA resulted from RNAiso Plus method followed with extraction solution ③ (1/5KAC+4/5PCI) was the most integrated, and the total RNA resulted from SDS method followed with extraction solution ④(1/5NaCl+4/5PCI) had the highest concentration (372.4 ng/ μ L). Total RNA obtained from twenty treatment groups have been used to successfully amplify 18s rRNA gene segment by RT-PCR. This study established a proper total RNA extraction method for *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. leaves, and it provided technique basis for gene cloning, expression, and transcriptomic analysis of the plant.

Key words: *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.; total RNA extraction; RT-PCR