

DOI:10.11937/bfyy.201701025

枸杞叶片 RNA 提取方法优化

付海辉^{1,2}, 张波³, 程慧^{1,2,3}, 李彦龙³, 曹有龙³, 周军^{1,2}

(1. 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学 林学院 云南 昆明 650224;

3. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘要:以“宁杞1号”枸杞叶片为试材,采用优化的CTAB法、异硫氰酸胍法、Trizol法以及SDS法提取叶片RNA,以期筛选出适合枸杞叶片的总RNA的提取方法。结果表明:常规方法不能提取到完整的RNA,且条带不清晰、杂质多。经优化后,异硫氰酸胍法较为理想,并且可以用于RT-PCR试验。

关键词:枸杞;叶片;RNA;改良异硫氰酸胍法

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)01-0114-04

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属多年生落叶灌木,主要以干燥果实入药,药材名为枸杞子。研究表明,枸杞子具有调节和增强机体免疫功能、抗氧化、抗肿瘤、延缓衰老、降血脂、降血糖、保肝、养颜美容等药理作用,因而,被誉为“宁夏四宝”之一^[1]。因此,对枸杞的生理生化和基因工程研究具有重要的理论意义和实践意义^[2-3]。

RNA是基因工程研究的重要对象之一,RNA的质量决定了RT-PCR、Northern杂交、cDNA文库构建等试验的成败。因此,筛选出一种高效、快捷的枸杞叶片的总RNA的提取方法有着重要的理论意义和科研价值。目前,RNA提取方法有CTAB法、异硫氰酸胍法、Trizol法、SDS法等;由于不同的物种体内的代谢物差异,没有一种方法能够普遍适合所有物种;另外,即使同一物种,不同组织生物体内代谢物也所不同,因而也决定了RNA提取方法上的差异。由于枸杞叶片中含有丰富的蛋白质和次生代谢物质,给RNA的提取带来一定的困难,现对SDS法、异硫氰酸胍法、Trizol法等方法提取枸杞叶片的总

RNA效果进行比较,并进一步优化了CTAB法、SDS法、异硫氰酸胍法、Trizol法等方法,以期筛选出适合枸杞叶片的总RNA提取的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试枸杞品种“宁杞1号”由宁夏农林科学院枸杞研究中心提供。取幼嫩叶片,液氮速冻,于-70℃冰箱中保存备用。

碳酸二乙脂、异硫氰酸胍、柠檬酸钠、十二烷基肌氨酸钠、Tris、酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、琼脂糖等均为国产分析纯,亚精胺为Sigma公司。

1.2 试验方法

1.2.1 常规方法提取枸杞叶片总RNA 分别采用Trizol法^[4]、异硫氰酸胍法^[5]、SDS法^[6]3种常规方法提取枸杞叶片总RNA,提取的RNA利用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 优化的CTAB法^[7] 1)取样品约100 mg,加液氮迅速磨成粉末,然后快速转入已经预冷好的1.5 mL的离心管中,加入在65℃水浴中预热好的裂解液(2% CTAB、1.4 mol·L⁻¹ NaCl、0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0)、0.02 mol·L⁻¹ EDTA(pH 8.0)、2% PVP、0.5 g·L⁻¹ 2%巯基乙醇)700 μL,振荡混匀,在65℃水浴中放置10 min;2)然后向含有裂解液的离心管中加入700 μL氯仿:异戊醇(24:1),混匀;3)12 000 r·min⁻¹,室温离心15 min;4)取上清,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)重复抽提一次;5)12 000 r·min⁻¹,室温离心15 min;6)取上清,加入

第一作者简介:付海辉(1981-),男,硕士,助理研究员,现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail:fh819@163.com。

责任作者:周军(1962-),男,博士,教授,现主要从事果树分子生物学等研究工作。E-mail:zhoujunbo@163.com。

基金项目:云南省林学一流学科建设经费资助项目;云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室开放基金资助项目;国家林木(含竹藤花卉)种质资源平台资助项目(2003DKA21003)。

收稿日期:2016-10-17

1/4 体积的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl, -20°C 过夜;7)次日, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;8)弃上清,将沉淀溶于 $500 \mu\text{L}$ 的 SSTE(0.5% SDS, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 溶液中,在 37°C 水浴中使之溶解,然后迅速置于冰上,再用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)重复抽提一次;该步骤为优化步骤,以分层相中的白色物质多少适当调节抽提次数,一般为 2~3 次;8)上清液加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc(pH 5.2) -20°C 沉淀 2 h;9) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;10)弃上清,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,干燥后加入 $60 \mu\text{L}$ 的 DEPC 水溶解,置于 -20°C 保存。

1.2.3 优化的异硫氰酸胍法 1)取样品约 100 mg,加液氮迅速磨成粉末,然后快速转入已经预冷好的 2 mL 的离心管中,加入 $700 \mu\text{L}$ 提取液($4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异硫氰酸胍、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠、 0.5% 十二烷基肌氨酸钠、 0.72% 巯基乙醇),混匀,冰浴 15 min;2)加入 $70 \mu\text{L}$ $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc(pH 5.2)、水饱和酚 $700 \mu\text{L}$ 、氯仿:异戊醇(24:1) $140 \mu\text{L}$,振荡混匀,冰浴放置 15 min;3) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 15 min;3)上清加入 1/2 体积的水饱和酚和 1/2 体积的氯仿:异戊醇(24:1),振荡混匀;4) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 15 min;5)上清加入等体积氯仿,混匀;6) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;7)上清液加入等体积的异丙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH 5.2),轻轻混匀,冰上放置 5~10 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;8)弃上清,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,干燥后加入 $60 \mu\text{L}$ 的 DEPC 水溶解,置于 -20°C 保存。

1.2.4 优化的 Trizol 法 参照 Trizol 试剂盒说明操作,另外,在氯仿提取阶段,重复抽提 2 次。

1.2.5 优化的 SDS 法 1)取样品约 100 mg,加液氮迅速磨成粉末,然后快速转入已经预冷好的 1.5 mL 的离心管中,加入 $350 \mu\text{L}$ 水饱和酚、 $350 \mu\text{L}$ 氯仿:异戊醇(24:1),振荡混匀;然后加入 $700 \mu\text{L}$ SDS 提取液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 8.0)、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 1% SDS),混匀,冰上放置 15 min;2) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 25 min;3)上清液加入 1/2 体积的水饱和酚和 1/2 体积的氯仿:异戊醇(24:1),振荡混匀;4) $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 15 min;5)上清加入等体积氯仿,混匀; $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;6)上清液加入等体积的异丙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc

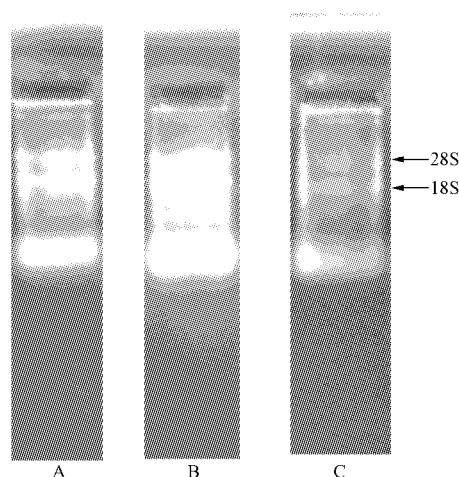
(pH 5.2),轻轻混匀,冰上放置 5~10 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;7)弃上清,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次;8)用 $200 \mu\text{L}$ DEPC 水溶解沉淀,加入 $200 \mu\text{L}$ 预冷的 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl, -20°C 过夜;9)次日, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C , 离心 10 min;10)弃上清,用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl 洗沉淀 1 次,风干后,加入 $60 \mu\text{L}$ 的 DEPC 水溶解,置于 -20°C 保存。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳及 RT-PCR 取 $3 \mu\text{L}$ RNA 样品在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。用大连宝生物公司的 M-MLV 反转录酶将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,针对 *actin* 基因进行 PCR 扩增。反应体系: $2 \mu\text{L}$ $10\times$ PCR buffer, $0.4 \mu\text{L}$ dNTP, 上下游引物 (*actinf*: $5'$ - TGCGATGATATG-GAGAAGAT - $3'$ 和 *actinr*: $5'$ - TCAGCAATACCAG-GRAACAT - $3'$),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)各 $0.4 \mu\text{L}$,反转录产物 $2 \mu\text{L}$ cDNA, $0.4 \mu\text{L}$ *Taq* 酶 ($2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),加水至总体积 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 循环条件: 94°C 3 min, 94°C 60 s, 56°C 30 s, 72°C 60 s, 35 个循环;最后 72°C 延伸 8 min,扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 常规方法提取的枸杞叶片 RNA 的检测

分别用 Trizol 法、异硫氰酸胍法、SDS 法 3 种常规的方法提取枸杞叶片总 RNA,各取 $3 \mu\text{L}$ RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测。由图 1 可知,Trizol



注:A. Trizol 法;B. 异硫氰酸胍法;C. SDS 法。

Note: A, Trizol method; B, Guanidinium isothiocyanate method; C. SDS method.

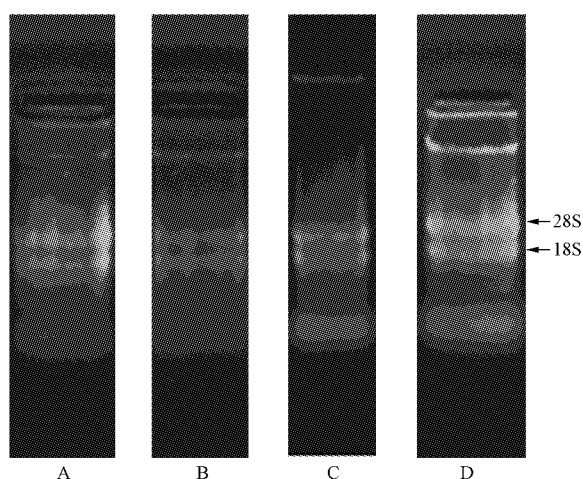
图 1 常规方法提取的枸杞叶片总 RNA

Fig. 1 Total RNA of *Lycium barbarum* leaves extracted by different isolated methods

法、异硫氰酸胍法、SDS 法虽然能够提取出 RNA,但是提取效果不好。SDS 法表现为 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 电泳条带模糊,并且杂质较多;异硫氰酸胍法表现为无法辨认条带,并且杂质较多;Trizol 法也表现为 28S rRNA、18S rRNA 分不开,并且有杂质。

2.2 优化后方法提取的枸杞叶片 RNA 的检测

由图 2 可知,异硫氰酸胍法提取效果最好,28S rRNA 条带亮度是 18S rRNA 的 2 倍,并且基本无杂质;Trizol 法提取效果次之,28S rRNA 条带亮度是 18S rRNA 的 2 倍,并且带少量杂质;再次,SDS 法比 Trizol 法提取效果稍次,28S rRNA 和 18S rRNA 条带不如 Trizol 法清楚,并且弥散杂质;最后,CTAB 法最次,杂质虽然比较少,但是条带模糊。经比较可知,异硫氰酸胍法为枸杞叶片总 RNA 提取的理想方法。



注:A. SDS 法;B. CTAB 法;C. 异硫氰酸胍法;D. Trizol 法。

Note: A. SDS method; B. CTAB method; C. Guanidinium isothiocyanate method; D. Trizol method.

图 2 优化后的不同方法提取的枸杞叶片总 RNA

Fig. 2 Total RNA of *Lycium barbarum* leaves extracted by optimized different methods

2.3 RT-PCR 检测

为了进一步确认异硫氰酸胍法作为枸杞叶片总 RNA 提取的理想方法的可靠性,将异硫氰酸胍法去除基因组后的总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。

由图 3 可知,异硫氰酸胍法提取的 RNA 反转录后,进行 PCR,产物为 700 bp 的核苷酸序列,此结果符合预期结果。异硫氰酸胍法提取的 RNA 反转录后进行 PCR,没有任何条带。因此,异硫氰酸胍法可以作为枸杞叶片总 RNA 提取的理想方法,RNA 提



注:A. 目的片段;M. Marker DL 2 000。

Note: A. Product of PCR; M. Marker DL 2 000.

图 3 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Result of RT-PCR

取产物可以用于后续的基因工程研究。

3 讨论

枸杞为茄科多年生木本植物,组织中富含丰富的蛋白质、枸杞多糖以及次生代谢物质,在提取过程中总 RNA 难以与其它各种成分有效的分离,并且细胞裂解后,内源 RNase 影响总 RNA 的提取,给 RNA 提取带来一定的困难。因此,要从枸杞叶片中有效的提取 RNA,可以从以下 3 个方面考虑。

1)在 RNA 提取一般原则基础上注意操作细节。如老叶 RNA 含量就不如嫩叶丰富,取样时就应该尽量取嫩叶。取样后,如果不立即使用,应用液氮速冻, -70 °C 冷藏备用。在 RNA 提取前,所用的试验器具和溶液都要做相应 RNase 灭活处理,并且设置 RNA 试剂和试验器具的专放区。在 RNA 提取过程中,尽量少说话,勤换 PE 手套,因为手上的汗液和口里溅出的唾沫带有大量的 RNase,这些都给 RNA 的提取带来潜在的风险。

2)在 RNA 提取原理上仔细斟酌。RNA 提取的一般步骤为:先把样品在液氮中快速研磨,然后加入细胞裂解液,再加入有机溶剂分离杂质,最后沉淀洗脱 RNA。从提取步骤分析,研磨时要充分并且迅速^[7]。加入细胞裂解液后,要快速的充分混匀。其次,在有机溶剂提取阶段,最好不要多次反复抽提,因为反复抽提将损失较多 RNA,所以在加入裂解液和有机溶剂后,尽量充分去除蛋白质和次生代谢物质,或者每份样品量不要过多,而应该让有机溶剂充分饱和和杂质。加入有机溶剂(酚和氯仿)后,要用力

震荡充分混匀。此外,该试验结果表明,在有机溶剂提取阶段,用水饱和酚和氯仿提取与用氯仿提取作比较,离心分层后,用水饱和酚和氯仿提取的蛋白层多。

3)在 RNA 提取方法上反复试验比较,并且优化。CTAB 法成本低,但是步骤比较繁琐,时间长,并且 RNA 提取质量差,有降解的迹象,表现为条带模糊不清,不适于枸杞 RNA 的提取,但是 CTAB 法在其它许多物种中成功提取到了 RNA^[9-12]。Trizol 法简单快捷, RNA 提取质量尚可,但是对杂质去除的不够彻底,可能由于其步骤比较简洁,此外, Trizol 试剂也比较昂贵,成本较高,所以认为 Trizol 法不是枸杞 RNA 提取的最佳方法。SDS 法提取 RNA 时容易产生有色物质,导致提取质量下降。该试验进行 RNA 提取过程中,观察褐变现象,可能是酚类物质氧化褐变的结果,氧化后的酚类物质将与 RNA 一起沉淀,这样就大大降低了 RNA 提取的产量。从 SDS 法提取枸杞 RNA 的结果也可知, RNA 条带模糊,并且含有不少杂质。另外,如果 RNA 用于反转录试验, SDS 法也是不合适的,因为 SDS 法中用到了 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl, 残留的 Li^+ 也会抑制后续的反转录试验。另外, SDS 法提取周期也较长,这样就增加了 RNase 污染的机会,所以不太适合枸杞 RNA 提取。经优化的异硫氰酸胍法,第一次水饱和酚提取结束后,再用水饱和酚和氯仿重复抽提一次,而不是直接进入氯仿抽提阶段;其次,就是在第一次抽提阶段,加大了裂解液和有机溶剂的量。经优化的异硫氰酸胍法能够很好的从枸杞叶片中提取出总 RNA,并且质量能够满足 RT-PCR 试验的要求。

通过该试验比较,认为经优化的异硫氰酸胍法适合枸杞叶片总 RNA 提取,优点在于简单方便、周期短、成本相对较低、RNA 提取效果好,能够满足后续分子生物学试验的要求。

参考文献

- [1] 郭巧生. 药用植物资源学[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [2] 曹有龙,贾勇炯. 应用组织培养技术离体筛选枸杞抗根腐病变异体的研究[J]. 宁夏农林科技,1997,29(2):163-168.
- [3] 罗青,曲玲,曹有龙,等. 抗蚜虫转基因枸杞的初步研究[J]. 宁夏农林科技,2001(1):1-3.
- [4] 姚宁涛,祝建波,邓福军. 改良 Trizol 法快速提取棉叶片总 RNA[J]. 生物技术通报,2010(7):125-126.
- [5] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [6] 刘晓菊,洪海波,李敏,等. 改良 CTAB 法提取核桃总 RNA 试验[J]. 山东农业科学,2008(1):97-99.
- [7] IKEGAMI H, KOSHITA Y, YAKUSHIJI H, et al. Simple and efficient RNA extraction and gene analysis in vegetative organs of Japanese persimmon[J]. Plant Biotechnology, 2009, 26(4):427-429.
- [8] 王玉成,杨传平,姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2):1-4.
- [9] ZENG Y, YANG T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20(4):417-418.
- [10] WANG X, TIAN W, LI Y. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues[J]. Molecular Biotechnology, 2008, 38(1):57-64.
- [11] FORT F, HAYOUN L, VALLS J, et al. A new and simple method for rapid extraction and isolation of high-quality RNA from grape (*Vitis vinifera*) berries[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2008, 88(2):179-184.
- [12] JAAKOLA L. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit[J]. Molecular Biotechnology, 2001, 19(2):201-203.

Optimizing of Different RNA Isolation Methods for *Lycium* Linn Leaves

FU Haihui^{1,2}, ZHANG Bo³, CHENG Hui^{1,2,3}, LI Yanlong³, CAO Youlong³, ZHOU Jun^{1,2}

(1. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650224; 2. Forestry College, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 3. Center of Chinese Wolfberry Engineering and Technology, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: The performances of four extraction methods, including CTAB, guanidinium isothiocyanate, Trizol and SDS were compared to select the suitable method for total RNA extraction from *Lycium* Linn leaves. The results showed that RNA could not be extracted perfectly by original methods and RNA non-clearness as well as impurity, but the optimizing guanidinium isothiocyanate method was perfect and total RNA could be used for RT-PCR.

Keywords: wolfberry; leaves; RNA; optimized guanidinium isothiocyanate method