

桑寄生不同部位总 RNA 提取方法比较研究*

韦树根^{1,2}, 马小军¹ **, 付金娥², 周 敏³, 潘丽梅²

(1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193;

2. 中国医学科学院药用植物研究广西分所 南宁 530023; 3. 广西中医药大学药学院 南宁 530222)

摘要: 目的: 从桑寄生中提取高质量的 RNA。方法: 以桑寄生叶片、茎、花和种子为材料, 采用 TRIzol 试剂盒法、改良 TRIzol 法、CTAB-LiCl 法、CTAB- 异丙醇法 4 种方法, 比较不同材料及不同方法分离 RNA 的效果。结果: TRIzol 试剂盒法和改良 TRIzol 法均不能有效的去除桑寄生中的多糖和蛋白质等杂质, 不适合用于桑寄生 RNA 的提取; CTAB-LiCl 法提取的 RNA 质量较高、完整性较好, 可满足各种后续分子生物学实验的要求; CTAB- 异丙醇法提取桑寄生 RNA 的效果虽然较好, 但还达不到小 RNA 分析实验要求。结论: 为桑寄生后续分子生物学研究提供基础, 也为次生代谢物较丰富的药用植物 RNA 的提取提供参考。

关键词: 桑寄生 RNA 提取 多糖 蛋白质 CTAB-LiCl

doi:10.11842/wst.2016.03.003 中图分类号: R282 文献标识码: A

2015 版《中国药典》规定桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝^[1]。桑寄生苦、甘、平, 具有祛风湿, 补肝肾, 强筋骨, 安胎元; 多用于治疗风湿痹痛, 腰膝酸软, 筋骨无力, 崩漏经多, 妊娠漏血, 胎动不安, 头晕目眩。提取质量高、纯度高、完整性好的 RNA 是分子生物学研究的重要基础, 对于进行 RT-PCR, cDNA 合成、RNA 序列分析、Northerm 印迹杂交等具有重要意义^[2,3]。由于植物组织中化学成分复杂,

并没有一种 RNA 提取方法适用于所有的植物^[4]。桑寄生化学成分复杂, 目前从桑寄生提取物中分离到多种化学成分, 主要有甾体化合物、三萜、黄酮类化合物、有机酸、胺类化合物、生物碱、氨基酸和肽类化合物等^[5], 复杂的化学成分增加了桑寄生 RNA 提取的难度, 虽然李永华等对桑寄生化学成分、种子特性及 DNA 条形码鉴定等方面进行了研究^[6-8],

但在桑寄生不同部位的 RNA 提取方面未见有研究。故本文通过比较 TRIzol 法、改良 TRIzol 法、CTAB-LiCl 法和 CTAB- 异丙醇四种方法提取桑寄生不同部位的 RNA, 所得结果将为桑寄生进一步的分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015 年 6-7 月样品采于广西药用植物园栽培基地, 样品包括桑寄生叶片、茎、花、果立即用液氮速冻或 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 实验试剂

TRIzol 试剂盒(天津市福晨化学试剂厂, 批号: 84704), 氯仿(天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20130718), 异丙醇(天津市致远化学试剂有限公司, 批号: 20130906), 氯仿: 异戊醇为 24:1(天津博迪化工股份有限公司, 批号: 20130513), 苯酚(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20140220), 75% 乙醇(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20120531), CTAB

收稿日期 2015-10-13

修回日期 2016-12-23

* 国家自然科学基金委青年科学基金项目(81403045) 桑寄生顽拗性种子保存及脱水敏感性死亡机理研究, 负责人: 韦树根 广西壮族自治区科学技术厅青年科学基金(2014GXNSFBA118204) 桑寄生顽拗性种子脱水敏感性分子机理研究, 负责人: 潘丽梅 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304006) 中药材种子种苗和种植(养殖)标准平台子课题——云木香、桑寄生、草果种子质量标准研究, 负责人: 马小军。
** 通讯作者: 马小军, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向: 药用植物遗传育种。

8 mol/L (北京久峰润达生物技术有限公司,批号:0140314)。LiCl(广州市金华化学试剂有限公司,批号:20130523),1%琼脂糖凝胶(批号:20150104),1×TAE缓冲液(北京博奥拓达科技有限公司,批号:20131116),DEPC水(加焦炭酸二乙酯灭菌超纯水(厦门星隆达化学试剂有限公司,批号:20140413))。

1.3 实验仪器

Eppendorf移液枪(德国Eppendorf公司),SIGMA Sartorius台式冷冻离心机(德国Sartorius公司),Bio-Rad电泳仪(美国Bio-Rad公司),ChemiDoc XRS凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),MILLIPORE超纯水机(法国MILLIPORE公司),制冰机(北京长流科学仪器公司),恒温干燥箱(上海天恒医疗器械有限公司),涡旋振荡仪器(上海青浦沪西仪器厂),水浴锅(上海天恒医疗器械有限公司),微量分光光度计(韩国OPTIZEN Nano Q型)。

1.4 操作方法

1.4.1 TRIzol试剂盒提RNA

取0.2 g植物组织,在液氮中研磨成细粉,转移至装有1 mL TRIzol的1.5 mL离心管中,再加入0.2 mL氯仿涡旋混匀15 s,室温静置3 min,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上清液转移至新的离心管中,加入等体积异丙醇,涡旋混匀,室温静置10 min,4℃下12 000 rpm离心10 min,弃上清,加入1 mL 75%乙醇溶液洗涤沉淀,4℃下8 190 rpm离心5 min,弃上清,室温干燥5 min,加50 μL DEPC处理水溶解。



图1 TRIzol法

注:M. Marker, 1. 叶片, 2. 茎, 3. 花, 4. 果。



图2 改良TRIzol法

注:M. Marker, 1. 叶片, 2. 茎, 3. 花, 4. 果。

1.4.2 改良TRIzol法提RNA

根据韦荣昌^[9]改良TRIzol法为基础进行改良:取0.2 g植物组织,在液氮中研磨成细粉,转移至装有1 mL TRIzol的1.5 mL离心管中,涡旋振荡1 min,4℃下2 000 rpm离心15 min,取上清液转移至新的离心管中,加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,涡旋振荡1 min,室温静置3~5 min,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上清液转移至新的离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇,室温静置3~5 min,4℃下12 000 rpm离心15 min,加入等体积氯仿,室温静置3~5 min,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上清液200 μL转移到新的离心管中,加入0.5 mL预冷的异丙醇,颠倒混匀8~10次,室温静置8~10 min,4℃下12 000 rpm离心10 min,弃上清,加入1 mL 75%乙醇溶液,4℃下8 190 rpm离心5 min,弃上清,室温干燥5 min,加50 μL DEPC处理水溶解。

1.4.3 CTAB-LiCl法

根据宋蓓^[10]LiCl法为基础进行改良:取0.2 g液氮研磨的样品迅速转移至60℃预热的含有600 μL CTAB的离心管中,涡旋振荡30 s,置60℃水浴2 min,期间颠倒混匀2~3次,室温冷却1 min后加入等体积氯仿:异戊醇溶液,涡旋振荡1 min后,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上清液,加入等体积的氯仿:异戊醇溶液,涡旋振荡1 min后,4℃下12 000 rpm离心15 min,将上清液转移至新的离心管中,加入1/3体积的8 mol·L⁻¹ LiCl,4℃过夜沉淀,4℃下12 000 rpm离心15 min,弃上清,加入1 mL 75%乙醇溶液,4℃下8 190 rpm离心5 min,弃上清,室温干燥5 min,加50 μL DEPC处理水溶解。

1.4.4 CTAB-异丙醇法

步骤同CTAB-LiCl法,用等体积的异丙醇沉淀。

1.5 RNA的质量检测

用1%的琼脂糖凝胶检测RNA的纯度和完整性,微量分光光度计检测RNA的浓度和纯度。

2 结果与分析

2.1 TRIzol试剂盒法和改良TRIzol提RNA

用TRIzol法以及改良TRIzol法提取RNA时,沉淀呈淡黄色,无法溶解在DEPC水中,加热溶解后,溶液呈乳白色混悬状,且无法完全溶解。电泳

后,结果如图 1 和图 2,条带均模糊不可见,可能是 RNA 长片段与多糖或某些次生代谢物结合,不能被核酸染料染色所致。

2.2 CTAB-LiCl 法

电泳结果图见图 3, RNA 浓度及 OD 值见表 1, 叶、茎、花条带清晰, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.80~2.10 之间,说明 RNA 在整个提取过程中结构完整,未发生明显降解。OD₂₆₀/OD₂₃₀ 均在 2.00~2.30 之间,说明去 DNA 和蛋白质效果很好。而种子外面还包裹一层胶状的果肉,可能含多糖和酚类物质较多, 提取过程中未去除干净,由图 3 和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 可知 RNA 出现了降解,而且含量也较低,CTAB-LiCl 法不适合作为提取种子 RNA 的方法。

2.3 CTAB- 异丙醇法

电泳结果图见图 4, RNA 浓度及 OD 值见表 2。叶片的条带模糊,略有降解,但 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.80~2.10 之间,浓度也较高,可能是点样过程中 RNA 污染了。茎、花、种子的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在合格范围内,18S 和 28S 条带也较清晰,但 5S 条带模糊,不清晰,说明 CTAB- 异丙醇法提取桑寄生的效果虽然较好,但达不到用于小 RNA 的分析。

3 讨论

在提取植物组织总 RNA 的过程中, RNA 酶(RNase)是决定提取效果的重要因素,包括内源性 RNase 和外源性 RNase。外源 RNase 存在的范围广而且很稳定。由于 RNA 是单链,不稳定,很容易降解。故在 RNA 提取时,所有研钵和玻璃器皿必须高温烘烤,所有离心管和枪头等塑料制品必须灭 RNase 酶且为提 RNA 专用,所有试剂的稀释必须用灭菌的 DEPC 水;为减少 RNA 的降解,所有操作都应该在低温下。操作台面应该用 75% 乙醇擦拭干净,在提取过程中多次用 75% 乙醇消毒,操作人员在操作过程中应佩戴口罩,使用一次性手套,并经常更换,减少人员流动,从而防止外源 RNase 的污染。

不同的植物提取 RNA 的方法不一样,富含次生代谢物的植物,分离高质量 RNA 的难度非常大^[11,12]。其次组织的破碎程度、RNase 的活性等^[13] 都会影响 RNA 提取的质量。多糖能与 RNA 共沉淀形成难溶的胶状物,还可以抑制许多酶的活性^[14]。由于桑寄生化学成分多,含多糖、蛋白质,所以要尽可能去除这些杂质,才能得到较好的结果。本研究采用 TRIzol 试剂盒法、改良 TRIzol 法、CTAB-LiCl 法、CTAB- 异丙醇法等 4 种方法,比较不同材料不同方法分离 RNA 的效果,目的找到一种适合于提取桑寄生不同组织 RNA 的方法,从而分离出高质量的 RNA,为桑寄生进一步的分子生物学研究提供基础。研究的结果表明,TRIzol 试剂盒法比较简单方便,耗时也较短,但是可能由于步骤比较简单,对杂质的去除不够彻底。改良 TRIzol 法加了苯酚,去除多糖、蛋白质等成分的能力更强,但还是不能将多糖和蛋白质等成分去除干净,无法从样品中提取 RNA。可能是因为桑寄生属于含多糖和酚

表 1 不同部位 RNA 的浓度和 OD 值

| 样品 | 浓度 ng·μL ⁻¹ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ |
|----|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 268 | 1.98 | 2.02 |
| 2 | 157 | 2.02 | 2.05 |
| 3 | 245 | 2.08 | 2.01 |
| 4 | 92 | 2.15 | 1.92 |

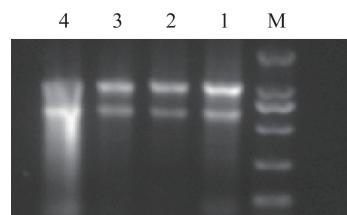


图 3 CTAB-LiCl 法

注:M. Marker, 1. 叶片, 2. 茎, 3. 花, 4. 种子。

表 2 不同部位 RNA 的浓度和 OD 值

| 样品 | 浓度 ng·μL ⁻¹ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ |
|----|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 132 | 1.95 | 2.12 |
| 2 | 106 | 1.98 | 2.08 |
| 3 | 114 | 2.03 | 2.21 |
| 4 | 96 | 1.99 | 2.07 |

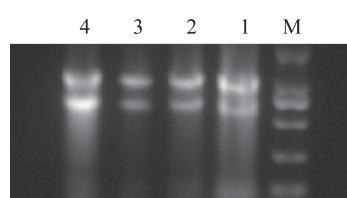


图 4 CTAB- 异丙醇法

注:M. Marker, 1. 叶片, 2. 茎, 3. 花, 4. 种子。

类成分较多，在桑寄生不同组织的 RNA 提取中，CTAB 较 TRIzol 试剂更能有效去除多糖和酚类等物质，CTAB 法提取的 RNA 沉淀呈透明状，溶解完全且电泳结果条带整齐无降解现象，从而能得到纯度较高、质量较好的 RNA。LiCl 本身沉淀大片段 RNA 效果好的特点使得到的 RNA 大片段损失很少，CTAB-LiCl 法提取的 RNA 质量较高、完整性较好，

条带清晰，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.80–2.10 之间，可以满足后续各种分子生物学研究的要求。而异丙醇沉淀获得的沉淀体积大，导致了多糖和酚类物质的共沉淀作用，CTAB- 异丙醇法提取桑寄生 RNA 的效果也较好，可用于转录组及 qPCR 等实验分析，但 5S 条带模糊，达不到小 RNA 分析的实验。故综合各种因素，CTAB-LiCl 更适合桑寄生 RNA 的提取。

参考文献

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 280.
- 郭彦萃, 熊毅, 张志. 桑黄总 RNA 提取方法研究. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 95–96.
- 李红熙, 徐美隆, 杨智. 一种适合葡萄多种组织的总 RNA 提取方法. 中国农学通报, 2012, 28(7): 155–159.
- 孙海波, 王智慧, 刘学群, 等. 一种适用于油菜、大豆、花生、芝麻四种油料作物种子的 RNA 提取方法. 中国油料作物学报, 2012, 34(4): 353–358.
- 李永华, 阮金兰, 陈士林, 等. 中国桑寄生科 Loranthaceae 药用植物资源学研究进展. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2009, 11(5): 665–669.
- Li Y H, Ruan J L, Chen S L, et al. Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *J Med Plants Res*, 2010, 4(24): 2706–2709.
- 苏本伟, 张协君, 李永华, 等. 柿树寄主的桑寄生科 7 种不同属桑寄生药用植物中槲皮苷含量分析. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2014, 16(2): 368–372.
- 李永华, 阮金兰, 陈士林, 等. 广寄生种子结构及其萌发实验研究. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2010, 12(6): 920–923.
- 韦荣昌, 马小军, 白隆华, 等. 罗汉果果实总 RNA 提取方法的比较研究. 浙江农业学报, 2014, 26(6): 1629–1634.
- 宋蓓, 赵锦, 刘孟军, 等. 改良 CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立. 中国农学通报, 2007, 23(7): 79–83.
- Wang T, Zhang N, Du L. Isolation of RNA of high quality and yield from *Girakgo biloba* leaves. *Biotechnol Lett*, 2005, 27: 629–633.
- 刘芳, 官春云. 富含多酚类植物 RNA 提取的研究进展. 作物研究, 2015, 29(1): 91–95.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 343–361.
- 李书杰, 郭晓博, 王运英, 等. 山药总 RNA 不同提取方法的比较研究. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2015, 43(3): 129–132.

Comparison of Four Methods for Total RNA Extraction from Different Sections of *Taxillus chinensis* (DC.) Danser

Wei Shugen^{1,2}, Ma Xiaojun¹, Fu Jin'e², Zhou Min³, Pan Limei²

(1. Institute of Medicinal Plant Development, China Academy of Chinese Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Guangxi Branch of Institute of Medical Plant Development, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanning 530023, China;

3. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530222, China)

Abstract: This study was aimed to extract high quality RNA from the *T. chinensis* (DC.) Danser. The leaves, stems, flowers and seeds of *T. chinensis* (DC.) Danser were used as materials. Four methods, which were the TRIzol reagent kit method, improved TRIzol method, CTAB-LiCl method, and CTAB-isopropyl alcohol method, were used to compare the effect of different methods and materials for the separation of RNA. The results showed that TRIzol reagent kit method and the improved TRIzol method cannot effectively remove the impurities such as polysaccharide and protein in the *T. chinensis* (DC.) Danser. Both of them were not suitable for the extraction of RNA from *T. chinensis* (DC.) Danser. The extraction of RNA with CTAB-LiCl method was with integrity and

high quality, which can meet the requirements of various molecular biology experiments subsequently. The RNA extraction effect with the CTAB-isopropyl alcohol method from *T. chinensis* (DC.) Danser was better, but it still cannot meet the small RNA analysis experiment requirement. It was concluded that the study provided foundation for *T. chinensis* (DC.) Danser subsequent molecular biology research, as well as provided the reference for the extraction of RNA from medicinal plants with relatively rich secondary metabolites.

Keywords: *Taxillus chinensis* (DC.) Danser, RNA extraction, polysaccharide, protein, CTAB-LiCl

(责任编辑:朱黎婷 张志华, 责任译审:王晶)