

山药总 RNA 不同提取方法的比较研究

李书杰^a, 郭晓博^a, 王运英^a, 赵喜亭^{a,b,c}, 李俊华^{a,b,c}, 李明军^{a,b,c}

(河南师范大学 a. 生命科学学院; b. 河南省绿色药材生物技术工程实验室;
c. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 为提取高质量的山药总 RNA, 以铁棍山药茎段为材料, 采用 Trizol 法、RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法、改良 CTAB 法和试剂盒法提取总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳分析所提取 RNA 的完整性, 并用超微量分光光度计分析 RNA 的纯度. 结果显示采用 Trizol 法难以提 RNA, RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法提取效果不理想, 存在 DNA 和蛋白质污染, 而用改良 CTAB 法和试剂盒法提取到的总 RNA 纯度高、完整性好, 其中, 改良 CTAB 法较试剂盒法价格便宜, 但提取过程较烦琐. 因此, 应根据实验需要选择 CTAB 法或试剂盒法提取铁棍山药总 RNA. 本结果对其他品种山药或富含多糖多酚类物质植物的 RNA 的提取也具有一定借鉴意义.

关键词: 山药; 茎段; 总 RNA 提取; 多酚类物质; 多糖

中图分类号: Q946

文献标志码: A

怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.) 又称薯蕷, 是薯蕷科薯蕷属的一种多年生缠绕草质藤本植物, 能形成肥大的地下肉质块茎. 它味甘而性平, 入脾、肺、肾三经, 具有健脾、补肺、固肾、益精等多种功效, 因其药用价值高、品质好, 故其产品畅销国内外^[1-2], 主产于河南省焦作市温县、武陟等地(明清时为怀庆府所辖), 是我国著名的“四大怀药”之一, 主要以块茎和珠芽入药, 具有很好的药用和食用价值^[3], 尤其是铁棍山药, 属怀山药中的“极品”, 备受国内外消费者的青睐, 被誉为“怀参”或“大棒人参”^[4].

高质量总 RNA 的提取是进行后续反转录 PCR, cDNA 文库构建和 Northern 杂交等分子生物学研究的必要前提^[5-6], 而对于山药核酸的提取, 目前报道多以 DNA 的提取为主^[7-8], 而对 RNA 的提取报道很少^[9]. 山药茎段中含有较多的多糖、多酚等化合物, 尤其是多糖的许多理化性质与 RNA 相似, 在提取过程中, 容易与 RNA 形成胶状物共沉淀, 因此在去除多糖的同时会造成 RNA 的损失, 使 RNA 产量减少; 酚类物质极易被氧化成多醌类物质, 与 RNA 不可逆结合, 进而影响 RNA 的产量和活性^[10], 最终均导致总 RNA 的提取较为困难. 因此, 本试验在参考其他含多糖多酚类物质植物 RNA 提取方法的基础上, 以铁棍山药茎段为材料, 拟探索出一种既快捷又高质量的提取山药总 RNA 的方法, 为深入开展山药分子生物学研究奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

来自“河南省高校道地药材保育及利用工程技术研究中心(依托河南师范大学生命科学学院)”继代培养的铁棍山药(*D. opp. cv. Tiegun*)试管苗.

1.2 实验试剂

Trizol 法所需试剂: Trizol; 氯仿; 异丙醇; 柠檬酸钠; 75% 乙醇; RNase-free 水.

收稿日期: 2015-01-01

基金项目: 国家自然科学基金(81274019); 河南省创新型科技人才队伍建设工程(C20130037); 新乡市科技创新平台建设
项目(CP1401); 河南师范大学青年科学基金项目(2013QK11).

作者简介: 李书杰(1988-), 女, 河南南阳人, 河南师范大学硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术.

通信作者: 李明军(1962-), 男, 河南温县人, 教授, 博士, 主要从事植物生理学教学及植物生物技术应用研究, E-mail: lim-
ingjun2002@263.net.

RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法所需试剂:RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue;氯仿;异丙醇;75%乙醇;高盐溶液;5 M NaCl;RNase-free 水。

改良 CTAB 法所需试剂:CTAB 提取缓冲液(2% CTAB (W/V), 2% PVP (W/V), 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH=8.0), 2.0 mol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH=8.0), 使用前加入 2% β-巯基乙醇);氯仿;异戊醇;异丙醇。

试剂盒法所需试剂:Buffer PE;Buffer NB;Buffer RL(每 1 mL Buffer RL 中加入 20 μL 的 50×DTT Solution);Buffer RWA;Buffer RWB(首次使用前,需向其中添加 70 mL 的无水乙醇);无水乙醇;80%乙醇;10×DNase I Buffer;Recombinant DNase I;RNase Free dH₂O。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取

1) Trizol 法 参考郭彦萃等^[11]的方法,并加以改进:在氯仿抽提液中加入各 300 μL 异丙醇和柠檬酸钠,以促使多糖析出。

2) RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法. 参考 TaKaRa 试剂说明书进行。

3) 改良 CTAB 法。(a)取 50~100 mg 新鲜或超低温冻存的铁棍山药茎段放入研钵,在液氮中迅速研磨成粉末状. 迅速将粉末状样品转入 800 μL 提取缓冲液中,涡旋振荡器混匀,65℃水浴 10 min,每隔 2 min 混匀一次;(b)水浴结束后,冷却至室温. 向离心管中加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),涡旋振荡器充分混匀,冰浴 10 min. 4℃下 12 000 g 离心 10 min;(c)取上清,转入新的 2 mL 离心管中,重复操作步骤(2)、(3);(d)取上清,转入新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min. 4℃, 12 000 g 离心 15 min. 弃掉上清;(e)向 RNA 沉淀中加入 1 mL 75%乙醇,漩涡振荡器上振荡混匀 5 s, 4℃, 7 500 g 离心 5 min, 弃上清. 4℃, 7 500 g 离心 1 min, 用枪头小心吸弃多余液体;(f)将 RNA 沉淀置于超净工作台吹干,约 5~10 min, 用适量 DEPC 处理水溶解 RNA 沉淀. 待 RNA 沉淀完全溶解后于-80℃保存。

4) 试剂盒法. 参照 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 说明书进行。

1.3.2 RNA 完整性的分析

取 2 μL 提取到的铁棍山药总 RNA 与 1 μL 6×loading Buffer 混合,用 1%的琼脂糖凝胶于 120 V 电泳 20 min,然后在凝胶成像仪上观察 RNA 完整性。

1.3.3 RNA 纯度的分析

取 1 μL 提取的铁棍山药总 RNA,用超微量分光光度计测其浓度、A₂₆₀/A₂₈₀ 和 A₂₆₀/A₂₃₀ 的值。

2 结果与分析

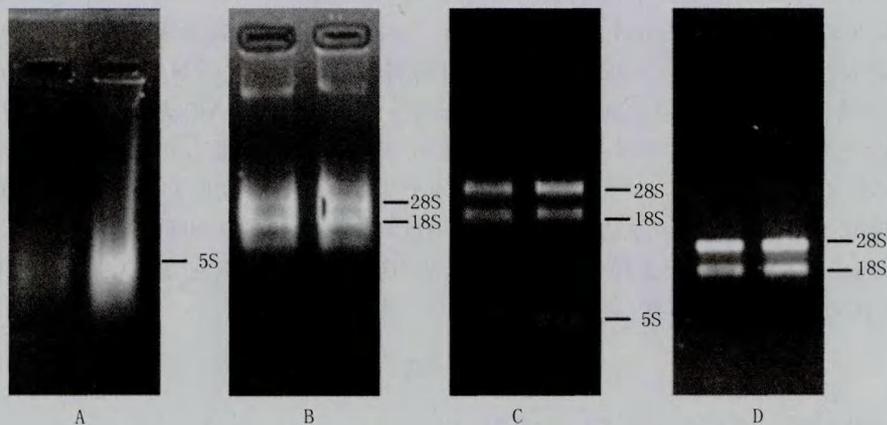
2.1 不同方法提取铁棍山药茎段总 RNA 样品完整性检测

将所提取的铁棍山药总 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示用 Trizol 法提取的铁棍山药茎总 RNA 不能清晰分辨出 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带(图 1-A);RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法提取的总 RNA 中,可以看到有 28S、18S 和 5S 3 条带,但 28S 条带的亮度与 18S 条带亮度几乎一致,5S 呈弥散状,同时观察到有 DNA 的存在(图 1-B);改良 CTAB 法提取的总 RNA 中,可以清楚看到有 28S、18S 和 5S 3 条带,且条带清晰并无杂带(图 1-C);试剂盒法提取的总 RNA 中,可以明显看到清晰、完整的 28S 和 18S 两条主带,且 28S 条带的亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍,5S 条带不明显,另外在点样孔附近看不到杂带(图 1-D),这说明提取到的铁棍山药总 RNA 没有被降解且纯度较高,没有蛋白质和基因组 DNA 的污染. 从这 4 种方法提取的总 RNA 样品的电泳图中可以得出,改良 CTAB 法和试剂盒法提取的总 RNA 质量高,完整性好,可用于下一步的分子生物学实验。

2.2 不同方法提取铁棍山药总 RNA 纯度、浓度的检测与分析

将 A、B、C、D 4 种方法提取的铁棍山药总 RNA 进行纯度分析,其结果见表 1. 280 nm、230 nm 和 260 nm 下吸光度值依次代表了核酸、盐浓度和蛋白质等有机物的含量. 质量较好的核酸 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应介于 1.8~2.2, 比值大于 2.2 则说明有核酸降解, 比值低则说明提取的 RNA 中有蛋白质及苯酚等杂质残留。

A260/A230 的比值应大于 2.0, 比值小则说明提取的 RNA 中有抽提试剂或多糖等杂质残留污染。



A: Trizol法; B: RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue法;
C: 改良CTAB法; D: 试剂盒法

图 1 不同方法提取的RNA电泳图

表 1 不同提取方法所得的 RNA 的纯度和质量浓度

提取方法	A260/A280	A260/A230	质量浓度/(ng·μL ⁻¹)
Trizol 法	1.49	0.84	49.2
RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法	1.70	1.68	94.7
改良 CTAB 法	2.06	2.12	126.5
试剂盒法	2.08	2.15	147.3

从表 1 中可以看出 Trizol 法提取的铁棍山药总 RNA 的 A260/A280 比值为 1.49, 小于 1.8, 说明提取的 RNA 中有蛋白质及酚类物质等杂质的污染; A260/A230 的比值为 0.84, 明显小于 2.0, 说明提取的 RNA 中有抽提试剂或多糖等杂质残留; RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法提取的铁棍山药总 RNA 的 A260/A280 比值为 1.70, 小于 1.8, 说明提取的 RNA 中有蛋白质或者其他有机物的污染; A260/A230 的比值为 1.68, 小于 2.0, 说明提取的 RNA 中有抽提试剂或多糖等杂质残留, 这与实际操作中铁棍山药茎段中多糖含量较多, 沉淀时大量多糖与 RNA 一起沉淀, 造成提取到的 RNA 中可能有多糖的残留相符合; 改良 CTAB 法和试剂盒法提取的铁棍山药总 RNA 的 A260/A280 的比值分别为 2.06 和 2.08, 都在 1.8~2.2 之间, 说明提取的 RNA 纯度较高无蛋白质的污染; A260/A230 的比值分别为 2.12 和 2.15, 均大于 2.0, 说明提取的 RNA 纯度较高没有有机抽提试剂或者多糖等杂质的残留, 这与电泳结果相符。综上可知, 改良 CTAB 法和试剂盒法提取的铁棍山药总 RNA 纯度优于 RNAiso for Polysacchariderich Plant Tissue 法和 Trizol 法。

3 讨 论

山药茎段中含有大量多糖和多酚等次生代谢物质。在实验中发现, 多糖和酚类物质对铁棍山药总 RNA 的提取影响较大。由于多糖的许多理化性质与 RNA 相似^[12], 在去除多糖的同时 RNA 也随之被带走, 这就造成 RNA 降解或产量降低^[13]; 而在沉淀 RNA 时, 多糖易与其形成共沉淀, 很难将二者分离, 从而造成一定量的 RNA 降解或丢失, 且含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水, 或溶解后的溶液很黏稠, 而且多糖会抑制许多酶的活性, 这些物质的存在使得铁棍山药总 RNA 的提取变得棘手。因此, 能否在总 RNA 提取过程中尽早地使 RNA 与蛋白质、多糖及基因组 DNA 等杂质分离, 以减少 RNase 作用的时间和机会, 并避免 RNA 与上述杂质共沉淀, 成为山药总 RNA 提取工作成败的关键。

由于不同的生物材料的内含物组成及 RNA 含量的不同, 使得用不同的 RNA 提取方法提取同一生物材料所得的 RNA 的质和量会出现很大差别^[14-15]。为了寻找一种高得率、高质量的山药总 RNA 提取方法, 本

实验通过分析 RNA 的电泳图谱、纯度和浓度,比较了用 Trizol 法、RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 法、改良 CTAB 法和试剂盒法提取的铁棍山药总 RNA 的质量,结果发现用 Trizol 法难以提取 RNA,且所需样品量较多;RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 法是针对富含多糖、多酚植物组织 RNA 提取的一种方法,但提取铁棍山药总 RNA 所需样品较多且所得的铁棍山药总 RNA 纯度较低,存在有蛋白质、多糖和基因组 DNA 的污染,不适合用于进一步的实验研究;而用改良 CTAB 法和试剂盒法提取铁棍山药总 RNA 所需样品量较少,且所得的总 RNA 纯度高、浓度高、完整性较好,适合用于铁棍山药后期的高通量测序、Northern 杂交、RT-PCR 和 cDNA 文库的构建等分子生物学实验,改良 CTAB 法所需费用较试剂盒法低,而试剂盒法提取 RNA 较 CTAB 法方便,时间短。因此,改良 CTAB 法和试剂盒法可作为提取怀山药总 RNA 的首选方案,应根据自己需要选择合适的提取方法。这两种方法对其它富含蛋白质、多糖和多酚等次生物质的植物材料 RNA 的提取也具有一定借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海:上海科技出版社,1997:167.
- [2] 姚宗凡,黄英姿. 常用中药种植技术[M]. 北京:金盾出版社,1993:70.
- [3] 李海兵,周娜,赵姣,等. 怀山药种质资源的包埋玻璃化超低温保存与植株再生[J]. 植物学报,2010,45(3):379-83.
- [4] 刘莹,赵喜亭,赵月丽,等. 铁棍山药 PPO 的最适底物、热稳定性及褐变控制研究[J]. 河南农业科学,2010,12(4):95-98.
- [5] 王东,白雁,陈志红. 不同产地山药 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):54-55.
- [6] 淦国英,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.
- [7] 李明军,徐鑫,张晓丽,等. 山药基因组 DNA 的提取和 RAPD 反应条件的优化[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2007,35(1):140-143.
- [8] 周延清,景建洲,郝建国,等. 用 ISSR 标记技术分析山药品种遗传多样性[J]. 实验生物学报,2005,38(4):324-329.
- [9] 罗火林,张亚楠,杨柏云. 紫山药组织 RNA 的提取方法[J]. 南昌大学学报(理科版),2014,38(4):373-376.
- [10] 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.
- [11] 郭彦琴,熊毅,张志. 桑黄总 RNA 提取方法研究[J]. 浙江农业学报,2014,26(1):95-99.
- [12] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 163(1):16-20.
- [13] 胡国斌,梅兴国,刘怡. 改良异硫氰酸胍一步法提取红豆杉细胞 RNA[J]. 生物技术,2001,11(5):31-33.
- [14] 张玉进,孟祥春,潘瑞焱,等. 非洲菊总 RNA 提取方法的改进[J]. 植物学通报,2001,18(6):722-726.
- [15] 夏海武,吕柳新,陈桂信. 羊蹄甲果荚中总 RNA 提取的新方法[J]. 分子植物育种,2006,4(1):147-149.

Comparison of Total RNA Isolated from *Dioscorea opposita* Thunb. Using Different Methods

LI Shujie^a, GUO Xiaobo^a, WANG Yunying^a, ZHAO Xiting^{a,b,c}, LI Junhua^{a,b,c}, LI Mingjun^{a,b,c}

(a. College of Life Sciences; b. Engineering Laboratory of Green Medicinal Material Biotechnology, Henan Province; c. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

Abstract: This study is aimed to obtain high-quality total RNA from *Dioscorea opposita* Thunb. Total RNA from nodal segments of *D. opp. cv. Tiegun* was extracted by the trizol reagent, the RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue Kit method, a modified CTAB method, and the TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit method. The quality of isolated total RNA was analyzed by agarose gel electrophoresis and ultramicro-spectrophotometer, and the efficiency of different methods were compared. The results showed that it was difficult to isolate RNA with Trizol method. RNA isolated with RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue Kit was contaminated by DNA and protein. With the TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit and the modified CTAB method, high quality RNA was obtained. Therefore, the modified CTAB method and the TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit method are better for total RNA isolation from *D. opp.* The modified CTAB method is more economic than the TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit method, however, it is more tedious than the TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit method. Our study is valuable for total RNA isolation from not only Tiegun yam, but also from other varieties of *D. opp.* and polyphenol-and polysaccharide-rich plants.

Keywords: *Dioscorea opposita* Thunb.; stem segment; total RNA isolation; polyphenol-rich plants; polysaccharide