

提取高质量人参 RNA 的方法研究*

王 昆 王 颖 鲍永利** 孟祥颖 乌 垠 李玉新**

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024)

摘要 针对人参组织多酚、多糖类物质含量较高的特点, 比较了改良的异硫氰酸胍法、改良的 CTAB 法和改良的 Trizol 法等 3 种不同的 RNA 提取方法. 3 种改良的方法均能从人参组织中提取到总 RNA. 其中改良的 Trizol 法能有效地抑制酚类物质和多糖对总 RNA 提取的影响, 能从成熟的叶片中获得高质量、完整性好的总 RNA, 每克新鲜组织 RNA 产量在 90~120 μg 之间, 电泳分析, 28 S rRNA 亮度约为 18 S rRNA 的 2 倍, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0 之间. 用改良的 Trizol 法分离的 RNA, 已成功进行了 RT-PCR 及人参叶 cDNA 文库构建等研究.

关键词 RNA 提取, 人参, 次生物质

学科分类号 Q946

RNA 提取技术不仅是分子生物学技术的重要组成部分, 也是功能基因组学技术的重要基础. 从植物组织中提取完整性好、纯度高的高质量 RNA, 是许多分子生物学实验尤其是以植物材料为背景的 DDRT-PCR、RACE、RNA 印迹、cDNA 文库构建、进行基因克隆和基因表达分析的重要前提. 有关从植物组织中提取 RNA 方法的报道很多^[1~4]. 植物细胞壁厚实且成分复杂, 细胞内富含单宁、萜烯、色素、酚等次生代谢物及蛋白质、多糖等大分子, 这些物质不但影响提取效率, 而且干扰其后的逆转录、酶切等实验操作^[5,6]. 且不同植物代谢物, 尤其是多糖及多酚的化合物, 含量亦不相同, 因而尽管有几种方法常被用于植物总 RNA 的分离, 但是基于植物化学组分的异质性, 不会存在一种适合于所有植物核酸的提取方法. 因此, 必须针对不同植物组织的特点, 对 RNA 的提取方法进行优化选择^[7,8]. 为从人参植物叶分离、筛选及克隆如人参皂苷等有效成分的生物合成相关基因, 需要用一种能获得高质量并包含稀有基因转录本的 RNA 分离法. 鉴于此, 我们尝试几种从人参植物叶组织中提取总 RNA 的方法, 经过多次实验, 认为用改良的 Trizol 法能够简便快速地提取出高质量的总 RNA, 并成功应用于逆转录和 cDNA 文库构建等分子生物学实验, 且得到了很好的结果. 同时, 对其他植物特别是含次生代谢物较多的多年生草本植物的总

RNA 提取具有指导和借鉴意义.

1 材料和方法

1.1 实验材料

6年生新鲜人参植株采自我国吉林省吉林市左家特产研究所. 取人参叶于自来水下冲洗以去除黏附的泥土, 用含少量清洁剂的水洗净, 置 70% 的乙醇中消毒 30 s, 再经无菌水冲洗后, 置于消毒滤纸上吸干水分, 于液氮中快速冷冻并保存于 -70℃ 或直接用于 RNA 的提取.

实验操作中使用的塑料制品如 Eppendorf 管、吸头等用 0.1% DEPC 水, 37℃ 处理 24 h, 然后高压灭菌后备用. 玻璃器皿于 200℃ 干热灭菌 10 h. 电泳槽等用 3% H_2O_2 处理.

1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; DEPC 为 Sigma 公司产品; cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司. 其余生化试剂苯酚、氯仿、乙醇、异丙醇、异戊醇、NaCl、NaAc、Tris、EDTA、NaOH、异硫氰酸胍、柠檬酸钠、十二烷基肌氨酸钠、巯基、乙醇、PVP 均为进口及国产分析纯.

*吉林省社会发展计划中药现代化专项重大项目 (20011109).

** 通讯联系人. Tel: 0431-5099502, E-mail: baoyl800@nenu.edu.cn

收稿日期: 2005-06-23, 接受日期: 2005-08-30

实验前所有配制的溶液 (Tris 除外) 均需经 0.1% DEPC 水, 37℃ 处理 24 h, 高压灭菌后方可使用. 含 Tris 的溶液用经高压灭菌的 0.1% DEPC 处理的水配制.

1.3 RNA 提取方法

1.3.1 改良的异硫氰酸胍法. a. 取 6 年生的人参成熟叶片约 200 mg 置于盛有液氮的研钵中, 迅速研磨成粉末后, 将粉末移入冰上预冷的加有 800 μ l 提取缓冲液 (4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠 pH 7.0, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 8% PVP, 用前加入 0.1 mol/L 的 β - 巯基乙醇) 的离心管中. b. 振荡混匀后加入 50 μ l 2 mol/L NaAc (pH 4.2) 和等体积的氯仿 / 异戊醇, 充分混匀. 冰浴 15 min 后 4℃ 12 000 *g* 离心 20 min. c. 转移上清液至一新离心管中, 用等体积的氯仿 / 异戊醇抽提至界面清亮后, 转上清至一新管, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 置 -20℃ 沉淀 2 h. 4℃ 12 000 *g* 离心 30 min. d. 小心去除上清液, 沉淀用 500 μ l 提取缓冲液重悬, 同时加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 2 h 以上. 4℃ 12 000 *g* 离心 30 min. e. 弃上清, 75% 乙醇洗沉淀 2 次, 室温下干燥, 溶沉淀于 20 μ l DEPC 处理的消毒双蒸水中.

1.3.2 改良的 CTAB 法. a. 先在 2 ml 含 CTAB 的提取缓冲液中 (2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA pH 8.0) 加入 2% β - 巯基乙醇和 2% PVP, 置 65℃ 预热. 再将 300 mg 经液氮研磨的叶片粉末放入其中, 用力混匀后, 置于 65℃ 中保温 1 h (每 10 min 摇匀一次). b. 然后取出样品, 自然冷却至室温, 分装于 3 个 2 ml 的 Eppendorf 管, 每管 1 ml. c. 向每管中加入 600 μ l 氯仿 / 异戊醇混合液 (24 : 1) 抽提至界面干净. d. 氯仿 / 异戊醇抽提一次. 室温下 12 000 *g* 离心 20 min. e. 取上清加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇混匀后置于 -20℃ 放置 2 h, 4℃ 12 000 *g* 离心 30 min. f. 沉淀物用 75% 乙醇洗 2 次, 室温干燥后分别溶于 20 μ l 的 DEPC 处理水中.

1.3.3 改良的 Trizol 试剂分离法. a. 取研磨成粉末的 100 mg 人参叶置于 2 ml Eppendorf 管中, 加入 1 ml Trizol 试剂, 移液器吸头重悬沉淀, 迅速混匀置冰上静置 5 min. b. 加入 50 μ l 2 mol/L NaAc (pH 4.2), 200 μ l 氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 震荡混匀, 再缓慢加入 150 μ l 无水乙醇和 100 μ l 5 mol/L KAc

(pH 4.8), 充分混匀. c. 加入 1% PVP 和 1% β - 巯基乙醇充分混匀, 冰浴 10 min 使组织充分裂解, 4℃ 12 000 *g* 离心 20 min. d. 将上清 (水相) 移至一新的管中加入等体积水饱和酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25 : 24 : 1) 充分混匀, 4℃ 12 000 *g* 离心 10 min. e. 重复氯仿 / 异戊醇抽提直至界面干净. f. 移上清至一新的 Eppendorf 管中, 加入 2/3 体积的异丙醇及等体积 Trizol 于 -20℃ 沉淀 1 h, 4℃ 12 000 *g* 离心 30 min. g. 沉淀用 75% 乙醇洗 2 次后在空气中干燥 10 min, 加入 20 μ l DEPC 处理的消毒水溶解 RNA. h. 待 RNA 溶解后加入 200 μ l 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 混匀, 4℃ 12 000 *g* 离心 20 min, 弃上清液. i. 沉淀用 75% 乙醇洗后于空气中干燥, 再加入 20 μ l DEPC 处理的水溶解.

1.4 RNA 的质量及完整性检测

1.4.1 RNA 的纯度和完整性. 分别取 5 μ l RNA 样品, 在 1.0% 的非变性琼脂糖凝胶上电泳检测. 分别取 10 μ l 人参总 RNA 溶液, 加灭菌的 DEPC 水至 3 ml, 用紫外分光光度计测量样品在 260 nm、280 nm 处的吸光度, 并计算得率.

1.4.2 RT-PCR 及 cDNA 文库检测. 将所得的 RNA 按 Clontech 公司的反转录酶操作说明反转录成 cDNA 后作为模板, 利用试剂盒提供的一对引物, 进行 RT-PCR 扩增使之成为双链 cDNA. PCR 反应条件为: 95℃ 1 min, 95℃ 20 s, 68℃ 6 min, 27 个循环. 反应结束后取 5 μ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测.

cDNA 文库的构建及滴度测定按 Clontech 公司的 SMART™ cDNA 文库合成试剂盒的操作说明进行. 从构建好的文库随机挑取噬菌斑进行 PCR 扩增来鉴定文库的质量.

2 结 果

2.1 人参总 RNA 的提取

电泳结果显示 (图 1), 3 种改良的方法均能从成熟的人参叶片中提取出总 RNA, 其中改良的异硫氰酸胍法产率最低, 28 S rRNA 与 18 S rRNA 亮度相近, 说明 RNA 有一定程度的降解. 改良的 CTAB 法提出的总 RNA, 电泳后, 泳道中背景较深, 说明有蛋白质、酚和无机盐等杂质未除去, 纯度较差.

从图 1 可以看出, 只有改良的 Trizol 法能从成熟的叶片中提取出总 RNA, 且泳道中无背景, 带型清晰, 28 S rRNA 的亮度是 18 S rRNA 亮度的 2

倍. 经紫外分光光度计测定 230 nm、260 nm、280 nm 的 A 值, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0 之间, A_{260}/A_{230} 大于 2.0. 表明所提 RNA 较纯, 而且 RNA 产率也比另两种方法提取的产率高, 介于 90~120 $\mu\text{g/g}$ 之间. 通过多次实验验证, 结果稳定.

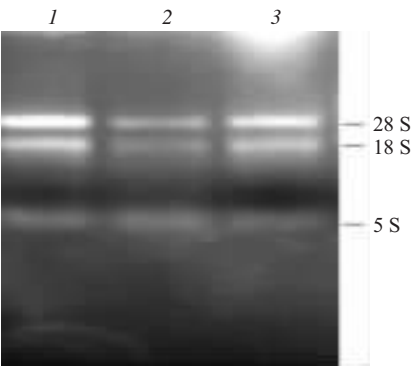


Fig. 1 Ethidium bromide-stained 1.0% agarose gel analysis of total RNA isolation from *Panax ginseng* leaf tissues with different method
1: RNA extracted by the improved Trizol; 2: RNA extracted by the modified acid guanidinium thiocyanate method; 3: RNA extracted by the modified CTAB.

2.2 RT-PCR

为进一步证明改良的 Trizol 法从人参叶组织中提取的总 RNA 完全可以用于 RT-PCR 及 cDNA 文库构建等分子生物学方面的研究, 以所提总 RNA 为模板进行 RT-PCR. 从扩增结果可以看出, 双链 cDNA 片段大小主要集中分布在 0.3~2.5 kb 之间, 由于植物 RNA 相对较短, 因此在这个范围内的 cDNA 是比较完整的. 同时表明提取的总 RNA 质量较高, 降解量少 (图 2).

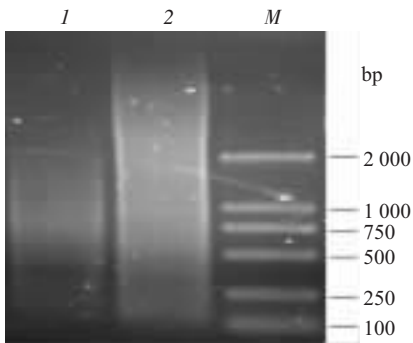


Fig. 2 Agarose electrophoresis analysis of RT-PCR products from total RNA extracted from *Panax ginseng* leaf tissues
1: ds-cDNA; 2: Control poly⁺ RNA from human placenta; M: DNA (DL-2000) marker.

2.3 cDNA 文库的构建

根据 Clarke 和 Carbon 的公式^[9], 要使低丰度 mRNA 被筛选到的保证系数达到 99%, cDNA 文库所需的克隆数为 2.073×10^5 , 而我们得到的克隆数为 1.2×10^6 , 完全能够保证从这个文库中筛选到所要的低拷贝基因. 扩增文库的滴度为 7.6×10^{10} pfu/ml, 蓝白斑鉴定重组率为 86%. 从文库中随机挑选 16 个噬菌斑, 以载体上已知序列为引物进行 PCR 验证插入片段大小, 其插入片段长度在 0.3~2.0 kb 之间, 平均大小在 1 kb 左右, 符合文库构建的要求. 因为 cDNA 文库构建的关键是获得高质量的总 RNA 和 mRNA, 这也进一步验证了用改进的 Trizol 法从人参叶组织中提取出完整性好的高质量 RNA (图 3).

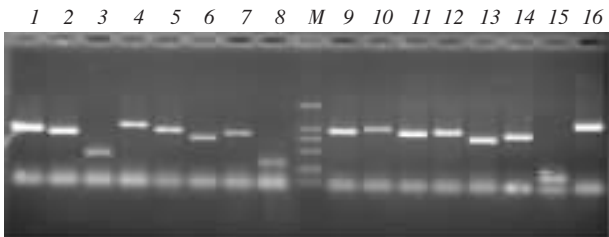


Fig. 3 PCR products of random clones from cDNA amplified library was analyzed by electrophoresis on 1.0% agarose gel
1~16: PCR products of random clones; M: DL-2000 marker.

3 讨 论

由于人参组织中酚类物质和多糖的影响, 常规的异硫氰酸胍法、CTAB 法、Trizol 试剂盒法从人参材料中提取的总 RNA 质量很差. 且随着人参叶片的生长及达到成熟, 植物体内代谢中降解的趋势大于合成, 包括 RNase 在内的各种水解酶大量积累, 同时多酚和多糖的含量也随之增加. 这些都对人参的总 RNA 提取及相关的分子生物学研究造成了很大的障碍.

成熟人参叶组织中含有大量的酚类及其代谢物, 在氧化条件下, 酚类物质会产生褐化效应 (browning effect)^[10,11], 酚类物质氧化成多醌后不可逆地结合到核酸上并与 RNA 共沉淀, 这导致 RNA 产量和质量均很差^[12]. PVP 作为多酚化合物的螯合剂, 具有很强的结合酚的能力, 使之不能被氧化成醌类, 有效地防止其与 RNA 的结合. β -巯基乙醇作为强还原剂能防止多酚氧化, 还可以打断多酚氧

化酶的二硫键而使之失活^[13]. 在改良的 3 个方法中, 提取缓冲液中同时加入 PVP 和 β - 巯基乙醇, 二者协同作用, β - 巯基乙醇提供还原条件, 使得多酚类物质不易被氧化, 得以与水溶性 PVP 充分结合, 形成螯合物, 再通过以后的步骤抽提除去, 有效抑制了酚类物质的阻碍^[14]. 而单独加入 PVP 或 β - 巯基乙醇都无法有效抑制多酚类物质的影响^[15].

多糖是另一个干扰人参总 RNA 提取的因素, 因其理化性质与 RNA 相似, 提取中往往与 RNA 形成难溶的共沉淀, 或溶解后形成黏稠的溶液, 无法用于下一步的分子生物学实验. 在改良的 Trizol 法中, 用 1/10 体积的乙醇和 1/15 体积的 5 mol/L KAc (pH 4.8) 共沉淀匀浆上清液中的多糖, 有效地去除了多糖的干扰.

在以上 3 种改良的提取方法中, 均未向组织匀浆液中加入水饱和酚进行抽提, 是因为 PVP 结合多酚的同时, 也与水饱和酚发生不可逆的结合^[16], 产生白色絮状物, 裹走大量 RNA. 在这 3 种改良的方法中还避免了用 LiCl 作为沉淀剂来沉淀 RNA. 原因是 LiCl 沉淀时间过长, 往往需要过夜沉淀. 而且 LiCl 只能选择性地沉淀高分子质量的 RNA, 这就会导致小分子质量 RNA 的丢失, 同时样品中残余的 LiCl 会干扰 RNA 的反转录、cDNA 文库构建和体外翻译等实验, 所以一般需要再次抽提, 乙醇沉淀以纯化样品. 而改良的 Trizol 法中采用高浓度盐 NaAc, 使 RNA 从高盐溶液中析出, 多糖则溶于高浓度的盐溶液中通过离心可进一步纯化 RNA. 这种方法简便易行而且效果很好. 同时沉淀的时间也相对较短.

目前发表的关于植物 RNA 提取的文献很多, 但不同植物或同一植物的不同品种往往因种属差异, 材料内含物组分及含量而有很大不同, 所以需要采用不同的 RNA 提取方法. 针对人参组织中富含多酚和多糖的特点, 在 Trizol 法上加以改良, 提取到了高质量的 RNA. 并在此基础上成功进行了 RT-PCR 和 cDNA 文库构建等分子生物学研究. 为其他植物尤其是含多糖、多酚等次生代谢物较多的植物组织 RNA 的制备提供了理论参考.

参 考 文 献

1 Lu Z, Yang Y H. Extraction of total RNA from *Onosma Paniculatum*,

- a Chinese medical plant, by CTAB method. *Letters In Biotechnology*, 2004, **15** (4): 372~373
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~159
- 3 Gehrig H H, Winter K, Cushman J, *et al.* An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharide. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, **18** (3): 369~376
- 4 Sun C, Chen W D, Lin Z P. A modified method for RNA purification from *Artemisia desertorum spreng* plant. *Biotechnology Bulletin*, 2004, **5** (1): 43~45
- 5 李 宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策. *生物技术通报*, 1999, **15** (1): 36~39
- Li H, Wang X L. *Biotechnology Information*, 1999, **15** (1): 36~39
- 6 Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton. *Anal Biochem*, 1994, **200** (3): 7~12
- 7 Mattheus N, Ekramoddoullah A K, Lee S P. Isolation of high-quality RNA from white spruce tissue using a three-stage purification method and subsequent cloning of a transcript from the pp-10 gene family. *Phytochem Anal*, 2003, **14** (4): 209~215
- 8 Sharma A D, Gill P K, Singh P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Anal Biochem*, 2003, **314** (2): 319~321
- 9 Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 1976, **9** (6): 91~99
- 10 Lessard P, Decroocq V, Thomas M. Extraction of RNA, cloning and subtractive hybridization. In: Clark M S, ed. *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*. New York: Springer Verlag Berlin Herdelberg, 1997. 152~158
- 11 SU X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae. *Anal Biochem*, 1988, **174** (3): 650~657
- 12 Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal Biochem*, 1991, **197** (1): 91~95
- 13 李菁芳, 黄劲毅, 田仁鹏. 一种适用于 RT-PCR 的杉树类植物中总 RNA 提取的方法. *武汉植物学研究*, 2004, **22** (6): 551~556
- Li Y F, Hang S Y, Tian R P. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2004, **22** (6): 551~556
- 14 Zhang J J, Wang Y J, Wang X P. An improved method for rapidly extraction total RNA from vitis. *J Fruit Sci*, 2003, **20** (3): 178~181
- 15 Lakhvir L, Rashmita S, Rajesh K G, *et al.* RNA isolation from high phenolic tea leaves and apical buds. *Plant Mol Biol Repr*, 2001, **19** (2): 181~185
- 16 Salzman R A, Fujita T, Zhu-Salzman K, *et al.* An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds of carbohydrates. *Plant Mol Repr*, 1999, **17** (5): 11~17

A Method for High-quality RNA Extraction From *Panax ginseng* Plant Tissues*

WANG Kun, WANG Ying, BAO Yong-Li**, MENG Xiang-Ying, WU Yin, LI Yu-Xin**

(Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract Extraction of high-quality RNA from *Panax ginseng* tissues is particularly difficult due to high levels of polyphenolics and polysaccharides, or other compounds that bind and/or coprecipitate with RNA. The methods such as guanidinium thiocyanate, CTAB and modified Trizol were applied to isolate high purity and integrity RNA from *Panax ginseng*. By all of these methods total RNA can be obtained, but only by the modified Trizol method, it extracts integrity and undegraded RNA from mature leaf tissue. Following this efficient procedure, 90~120 $\mu\text{g/g}$ total RNA from leaf tissues can be obtained. The ratio of intensities of the 28 S and 18 S rRNA bands was 2 : 1. The absorbance ratios (A_{260}/A_{280}) were 1.8 to 2.0. The RNA is suitable for RT-PCR and cDNA library construction.

Key words RNA extraction, *Panax ginseng*, secondary substance

*This work was supported by a grant from The Science Fund for Social Development Program (Modern Chinese Medicine) of Jilin Province (20011109).

**Corresponding author . Tel: 86-431-5099502, E-mail: baoyl800@nenu.edu.cn

Received: June 23, 2005 Accepted: August 30, 2005