

技术主题

Technology Feature

三种提取铁皮石斛叶片总 RNA 方法的比较

孟衡玲¹, 杨生超¹, 文国松¹, 查应洪³, 段承俐^{1,2}

1. 云南农业大学中药材研究所, 云南省中药材规范化种植技术指导中心, 云南, 650201

2. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江, 311300

3. 云南红河群鑫石斛种植有限公司, 云南, 661200

✉ 通讯作者: dcl_12103@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 83 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0083

收稿日期: 2011 年 05 月 20 日

接受日期: 2011 年 06 月 20 日

发表日期: 2011 年 06 月 27 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

孟衡玲等, 2011, 三种提取铁皮石斛叶片总 RNA 方法的比较, 分子植物育种 Vol.9 No.83 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0083)

摘要 在提取富含多糖类植物组织 RNA 时, 如何有效去除多糖类物质污染是一个首要问题, 本文采用普通 TRIZOL 法、试剂盒法和“去多糖辅助剂+TRIZOL”三种方法提取铁皮石斛幼嫩叶片总 RNA, 试验结果表明: 采用“去除多糖辅助剂+TRIZOL”能够提出的 RNA 浓度较高、DNA 含量很低, 有明显的三条带, 经纯化后 RNA 的 OD 值为 1.8~2.0 之间, RNA 质量及浓度较好, 经济实惠。

关键词 铁皮石斛; 多糖; 总 RNA

Research of Total RNA Extraction Methods from *Dendrobium officinale*

Meng Hengling¹, Yang Shengchao¹, Wen Guosong¹, Zha Yinghong³, Duan Chengli^{1,2}

1. Institute of Chinese Medical Materials, Yunnan Agricultural University, Yunnan Provincial Good Agricultural Practice Center of Chinese Medical Materials, Yunnan, 650201, P.R. China

2. Faculty of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Yunnan, 311300, P.R. China

3. Yunnan Honghe Dendrobium planting Co., Ltd., Yunnan, 661200, P.R. China

✉ Corresponding author, dcl_12103@163.com; ✉ Authors

Abstract It is very important how to remove the polysaccharides pollution effectively when we extract high-quality RNA from *D. officinale*. In this paper, we use three methods such as common TRIZOL, kit and “removing polysaccharides assistant + TRIZOL” to extract total RNA from *D. officinale*. The experiment result shows that the third method is best, the total RNA has obvious three bands, high quality and high concentration, low DNA and economy.

Keywords *D. officinale*; polysaccharides; total RNA

研究背景

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 属兰科 orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 植物, 为石斛中的极品, 是传统名贵的中药材, 多糖是其主要活性成分, 是防老抗衰、养颜驻容、养肝明目的上等保健药品。由于铁皮石斛植物组织中多糖含量高于 17.76%~29.19%(刘宏源等, 2010), 严重影响了 RNA 的提取, 纯度高、质量好的 RNA 是进行相关分子生物学研究的前提和关键(李宏和王新力, 1999)。现已有很多文献报道了关于去除 RNA 中多糖的一些方法, 主要有: ①在提取的 RNA 中加入

高浓度盐, 改变多糖的溶解特性, 通过苯酚、氯仿等有机溶剂抽提去除(Fang et al., 1992); ②通过 LiCl 选择沉淀 RNA, 使部分多糖留在上清液中(Su and Gibor, 1988; 葛晓萍和石琰璟, 2007; 岑鹏等, 2009); ③用低浓度乙醇选择沉淀多糖(10%~30%), 而 RNA 仍保留于溶液中(Tesniere and Vayda, 1991; Lewinsohn et al., 1994; 顾红雅等, 1995; Hu et al., 2002); ④无水乙醇和 5mol/L 醋酸钾溶液配合以去除多糖杂质(朱昀等, 2007); ⑤采用有机溶剂乙二醇丁醚(周波等, 2004)、2-丁氧乙醇(何振艳等, 2005)、乙醚(袁明珠等, 2005)等去除多糖, 虽然这些方法在

很多植物上都有成功的报道, 但由于不同植物及相同植物的不同组织间在物质组成上千差万别, 因此一种方法仅适用于某种或某类材料, 对于特殊的植物材料, 理想的 RNA 提取方法是在探索中逐渐完善的。

本研究以多糖含量高的铁皮石斛叶片为材料, 采用 3 种不同的方法提取总 RNA, 高质量的 RNA 是进行后续分子生物学研究的基础, 并为其他富含多糖类植物 RNA 的提取提供借鉴。

1 结果与分析

1.1 总 RNA 的电泳检测

由于在提取铁皮石斛 RNA 时, RNA 被大量的多糖包裹而损失, 导致提取的 RNA 浓度较低, 不能满足 RNA 需求量大的实验, 因此, 本研究以普通的 TRIZOL 法提取的 RNA 浓度及纯度为对照, 比较三种方法提取的 RNA 质量。

普通的 TRIZOL 法提取总 RNA: 在加入氯仿抽提离心后, 上清液粘稠, 离心后不能很好的和中间层有机相分离, 因此, 在离心过程中无法去除多糖, 最后一步加 DEPC 处理水溶解时底部出现大量不溶黏性物质, 经电泳检测, 没有 RNA(图 1A)。

百泰克公司通用植物总 RNA 提取试剂盒提取的总 RNA 有两条完整的带, 但带较弱, 略有降解, DNA 含量高(图 1B), 经纯化后, RNA 的浓度很低, 满足不了 RNA 需求量大的实验。

TIANGEN RNAPrep pure Plant Kit 提取的 RNA 中有两条较完整的带, 但 DNA 含量较高(图 1C), 在后续 DNA 消化中往往消化不完全, 且 RNA 的含量都很低, 只有 100 ng/μL~200 ng/μL, 经纯化后 RNA 含量很低, 几乎检测不到, 给 RNA 的定量及

一些实验带来了很大的困难。

去多糖辅助剂+TRIZOL 法提取的 RNA 浓度较高, 有三条完整的带, 且 RNA 的浓度较高, 是试剂盒法的 2~3 倍, DNA 污染小在琼脂糖凝胶电泳中几乎看不到(图 1D), 纯化后 OD 值在 1.8~2.0 之间, 三种方法提取的 RNA 浓度及纯度见表 1。

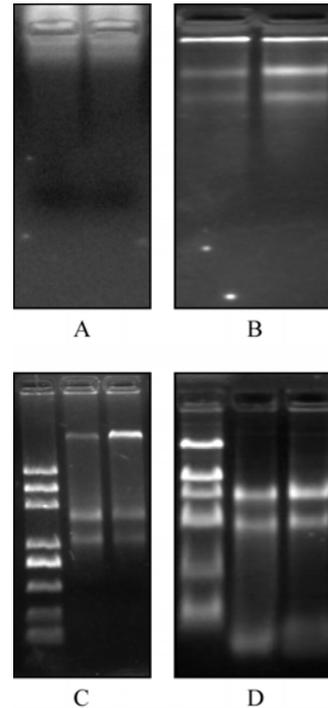


图 1 A: 普通 TRIZOL 法; B: 百泰克试剂盒; C: TIANGEN 试剂盒; D: “去多糖辅助剂+TRIZOL”法
Figure 1 A: Common TRIZOL method; B: BIOTEKE kit; C: TIANGEN kit; D: Removing polysaccharides assistant plus TRIZOL

表 1 3 种方法提取的铁皮石斛总 RNA 的平均浓度和纯度

Table 1 Total RNA purity and quantity of *Dendrobium officinale* by three methods

方法 Method	平均浓度(ng/μL) Mean concentration (ng/μL)	总 RNA 平均纯度(A260/A280) Total RNA average purity (A260/A280)
TRIZOL 法 TRIZOL method	0	0
试剂盒法(百泰克试剂盒和天根试剂盒) Kit method (Bioteke and Tiangen kit)	178	1.82
除多糖辅助剂+TRIZOL 法 Removing polysaccharides assistant + TRIZOL method	468	1.95

1.2 PCR 扩增

对三种方法提取的 RNA 反转录成 cDNA, 用 F1 和 R1 特异引物进行 PCR 扩增, 扩增结果(图 2), 第三种方法提取的 RNA 质量最好, PCR 扩增出的条带最清晰, 其次是试剂盒法, 而普通 TRIZOL 法没有扩增出条带。

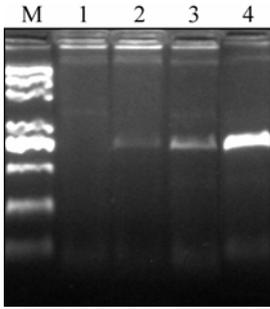


图 2 铁皮石斛部分序列 PCR 扩增结果

注: M: Marker; 1: 普通 TRIZOL 法; 2: BIOTEKE 试剂盒法; 3: TIANGEN 试剂盒法; 4: “去多糖辅助剂+TRIZOL”法

Figure 2 The part of sequence of PCR amplification

Note: M: Marker; 1: Common TRIZOL method; 2: BIOTEKE kit method; 3: TIANGEN kit method; 4: “Removing polysaccharides assistant+TRIZOL” method

2 讨论

有关植物组织中 RNA 提取方法的报道已很多, 最常用的有胍法、苯酚法和 CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)法等, 这些方法已广泛用于许多植物组织中 RNA 的提取。但有某些植物组织所含物质种类极为复杂, 尤其是在富含多糖、多酚及一些尚未能确定的次生代谢产物等情况下, RNA 提取的产量和纯度常受到影响。由于多糖与 RNA 间的理化性质很相似, 常以复合体形式存在, 不易分开(Logemanny et al, 1987)。在去除多糖的同时, 大量的 RNA 也被裹走了, 造成 RNA 的产量减少和降解, 而沉淀的 RNA 中也有凝胶状沉淀, 难溶于水, 或溶解后溶液粘稠(Lewinsohn et al, 1994), 由于多糖的污染, 使 RNA 溶解困难, 定量不准, 甚至抑制下游酶的反应活性(Fang et al., 1992), 因此, 如何从富含多糖的植物组织中提取高质量 RNA 很关键。

在本实验中, 采用常规方法提不出 RNA, 主要原因在于初提时上清液粘稠, 不能很好的和有机相分离, 与铁皮石斛材料多糖含量较高有关。本研究采用的第三种(除多糖辅助剂+TRIZOL 法)对于提取

多糖含量高的植物组织较为有效, 由于 RNAiso-mate for Plant Tissue 试剂中含有高分子聚合物, 能够有效地与组织样品中的多糖结合, 并可以在之后的离心步骤中除去, 因此在初提时大量的 RNA 被释放出来, 提取的 RNA 浓度是试剂盒的三倍左右, 而且较试剂盒提取法经济实惠。因此, 此方法可以从富含多糖的植物材料中提取高质量、高浓度的总 RNA。

3 材料与方法

3.1 材料

采自云南省屏边县屏边群鑫石斛种植有限公司铁皮石斛种植园的一年生幼嫩叶片, 从正在生长的植株上剪下后立即用液氮冷冻, -80°C 冰箱保存。

3.2 方法

3.2.1 铁皮石斛 RNA 方法的提取

样品处理: 取出上述保存的 100 mg 植物材料于 DEPC 处理过的研钵中, 加入适量的 PVPP 于研钵中, 迅速加入液氮研磨, 直至磨成状, 在其间保持研钵中都有液氮, 将粉末装入干净的离心管中。

a TRIZOL 法: 采用 TaKaRa 公司 RNAiso Plus(D9108A), 操作步骤按照说明书进行操作, 取 $3\ \mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳。

b 试剂盒法: 分别采用 TIANGEN RNAprep pure Plant Kit (DP432)和百泰克公司通用植物总 RNA 提取试剂盒 (RP3301), 按照说明书进行操作, 取 $3\ \mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳。

c 去多糖辅助剂+TRIZOL 法: 采用 TaKaRa 公司 RNAiso-mate for Plant Tissue (D325S)及 RNAiso Plus (D9108A)提取铁皮石斛总 RNA, 按照说明书进行操作。

3.2.2 总 RNA 的反转录及纯化

提取总 RNA 中 DNA 的去除采用 fermentas 公司 RNase free 的 DNase I, 建立 $100\ \mu\text{L}$ 的酶解体系($10\ \mu\text{g}$ RNA, $10\ \mu\text{L}$ DNase I, $10\ \mu\text{L}$ $10\times$ buffer, 用 RNase free water 补齐), 混匀, 37°C 水浴 30 min, 加 $10\ \mu\text{L}$ $25\ \text{mmol/L}$ EDTA, 65°C 水浴 10 min。加 RNase free water 至 $420\ \mu\text{L}$, 加水饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1) $400\ \mu\text{L}$ 抽提, 取上清液至另一个干净的离心管中, 加氯仿: 异戊醇(24: 1) $400\ \mu\text{L}$ 抽提, 移上清至离心管加 1/10 体积 $3\ \text{mol/L}$ Na AC (pH 5.2)

和 1 mL 无水乙醇, -20℃ 放置过夜; 4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 用 75% 乙醇和无水乙醇各清洗沉淀 1 次, 室温下干燥; 沉淀溶于 30 μL DEPC 水中, -80℃ 冻存。

3.2.3 RNA 凝胶电泳检测

0.5 x TBE 作为电泳缓冲液, 电压 120V, 琼脂糖凝胶浓度为 1%, 取 3 μL RNA 进行电泳检测。

3.2.4 RT-PCR 检测

采用铁皮石斛特异引物 F1: CGAGTCTCATA CTGCCTTCACA; R1: ACCAGCCAAGGTCATC AATCTC, 铁皮石斛的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 其反应条件如下: 94℃ 5 min, 35 个循环(94℃ 30 S, 53℃ 30 S, 72℃ 1 min), 72℃ 10 min, 反应体系 25 μL (cDNA 1 μL, 引物 F1/R1 2 μL, 2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL, ddH₂O 7.5 μL)。

致谢

本研究由云南省产业重大关键技术开发专项项目(云发改高技[2007]1718号), 国家支撑计划项目(2011BAI13B02-5)资助。

作者贡献

孟衡玲是本研究试验设计、实验研究及论文初稿写作的执行人; 杨生超, 文国松, 段承俐指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改, 查应洪是项目合作者, 为本研究提供大量的材料。

参考文献

- Cen P., Pan L.J., Zhang M.B., Fan G.Q., and Cheng P., 2009, Preliminary study on extracting total RNA from polysaccharides-rich *Dendrobium* buds polysaccharides-rich *Dendrobium* buds, *Guangdong Nongye Kexue* (Guangdong agricultural science), 6: 162-164 (岑鹏, 潘丽晶, 张妙彬, 范干群, 程萍, 2009, 从富含多糖的石斛兰花蕾中提取总 RNA 初探, *广东农业科学*, 6: 162-164)
- Fang G., Hammars G., and Grumet R., 1992, A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA, *Bio. Techniques*, 13(1): 52-54, 56
- Ge X.P., and Shi Y.J., 2007, A useful method for extracting RNA from plant tissues rich in polysaccharides and polyphenol, *Qingdao Keji Daxue Xuebao* (Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition)), 28(1): 6-8 (葛晓萍, 石琰璟, 2007, 一种适合富含多糖, 多酚植物的 RNA 提取方法, 青岛科技大学学报(自然科学版), 28(1): 6-8)
- Gu H.Y., Zhai L.J., and Ming X.T., eds, 1995, *Plant gene molecular and operation*, BeiJing university press, BeiJing, China, p.77-78 (顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 编著, 1995, 植物基因与分子操作, 北京大学出版社, 中国, 北京, pp.77-78)
- He Z.Y., Xu W.Z., Yang X. X., and Ma M., 2005, An effective method of total RNA isolation from a fern Plant-*Pteris vittata* L., *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 22(2): 198-202 (何振艳, 徐文忠, 杨学习, 麻密, 2005, 提取蕨类植物蜈蚣草总 RNA 的一种有效方法, *植物学通报*, 22(2): 198-202)
- Hu C.G., Honda C., Kita M., Zhang Z., Tsuda T. and Moriguchi T., 2002, A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds, *Plant Mol. Bio. Report*, 20(1): 69-76
- Lewinsohn E., Steelecl C.L., and Croteau R., 1994, Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms, *Plant Mol. Bio Repr.*, 12(1): 20-25
- Li H., and Wang X. L., 1999, The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology information), 1: 36-39 (李宏, 王新力, 1999, 植物组织 RNA 提取的难点及对策, *生物技术通报*, 1: 36-39)
- Liu H.Y., Yang J.Y., Huang S., Huang B., and Lai X.P., 2010, Determination of polysaccharide in *dendrobium officinale* by 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry, *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 6 (8): 14-16 (刘宏源, 杨金燕, 黄松, 黄斌, 赖小平, 2010, 3,5-二硝基水杨酸法测定铁皮石斛中多糖的含量, *亚太传统医药*, 6(8): 14-16)
- Logemann Y.J., Schell J., and Willmitzer L., 1987, Improved method for isolation of RNA from plant tissues, *Anal. Biochem.*, 163(1): 16-20
- Su X., and Gibor A., 1988, A method for RNA isolation from marine macroalgae, *Anal Biochem*, 174(2): 650-657
- Tesniere C., and Vayda M.E., 1991, Method for the isolation of high quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates, *Plant Mol. Bio. Repr.*, 9(3): 242-251
- Yuan M.Z., Wen R. Liu J.S., Jie Y.S., Li J.H., Yin H.P., Zeng Q.L., Long G., Yang D.H., Liu H., Huang S.Q., and Xu J., 2005, Isolation of total RNA from different plant species, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 3(2): 285-292 (袁明珠, 温柔, 刘吉升, 揭英省, 黎金花, 尹汗萍, 曾秋莲, 龙刚, 杨德华, 刘海, 黄胜琴, 徐杰,

2005, 几种植物材料中总 RNA 的提取, 分子植物育种, 3(2): 285-292)

Zhou B., Zhang Y., and Li Y.H, 2004, Improvement of extraction method of total RNA from strawberry fruit with abundant polymeric carbohydrates, Shengwu Jishu Tongxun (Letters in biotechnology), 15(1): 48-50 (周波, 张旸, 李玉花, 2004, 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进, 生物技术通讯, 15(1): 48-50)

Zhu Y., Wang M., Jia Z.W., Lian Y., Jin Y., and Wang G.Y., 2007, An effective method for extracting total RNA from young ears of maize, Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany), 24(5): 624-628 (朱昀, 王猛, 贾志伟, 练云, 金颖, 王国英, 2007, 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法, 植物学通报, 24(5): 624-628)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>