

人参根组织 RNA 提取方法的研究与优化*

胡 薇¹, 白 石², 祝 涛¹, 张连学^{2**}

1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118

摘 要: 针对人参根组织中多酚和多糖类物质含量较高的特点, 比较了 CTAB-LiCl 法、pBIOZOL 植物提取试剂法、植物 RNAout 法和优化的 Trizol 法 4 种 RNA 分离提取方法。结果表明: 4 种方法均能从新鲜的多年生人参根组织中分离提取到总 RNA。其中优化的 Trizol 法能有效地抑制多酚和多糖对总 RNA 提取的影响, 能从成熟的根组织中获得完整性好的总 RNA, 每克人参根组织 RNA 产量为 100~120 μg , $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8~2.0, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 为 2.0~2.3。

关键词: RNA 提取; 人参; 条件优化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2010)05-0505-04

Study and Optimization of a Method for High Quality RNA Extraction From *Panax ginseng* Root Tissues

HU Wei¹, BAI Shi², ZHU Tao¹, ZHANG Lian-xue²

1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Extraction of high-quality RNA from *Panax ginseng* root tissues is very difficult due to high levels of polyphenolics and polysaccharides that bind or coprecipitate with RNA. The methods such as CTAB-LiCl, pBIOZOL, RNAout and optimized Trizol were applied to isolate high purity and integrity RNA from *Panax ginseng* root. By all of these methods total RNA can be obtained, but only by the optimized Trizol method, it extracts integrity and high class RNA from mature root tissue. RNA production rate for 100—120 $\mu\text{g}/\text{g}$ total RNA from root tissues can be obtained. The absorbance ratios ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) were 1.8 to 2.0. The absorbance ratios ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$) were 2.0 to 2.3.

Key words: RNA extraction; *Panax ginseng*; condition optimization

人参 (*Panax ginseng*) 为五加科人参属植物, 素有“东北三宝”之称。目前对人参的研究多集中在有效成分、结构、生物活性、药理和临床应用上^[1], 对人参功能基因和次生代谢生物合成途径的研究相对较少, 其次生代谢产物人参皂苷 (ginsenoside) 尚未实现全化学合成, 对于一些含量甚微、活性较强的单体皂苷新药开发还较为困难^[2-3]。与其他高等植物的次生代谢产物一样, 属

于高等萜类的人参皂苷生物合成途径仍不清楚, 基础研究相对缺乏^[4-5]。因此, 深入了解人参皂苷生物合成途径及其调控的分子遗传学基础, 从而在分子水平实现皂苷生物合成的人工调控, 将是利用生物技术大量生产人参皂苷的重要前提。

深入研究人参皂苷生物合成途径中功能基因的关键一环是提取纯度高、完整性好的总 RNA。由于植物细胞组成成分的复杂多样性, 使得植物

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570185)

作者简介: 胡 薇, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

收稿日期: 2010-07-10 修回日期: 2010-08-20

** 通讯作者

组织 RNA 的提取相对于其他生物材料要困难一些,人参更是如此。成熟的人参根组织中含有大量的酚类、糖类及其他代谢产物。人参组织被研磨后,酚类物质与多酚氧化酶的平衡分布被破坏,酚类极易被氧化成醌,并易与 RNA 分子发生不可逆结合,产生褐化效应^[6],进而干扰 RNA 的提取过程,这将导致 RNA 提取产量和质量均很差。本研究比较了 4 种提取人参根组织总 RNA 的方法,摸索出适合提取人参根组织总 RNA 的方法为优化的 Trizol 法,并用该方法提取出纯度高、完整性好的总 RNA,为人参中有明确功能的特异基因的克隆与功能研究奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

四年生人参取自吉林农业大学参园。用清水冲洗掉粘附的泥土,置 70%乙醇中消毒 1 min,再经无菌水冲洗后,置于消毒滤纸上吸干水分,并迅速于液氮中保存。试验操作中使用的塑料制品用 0.1% DEPC 水 37℃处理 24 h,然后高压灭菌后备用。玻璃器皿于 180℃干热灭菌 8 h。电泳槽等用 3% H₂O₂处理。

1.2 主要试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司,植物 RNAout 试剂盒购自天泽基因工程有限公司,pBIOZOL 植物总 RNA 提取试剂购自杭州博日科技有限公司,PVP、DEPC 为 AMRESCO 公司生产,其他生化试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 CTAB-LiCl 法提取总 RNA 称取样品 100 mg,置于含液氮的研钵中研成粉末状。1.5 mL 离心管加入 1 mL CTAB 样品提取液,65℃预热 30 min。将研好的粉末转入 1.5 mL 离心管中,剧烈摇动,充分混匀。匀浆液继续在 65℃温育 10 min,4℃、1.2 万 r/min 离心 10 min。吸取上清于新离心管中,每管加入等体积氯仿,轻轻颠倒混匀,冰上放置 10 min,1.2 万 r/min 离心 10 min,重复此步骤 2~3 次至无蛋白。吸取上清液于新离心管中,加入 1/3 体积 LiCl (8 mol/L),4℃放置过夜。4℃、1.2 万 r/min 离心 20 min。弃上清,70%乙醇洗涤 2 次,用经 DEPC 处理的去离子水 (20 μL) 溶解 RNA, -70℃保存备用。

1.3.2 pBIOZOL 植物提取试剂提取总 RNA 在

液氮中将 100 mg 样品研磨成粉末。立刻将样本转移到离心管中,加 0.5 mL 预冷 (4℃) 的 pBIOZOL 到冷冻、研磨好的样本中,用漩涡振荡器混匀直到样本完全重悬,室温放置 5 min。于室温下 1.2 万 r/min 离心 2 min 以使液体澄清。将上清转移到新的离心管中,加入 0.1 mL NaCl (5 mol/L),轻弹离心管以混合均匀。加 0.3 mL 氯仿,颠倒或漩涡振荡混匀,于 4℃下 1.2 万 r/min 离心 10 min 使液体分相。转移上层水相到新的离心管中,加入相同体积的异丙醇,混匀后室温放置 10 min,于 4℃下 1.2 万 r/min 离心 10 min。轻弃去上清液,小心操作不要丢失沉淀。向沉淀物中加 1 mL 的 75%乙醇,于室温下 1.2 万 r/min 离心 1 min。小心地弃去液体,不要丢失沉淀。加 30 μL 经 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA。保存于 -70℃备用。

1.3.3 植物 RNAout 法提取总 RNA 将溶液 A 放在 65℃水浴中使沉淀彻底溶解。取四年生人参根组织 300 mg 与 1 mL 溶液 A 加入到研钵中,充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中,振荡混合 30 s。在装有裂解物的离心管中加入 0.3 mL 的溶液 B 和 0.2 mL 氯仿,用手上下颠倒 30 s 混匀,此时溶液呈均匀的乳浊状。室温下 1.3 万 r/min 离心 5 min。将上清液 (约 800 μL) 转移到另一个干净的 1.5 mL 离心管中,下层有机相和中间层含有 DNA、蛋白质和其他杂质,避免触及或吸取,最好留下 100 μL 上清液不取。在上清液中加入 500 μL 的溶液 C 和 200 μL 氯仿,上下颠倒振荡 30 s 混匀,此时溶液呈均匀的乳浊状。室温下 1.3 万 r/min 离心 3 min,两相间将有白色膜状物形成。将上清液转移到另一干净的 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 倍体积的溶液 D,上下颠倒振荡 30 s 混匀,此时溶液呈白色浑浊状,室温下 1.3 万 r/min 离心 3~5 min, RNA 将在管底形成白色沉淀。在离心管中加入 75%乙醇 1 mL,振荡器上振荡混匀 30 s,室温下 1.3 万 r/min 离心 1 min,小心弃去上清液,注意不要吸弃 RNA 沉淀。加入 20 μL 经 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA 沉淀, -70℃保存备用。

1.3.4 优化的 Trizol 法提取总 RNA 从 -70℃冰箱中取出 200 mg 四年生人参根组织,放入研钵中,充分研磨至粉末状,立刻转至装有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管中,涡旋混匀,室温放置 10 min 充分裂解组织;4℃、1.2 万 r/min 离心 10 min,弃

沉淀,收集液相至新的离心管中;加入 200 μL 氯仿、50 μL 乙酸钠(2 mol/L, pH4.2)、15 μL β -巯基乙醇、1 %PVP 10 μL ,旋涡混匀,冰浴 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、1.2 万 r/min 离心 15 min,收集上层水相至新的离心管中;加入等体积(或 0.5 mL)异丙醇和 200 μL 乙酸钠(3 mol/L),颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h;4 $^{\circ}\text{C}$ 、1.2 万 r/min 离心 10 min,弃上清;用 1 mL 的 75 %乙醇洗涤沉淀;4 $^{\circ}\text{C}$ 、1.2 万 r/min 离心 5 min,弃上清,空气干燥沉淀 10 min,加入 20 μL 经 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.5 人参根组织总 RNA 的质量检测 采用 1.0 %的琼脂糖凝胶电泳进行总 RNA 完整性的检测。用 TU-1810 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)测定 RNA 样品在 230、260、280 nm 处的吸光度,分析样品纯度及产率。

取 1 μL 总 RNA 溶液,溶于 1 mL 经 DEPC 处理的去离子水中,检测其吸光度值。无污染的总 RNA 其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8~2.0、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 为 2.0~2.3。通过吸光度值可以得出 RNA 浓度(OD_{260} 的 RNA 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进而计算 RNA 产率:

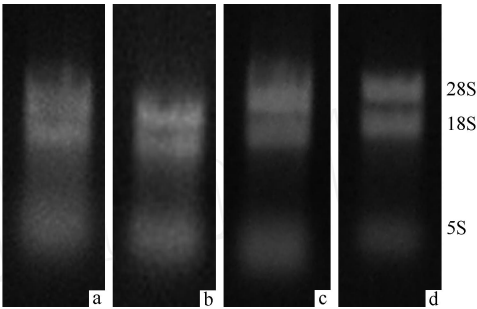
$$\text{RNA 产率}(\mu\text{g}/\text{g}) = [\text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_{\text{RNA}}(\text{mL})] / \text{材料质量}$$

2 结 果

2.1 4 种方法对人参根组织总 RNA 的提取效果
4 种方法提取的四年生人参根组织总 RNA 经 1 %琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。

由图 1 可见,4 种提取方法均能从人参根组织中提取到总 RNA,其中 CTAB-LiCl 法提取的 RNA 产率最低,28S 和 18S 条带不清晰,且条带附近有明显的拖带现象,说明所提取的 RNA 有严重的降解;植物 RNAout 法提取的 RNA 能看见 3 条

主带,但 28S 和 18S 的荧光亮度不接近 2:1;pBIOZOL 法提取的 RNA 能看见明显的 3 条主带,但有一定的降解,说明提取结果也不是特别理想;优化的 Trizol 法提取的总 RNA 28S 和 18S 2 条特征条带清晰,亮度比接近 2:1,表明总 RNA 较完整,没有降解,也无明显的基因组 DNA 污染,符合后续功能基因克隆、表达的要求。



a. CTAB-LiCl 法 The CTAB-LiCl method;b. 植物 RNAout 法 The RNAout method;c. 植物 pBIOZOL 试剂法 The pBIOZOL method;d. 优化的 Trizol 法 The optimized trizol method

图 1 4 种方法提取的人参总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1. The electrophoresis analysis of total RNA isolation from Panax ginseng root tissues with different methods

2.2 人参根组织总 RNA 质量检测结果

采用紫外分光光度计可以分析检测 RNA 的纯度与产率。RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8~2.0,比值 < 1.8,可能是有蛋白质或苯酚污染;比值 > 2.0,可能是所用抽提液中有残留的 β -巯基乙醇等杂质。RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 为 2.0~2.3,低于或高于此范围表明样品可能有蛋白质或多糖的污染。表 1 中试验结果表明:利用优化的 Trizol 法提取的人参根组织总 RNA 可用于后续试验研究。

表 1 4 种方法提取人参根组织总 RNA 质量检测结果

Table 1. The detection of the quality of total RNA from Panax ginseng root by four methods

方法 Method	OD			$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$	产率/($\mu\text{g g}^{-1}$) Yield
	260 nm	280 nm	230 nm			
CTAB-LiCl 法 CTAB-LiCl method	0.011	0.007	0.005	1.60	1.60	44.6
植物 RNAout 法 RNAout method	0.015	0.009	0.008	1.67	1.88	61.2
pBIOZOL 法 pBIOZOL method	0.018	0.010	0.009	1.80	2.00	72.5
优化的 Trizol 法 Optimized trizol method	0.029	0.015	0.013	1.93	2.23	116.0

3 讨 论

近年来,药用次生代谢产物生物合成基因调控研究已成前沿研究领域。目前开展药用次生植物基因调控研究的药用植物有红豆杉^[7]、长春花^[8]、紫草^[9]等。药用植物人参的次生代谢产物人参皂苷主要分布于根部,其次为茎和叶。迄今为止,分离并确定了结构的皂苷成分有 40 余种。各皂苷单体均具有其独特的药理作用,临床应用十分广泛。人参皂苷尚未实现全化学合成,某些单体皂苷可从根、茎、叶部位提取以满足部分市场需要,但一些含量甚微、活性较强的单体皂苷如具有强效抗肿瘤活性的 Rg₃、Rh₂ 以及抗衰老先导化合物 Rg₁ 和 Rb₁ 等新药开发还较为困难^[10],而应用植物基因工程与组织细胞工程相结合的生物学方法有望成为生产这些低含量的药用次生代谢产物最有效的手段^[11],通过基因工程的方法提高中药有效成分的产量是很值得研究的课题。

提取纯度高、完整性好的 RNA 是克隆基因的关键所在。由于人参根组织中酚类和多糖物质的影响,应用常规的 CTAB 法和 Trizol 试剂盒法从人参根组织中提取的总 RNA 质量很差。且随着人参的生长及逐渐成熟,多酚和多糖的含量也随之增加,这些都给人参的总 RNA 提取及相关功能基因的研究造成了很大的障碍。成熟的人参根组织中含有大量的酚类物质,在氧化条件下,酚类极易被氧化成醌,并易与 RNA 分子产生不可逆结合,进而干扰 RNA 的提取过程^[12]。PVP 作为多酚化合物的螯合剂,具有很强的与酚结合的能力,使酚类物质不能被氧化成醌类,有效地防止其与 RNA 的结合。而 β-巯基乙醇是强还原剂,可使多酚类物质不易被氧化,并与水溶性 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对 RNA 提取的影响^[13]。由于人参根组织中还含有 70 % 左右的多糖,而多糖的结构与 RNA 相似,很难将它们分开,在去除多糖的同时 RNA 也被带走,造成 RNA 的产量减少,而在沉淀 RNA 时,也可能产生多糖的凝胶状沉淀,这种含有多糖的 RNA 沉淀难溶于水,或溶解后产生黏稠状溶液。由于多糖抑制了许多酶的活性,因此污染了多糖的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。

本试验中采用 CTAB-LiCl 法、pBIOZOL 法、植

物 RNAout 法、优化的 Trizol 法分别提取人参根组织总 RNA,结果只有优化的 Trizol 法得到了质量较高的总 RNA。分析其原因在于此方法最大程度地简化了操作程序,因而避免了复杂的操作可能引起的 RNase 污染;在整个分离提取过程中,样品一直处于强变性剂之中,加入一定浓度的 PVP 溶液,并适当加大 β-巯基乙醇的浓度,同时试验在低温条件下进行,基本上保证了 RNA 样品周围 RNase 的失活,再经离心除去 PVP 和 β-巯基乙醇^[14];再采用高浓度盐 NaAc,使 RNA 从高盐溶液中析出,而多糖则溶于高浓度的盐溶液中,通过离心可进一步纯化 RNA,从而分离纯化出完整性好的总 RNA。4 种人参根组织 RNA 提取方法操作过程中均未加入水饱和酚进行抽提,这是因为 PVP 结合多酚的同时,也与水饱和酚发生不可逆的结合,产生白色絮状物,带走大量 RNA^[15]。目前发表的关于植物 RNA 提取的文献很多,但不同植物往往因种属差异其内含物组分及含量有很大差异,所以需要采用不同的 RNA 提取方法。本试验针对人参根组织中富含多酚和多糖的特点,在传统 Trizol 法上加以优化,获得了高质量的 RNA,建立了人参根组织总 RNA 的提取体系,为深入开展药用次生植物基因调控的研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 王海南. 人参皂苷药理研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(11): 1201-1206.
- [2] 杜丽娜, 张存莉, 朱玮, 等. 植物次生代谢合成途径及生物学意义[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(3): 150-155.
- [3] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- [4] 邢朝斌, 王一曼, 陈正恒, 等. 三萜皂苷的生物合成[J]. 生命的化学, 2005, 25(5): 420-422.
- [5] 张长波, 孙红霞, 冯中军, 等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 779-786.
- [6] Lessard P, Decroocq V, Thomas M. Extraction of RNA, cloning and subtractive hybridization[C]. //In: Clark M S. Plant molecular biology: A laboratory manual. New York: Springer Verlag Berlin Herdelberg, 1997: 152-158.
- [7] Ogita S, Uefuji H, Yube Y, et al. Producing decaffeinated coffee plants[J]. Nature, 2003, 423(19): 823.
- [8] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes[J]. Phytochemistry, 2001, 58(1): 1-7.

(下转第 522 页)

3 结 论

将姬松茸菌糠施入苏打盐碱土后,改善了土壤的化学性质,使苏打盐碱土中盐分含量组成、主要阳离子含量组成等利于向优化土壤结构方向转化,降低了苏打盐碱土的 pH 值和碱化度,提高了土壤肥力。在施入姬松茸菌糠的苏打盐碱土上种植牧草,可提高其地上部生物量。本研究结果初步证明了姬松茸菌糠改良苏打盐碱土确实可行。有关姬松茸菌糠施用后对苏打盐碱土生物活性等其他方面的影响及菌糠用量等仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 侯立娟,姚方杰,高芮,等. 食用菌菌糠再利用研究概述[J].

中国食用菌,2008,27(3):6-8.

[2] 周飞. 菌糠在肥料上的利用[J]. 土壤肥料,1991(3):42-44.

[3] 郑林用,黄小琴,彭卫红. 食用菌菌糠的利用[J]. 食用菌学报,2006,13(1):74-75.

[4] 李学梅. 食用菌菌糠的开发利用[J]. 河南农业科学,2003(5):40-42.

[5] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[6] 李宽意,刘正文,胡耀辉,等. 影响盐碱地作物产量的土壤化学特征分析[J]. 江苏农业科学,2002(3):76-78.

[7] 谢修鸿. 吉林省西部苏打盐碱土理化特性及改良利用技术研究[D]. 长春:吉林农业大学,2000.

[8] 申进文,沈阿林,张玉亭,等. 平菇栽培废料等有机肥对土壤活性有机质和土壤酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2007,13(4):631-636.

(上接第 508 页)

[9] Vander Fits L, Hilliou F, Memelink J. T2DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non2 tractable plant species[J]. Transgenic Res, 2001, 10(6): 513-521.

[10] 李杰,宋淑霞,吕占军. 人参皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2004,11(1):61-63.

[11] 罗志勇,陆秋恒,刘水平,等. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报,2003,35(6):554-560.

[12] Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J].

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[J]. 武汉植物学研究,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]. J Fruit Sci, 2003, 20(3):178-181.

[15] 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[J]. Plant Mol Reprtr, 1999, 17(5):11-17.

(上接第 512 页)

[10] Akiyoshi H, Noriyoshi M, Kouki F, et al. GFP expression by intracellular gene delivery of GFP-coding fragments using nanocrystal quantum dots[J]. Nanotechnology, 2008, 19: 1-12.

[11] Gonzalez-Meilendi P, Fernandez-Pacheco R, Coronado M J, et al. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues[J]. Ann Bot, 2008, 101:187-195.

[12] Karthikeyan Pasupathy, Sijie Lin, Qian Hu, et al. Direct plant

gene delivery with a poly(amidoamine) dendrimer[J]. Biotechnol J, 2008, 3: 1078-1082.

[13] Liu J, Wang F H, Wang L L, et al. Preparation of fluorescence starch-nanoparticle and its application as plant transgenic vehicle[J]. Journal of Central South University of Technology, 2008, 15(6):768-773.

[14] 宋瑜,李颖,崔海信,等. 两种阳离子纳米基因载体及植物基因介导效果的研究[J]. 生物技术通报,2009(6):75-80.