

## 雷公藤 RNA 提取方法选择与优化

陈欣<sup>1</sup>, 祝传书<sup>1,2</sup>, 冯俊涛<sup>1,2\*</sup>, 张兴<sup>1,2</sup>

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**建立提取完整性好、丰度高的雷公藤 RNA 的方法,是后续分子生物学试验的必要前提。试验以雷公藤叶、根、愈伤组织和悬浮细胞为材料,比较亚精胺法、SDS 法、CTAB 法和异硫氰酸胍法从雷公藤组织中提取的 RNA,并对最佳方法进行优化。结果表明:SDS 法从雷公藤组织中获得 RNA 片段完整性较好,但丰度较低;对该方法的操作步骤进行删减,并在 2 次氯仿/异戊醇去除蛋白质和多糖的过程中进行不同时间和程度的振荡提取,得到的 RNA 较优化前丰度更高,完整性更好,28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍,经过紫外分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间,  $A_{260}/A_{230}$  比值在 1.9~2.1 之间。用优化的 SDS 法提取的雷公藤各组织 RNA 均具有很好的反转录活性,完全能满足后续 RT-PCR、全长基因的克隆和 Northern blotting 分析等分子生物学研究。

**关键词:**雷公藤;RNA 提取;SDS 法;方法优化

**中图分类号:**S722.33

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2014)-02-0112-06

### The Establishment and Optimization of RNA Isolation in *Tripterygium wilfordii*

CHEN Xin<sup>1</sup>, ZHU Chuan-shu<sup>1,2</sup>, FENG Jun-tao<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Xing<sup>1,2</sup>

(1. Research & Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Research Center of Biopesticide Technology & Engineering, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Four methods (Spermidine, sodium dodecyl sulfate, abbreviated as SDS, hexadecyl trimethyl ammonium bromide, abbreviated as CTAB, and Guanidinium) were adopted to extract high-quality RNA from the leaves, roots, calli, and suspending cells of *Tripterygium wilfordii*. Optimization experiment was conducted. The results demonstrated that the SDA method could extract RNA fragments with high integrity, however, the yield was low. In order to increase the yield, the method was modified. Agarose gel electrophoresis showed that the RNA-containing bands were more clear and bright, and the brightness of 28S rRNA was two times than 18S rRNA. The ratios of D260/D280 and D260/D230 were approximately 1.8~2.0 and 1.9~2.1, respectively. The modified method could be directly used in molecular biology experiments.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii*; RNA extraction; SDS method; Optimization

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 是中国传统的药用植物,具有很好的杀虫活性<sup>[1]</sup>,由于资源问题,其次生代谢物生物合成研究日益受到关注。RNA 分子的分离提取是分子生物学研究的基本内容,是进行基因表达分析和生物合成研究的基础。

而质量高、完整性好的 RNA 是进行 cDNA 文库构建、northern 印迹分析、RT-PCR 等分子生物学研究工作的基础<sup>[4]</sup>。

雷公藤在生长过程中积累了大量的次生代谢物质,如多糖、多酚等物质,它们易与 RNA 共沉淀,对

收稿日期:2013-05-20 修回日期:2013-06-19

基金项目:国家自然科学基金(312710)。

作者简介:陈欣,女,硕士研究生,研究方向:农药毒理学。E-mail:sara19890707@163.com

\* 通信作者:冯俊涛,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:农药学。

RNA 的提取和纯化有干扰作用<sup>[2-6]</sup>;同时,作为木本植物的雷公藤有木质素、纤维素、半纤维素、果胶等物质组成的坚硬的细胞壁,很难被充分研磨破碎,影响雷公藤 RNA 的质量和产量。

目前,植物 RNA 的提取方法有多种,应用较多的有 CTAB 法、SDS 法以及商业试剂盒 Trizol 等<sup>[7]</sup>,但是植物总 RNA 的提取有很强的组织特异性,针对不同植物或者不同组织,仍需要选择合适的 RNA 分离提取方法<sup>[8-11]</sup>。本研究以雷公藤根、叶、愈伤组织和悬浮细胞等组织为材料,对比亚精胺法、SDS 法、CTAB 法和异硫氰酸胍法等 4 种 RNA 提取方法并对其试验步骤进行优化,以期建立雷公藤高质量 RNA 的提取方法,为下一步分子生物学试验提供有用材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和准备

雷公藤叶和根采自西北农林科技大学农药学教学实习实验基地,用超纯水冲洗干净、拭干后迅速放入液氮中冷冻,之后放入 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;雷公藤悬浮细胞和愈伤组织由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供,样品经液氮冷冻后迅速放入 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取方法

1.2.1.1 亚精胺法<sup>[12]</sup> 1)将冷冻的叶、根、悬浮细胞和愈伤组织研磨后快速转移到缓冲液(25 mM EDTA(乙二胺四乙酸),2% (W/V) PVP(聚乙烯吡咯烷酮),2% (W/V)CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),100 mM Tris-HCl (pH8.0),2.0 M NaCl,0.5 g·L 亚精胺,用前加入 2% 体积的  $\beta$ -巯基乙醇)中,65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min;2)加入等体积的氯仿/异戊醇(体积比 24:1)涡旋混匀后离心;3)向上清液加入 1/4 体积的 10.0 M LiCl 沉淀 RNA;4)用 75% 乙醇洗涤,自然晾干后用 0.1% 热灭活的 DEPC(焦炭酸二乙酯水)超纯水溶解,保存在 $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

1.2.1.2 SDS 法<sup>[13]</sup> 1)将冷冻的叶、根、悬浮细胞和愈伤组织研磨后快速转移到缓冲液(50 mM EDTA,2% (W/V) PVP,2% (W/V)SDS(十二烷基硫酸钠),100 mM Tris-HCl (pH8.0),1.4 M NaCl,用前加入 10% 体积的  $\beta$ -巯基乙醇)中,65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min;2)加入 100  $\mu\text{L}$  3mol·L 醋酸钾和 150  $\mu\text{L}$  无水乙醇,混匀,加入等体积氯仿混匀;3)离心后向上清液中再次加入等体积的氯仿/异戊醇(体积比 24:1)涡旋混匀后离心;4)向上清液中加入 1/4 体积的 10.0 M LiCl,混匀后 $-20^{\circ}\text{C}$  放置 3 h,得到的

沉淀用 75% 乙醇洗涤、干燥;5)用 DEPC 超纯水溶解后加入 1/10 体积的 3 mol·L 的 NaAc(pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇( $-20^{\circ}\text{C}$  预冷), $-70^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 h;6)沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,自然晾干后用 DEPC 超纯水溶解,保存在 $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

1.2.1.3 CTAB 法<sup>[14]</sup> 1)将冷冻的叶、根、悬浮细胞和愈伤组织研磨后快速转移到缓冲液(2% (W/V) CTAB,2% (W/V) PVP,100 mM Tris-HCl (pH8.0),25 mM EDTA,2.0 M NaCl,用前加入 10% 体积的  $\beta$ -巯基乙醇)中,65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min;2)加入等体积的氯仿/异戊醇(体积比 24:1)涡旋混匀后离心;3)向上清液中加入 1/3 体积的 8.0 M LiCl, $-70^{\circ}\text{C}$  放置 1 h;4)得到的 RNA 沉淀用 75% 乙醇洗涤,再加入 SSTE(1.0 mol/L NaCl,质量分数为 0.5% SDS,10 mmol·L Tris-HCl (pH 8.0),1mmol·L EDTA)和体积分数为 0.1% 的 DEPC 超纯水溶解沉淀;5)用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)和氯仿/异戊醇(体积比 24:1)各抽提 1 次;6)加 2 倍体积冷无水乙醇, $-20^{\circ}\text{C}$  放置 2 h;7)沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,自然晾干后用 DEPC 超纯水溶解,保存在 $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

1.2.1.3 异硫氰酸胍(GTC)<sup>[15]</sup> 1)将冷冻的叶、根、悬浮细胞和愈伤组织研磨后快速转移到缓冲液(4.0 M 异硫氰酸胍,100 mM Tris-HCl, pH 8.0,25 mM 柠檬酸钠 pH 8.0,0.5% N-月桂酰肌氨酸,2% (W/V) PVP,用前加入 10% 体积的  $\beta$ -巯基乙醇)中;2)加入等体积的氯仿/异戊醇(体积比 24:1)涡旋混匀后离心;3)向上清液加入 2 倍体积的无水乙醇和 1 倍体积的 5.0 M NaCl, $-20^{\circ}\text{C}$  放置 3 h,得到的沉淀用 1 mL 的 DEPC 超纯水溶解沉淀;4)加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(体积比为 25:24:1)进行抽提;5)取上清液加入 2 倍体积的无水乙醇和 1 倍体积的 5.0 M NaCl,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜沉淀 RNA;6)用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,自然晾干后用 DEPC 超纯水溶解,保存在 $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

1.2.2 SDS 法提取雷公藤 RNA 的优化 参照 1.2.1 中 SDS 法,对其操作步骤进行优化。

1)取 5 mL 离心管,加入 4 mL 提取缓冲液和 10%  $\beta$ -巯基乙醇,置于 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min;2)称取组织材料 500 mg,置于含液氮的研钵中研磨成粉末状,迅速转入预热的 SDS 提取缓冲液中,剧烈旋涡振荡 2~3 min,置于 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,其间上下倒置 4~5 次;3)用等体积的氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)抽提 2 次,第 1 次剧烈旋涡振荡 3~5 min,第 2 次轻微涡旋振荡 1~2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ ,10 000 g 离心 10 min;4)向上清液中加入 1/3 体积的 8 M 氯化锂,一

70℃放置 1 h;5)4℃,10 000 g 离心 30 min,沉淀 RNA;6)用 75%乙醇洗涤,自然晾干后加入 30~50 μL DEPC 超纯水溶解,-70℃下保存。

1.2.3 总 RNA 质量检测 RNA 样品经 1%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳,置于 *AlphaImager PE* 凝胶成像系统拍照,检测其完整性。用 *Eppendorf Biophotometer* 紫外分光光度计测定 RNA 样品  $A_{260}/A_{230}$  和  $A_{260}/A_{280}$  的比值及样品浓度,以检测 RNA 纯度和产量。将提取的总 RNA 用无 RNase 的 DNase I (TaKaRa)处理;第一链 cDNA 的合成参照 Takara 公司 RevertAidTM First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒。以合成的 cDNA 为模板,根据雷公藤 DXR 基因同源序列设计引物进行扩增<sup>[16-18]</sup>,引物序列如下:

5'-ATTCCTGGGGAGCAAGGTGTYATAG-3'

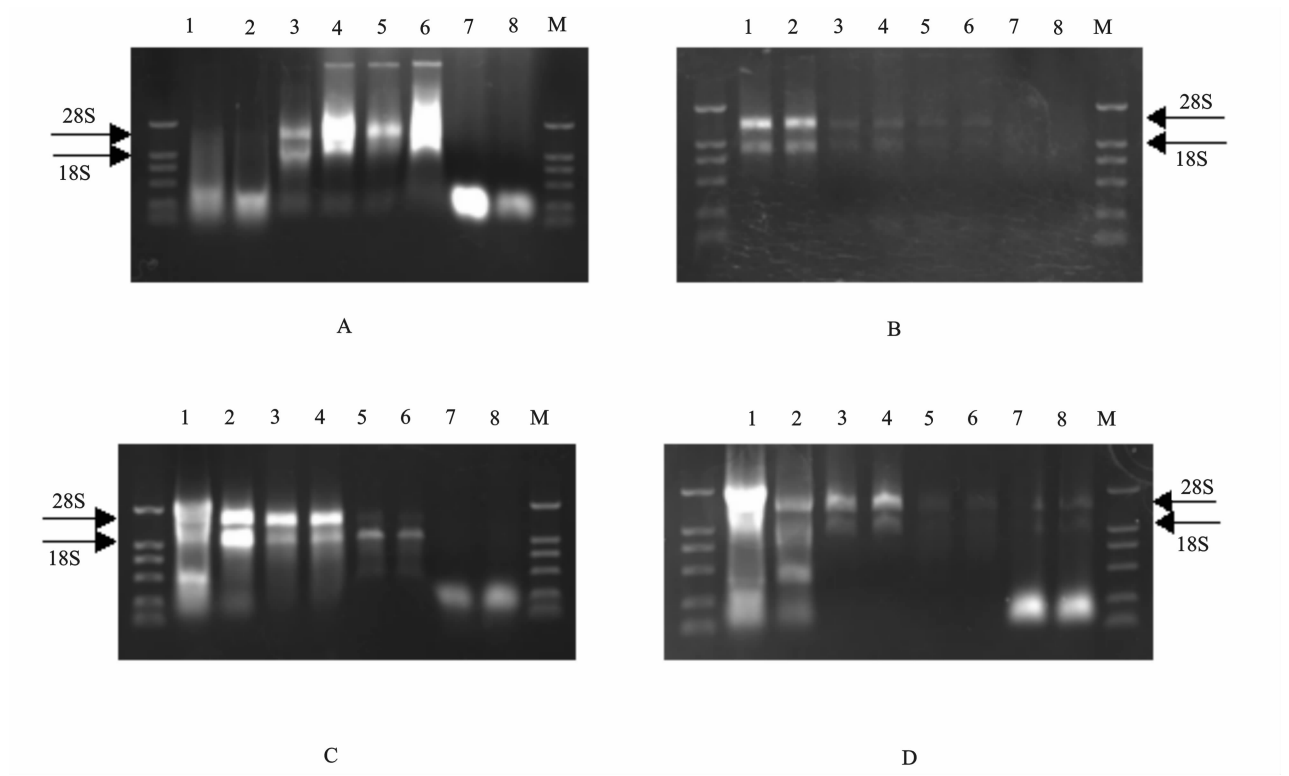
5'-CCAGGTGACCTCDGAGCAATAGA-3'。

2 结果与分析

2.1 4 种 RNA 提取方法的效果对比

用亚精胺法、SDS 法、CTAB 法和异硫氰酸胍法等 4 种方法提取雷公藤叶、根、悬浮细胞和愈伤组织 RNA。从图 1 可以看出,雷公藤叶、悬浮细胞和愈伤组织 RNA 提取结果中以 SDS 法的效果最好;雷公藤根 RNA 提取结果以亚精胺法最好,SDS 法次之;CTAB 法提取 4 种组织 RNA 效果均不理想;异硫氰酸胍法所得各组织 RNA 均降解严重。

综合分析可知,尽管 SDS 法对根和悬浮细胞 RNA 提取量相对较低,但该方法提取 4 种组织 RNA 条带均清晰,完整性较好。说明在采用的 4 种方法中,SDS 法较适宜于雷公藤 RNA 的提取。



注:1,2 亚精胺法;3,4 SDS 法;5,6 CTAB 法;7,8 异硫氰酸胍法;RNA 凝胶电泳图谱;M. DL2000 DNA Maker。

图 1 用不同方法提取雷公藤不同组织(A 叶;B 根;C 愈伤组织;D 悬浮细胞)

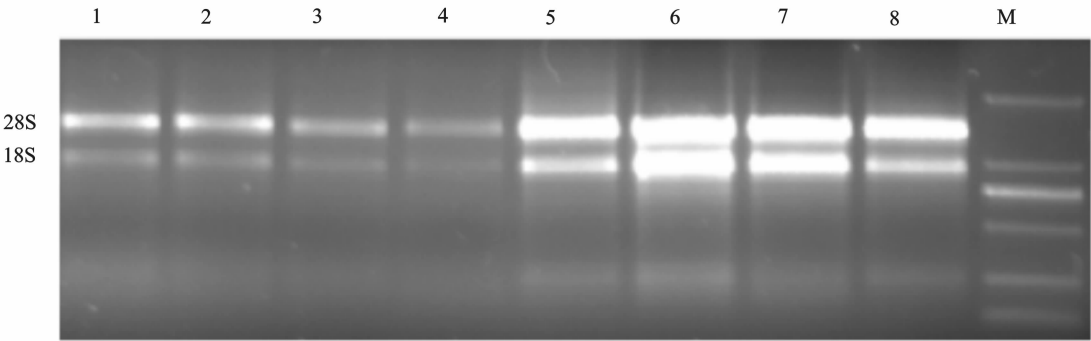
Fig. 1 Gel electrophoretic analysis of *T. wilfordii* RNA isolated using various extraction methods

2.2 SDS 法优化后提取 RNA 结果

SDS 法提取各组织 RNA 条带完整性好,但是得率较低,在其基础上对操作步骤进行优化:删减了原 SDS 法中 2)、5)、6)等步骤;用氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)抽提 2 次去除蛋白质和多糖的步骤中,第 1 次抽提需剧烈旋涡振荡 3~5 min,第 2 次轻微涡旋振荡 1~2 min。

通过对试验步骤进行调整和精简,试验结果表

明(图 2),经琼脂糖凝胶电泳检测,用优化的 SDS 法从 4 种组织中提取的总 RNA 比优化前提取的 RNA 不仅条带更加清晰,而且丰度远远高于后者,经过紫外分光光度计检测得出:优化后的 SDS 法提取的 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间,  $A_{260}/A_{230}$  比值在 1.9~2.1 之间;改良 SDS 法提取的 RNA 浓度是原 SDS 法提取 RNA 浓度的 3~4 倍。



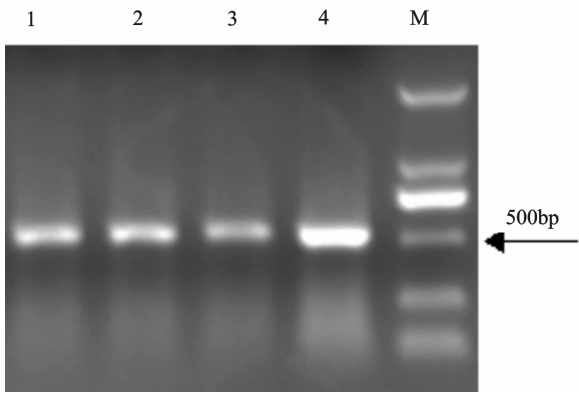
注：1. 叶；2. 根；3. 愈伤组织；4. 悬浮细胞；5. 叶；6. 根；7. 愈伤组织；8. 悬浮细胞；M. DL2000 DNA Maker。

图 2 SDS 法优化前提取不同组织和优化后提取 RNA 凝胶电泳图

Fig. 2 Compared RNA extracted by the original SDS method with RNA extracted by the optimized SDS method

2.3 RT-PCR 检测结果

为进一步确定优化的 SDS 法所提取 RNA 的完整性,采用 Oligo(dT)作为逆转录反应的引物将叶、根、愈伤组织和悬浮细胞提取的 RNA 反转录合成 cDNA,用 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因(DXR)的保守序列设计兼并引物进行 PCR 扩增,得到预期大小约为 500 bp 的产物(图 3)。将目的片段送去生工生物工程(上海)有限公司进行测序,所得序列在 NCBI 上对比,比对结果显示该基因为 DXR 基因的中间片段,说明 SDS 法提取的 RNA 完全可应用于后续试验。



注：1. 叶；2. 根；3. 愈伤组织；4. 悬浮细胞；  
M. DL2000 DNA Maker。

图 3 基于不同雷公藤组织 RNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 3 Electrophoresis of RT-PCR based on  
RNA extracted from different tissues

3 结论与讨论

植物总 RNA 的提取有很强的组织特异性<sup>[10]</sup>,针对不同植物或者不同组织,各种 RNA 分离提取方法所得结果差异很大,这种差异在本试验中也得到验证。平行试验结果也有一定的差异,例如图 1A 中 3 与 4、5 与 6 之间,这可能是由各管内所加入样品数量的差异、操作过程中的差异所造成。

从试验结果看出,SDS 法优于其他 3 种方法,可以稳定的从雷公藤各组织中提取出完整性较好的 RNA。在 SDS 法提取 RNA 过程中,使蛋白质变性从而去除蛋白质;利用  $\beta$ -巯基乙醇打断多酚氧化酶的二硫键,整合剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)与多酚化合物形成稳定的复合物,防治酚类化合物的氧化,阻止其与 RNA 的结合;利用醋酸钾去除部分多糖,LiCl 选择性沉淀 RNA 将剩余多糖留于上清液这些步骤,降低多糖对 RNA 提取的影响,从而提取出完整性较好的 RNA。但是尽管原 SDS 法可以提取出完整性较好的 RNA,但由于提取的 RNA 量较少,难以满足后续试验要求。

针对以上问题对 SDS 法进行优化,最终试验结果表明,优化的 SDS 法提取的总 RNA 比优化前不仅丰度更高,而且完整性更好。原方法中第 2)步用醋酸钾去除多糖,但在提取雷公藤 RNA 过程中实际不但去除多糖效果不显著,而且还沉淀出部分 RNA,造成 RNA 产量降低,因此删去该步骤;5)、6)2 步主要作用是再次沉淀 RNA,提高纯度和完整性,但是在很大程度上降低了 RNA 的产量,且多次试验结果证明,去除这 3 个步骤后 RNA 纯度和完整性依然满足后续试验要求;因此,优化后的 SDS 法不但明显缩短了提取时间,而且也降低了试验操作中 RNA 的降解和流失。

RNA 提取试剂盒与优化的 SDS 法比较,前者大多是用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿作为提取试剂,整个提取过程只需要 2~3 h,不仅节约了大量的时间,而且已经被证明可以高效提取一些常见植物的总 RNA,例如水稻、大麦和拟南芥<sup>[19-20]</sup>。然而在前期试验中, RNA 提取试剂盒提取雷公藤 RNA 均降解严重。后者的提取过程需要 3~4 h,提取的 RNA 完整性好,经过 RT-PCR 试验证明,优化 SDS 法提取的总 RNA 可直接用于雷公藤基因的克隆和后续的分子生物学研究。

参考文献：

- [1] BRINKER A M, MA J, LIPSKY P E, *et al.* Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* [J]. *Phytochem*, 2007, 68: 732-766.
- [2] 王曼玲,朱虹琳,周明全,等. 莲藕组织总 RNA 的速提取方法 [J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(5): 475-477.  
WANG M L, ZHU H L, ZHOU M Q, *et al.* A Method of Total RNA Isolation in Lotus Tissues [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23(5): 475-477.
- [3] 闫苗苗,魏光成,沙伟,等. 藓类植物 RNA 提取方法研究 [J]. *广西植物*, 2008, 28(3): 329-331.  
YAN M M, WEI G C, SHA W, *et al.* Study on extraction methods of bryophytes genomic RNA [J]. *Guihaia*, 2008, 28(3): 329-331.
- [4] 李宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点和对策 [J]. *生物技术通报*, 1999(1): 36-39.  
LI H, WANG X L. The Difficulties in the Isolation of RNA from Plant tissues and their Resolving strategies [J]. *Biotechnology Information*, 1999(1): 36-39.
- [5] CHAN C X, TEO S S, HO C L, *et al.* Optimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii* [J]. *Applied Phyco*, 2004, 16: 297-301.
- [6] 孙璐宏,鲁周民,张丽. 植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展 [J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(6): 102-106.  
SUN L H, LU Z M, ZHANG L. Advances in Extraction and Purification of plant Genome DNA [J]. *Jounal of Northwest forestry University*, 2010, (1): 36-39, 25(6): 102-106.
- [7] 吴静,李永华,何松林,等. 牡丹根系 RNA 提取方法的比较研究 [J]. *西北林学院学报*, 2010, 5: 60-63.  
WU J, LI Y H, HE S L, *et al.* Comparative Study of Extraction Methods for total RNA from the Roots of *Paeonia suffruticosa* [J]. *Jounal of Northwest Forestry University*, 2010, 5: 60-63.
- [8] GHAWANA S, PAUL A, KUMAR H, *et al.* A RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4: 85-89.
- [9] WANG X H, XIAO H L, CHEN G X, *et al.* Isolation of high-quality RNA from *Reaumuria soongorica*, a desert plant rich in secondary metabolites [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 48: 165-172.
- [10] GHANGAL R, RAGHUVANSHI S, SHARMA P C. Isolation of good quality RNA from a medicinal plant *Seabuckthorn*, rich in secondary metabolites [J]. *Plant Physio and Biochem*, 2009, 47: 1113-1115.
- [11] KUMAR G R, ESWARAN N, JOHNSON T S. Isolation of high quality RNA from various tissues of *Jatropha curcas* for down-stream applications [J]. *Anal Biochem*, 2011(1): 63-65.
- [12] CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 113-116.
- [13] KIRK E A, STEPHANIE K C, DENNIS A P, *et al.* The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera* [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 246: 455-464.
- [14] 刘洋,何心尧,马红波,等. 用 CTAB-PVP 法提取棉花各组织总 RNA 的研究 [J]. *中国农业大学学报*, 2006, 11(1): 53-56.  
LIU Y, HE X Y, MA H B, *et al.* Extraction of total RNA from cotton tissues with CTAB-PVP method [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2006, 11(1): 53-56.
- [15] SALZMAN R A, FUJITA T, ZHU K, *et al.* An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17: 11-17.
- [16] CARRETERO P L, AHUMADA I, CUNILLERA N, *et al.* Expressing and molecular analysis of the *Arabidopsis* plants DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1581-1591.
- [17] SEETANG N Y, SHARKEY T D, SUVACHITTANONT W. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 165(9): 991-1002.
- [18] RPDRÍGIEZ C M, AJI, ADA I, DIEZ J E, *et al.* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening [J]. *Plant J*, 2001, 27(3): 213-222.
- [19] YONG H M, JI Y J, HONG G K, *et al.* Identification of a rice APETALA3 homologue by yeast two-hybrid screening [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 167-177.
- [20] ANNE E, STEFAN M, SILVIA S, *et al.* Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll cells by a Tonoplast Proteomic Approach [J]. *American Society of Plant Biologists*, 2006, 141(1): 196-207.