

文章编号: 1674-7054(2016)03-0376-05

多年生白木香茎干不同部位总 RNA 提取方法的改良

侯晓婉¹, 刘培卫², 孙佩文³, 孟慧², 张争³

(1. 中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 海南分所, 海口 570311; 3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 运用“通体结香”技术诱导处理 10 年生白木香, 以处理 15 d 结香后的茎干白木层(H)、过渡层及结香层(A+T)为材料, 对艾德莱 EASY-spin plus RN38 试剂盒 RNA 提取过程进行改良, 并对对比分析改良前后 2 种方法提取 RNA 质量的差异。结果表明: 改良法提取的总 RNA 质量、纯度和完整性等均较 RN38 试剂盒好, 其中 28S 和 18S 条带清晰无杂质污染, 无降解, A_{260}/A_{280} 接近 2.0, RIN 值大于 6。说明改良后的方法适用于多年生白木香不同结香部位总 RNA 的提取, 能满足转录组数据分析。

关键词: 白木香; 结香部位; 通体结香; 总 RNA 提取; 茎干

中图分类号: Q 522

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.03.018

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 又称土沉香, 属瑞香科沉香属植物, 是我国特有的珍贵药用植物, 也是我国生产名贵芳香类药材沉香的主要资源植物, 为中药沉香的正品来源。白木香在自然生长状态下不会产生沉香, 只有在受到各种物理、化学等外界伤害和真菌侵染后才能产生^[1-3]。为了获得高质量的沉香, 人们对白木香等沉香类树木进行了大肆伤砍、火烙等伤害, 使得野生沉香属植物资源遭到严重的破坏, 以致于所有沉香属和拟沉香属植物都被列入《濒危野生动植物种贸易公约》(CITES, 2004), 同时白木香也被列为国家 2 级濒危保护植物^[6-7]。为保护珍稀濒危的白木香资源和实现沉香药材的可持续生产, 近年来, 海南已有规模化的白木香种植基地, 随着“通体结香技术”的研发和推广, 沉香的产率大大提高, 在一定程度上保护了野生沉香资源。目前, “通体结香技术”诱导白木香结香的机理尚不清楚, 因此, 从分子水平上揭示“通体结香技术”诱导沉香结香的机理, 分析其生物学特性, 指导“通体结香技术”的优化和改进, 很有必要。白木香总 RNA 的提纯是研究其结香机理的前提, 白木香不但有着坚硬的细胞壁, 细胞不易于破碎, 而且富含大量的多糖多酚化合物木质纤维、色素等物质^[8-10], 另外, 白木香还富含 RNase, RNA 极易被分离降解, 这些因素无疑增加了提取高质量的 RNA 及后续相关实验研究(如反转录 PCR, cDNA 合成, 蛋白质体外翻译, cDNA 文库构建及运用转录组学分析筛选关键基因等)的难度。因此, 获得高质量、高纯度、完整性好的 RNA 是非常重要的。目前, 已有关于白木香总 RNA 提取的相关报道, 但多集中在对白木香愈伤组织、悬浮细胞、叶片等组织提取方法的研究, 而对白木香茎干中白木样品的提取方法研究, 也仅集中于 5 年生以下白木样品, 未见多年生的白木样品提取方法的研究^[9, 11-13]。笔者对 10 年生白木香树进行通体结香诱导, 用艾德莱 EASY-spin plus RN38 试剂盒提取法, 对不同结香部位的样品进行 RNA 提取, 未获得高质量的 RNA。为此, 笔者对“通体结香”诱导白木香结香的不同部位 RNA 提取

收稿日期: 2016-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000136, 81173481); 北京市自然科学基金项目(6102024); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(2008); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20091106120009); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI01B07); 海南省中药现代化专项项目(2010ZY001, 2012ZY002); 海南省重大科技研发专项(ZDZX20100006)

作者简介: 侯晓婉(1987-), 女, 研究实习员, 主要从事生物化学与分子生物学基因功能相关研究。E-mail: yimiyanguanghwx@163.com

通信作者: 张争(1979-), 男, 副研究员, 主要从事伤害及微生物侵染诱导白木香结香研究。E-mail: zhang-zheng321@126.com

方法进行了系统的研究及优化改良,成功获得满足转录组学和分子生物学研究的 RNA 样品,为今后白木香结香机理的研究、关键功能基因、转录因子的筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 从海南省海口市演丰白木香种植产业基地选取胸径约 6 cm 的 10 年生白木香树 5 棵,用“通体结香技术”进行处理,处理 15 d 后白木香结香,锯取输液孔上 10 cm 长木段,每隔 4 cm 锯取 1 片厚 1 cm 的木圆片。在木圆片上由外到内依次用枝剪剪下不同部位的木材样品,外围未变色的白色木材为白木层(H),向内与白木部分具明显界限的木材为过渡层(T),再向内与 T 样品相邻的深红棕色木材为结香层(A),以及最内侧已腐烂的部分为坏死层(D)(图 1),将 H 层和 A+T 层用液氮冻藏,用于后续 RNA 提取。

1.2 RNA 的提取 RNA 提取参照北京艾德莱生物公司的 RN38 EASYspin plus 植物总 RNA 提取试剂盒说明书,并在其基础上每一操作步骤均加以改良,以达到快速、高效提取出高质量 RNA 的目的。具体操作步骤如下:(1) 准备裂解液:在 1.5 mL RNase-Free 离心管中加入 1 mL 的 RLT 和 100 μ L 的 PLAN Taid;(2) 取适量冻藏的白木香样品,置于经液氮预冷的研钵中,加入质量分数为 10% 的 PVP 粉,用液氮迅速研磨成粉末状,取 150 ~ 200 mg 加入提前准备好的裂解液中,涡旋,振荡混匀,冰上裂解 15 ~ 20 min,每 5 min 涡旋混匀 1 次。裂解充分后,离心 5 ~ 10 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$);(3) 吸取上清转移至天根 CS 吸附柱/DNA 吸附柱中,离心 30 s(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r $\cdot$ min $^{-1}$);(4) 往滤液中加入 1/2 体积无水乙醇,吸打混匀后加入 1 个基因组清除柱中,冰上静置 2 min,离心 2 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),弃滤液;(5) 将基因组清除柱放入 1 个新的 2 mL RNase-Free 离心管中,在基因组清除柱中加入 600 μ L 的 RLT plus,冰上静置 2 min,离心 1 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$);(6) 收集滤液,加入等体积的氯仿,涡旋混匀,离心 2 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$);(7) 小心吸取上清到 1.5 mL RNase-Free 离心管中,加入 1/2 体积的无水乙醇,吸打混匀后转入 1 个吸附柱 RA 中,冰上静置 2 min,离心 2 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),倒掉收集管中滤液;(8) 向吸附柱 RA 中加入 700 μ L 去蛋白液 RW1,离心 1 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),弃滤液;(9) 向吸附柱 RA 中加入 500 μ L 的漂洗液 RW(含乙醇),离心 1 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),弃滤液后重复(9)步骤;(10) 将空柱子空离 2 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),确保吸附柱上不残留滤液;(11) 将吸附柱 RA 放入 1 个新的 RNase-Free 离心管中,置于超净工作台中晾 1 ~ 2 min,向吸附膜中加入 80 $^{\circ}$ C 预热的 30 ~ 50 μ L RNase-Free ddH $_2$ O,室温静置 2 min,离心 2 min(4 $^{\circ}$ C, 13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$),得到 RNA 溶液后,立即置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存备用。

1.3 RNA 纯度及完整性检测 制作 1% 的非变性琼脂糖凝胶,在 1 $\times$ TAE 电泳液中进行电泳检测,评价 RNA 的完整性和质量。取 2 μ L 上样,180 V 恒压电泳 15 min 后,在紫外凝胶成像系统中观察分析 RNA 质量。用 NanoDrop^{*} 2000 微量紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度。Agilent2100 生物分析仪检测 RNA 的完整系数(RIN)及 28S/18S。

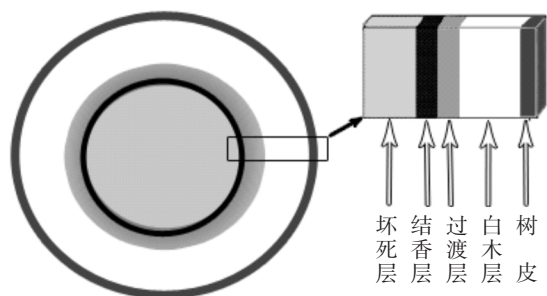


图 1 白木香“通体结香”横剖面及部分纵切面示意图

Fig.1 Sketch of cross section and part of transverse section of *Aquilaria sinensis* stem induced by liquid transfusion technology

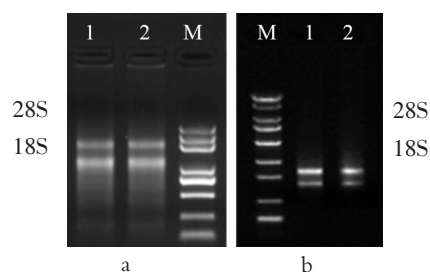


图 2 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳结果
a: RN38 试剂盒法; b: 改良后方法

1: 白木层(H); 2: 过渡层和结香层(A+T)

Fig.2 The result of RNA in non-denaturing agarose gel electrophoresis

a: RN38 Kit; b: Improved method

1: Healthy layer (H); 2: Transition and agarwood layers

2 结果与分析

2.1 不同结香部位提取的总 RNA 质量 从图 1-a 可见, RN38 试剂盒法提取的白木香 H 层和 A+T 层的 RNA 能看到清晰的 28S 和 18S 2 条主带, 但亮度相近, 并且有明显的下拖尾, 说明 RNA 已部分降解; 另外, 点样孔下方有微弱的白色物质, 说明制备的 RNA 中残留有蛋白质和多糖物质^[14]。

从图 1-b 可见, 改良法提取的白木香 H 层和 A+T 层的总 RNA 28S 和 18S 条带清晰, 无拖尾, 并且 28S 的亮度是 18S 的 2 倍, 说明获得的 RNA 完整性好, 未出现降解^[14]。

2.2 RNA 纯度及产率 从表 1 可以看出, 完全按照北京艾德莱生物公司 RN38 的 EASYspin plus 植物总 RNA 提取试剂盒提取白木香 H 层和 A+T 层 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值分别为 1.880 和 1.895, 介于 1.6~1.9 之间, 结果说明, RNA 样品中存在少量的蛋白质、多糖、酚或其他杂质^[14]; 而改良法提取的白木香 H 层和 A+T 层 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值分别为 1.979 和 2.050, 介于 1.9~2.1 之间, 接近 2.0, 结果说明, 改良 RN38 试剂盒法提取的白木香总 RNA 的纯度较高, 几乎无蛋白质、多糖等杂质污染^[17]。此外, 改良后方法提取的多年生白木香的 H 层和 A+T 层样品的总 RNA 产率远高于 RN38 试剂盒法提取的总 RNA。

表 1 不同方法提取多年生白木香茎干不同层总 RNA 的纯度及得率

Tab. 1 The purity and yield of total RNA from different layers in a ten-year-old *Aquilaria sinensis* stem

参数 Parameter	改良法 Improved method		RN38 试剂盒法 RN38 Kit	
	H 层 H layer	A+T 层 A+T layer	H 层 H layer	A+T 层 A+T layer
A_{260}/A_{280}	1.979	2.050	1.880	1.895
A_{260}/A_{280}	1.056	1.640	0.638	0.600
得率 Yield/(mg·kg ⁻¹)	6.27	8.36	1.92	2.52

2.3 RNA 完整性检测 基于非变性琼脂糖凝胶和 NanoDrop* 2000 微量紫外分光光度计的检测结果, 选取改良法提取的多年生白木香 H 层和 A+T 层的总 RNA, 经过 Agilent2100 生物分析仪检测 RIN 及 28S/18S。结果如表 2 所示, 白木香 H 层和 A+T 层总 RNA 的 28S/18S 分别为 1.1 和 1.2, RIN 值分别为 6.8 和 7.1, 均能满足药用植物转录组建库的要求, 表明该方法适用于需求高质量 RNA 实验的提取。

表 2 改良法提取多年生白木香茎干不同层总 RNA 的完整性

Tab. 2 The integrity of RNA extracted by the improved method from different layers of a ten-year-old *A. sinensis* stem

提取方法 Extracting method	分层 Layer	28S/18S	RIN
改良法 Improved	H	1.1	6.8
	A+T	1.2	7.1

3 讨论

目前, 用于植物总 RNA 提取的方法有很多种, 但多集中于酚类物质含量较少的草本植物, 酚类物质含量较多的木本植物总 RNA 的提取也多见于幼嫩组织或叶片。木本植物随着树龄的增加, 老的组织中的酚类物质会显著多于幼嫩组织, 这无疑增加了多年生木本植物总 RNA 提取的难度^[8,18]。白木香是珍稀濒危的木本植物, 其茎干的细胞具有坚硬的细胞壁, 并且富含萜、酚、多糖、木质、纤维、RNase 等多种物质。此外, 通过各种方式诱导结香后的白木香, 各种挥发性油类及部分非挥发性成分大量积累, 如倍半萜、芳香化合物和 2-色酮衍生物等^[4,19-20]。这些物质在破壁时和 RNA 一起释放出来, 经过氧化与 RNA 不可逆的结合在一起, 形成胶状物质, 大大降低了 RNA 的得率和质量。本实验在 RN38 多糖多酚总 RNA 提取试剂盒提取方法上加以改进, 探索出适合多年生白木香茎干总 RNA 提取的方法。该方法可以抑制 RNase 和多酚氧化酶的作用, 能快速、有效地剔除木质素、纤维素、多糖、多酚类物质的干扰, 获得高质量的 RNA。

改良法的要点: (1) 提取研磨过程中加入抗氧化剂 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 粉。PVP 作为多酚化合物的螯合剂, 能够与酚类物质结合, 抑制氮酚的氧化, 使其不能被氧化成醌类, 进一步防止了其 RNA 的结合, 减少提取过程中 RNA 的损失^[8,21-23]。(2) 在 RN38 试剂盒原混匀裂解的基础上延长裂解时间至 15~20 min, 并且确保在低温环境中裂解, 每 5 min 涡旋混匀 1 次, 让裂解液与研磨后的组织充分接触。白木香细胞壁坚硬, 富含大量的木质纤维, 液氮研磨虽然可以提高纤维细胞的破碎效率, 但仍然有残留的纤维组织, 它们的存在会阻碍细胞与裂解液的接触。延长裂解时间, 并多次涡旋混合会将大大增加裂解液与细胞的接触, 使其充分裂解。此外, 裂解过程中始终保持低温环境, 能很大程度上抑制 RNase 和多酚氧化酶的作用, 也在一定程度上杜绝 RNA 的降解和污染^[24-25]。(3) 裂解离心后加 CS 柱子/DNA 吸附柱。裂解离心后的上清液要吸取彻底, 避免 RNA 提取量的损耗, 然而由于木质纤维的影响, 上清液中残杂会堵塞下一步基因组清除柱, 造成 DNA 污染。过 CS 柱子, 能够彻底清除上清液中残杂, 并确保无 RNA 的损耗; 而选择 DNA 吸附柱过柱, 不仅能给清除残杂, 还能剔除部分 DNA 的污染。(4) 等体积氯仿抽提。白木香富含蛋白质和多糖, 特别是结香后的白木香组织中含有大量的脂类次生代谢物质。因其成分复杂, 目前还没有确切的方法来解决这一问题。氯仿具有使蛋白变性, 去除脂溶性物质的作用, 加等体积的氯仿再次抽提能更加彻底的清除蛋白、多糖和脂类物质, 获得高质量的 RNA^[24]。

笔者对白木香 RNA 提取的多个中间环节进行了系统科学的优化, 如组织裂解、蛋白质和酚类物质除杂、氧化剂去除等多个环节优化, 极大地提高了 RNA 的纯度、得率以及完整性, 为后续功能基因分析、结香机理的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yagura T, Shibayama N, Ito M, et al. Three novel diepoxy tetrahydrochromones from agarwood artificially produced by intentional wounding [J]. Tetrahedron Lett, 2005, 46: 4395-4398.
- [2] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 环境因子导致的拉物防御反应与药用次生代谢物的合成和积累 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(9): 919-924.
- [3] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. 中草药, 2010, 40(1): 156-159.
- [4] 李戈, 段立胜, 杨春勇, 等. 白木香结香技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 12012-12013.
- [5] 陈怀琼. 白木香通体结香技术的评价 [J]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [6] 国家林业局. 国家重点保护野生植物名录 [J]. [1999-09-09]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2000/content_60072.htm.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 172;
- [8] 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 1-4.
- [9] 高志晖, 魏建和, 熊换英, 等. 几种提取白木香茎干总 RNA 方法的比较 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23(5): 718-721.
- [10] 魏琦琦, 冯延芝, 林青, 等. 适于转录组测序的枣不同器官总 RNA 提取方法筛选 [J]. 经济林研究, 2015, 33(2): 63-67.
- [11] 杨云, 张争, 孟慧, 等. 濒危南药白木香愈伤组织总 RNA 提取方法研究 [J]. 广东农业科学, 2010(3): 193-195.
- [12] 陈晓东, 周伟平, 刘少烽, 等. 镰刀菌诱导白木香结香部位总 RNA 提取方法的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 993-995.
- [13] Sharma A D, Gill P K, Singh P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides [J]. Anal Biochem, 2003, 314: 319-321.
- [14] Hu C G, Honda C, Kita M, et al. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of poly-saccharides and polyphenol compounds [J]. Plant Mol. Biol. Rep., 2002, 20: 69a-69g.
- [15] Gao J W, Liu J Z, Li B, et al. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids [J]. Plant Mol. Biol. Rep., 2001, 19: 185a-185i.
- [16] Schneiderbauer A, Sandermann J H, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. Anal Biochem, 1991, 197(1): 91-95.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2003: 516-548.
- [18] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策 [J]. 生物技术通报, 1999(1): 36-39.
- [19] 韩晓敏. 珍稀濒危南药沉香主要成分检测方法研究 [J]. 秦皇岛: 燕山大学, 2014.
- [20] 刘军民, 翟明. 国产沉香资源开发利用及化学成分研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(1): 48-51.

- [1] 王艳, 高疆生, 金强, 等. 不同 RNA 提取方法在南疆特色果树上的应用 [J]. 新疆农业科学, 2015, 52(3): 461–466.
- [2] 淦国英, 漆艳香, 蒲金基, 等. CTAB 法提取高质量香蕉叶片 RNA 的方法 [J]. 广东农业科学, 2009(7): 192–195.
- [3] 王暑辉, 徐倩, 徐筱, 等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法 [J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1): 76–80, 89.
- [4] 侯双利, 刘翠晶, 杨利民, 等. 影响植物组织总 RNA 质量的因素 [J]. 人参研究, 2013(2): 11–16.
- [5] 徐雯, 邓宗汉, 陈婷婷, 等. 棉花纤维 RNA 提取方法的比较及酵母双杂交文库的构建 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(30): 177–183.

Improved Method for Extracting High Quality Total RNA from Different Stem Parts of *Aquilaria sinensis*

HOU Xiaowan¹, ZHANG Peiwei¹, SUN Peiwen², MENG Hui¹, ZHANG Zheng²

(1. South subtropical crops research institute, Chinese academy of tropical agricultural sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 2. Hainan Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou, Hainan 570311; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: A ten-year-old plant of agarwood (*Aquilaria sinensis*) was induced by liquid transfusion technology, using healthy layer, transition and agarwood layers of the stems transfusion treated for 15 days as materials. Aid-lab EASY-spin plus RN38 RNA extraction kits was modified in many key steps to improve the total RNA product qualities which were analyzed and then compared with those of the unmodified RNA extraction method. The results showed that the total RNA extracted by the modified RNA extraction method had better quality, purity and integrity than that of the unmodified method, in which the 28S and 18S bands were more legible with no impurity nor degradation, A_{260}/A_{280} was approximated to 2.0, and the RIN greater than 6. This suggests that the modified method for extracting total RNA in different *A. sinensis* tissues transfusion treated produces high quality total RNA which can be used for transcriptome data analysis.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; agarwood layer; liquid transfusion treatment; total RNA extraction; stem