

杨 佳,吴诗杰,王淑萍,等.发菜总 RNA 提取方法的比较与优化[J].江苏农业科学,2015,43(9):58-60.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.015

# 发菜总 RNA 提取方法的比较与优化

杨 佳,吴诗杰,王淑萍,毛桂莲,石 晶,梁文裕

(宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**发菜是一种具有丰富胶质鞘、色素、多糖的陆生蓝藻。采用 Omega RNA 提取试剂盒、Trizol RNA 提取法、天根试剂盒及优化后的 Omega RNA 提取试剂盒、Trizol 法、天根试剂盒法从发菜藻体中提取 RNA,并用核酸浓度测定仪和琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量。结果表明,优化前后的 Trizol 法均无法提取到发菜总 RNA;利用 Omega 试剂盒获得发菜总 RNA 已降解;利用天根试剂盒可获得发菜总 RNA,进一步改进和优化天根试剂盒的提取程序,获得的发菜总 RNA 23S、16S 条带清晰, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  分别为 2.06、2.08。研究结果为深入开展发菜转录组研究奠定了基础。

**关键词:**发菜;总 RNA;提取;方法优化

**中图分类号:**Q781 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0058-03

生物体性状和对外界环境的响应归根到底是由基因调控的,基因调控主要涉及到核酸、蛋白质等生物分子,高质量 RNA 是进行基因表达分析的基础。细胞内 RNA 分子多样性和易被降解的特性决定了 RNA 提取过程的复杂性<sup>[1]</sup>,RNA 酶高稳定性是造成 RNA 分离困难的主要原因。RNA 提取过程中出现的 RNA 酶有 2 种来源:外源性 RNA 酶和内源性 RNA 酶。外源 RNA 来自 RNA 制备过程中用到的玻璃和塑料制品、研究人员本身以及分离过程中用到的试剂或溶液,但这些外源性 RNA 酶可以通过 RNA 酶抑制剂处理或使用 RNA 研究的专用试剂等措施来解决<sup>[2-4]</sup>。而内源性 RNA 酶存在于材料本身,如材料的不新鲜会降低 RNA 的产量,破碎细胞内含物常与 RNA 形成难溶的物质(多糖类等)导致 RNA 分离困难<sup>[5-6]</sup>,因此,诸多因素会直接影响 RNA 的提取效果,增加 RNA 的提取难度。

发菜(*Nostoc flagelliforme*)是一种陆生固氮蓝藻,生长在干旱-半干旱荒漠草原地区,具有独特的抗干旱、高温、高光照度、紫外线等非生物胁迫的特性<sup>[7]</sup>。RNA 提取是探索发菜抗逆差异基因表达或转录组研究的重要基础,但由于发菜藻体被较厚的胶质鞘包被,对发菜藻体和细胞的破碎存在一定难度,同时发菜藻体富含的多糖、色素、蛋白质等会以不同方式干扰 RNA 的提取,从而加大了发菜藻体 RNA 提取的难度。目前,国内尚无发菜高质量 RNA 提取的相关报道,找到适合提取发菜总 RNA 的方法具有重要意义。本研究对 3 种发菜藻体 RNA 的提取方法进行比较和优化,筛选出最适合发菜 RNA 的提取方法,为从抗逆差异基因表达或转录组角度研究发菜耐干旱、抗紫外辐射等机理奠定重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

野生新鲜发菜采自宁夏贺兰山发菜自然生长地。

### 1.2 发菜藻体总 RNA 的提取及优化

1.2.1 Omega 试剂盒法提取发菜藻体总 RNA 将研磨充分的发菜藻体粉末转入 Buffer RCL 中(含  $\beta$ -巯基乙醇),迅速涡旋振荡,使材料充分裂解,按 Omega 公司 E. Z. N. A. TM Plant RNA Kit 试剂盒说明书中的 E. Z. N. A. TM Plant RNA Protocol II 进行试验。

1.2.2 Trizol 法提取发菜藻体总 RNA 按照 TRIzol Reagent 说明书进行发菜藻体 RNA 的提取。

1.2.3 天根试剂盒法提取发菜 RNA 将充分研磨至粉末的发菜藻体迅速转移至裂解液 SL(含  $\beta$ -巯基乙醇)中,立即涡旋剧烈振荡混匀,按天根公司 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒步骤提取发菜藻体总 RNA。

### 1.3 发菜藻体总 RNA 提取方法的优化

1.3.1 Omega 试剂盒方法的优化 参照 Omega 试剂盒稍作修改。使用 700  $\mu\text{L}$  Buffer RCL 进行材料的裂解。试验步骤中增加 DNase I,即当 RNA 全部吸附到 HiBind<sup>TM</sup> RNA Mini 柱子上后,加 300  $\mu\text{L}$  RWC Wash Buffer 到柱子上,10 000 g 离心 1 min,把配好的 DNase I mix 准确地加入柱子中心,室温静置 15 min;将 HiBind<sup>TM</sup> RNA Mini 柱子放入 1 个新的收集管中,加 400  $\mu\text{L}$  RWC Wash Buffer,静置 5 min,10 000 g 离心 1 min;最后加入在 70  $^{\circ}\text{C}$  水中孵育的 DEPC 水进行 RNA 的提取。

1.3.2 改良 Trizol 法提取发菜 RNA 对 TRIzol Reagent RNA 的提取方法稍作修改。向研磨好的发菜细胞中加入 1 mL Trizol 后,用涡旋混合器充分混匀,并在冰上放置 15 min;55 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$  水孵育 10 ~ 15 min 后,4  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 再转移至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

1.3.3 天根试剂盒方法的优化 参照天根试剂盒稍作修改。将研磨好的材料加入裂解液 SL 充分涡旋振荡混匀后,

收稿日期:2014-08-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360054)。

简介作者:杨 佳(1988—),女,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事资源植物学方面的研究。E-mail:yangjia713@126.com。

通信作者:梁文裕,博士,教授,主要从事植物资源及植物分子生物学的研究。E-mail:liangwy2009@163.com。

12 000 g 离心 3 min;2 次加入去蛋白液 RW1 后,放置 1 min 再进行离心 1 min;用漂洗液 RW 漂洗 3 次再空转离心 2 min;加入 RNase - Free 水后于室温放置 5 min 后离心收集 RNA。

1.4 RNA 质量和完整性检测

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳检测 分别取 RNA 样品进行 1.0% 的琼脂糖凝胶,电泳条件为 0.5 × TAE 缓冲液、160 V 恒压、15 min,紫外灯下观察 RNA 条带并照相记录结果。

1.4.2 RNA 产量和纯度检测 RNA 产量和纯度通过核酸浓度测定仪进行检测。通常  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值在 1.8 ~ 2.2 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  比值在 2.0 左右,说明 RNA 纯度较高, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值为 2.0 时质量最高<sup>[8]</sup>。用 RNase free ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照,取 1 μL RNA 样品,用核酸浓度测定仪检测  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  以及 RNA 的浓度 (ng/μL) 值。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取发菜总 RNA 质量比较

Omega 试剂盒法提取的发菜总 RNA 样品电泳显示无典型的 RNA 条带 (图 1);Trizol 法所提 RNA 无 23S、16S 条带,只有 1 条条带,表明 RNA 完全降解 (图 2);天根试剂盒法提取的发菜总 RNA 电泳结果表明,23S、16S 条带明显,但条带拖尾现象严重 (图 3)。

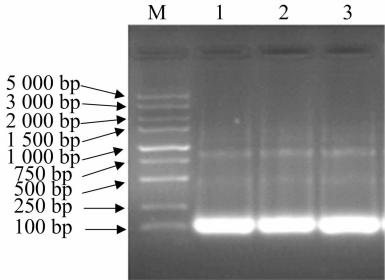


图1 Omega 试剂盒所提发菜藻体RNA电泳结果

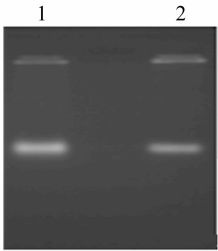


图2 Trizol 法所提发菜藻体 RNA 电泳结果

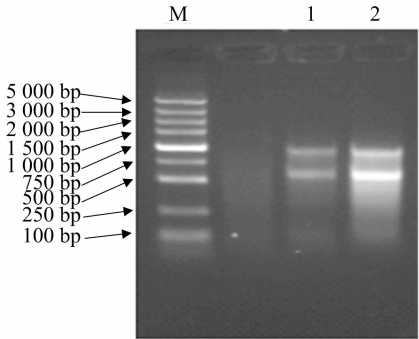


图3 天根试剂盒提取发菜藻体 RNA 电泳结果

用核酸浓度测定仪分别检测 3 种方法所提发菜藻体 RNA 的产量和纯度,检测结果表明,Omega 试剂盒所测值均超出了正常值的范围;Trizol 法所提 RNA 相关数据远远低于正常值范围,RNA 浓度值较高,说明所提 RNA 不纯,蛋白质、多糖等杂质污染严重;天根试剂盒法所得数值均正常,且  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  比值接近 2.0,说明 RNA 纯度较高,可进行优化后用于后续的分子试验 (表 1)。

2.2 3 种方法优化后所提发菜藻体 RNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

优化后 Omega 试剂盒法所提发菜总 RNA (图 4) 与优化

表 1 不同方法所提发菜藻体 RNA 的质量及产量检测

方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	RNA 浓度 (ng/μL)	峰值波长 (nm)
Omega 试剂盒法	2.12	2.47	737.7	260
Trizol 法	1.72	0.53	328.3	220
天根试剂盒法	2.07	1.93	97.1	260

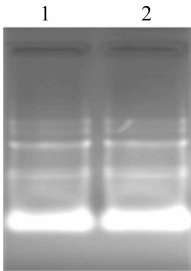


图4 优化后 Omega 试剂盒法所提发菜藻体 RNA 电泳结果

前 (图 1) 无明显差异,用 DNase 处理后,仍有杂带,无明显改变,在最下 1 条亮带以上,能清晰看到 4 条条带,这与正常 RNA 电泳条带相异,推测 Omega 试剂盒不适合发菜藻体 RNA 的提取;改良后的 Trizol 法 23S、16S 2 条带已有大部分

降解,5S 条带比较明亮,并伴有拖尾现象,表明该方法所提 RNA 降解快,不适合进行后续试验 (图 5);优化后的天根试剂盒法所提发菜总 RNA 质量有明显提高,23S、16S 条带清晰,无明显弥散、拖尾现象 (图 6)。

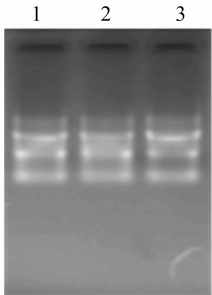


图5 改良 Trizol 法所提发菜藻体 RNA 电泳结果

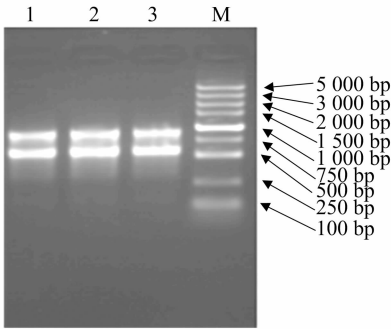


图6 优化后天根试剂盒法所提发菜藻体 RNA 电泳结果

与没有优化前的 3 种 RNA 提取方法相比,优化的 Omega 试剂盒法和改良 Trizol 法所提 RNA 并没有提高其质量和纯度,优化的 Omega 试剂盒法比值依然较高;改良 Trizol 法所得比值均低,说明改良后 Trizol 法所提 RNA 仍伴有蛋白质、多糖等杂质的污染;天根试剂盒经过优化,所提取的 RNA 质量和浓度都有所增加, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 、浓度分别达 2.06、2.08、154.3 ng/ $\mu\text{L}$ (表 2),260 nm 处峰值显著(图 7)。

表 2 不同方法优化后所提发菜藻体 RNA 的质量及产量检测

方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	C (ng/ $\mu\text{L}$ )	峰值波长 (nm)
优化 Omega 试剂盒法	2.12	2.24	663.1	260
改良 Trizol 法	1.77	0.58	45.5	220
优化天根试剂盒法	2.06	2.08	154.3	260

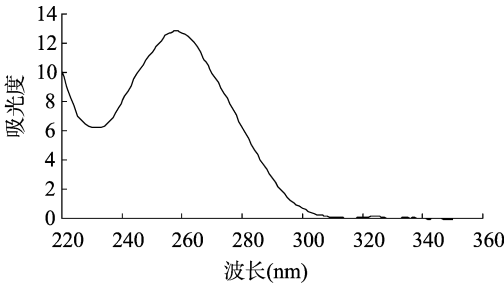


图7 优化后天根试剂盒法所提发菜藻体 RNA 核酸检测结果

3 讨论

RNA 提取一般采用研磨等方法使细胞破碎,通过去除材料中的多糖、蛋白质、DNA 的污染,进一步进行洗涤和沉淀,最终得到纯度较高的 RNA。有效细胞裂解是提取高质量及高产 RNA 的关键环节<sup>[8-9]</sup>,由于发菜藻体富含胶质、色素和多糖等,并且极易大量吸水和细胞壁坚硬的特性造成了 RNA 提取困难,对发菜藻体和细胞破碎以及缓冲液的选择无疑成为提取其 RNA 的关键步骤。笔者进行了几种破碎方法的比较,发现采用反复多次液氮研磨是破碎发菜藻体和细胞的理想方法。然而研磨过程中还应确保研磨用力恰当、液氮充足,避免材料溶解,而且研磨时间不宜过长(小于 8 min)。

根据不同试验目的和材料, RNA 提取可采用不同的方法<sup>[10-11]</sup>。李亚军等研究表明, Trizol 法能更简单有效获得莱茵藻中高质量的 RNA,而最适合提取微芒藻中高质量 RNA 的方法是 SDS-LiCl 沉淀法<sup>[12]</sup>。本研究结果表明, Omega 试剂盒法所提取的 RNA 伴随杂质较多; Trizol 法和改良 Trizol

法均不适用于发菜藻体 RNA 的提取,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  都与标准数值相差甚远;天根试剂盒法是发菜总 RNA 提取的理想选择,所得发菜 RNA 基本可以满足 RT-PCR 要求,但仍达不到转录组测序的要求。通常情况下,试剂盒法所提取的 RNA 质量并不高,原因是不同材料组织结构以及其中所含物质的种类不同,导致试剂盒在提取过程中并不理想,因此,试剂盒使用应根据试验目的及试验材料的特性进行适当改进。王友华等用改进的热酚提取法获得了高质量的棉花根总 RNA<sup>[13]</sup>;王春晖等通过对 2 种试剂盒法和改良的异硫氰酸胍法的比较,得出改良的异硫氰酸胍法所提出的棉花幼根总 RNA 能够满足转录组测序要求<sup>[14]</sup>;杨晓燕等针对 3 种常用 RNA 提取试剂盒对红地球葡萄叶样品 RNA 的提取效果进行评估和优化,结果显示最适于提取葡萄叶片总 RNA 的为 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒,同样需要延长提取试剂与样品的接触时间从而提高 RNA 的提取质量<sup>[8]</sup>。笔者对 Omega RNA 提取试剂盒、Trizol RNA 提取法、天根试剂盒等 3 种方法进行优化,结果表明,天根试剂盒法所提发菜 RNA 质量最高,达到转录组测序要求。

参考文献:

[1] 曹建斌. RNA 的提取及 3 种 RNA 提取试剂盒的比较[J]. 科技情报开发与经济, 2008, 18(10): 206-207.

[2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[3] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 278.

[4] Lessard P, Decroocq V, Thomas M, et al. Extraction of RNA, cloning and subtractive hybridization[M]//Plant molecular biology: a laboratory manual. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1997: 154-220.

[5] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. Methods in Enzymology, 1974, 31: 528-544.

[6] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 163(1): 16-20.

[7] Liang W Y, Zhou Y W, Wang L X, et al. Ultrastructural, physiological and proteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration and rehydration[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(18): 5604-5627.

[8] 杨晓燕, 张波, 黄方爱, 等. 适合转录组测序的葡萄叶片总 RNA 试剂盒提取法的改进[J]. 生物技术通报, 2013(6): 215-220.

[9] 邹晓蕾, 刘礼崔, 罗立新. 细菌总 RNA 提取方法的比较[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 1948-1954.

[10] 王伟, 李立芹, 邹雪, 等. 马铃薯块茎总 RNA 提取方法比较[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 38-40.

[11] 狄建军, 张庆波, 孙颖飞, 等. 蓖麻种子总 RNA 提取方法比较[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 33-34.

[12] 李亚军, 费小雯, 邓晓东. 2 种微藻总 RNA 提取方法的比较[J]. 热带农业科学, 2011, 31(5): 24-27.

[13] 王友华, 卢孟柱, 段留生. 棉花幼苗根总 RNA 提取的改进热酚法[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 723-726.

[14] 王春晖, 赵云雷, 王红梅, 等. 适用于转录组测序的棉花幼根总 RNA 提取方法筛选[J]. 棉花学报, 2013, 25(4): 372-376.