

细菌总 RNA 提取方法的比较

邹晓蕾, 刘礼崔, 罗立新

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 采用改良前后的 Trizol 法, RNAiso plus 法、Qiagen 试剂盒法以及 Triton X-100 法, 从大肠杆菌 (*Escherichiacoli*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 乳酸乳球菌 (*Lactococcuslactis*) 3 株细菌中提取 RNA。用琼脂糖凝胶电泳和核酸浓度测定仪检测总 RNA 的提取质量, 并用 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 对 RNA 的质量进行验证。结果表明: RNAiso plus 法对 3 株菌的总 RNA 提取均有很好的效果。Trizol 法和 Qiagen 试剂盒法对于 *E. coli* 总 RNA 的提取效果不错, 但对其他 2 株菌的提取效果均不明显, 并且都伴有 DNA 污染。上述几种方法提取出的 RNA 样品中均含有 23S 和 16S rRNA。*L.lactis* 更适合用 Triton X-100 法提取总 RNA。改良后的 Trizol 法和 RNAiso plus 法与 Triton X-100 法的原理基本相同, 都是采用加热的方法, 更彻底地裂解细菌细胞, 而且得到的 RNA 中不含有 rRNA 和 tRNA, 只保留了 mRNA, 能更好地用于后续的实验研究。

关键词: 细菌; 总 RNA 提取; 反转录聚合酶链式反应

文章编号: 1673-9078(2013)8-1948-1954

Comparison of Different Methods for Total Bacteria RNA extraction

ZOU Xiao-lei, LIU Li-cui, LUO Li-xin

(College of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: In this research, RNA was isolated from three bacterial strains, (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Lactococcuslactis*) by using modified and un-modified Trizol and RNAiso plus methods, Triton X-100 method and Qiagen method. The quality and integrity of the extracted RNA samples were determined with agarose gel electrophoresis, nucleic acid detector and RT-PCR detection. The results demonstrate that un-modified RNAiso plus method can effectively collect high-quality RNA from the three bacterial strains. Qiagen method and un-modified Trizol method showed good efficiency when isolating total RNA from *E.coli* but other strains. In addition, the RNA samples also contain DNA contamination. *L. lactis* was more suitable for using Triton X-100 method. With the same principle, modified Trizol method, modified RNAiso plus method and Triton X-100 method reported here can be employed for extraction of RNA that are free from 16S and 23S rRNA and provide simple, rapid and effective tools for the isolation of high-quality RNA appropriate for downstream molecular experiments

Key words : bacteria; total RNA extraction; RT-PCR

RNA 是生物体重要的遗传物质, RNA 的提取是分子生物学的基础实验, 对于 cDNA 文库构建、荧光定量 PCR、RT-PCR、Northern 杂交等下游分子生物学实验来说, 都需要质量好的, 完整性高的 RNA^[1]。Chomczynski 和 Sacchi^[2]第一次提出了用异硫氰酸胍法提取细胞内的 RNA, 使得 RNA 的提取过程变得简便快捷。常见的细菌 RNA 提取方法有强变性剂法^[3]、CTAB 法^[4]、SDS-Phenol 法^[5]以及热硼酸法^[6]等。在商品化的今天, 国内外生物试剂公司研发出了许多细菌 RNA 提取试剂盒。比如 Takara 公司的 RNAiso Plus; Invitrogen 公司的 Trizol 总 RNA 提取试剂盒以及 PureLink™ RNA Mini Kit; 上海生工的 UNIQ-10 柱式

Trizol 总 RNA 抽提试剂盒; Omega 公司的细菌 RNA 小量提取试剂盒 (Bacteria RNA kit) 以及高纯 RNA 抽提试剂盒 (HP total RNA kit); Qiagen 公司的 RNeasy Protect Bacteria Mini and Midi Kits 等。都可以从细菌或者培养细胞中快速有效地提取出高质量高纯度的 RNA。

有效的细胞裂解是提取高质量及高产量 RNA 必需且重要的第一步。目前, 国内外有许多关于细菌细胞壁破碎方法的报道, 如超声波法、酶解法、玻璃珠法等等^[7-10]。许多细菌是很难被破坏的, 因为他们是有细胞壁来保护。相对于动植物等真核细胞来说, 细菌的 RNA 含量少, 半衰期很短, 没有 5'帽子结构和 3'Poly(A)尾巴, 所以很容易降解。环境以及操作体系中无处不在的 RNA 酶也是导致 RNA 提取效果不理想的重要因素^[11]。此外, 破碎细胞内含物常与 RNA 形成难溶的物质 (多糖多酚类), 导致 RNA 分离困难

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271924)

作者简介: 邹晓蕾 (1991-), 女, 硕士, 微生物生理生化

通讯作者: 罗立新, 男, 教授, 微生物学及发酵

[12,13]。目前,国内关于 RNA 提取的报道大多集中在真核生物,对于细菌 RNA 提取的报道很少。

一般从材料中提取出的总 RNA 中,大约有 70% 是 rRNA, 10~15% 是 tRNA, 只有 3~5% 是 mRNA^[14]。而对于许多后续分子生物学实验, rRNA 和 tRNA 通常是没有用处的。因此,研究人员常采用一些改良的方法去除总 RNA 中的 rRNA 和 tRNA, 以便更有效地用于下游实验。

本文以 *Escherichiacoli*、*Bacillus subtilis*、*Lactococcuslactis*3 株菌作为实验材料,对目前应用比较广泛的 RNA 提取方法进行了比较和讨论,并对 Trizol 法、RNAiso plus 法进行了改良,分析并讨论了各种方法的优缺点,为细菌 RNA 的提取提供重要的理论依据和实验基础,从而为进一步研究细菌的抗逆机制和基因表达差异奠定基础。另外,必须要指出的是,对于不同的细菌,同一种方法所呈现出的结果往往差异很大,所以导致之前的实验报告得到的结论各不相同。本文将对实验成功和失败的原因进行分析。

1 材料与方法

1.1 原料

大肠杆菌 (*E.coli*)、枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*)、乳酸乳球菌 (*L.lactis*) 均为本实验室保存菌种。

1.2 培养基

MRS 培养基: 蛋白胨 10.00 g, 牛肉膏 10.00 g, 酵母膏 5.00 g, 柠檬酸氢二铵 2.00 g, 葡萄糖 20.00 g, 吐温(80) 1.00 mL, 乙酸钠 5.00 g, 磷酸氢二钾 2.00 g, 硫酸镁 0.58 g, 硫酸锰 0.25 g, 蒸馏水定容至 1.00 L, 调 pH 至 6.20~6.60。LB 培养基: 胰蛋白胨 10.00 g, 酵母提取物 5.00 g, 氯化钠 10.00 g, 蒸馏水定容至 1.00 L, 调 pH 至 7.00。

1.3 主要试剂及仪器

1.3.1 需配制的试剂

10×30 mM Tris-HCL, pH 8.0: 称取 3.63 g Tris 碱于烧杯中, 加入 80.00 mL DEPC 水, 充分搅拌溶解, 用 HCL 调 pH 至 8.00, DEPC 水定容至 100.00 mL。

100×1 mM EDTA: 称取 3.72 g Na₂EDTA·2H₂O 于烧杯中, 加入 80.00 mL DEPC 水溶解混匀, DEPC 水定容到 100.00 mL。

10×10 mM Tris-HCL, pH 7.5: 称取 1.21 g Tris 碱于烧杯中, 加入 80.00 mL DEPC 水, 充分搅拌溶解, HCL 调 pH 至 7.50, DEPC 水定容至 100.00 mL。

3 M NaOAc (pH 5.2): 向烧杯中加入 40.80 g NaOAc·3H₂O, 加入 40.00 mL 去离子水, 冰醋酸调 pH 至 5.20, 加水定容至 100.00 mL。

50×TAE 缓冲液: 称取 tris 242.00 g 和 Na₂EDTA·2H₂O 37.20 g, 用 800.00 mL 的 0.1% DEPC 水充分溶解混匀, 加 DEPC 水定容到 1.00 L。1×TAE 电泳缓冲液: 取 20.00 mL 50×TAE, 980.00 mL 的 DEPC 水, 混匀即可。

所需其他化学试剂均为进口或者国产分析纯试剂, 如水饱和酚、异丙醇、无水乙醇、氯仿、异戊醇等。

1.3.2 实验所需试剂盒

Trizol 法, Trizol 总 RNA 提取试剂盒, Invitrogen 公司; RNAiso Plus 法, RNAiso Plus 试剂盒, Takara 公司; Qiagen 法, RNeasy Protect Bacteria Mini Kit, Qiagen 公司; 逆转录试剂盒, First Strand cDNA Synthesis Kit, 赛飞生物公司。

凡是含有 Tris-HCL 的试剂都需用 DEPC 水配置, 其余试剂则需用 0.1% DEPC 水处理过夜, 121 °C 高压灭菌 3 小时备用。所用的玻璃、金属制品同样需要 0.1% DEPC 水处理, 然后高温高压灭菌, 烘干备用。所用的塑料制品均是 RNase-free 的。

1.3.3 主要仪器

DK-S26 型电热恒温水浴锅; SUKUN 双层小容量全温恒温培养摇床; eppendorf 舒适型恒温混匀器; eppendorf 梯度 PCR 仪; HERMLE, Z323K 通用高速离心机; Tanon EPS 100 核酸电泳仪; Thermo Scientific (NANODROP 1000) 核酸测定仪等。

1.4 实验方法

1.4.1 细菌的培养

E.coli 和 *B.subtilis* 均接种于 LB 培养基中, 37 °C 摇床培养 12 h; *L.lactis* 接种于 MRS 培养基中, 30 °C 摇床培养 14 h。

1.4.2 细菌总 RNA 的提取

(1) Trizol 法提取 RNA: 8,000 r/min, 4 °C, 5 min 收集菌体细胞 2~4 mL; 加入 1 mL Trizol Reagent, 反复抽吸混匀; 12,000 r/min, 4 °C 离心 10 min; 上清转入新管 (2 mL 离心管), 15~30 °C 静置 5 min; 加入 1/5 体积量的氯仿 (约 0.2 mL), 大力摇 15 s, 15~30 °C 静置 2~3 min; 4 °C, 12,000 r/min, 离心 15 min; 转水相至新管 (1.5 mL 离心管), 加入等体积异丙醇 (约 0.5 mL), 轻轻上下颠倒混匀, 15~30 °C, 10 min; 12,000 r/min, 4 °C, 10 min, 去上清; 加入 1 mL 75% 预冷乙醇 (需用 DEPC 水来配制), 混匀, 7500 r/min, 4 °C,

5 min, 去上清, 室温放置 5~10 min (可倒置于纸巾上, 使得乙醇挥发); 30~50 μL RNase-free 水重溶, 55~60 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 加入 1 μL RNA 酶抑制剂, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2) RNAiso plus 法提取 RNA: 8,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 收集菌体细胞 2~4 mL; 加入适量的 RNAiso Plus 后匀浆混匀, 室温静置 5 min; 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 上清转移至新的 1.5 mL tube 中; 加入 1/5 RNAiso Plus 体积量的氯仿, 振荡混匀, 室温静置 5 min; 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min; 转水相至新的离心管中(1.5 mL 离心管), 加入 0.5~1 倍的 RNAiso Plus 体积量的异丙醇, 室温静置 10 min; 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min; 用与 RNAiso Plus 等量的 75% 乙醇清洗沉淀, 7,500 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min; 弃上清保留沉淀, 室温干燥 8 min; 溶解于 RNase-free 水中, 保存备用。

(3) Qiagen 法提取 RNA: 8,000 r/min, 5 min 收集菌体细胞 2~4 mL; 加入 2 mL RNA protect Bacteria Reagent 反复吹打混匀, 室温静置 5 min, 同样转速离心 10 min (离心后可能未见沉淀但并不影响实验结果); 去上清, 倒置于纸巾上, 轻轻去除管壁多余的液体 (收集到的菌体细胞可以在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或者 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用前需室温解冻); 准备一个 PCR 小管, 加入 20 μL 蛋白酶 K 和 200 μL 溶菌酶 (15 mg/mL), 混匀。加入上述菌体细胞中, 用移液枪反复吹打混匀几次。涡旋振荡 15 s, 室温静置温育 30 min, 期间每 2 min 振荡一次 (可适当延长温育的时间, 可提高 RNA 的产量); 加入 700 μL Buffer RLT (已加巯基乙醇), 剧烈振荡, 如果可以看到沉淀物质, 最大转速离心 2 min, 保留上清, 弃沉淀; 加入 500 μL 无水乙醇, 剧烈振荡混匀 (切忌不要离心)。加入乙醇可能会出现沉淀, 但是并不影响实验结果; 将 700 μL 样品转入 RNeasy Spin Column, 并置于 2 mL 收集管中, 轻轻盖上盖子, 12,000 r/min, 离心 15 s。去掉收集管中的滤液; 加入 700 μL RW1, 12,000 r/min, 15 s, 去滤液; 加入 500 μL RPE (已加无水乙醇), 12,000 r/min, 15 s, 去滤液; 再加入 500 μL RPE, 12,000 r/min 离心 2 min。弃去收集管和里面的液体; 换上新的 2 mL 离心管, 最大转速离心 1 min, 将乙醇除尽; 换上新的 1.5 mL 离心管, 加入 30~50 μL RNase-free 水, 12,000 r/min, 1 min 洗脱 RNA; 同样转速重新洗一次, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 保存备用。

(4) Triton X-100 法提取 RNA: Triton X-100 是一种非离子型的表面活性剂, 用来裂解细胞时, 0.1% 的浓度就足够了。结合加热裂解、氯仿抽提、无水乙醇沉淀等方法, 可以用来提取细菌中的 RNA, 而且提

取出来的 RNA 不含有 23S 和 16S rRNA, 更有利于后续分子实验研究。具体步骤如下: ① 8,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 收集菌体细胞 2~4 mL。② 1 mL TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7.5) 缓冲液洗一次, 1 mL TE (内含 0.2% Triton X-100) 重悬。③ 100 $^{\circ}\text{C}$, 15~25 min, 迅速转至冰浴。④ 加等体积的氯仿, 上下颠倒 10~15 次混匀, 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 离心。⑤ 转上清至新管。⑥ 加 1/10 体积 3 M 醋酸钠 (pH 5.2), 2~2.5 倍体积预冷无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min-过夜。⑦ 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 离心, 弃上清。⑧ 1 mL 无水乙醇清洗沉淀 2~3 次。⑨ 室温放置 5 min, 沉淀用 30~50 μL RNase-free 水溶解。加入 1 μL 的 RNA 酶抑制剂, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(5) 改良的 Trizol 法和 RNAiso plus 法提取 RNA: 分别参照 (1) 和 (2) 的方法稍作修改, 向收集到的菌体细胞加入 Trizol Reagent 和 RNAiso Plus 之后, 放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅, 加热 15~25 min, 然后迅速转至冰浴; 清洗沉淀时使用无水乙醇清洗 2~3 次。

1.4.3 RNA 质量和完整性检测

(1) 琼脂糖凝胶电泳检测: 分别取 RNA 样品 4~5 μL , 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 85 V 恒压, 25 min。紫外灯下观察 RNA 的条带, 并照相记录结果。

(2) RNA 的产量和纯度检测: 各取 2 μL RNA 样品, 用核酸浓度测定仪分别测量 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 以及 RNA 的浓度 OD (ng/ μL)。

(3) RT-PCR 验证

① 去除 RNA 中的 DNA: 在进行反转录之前, 需采用 RNase-free DNase (赛飞生物) 去除 RNA 样品中的 DNA 污染。在微量离心管中配置下列反应液, 全量 50 μL (RNA 样品 35 μL , 10 \times DNase I Buffer 5 μL , Recombinant DNase I (RNase-free, 5 U/ μL) 2 μL , RNase Inhibitor (40 U/ μL) 0.5 μL , DEPC 处理水 7.5 μL); 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热反应 30 min; 加入等体积的 50 μL 苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混匀; 室温, 12,000 r/min, 离心 5 min, 取上清; 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 上下颠倒混匀; 室温, 12,000 r/min 离心 5 min, 取上清 (切勿吸取沉淀, 不要贪多); 加入 10 μL 3M 醋酸钠和 250 μL 无水乙醇 (预冷), -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min; 12,000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清; 再次加入 70% 冷乙醇 (DEPC 水配置), 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 r/min, 离心 5 min 洗净, 弃上清; 室温干燥沉淀 (切勿加热干燥, 容易导致 RNA 不易被溶解); 用 30~50 μL 的 RNase-free 水溶解沉淀。

② cDNA 第一条链合成 (First Strand cDNA

Synthesis Kit): 向 PCR 小管中加入 1 μL 纯化 RNA, 随机引物 1 μL , RNase-free 水定容到 12 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$, 温育 5 min, 立刻转至冰上; 按照顺序加入 5 \times Reaction Buffer 4 μL , RibolockRNase Inhibitor 1 μL , 10 mM dNTP Mix 2 μL , RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL , 离心混匀; 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min, 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 70 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 结束反应。

③ RT-PCR: RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 即逆转录 PCR, 是将 RNA 的逆转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链式扩增反应 (PCR) 相结合的技术。原理是: 提取组织或细胞中的 RNA 作为模板, 采用 Oligo(dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 而获得目的基因或检测基因表达。逆转录的具体操作: 向 PCR 小管中加入 1 μL RNA, 随机引物 1 μL , RNase-free 水定容到 12 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$, 温育 5 min, 立刻转至冰上; 按照顺序分别加入 5 \times Reaction Buffer 4 μL , RibolockRNase Inhibitor 1 μL , 10 mM dNTP Mix 2 μL , RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL ; 离心混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min; 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 70 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 结束反应。

2 结果与讨论

2.1 不同方法提取 3 株细菌 RNA 的琼脂糖凝胶电泳质量检测

琼脂糖凝胶电泳可以检测 RNA 的完整性。原核生物和真核生物不同, rRNA 分为 23S rRNA、16S rRNA 和 5S rRNA。琼脂糖凝胶电泳中, 质量好的 RNA 的条带一般为 2 条, 分别是 23S 和 16S rRNA, 且条带清晰透亮。如图 1、图 2、图 3、图 4 所示, 是不同方法所提取的 3 株细菌的 RNA 凝胶电泳检测结果。

2.1.1 改良前后 Trizol 法

由图 1 可看出, Trizol 法所提取的大肠杆菌的 RNA (1 号泳道), 23S、16S 及 5S rRNA 条带清晰, 无明显的拖尾现象, 说明 RNA 的质量很好。但是枯草芽孢杆菌 (3 号泳道) 和乳酸乳球菌 (5 号泳道) 的 RNA 几乎看不到条带, 这个结果也与核酸浓度测定仪得到的数据相符合 (见表 1)。原因可能是由于 Trizol 试剂没有将枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌的细胞壁完全破碎。改良后的 Trizol 法 (2、4、6 号泳道), 将总 RNA 中的 23S 和 16S rRNA 去除了, 所以在电泳条带中看不到清晰的 23S 和 16S rRNA 两条带, 只有 5S rRNA 的条带保留。

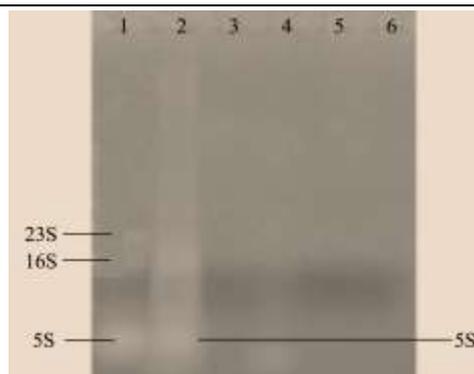


图 1 Trizol 法改良前后 3 株菌的 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RNA from three bacterial strains by modified and un-modified Trizol method

注: 1 和 2 分别为 Trizol 法改良前后的 *E. coli* RNA; 3 和 4 分别为 *B. subtilis* 改良前后的 RNA; 5 和 6 为 *L. lactis* 改良前后的 RNA。

2.1.2 未改良 RNAiso plus 法

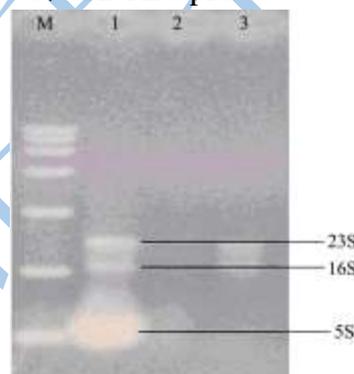


图 2 RNAiso plus 法提取的 3 株菌 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of RNA from three bacterial strains by un-modified RNAiso plus method

注: M 为 DL15,000 marker; 1 为大肠杆菌 RNA; 2 为枯草芽孢杆菌 RNA; 3 为乳酸乳球菌 RNA。

除枯草芽孢杆菌外, RNAiso plus 法对其余两株菌的总 RNA 提取效果还是比较理想的。从图中可以看到, RNA 的条带有三条, 从上到下依次为 23S rRNA, 16S rRNA 和 5S rRNA。其中 23S rRNA 的亮度约是 16S rRNA 的两倍。而枯草芽孢杆菌的 RNA 条带模糊, 隐约能看到一些条带, 但是不明显。核酸浓度测定仪测定的枯草芽孢杆菌 RNA 的 A_{260}/A_{280} 的值为 1.89, A_{260}/A_{230} 为 1.44, 说明 RNA 样品中仍有胍盐和巯基乙醇的残留。3 号泳道的乳酸乳球菌的 23S 和 16S 条带可以看见, 但是 5S 条带不太明显。

2.1.3 改良后的 RNAiso plus 法

如图 3 (A) 所示, 与 Trizol 法的原理相同, 改良后的 RNAiso plus 法也同样去除了 23S 和 16S rRNA, 只保留了底部最亮的 5S rRNA。在 B 图中, 改良后的 RNAiso plus 法提取的大肠杆菌的 RNA (2 号泳道)

条带有拖尾现象,可能是 RNA 已经降解了。

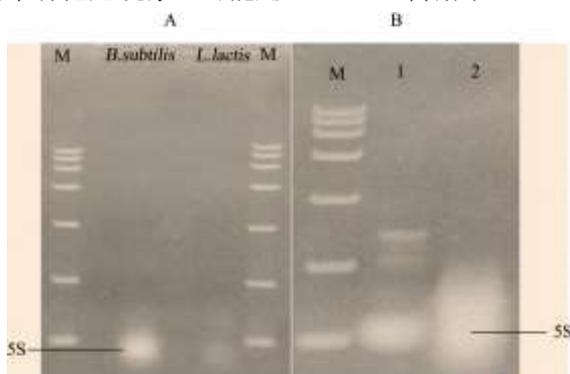


图3 改良后的 RNAiso plus 法提取的 3 株菌 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of RNA from three bacterial strains by modified RNAiso plus method

注: M 为 DL15,000 DNA marker; A 为改良后枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌的 RNA; B 为大肠杆菌改良前后的 RNA 对比图 (1 为改良前的 RNAiso plus 法提取的大肠杆菌 RNA; 2 为改良后 RNAiso plus 法提取的大肠杆菌 RNA)。

2.1.4 Qiagen 法提取 RNA

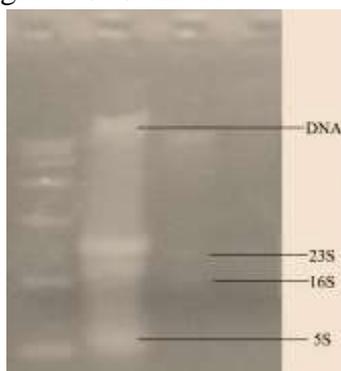


图4 Qiagen 法提取的 3 株菌 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of RNA from three bacterial strains by Qiagen method

注: 从左至右依次为 DL15,000 DNA marker; 大肠杆菌 RNA; 枯草芽孢杆菌 RNA; 乳酸乳球菌 RNA。

Qiagen 法对 3 株菌的 RNA 提取效果均不好。电泳图中, 大肠杆菌 RNA 的条带不清晰, 很浑浊, 有明显的拖尾现象, 说明 RNA 样品中有杂质未除去。除此之外, 在 23S rRNA 的上方还有一个条带, 可能是基因组 DNA。枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌的 RNA 条带比较暗, 但还是可以分辨出来。至于 RNA 的质量如何, 还需进一步用 RT-PCR 来验证。笔者分析, 破碎之后的枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌内部也许会含有一些多糖和酚类物质, 与 RNA 粘连在一起, 从而使得 RNA 很难从点样孔里扩散出来, 所以条带不够清晰。

2.1.5 Triton X-100 法提取 RNA

Triton X-100 法对 3 株菌的 RNA 提取效果都还可以, 特别是对于难破壁的乳酸乳球菌效果最好, 从电泳图可以看出, 提取出的 RNA 和改良后的 Trizol 法及 RNAiso plus 法一样均不含有 23S 和 16S rRNA 条带, 只保留了 5S rRNA 条带。Triton X-100 法相对于其他的试剂盒方法来说, 所需的试剂比较少, 更加经济实惠, 特别是对难以破壁的革兰氏阳性菌有很强的针对性, 而且提取出的 RNA 去除了 23S 和 16S rRNA 的干扰, 无需再对 RNA 样品进行纯化。

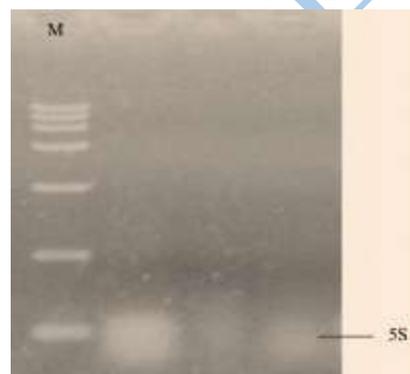


图5 Triton X-100 法提取的 3 株菌 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of RNA from three bacterial strains by Triton X-100 method

注: 从左至右依次为 DL15,000 DNA marker; 大肠杆菌 RNA; 枯草芽孢杆菌 RNA; 乳酸乳球菌 RNA。

2.2 RNA 的产量和纯度测定

用核酸浓度测定仪来检测 RNA 的产量和纯度。一般评估 RNA 纯度的标准为: A_{260}/A_{280} 比值为 2.00 ± 0.10 , A_{260}/A_{230} 的比值在 2.00 和 2.40 之间。如果 A_{260}/A_{280} 比值小于 2.00, 样品中存在蛋白污染; 如果 A_{260}/A_{230} 的比值小于 2.00, 说明样品中残留了试剂盒试剂中的异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇。不同方法提取的 3 株菌的 RNA 产量和纯度见表 1。从表 1 的数据可以看出: 几种方法提取的大肠杆菌 RNA, 质量都很好。均没有蛋白和多糖及酚类物质的污染, A_{260}/A_{280} 的值都在 2.00 左右, A_{260}/A_{230} 都在 2.00 和 2.40 之间; 对于枯草芽孢杆菌来说, 几种方法提取的效果均不理想。 A_{260}/A_{230} 的值都低于 2.00, 说明 RNA 样品中含有胍盐、巯基乙醇等物质; 改良后的 Trizol 法和 RNAiso plus 法, A_{260}/A_{280} 的值有所提高, 但 A_{260} 和 A_{230} 的比值始终达不到 2.00。笔者在研究时发现, 当用 70% 乙醇清洗沉淀, 离心后, 容易将沉淀倒出, 所以建议可以直接用无水乙醇洗 2~3 次, 以此来提高 A_{260}/A_{230} 的值。Triton X-100 法更适合用于提取乳酸乳球菌的 RNA, A_{260}/A_{280} 的值为 1.99, A_{260}/A_{230} 的值为 2.03, 说明提取出的 RNA 质量和完整性很好, 可以用于后续的分

子实验。

表 1 不同提取方法 3 株菌 RNA 的质量和产量比较

Table 1 Comparison of the quality and yield of RNA by different methods

方法	含量测定	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. lactis</i>
Trizol 法	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2.00	1.69	1.66
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1.87	0.61	0.81
	OD/(ng/μL)	710.40	32.8	20.20
Trizol 法 (改良后)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2.10	1.86	1.69
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2.05	1.28	0.64
	OD/(ng/μL)	3763.00	76.80	20.60
RNAiso plus 法	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2.07	1.89	2.14
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2.11	1.44	1.80
	OD/(ng/μL)	3593.00	41.80	48.80
RNAiso plus 法 (改良后)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.96	1.98	2.02
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2.19	1.44	1.25
	OD/(ng/μL)	2627.95	501.40	97.20
Qiagen 法	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2.13	1.92	1.71
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2.02	0.24	0.05
	OD/(ng/μL)	1826.45	21.55	8.45
Triton X-100 加热法	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.95	1.85	1.99
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1.72	1.33	2.03
	OD/(ng/μL)	304.65	50.45	68.10

2.3 RT-PCR 分析验证

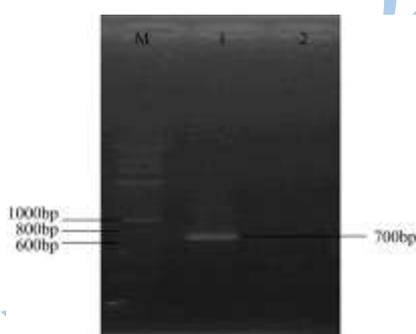


图 6 RT-PCR 扩增 *dnaK* 的部分基因序列

Fig.6 Amplification of the partial *dnaK* gene by RT-PCR

如图 6 所示, 以 Triton X-100 法提取的 *L. lactis* RNA 为模板, 扩增出的 *dnaK* 部分序列, 条带清晰, 大小正确, 且没有别的杂带污染。说明用 Triton X-100 法提取的乳酸乳球菌的 RNA 样品质量很好, 在提取过程中就除去了 rRNA 和 tRNA, 不需要进行 mRNA 的分离纯化就可以进行下游的分子实验, 但是要完全验证 RNA 的完整性还需进一步检验。

3 结论

3.1 RNA 提取的原理就是将细胞破碎裂解, 利用一

些试剂去除多糖、酚类、蛋白和 DNA 的污染, 通过一系列的抽提、洗涤和沉淀, 最终得到纯净的 RNA 的过程。影响 RNA 提取质量的因素有很多: ①RNase 的污染。RNase 无处不在, 包括破碎细胞内的 RNA 酶; 实验所用试剂中的 RNA 酶; 实验人员身上携带的 RNA 酶以及实验器材的污染等等。而且 RNase 性质稳定, 实验室很难做到完全隔离这个酶的作用。②RNA 提取试剂盒的通病就是 A₂₆₀/A₂₃₀ 普遍偏低。主要是因为 RNA 样品中易残留 RNA 酶的变性剂异硫氰酸胍和 β-巯基乙醇。③细胞裂解不彻底, 导致 RNA 不能完全释放出来。有些细菌的细胞壁坚韧, 一般温和的破壁方法很难将其完全破碎。

3.2 本实验采用的 3 株菌有一定的代表性, 大肠杆菌属于革兰氏阴性菌, 细胞壁中的肽聚糖含量低 (占胞壁干重的 10~20%)、层数少 (1~3 层), 且交联疏松, 所以极易破碎。所以一般的 RNA 试剂盒 (如 Trizol 提取试剂盒; RNAiso Plus 试剂盒等等) 都适用。而且提取出来的 RNA 纯度和产量均处于理想状态。枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌都属于革兰氏阳性菌, 细胞壁较厚 (约 20~80 nm), 肽聚糖层含量丰富, 有 15~50 层, 约占细胞壁干重的 50~80%, 此外, 阳性菌的细胞壁结构属于三维结构, 而且交联紧密。本文所采取的几种方法: ①Trizol 法和 RNAiso plus 法) 主要是利用强变性剂来破碎细菌细胞壁和去除 RNA 酶的作用的。②Qiagen 法则是利用酶解法来对细胞进行破碎的。③Triton X-100 是一种非离子型的表面活性剂, 一般用 0.1~0.2% 的浓度来裂解细胞。④改良后的 Trizol 法和 RNAiso plus 法通过加热来使细胞破碎更加完全, 同时去除了 rRNA 和 tRNA。有效的改善了实验菌 (特别是乳酸乳球菌) 的 RNA 提取效果。这些方法中, Qiagen 法对 3 株菌 RNA 的提取均没有很好的效果, 所提取出的 RNA 纯度低, 产量低。可能是由于在破碎细胞的时候, 我们只采用了比较温和的方法 (用蛋白酶 K 和溶菌酶裂解), 在以后的实验中可以尝试将化学裂解、物理裂解和机械破碎相结合, 以其获得质量高的 RNA。

3.3 琼脂糖凝胶电泳检测和核酸浓度测定仪得出的结果只能作为判断 RNA 质量和完整性的一个重要参考, 并不是唯一标准。最重要的还是要用 RT-PCR 进行验证。而且不同的实验目标, 对 RNA 质量的要求也不同。如果是用来做一般的荧光定量 PCR 分析, 则对 RNA 的纯度要求并不高; 但若是用于构建 cDNA 文库, 所需 RNA 的质量和完整性必须达到很高, 且要进一步分离纯化得到 mRNA。

3.4 通过对本实验得到的数据进行分析, 笔者认为

RNAiso plus 法更适合细菌 RNA 的提取。实验所用的试剂经济实惠, 实验所用的仪器也都是实验室里的基础设备, 且所需实验时间大概在 2 h 左右, 更适合在各大实验室操作使用。Triton X-100 法对于革兰氏阳性菌 RNA 的提取效果很好, 而且去除了 rRNA 和 tRNA 对于后续分子实验的影响, 也可作为以后提取阳性菌 RNA 的一个参考。Qiagen 试剂盒的方法, 对于本实验的 3 株菌来说, 效果均不理想, 价格也比较昂贵, 提取步骤相对繁杂, 所以不建议在实验室中经常使用。细菌 RNA 的提取相对于真核生物来说, 难度更大。我们仍然需要继续进行大量的实验, 来获得更多的数据和理论支持。以其达到针对不同的细菌, 选择合适的 RNA 提取方法。

参考文献

- [1] Jun H L, Chuan H T. A simple rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes* [J]. *Lett Biotechnol*, 2006, 28: 1193-1197
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159
- [3] 陈晖,何海福.植物组织总 RNA 提取方法的研究进展[J].甘肃农业,2006,8:228-230
Chen H, He H F. Progress of Extraction Methods for Plant Tissues Total RNA [J]. *Journal of Gansu Agriculture*, 2006, 8: 228-230
- [4] 杨占军,谷守琴,张健.几种植物组织总 RNA 提取方法的特点及疑难对策[J].安徽农业科学,2009,37(18):8341-8342
Yang Z J, Gu S Q, Zhang J. Characteristics of Several Extraction Methods on Total RNA in Plant Tissues and Strategies to Problems [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2009, 37(18): 8341-8342
- [5] 吴丽娟,黎燕,胡美茹等.改进 SDS-Phenol 法快速提取细胞总 RNA[J].第三军医大学学报,1999,1(21):57-59
Wu L J, Li Y, Hu M R, et al. Preparation of cellular total RNA by improved SDS-phenol method [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 1999, 1(21), 57-59
- [6] 姚玉新,赵玲玲,郝玉金,等.改良热硼酸法高效提取苹果果实 RNA[J].果树学报,2005,22(6):737-740
Yao Y X, Zhao L L, Hao Y J, et al. A Modified Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Apple Pulp [J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(6): 737-740
- [7] Bashyam M D, Tyagi A. An efficient and high-yielding method for isolation of RNA from mycobacteria [J]. *Bio Techniques*, 1994, 17: 834-836
- [8] Rajagopalan M., Boggaram V, Madiraju M V. A rapid protocol for the isolation of RNA from mycobacteria [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1995, 21: 14-17
- [9] Santos A R, De Miranda A B, Sarno E N, et al. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy [J]. *Med Microbiol*, 1993, 39: 298-304
- [10] 易戈,容元平,程谦伟,等.不同破壁方法提取酵母菌总 RNA 的比较[J].食品科学,2011,32(11):161-164
Yi Y, Rong Y P, Cheng Q W, et al. Comparison of Different Cell Wall Disruption Methods for Yeast Total RNA Extraction [J]. *Food Science*, 2011, 32(11): 161-164
- [11] 庞昕,周冬生,杨瑞馥.细菌 mRNA 的提取方法[J].生物技术通报,2003,1(1):30-34
Pang X, Zhou D S, Yang R F. Summary of Bacteria mRNA Extraction [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2003, 1(1): 30-34
- [12] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles [J]. *Meth Enzymol*, 1974, 31: 528-545
- [13] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues [J]. *Anal Biochem*, 1987, 163: 16-20
- [14] Adel M, Talaat P, Hunter, et al. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 679-682