

担子菌草菇总 RNA 的快速抽提方法*

李 迅¹ 裴建军² 邵蔚蓝^{1,2**}

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)¹

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)²

摘要: 针对高等真菌草菇 (*Volvariella volvacea*), 提供一种改进的简易抽提总 RNA 的方法。纯化的 RNA 可直接作如下的各种应用, 如 RT-PCR、poly A-RNA 的富集、差异显示、Northern 杂交、引物延伸、cDNA 合成、基因表达谱芯片和基因表达谱芯片分析。我们用此方法成功地从草菇中抽提到总 RNA, A_{260}/A_{280} 为 1.7~2.0, A_{260}/A_{230} 大于 2.0, 数值显示 RNA 的纯度是足够高的 (RNA 没有被蛋白或苯酚等污染)。电泳图上 28S:18S 比例约为 2:1, 显示 RNA 没有被降解。

关键词: 担子菌, 草菇, 总 RNA

中图分类号: Q522. **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0081-04

Rapid Isolation of Total RNA from Basidiomycetes *Volvariella volvacea*

LI Xun¹ PEI Jian-Jun² SHAO Wei-Lan^{1,2**}

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036)¹

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)²

Abstract: We provide a modified and simple method to isolate the total RNA from basidiomycetes *Volvariella volvacea*. The purified RNA is ready for use in standard and downstream applications such as RT-PCR, poly A-RNA selection, differential display, Northern dot and slot blotting, primer extension, cDNA synthesis, expression array and expression-chip analysis. We have successfully isolated total RNA from *Volvariella volvacea* with the way for many times. The value of A_{260}/A_{280} fell in the range from 1.7 to 2.0 and that of A_{260}/A_{230} is larger than 2.0 which indicated that the purity of RNA was satisfactorily high (RNA was not contaminated by proteins or benzene phenol etc.). Electrophoresis analyzing total RNA sample show total RNA hasn't been broken down because 28S:18S is equal to 2:1.

Key words: Basidiomycetes, *Volvariella volvacea*, Total RNA

RNA 的抽提基本步骤是: 主要在胍盐、酚、氯仿、SDS 这些 RNase 的抑制剂的作用下, 使破碎细胞后在无 RNase 的环境下, 将 RNA 去蛋白。然后利用 RNA 与细胞内其他大分子成分在溶解性和沉降性上的差异进行物理分离, 从而获得完整且均一的 RNA^[1,2]。来源于不同的组织和细胞, 抽提 RNA 的方法不完全相同, 需要针对不同的情况选择合适的方法, 并加以改进。同样从担子菌草菇中提取 RNA 仅用传统方法无法得

* 国家自然科学基金资助项目 (NO. 30370034)
project granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30370034)

** 联系人 Tel: 025-83598838, Fax: 025-83598838

收稿日期: 2003-11-14, 修回日期: 2004-01-11

到高质量的产品, 需要加以改进, 才能取得良好的效果。我们的改进主要分为 3 部分, 分别为改变菌丝的培养方式, 即将液体摇瓶培养改变为琼脂平板培养、增加变性液用量及增加酚/氯仿的抽提次数。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养

草菇 (*Volvariella volvacea*) 菌种由南京师范大学何强泰先生惠赠。将草菇 V_0 菌丝接种于 100 mL 液体培养基中, 在 40℃, 200 r/min 振荡培养, 或者将菌丝接种于平板上, 40℃ 静止培养。

1.2 主要试剂

变性溶液: 4 mol/L 异硫氢酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 0.1 mol/L β -巯基乙醇。水饱和酚: 购于上海申能博彩公司。2 mol/L 乙酸钠 (pH 4.0): 先溶解, 用乙酸调 pH 至 4.0, 再用 DEPC 处理。氯仿: 异戊醇 = 24:1, 密封保存。

1.3 经典法^[3]

将草菇菌丝液体培养 4~5 d, 收获菌体, 用灭菌蒸馏水洗涤菌体, 带手套将其尽量挤干, 称取 100 mg 菌体, 置于研钵中。在液氮存在下研成极细的粉末, 将粉末迅速转移至 40 mL 离心管中, 加入 10 mL 变性液, 混匀, 加入 1 mL 2 mol/L NaAc (pH 4.0), 充分混匀, 再加入 10 mL 水饱和酚和 2 mL 氯仿/异戊醇 (24:1), 振荡 10 s, 冰浴 15 min 后, 在 4℃, 10,000 g 离心 20 min。上清加入等体积的异丙醇, -20℃, 沉淀 60 min 后, 在 4℃, 10,000 g 离心 15 min。将 RNA 沉淀用 3 mL 变性液再溶 1 次, 完全溶解后, 分装, 加入等体积的异丙醇, -20℃, 沉淀 60 min 后, 在 4℃, 10,000 g 离心 15 min。用 75% 的乙醇洗涤沉淀两次, 将 RNA 溶于适量的 DEPC 水中, -70℃ 保存。

1.4 简易的方法^[4]

改为待草菇菌丝在平板上长满, 收获菌丝, 注意不要带入固体培养基, 直接称取 100 mg 菌丝体, 置于研钵中。在液氮存在下研成极细的粉末, 将粉末迅速转移至 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 0.1% 十二烷基肌氨酸钠, 混匀后, 在室温 10,000 g 离心 20 min, 沉淀加入 1 mL 醋酸盐/SDS, 混匀, 在 100℃ 沸水浴 5 min。液体悬浮液中加入 9 mL 无 RNase 的水, 在室温 10,000 g 离心 20 min, 上清液加入等体积异丙醇沉淀 RNA, 在 4℃, 10,000 g 离心 10 min。沉淀加入 1 mL 75% 乙醇重悬, 室温静置 10 min, 10,000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 风干。

1.5 改进的方法

在异丙醇沉淀前增加一步, 转移上清, 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 再抽提一次^[5], 振荡 10 s, 冰浴 15 min 后, 在 4℃, 10,000 g 离心 20 min。加大变性液的用量, 将 1.3 中变性液的用量增大为原来的 3 倍。

1.6 RNA 质量的检验

1.6.1 测定 A_{260} 值: RNA $A_{260} = 1$ 的溶液其 RNA 含量约为 40 $\mu\text{g/mL}$, 所以 RNA 浓度 = $40 \times A_{260} \mu\text{g/mL}$, RNA 产量 = (RNA 浓度 \times 总体积数) / 来源材料的质量。

1.6.2 用核酸检测仪或紫外分光光度计测量样品的纯度: 在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光度, A_{260}/A_{230} 应大于 2, A_{260}/A_{280} 应在 1.7~2.0 之间。

1.6.3 用变性琼脂糖凝胶来检验 RNA 的完整性: 真核细胞质总 RNA 电泳存在 3 条带,

依次相应于 28S、18S 和 5S rRNA 及嵌于 3 条带之间的片状带 mRNA, 28S 和 18S 核糖体 RNA 大约为 4.5 kb 和 1.9 kb, 条带亮度比例大约为 1.5 ~ 2.5:1。根据所测的浓度, 取相同含量的 RNA (约 0.4 μg) 进行电泳, 对比不同方法所提 RNA 的质量。

2 结果与讨论

2.1 总 RNA 样品的纯度分析

用 4 种方法抽提 RNA, 分别为用经典法抽提液体菌丝、经典法抽提平板菌丝、简易法抽提平板菌丝和改进法抽提平板菌丝, 分别测试吸光度, 结果显示每一步改进都有显著的效果 (表 1)。改用菌丝, 使其小分子污染大为减少, 但仍然未解决蛋白污染, 所以改进法的措施针对减少蛋白污染, 结果显示效果显著。

表 1 3 种方法提取 RNA 纯度及产量的比较

	简易法抽提平 板菌丝 (I)	经典法抽提液 体菌丝 (II)	经典法抽提平 板菌丝 (III)	改进法抽提平 板菌丝 (IV)
A_{230}	0.388	0.325	0.391	0.793
A_{260}	0.301	0.300	0.855	1.692
A_{280}	0.261	0.264	0.421	0.811
A_{260}/A_{280}	0.776	0.923	2.190	2.134
A_{260}/A_{230}	1.153	1.135	2.033	2.086
浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	12.04	12.00	34.20	67.68
稀释倍数	30	30	30	30
总体积数 (μL)	30	100	60	60
菌丝量 (mg)	100	100	100	100
RNA 产量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 菌体)	0.011	0.360	0.616	0.914

2.2 总 RNA 样品的完整性分析

2.2.1 用变性甲醛琼脂糖凝胶来检验 RNA 的完整性: 图 1 为 4 种不同方法抽提得到的 RNA 的电泳图, 上样量浓度相同, 简易法不适合用来抽提草菇平板菌丝, 可能是液氮研磨后已经将细胞破碎, RNA 已经释放出来存在于水相中, 从而被丢弃; 而如果不使用液氮处理, 用此法无法破碎菌丝, 抽提效果也很差。用 III 和 IV 抽提的 RNA 中的 28S RNA 和 18S RNA 的亮度比例约为 2:1, 亮度最亮, 完整性好。而方法 II 抽提的 RNA 亮度小, 且 28S RNA 和 18S RNA 的亮度比例则明显小于 2:1, 完整性差, 加样孔中亮度明显, RNA 中基因组 DNA 污染较严重。同时发现用 III 抽提的 RNA 中同样存在基因组 DNA 污染较严重的问题, 加样孔中亮度明显, 而 IV 中几乎无 DNA 的污染, 而且和经典法比较 RNA 的产量是它的 1.5 倍。

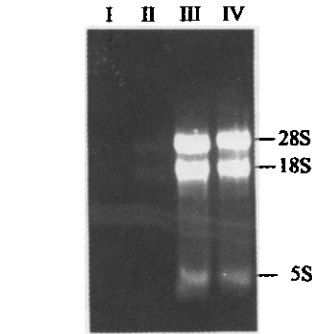


图 1 4 种方法抽提的 RNA 的电泳图
I 简易法抽提平板菌丝, II 经典法抽提液体菌丝, III 经典法抽提平板菌丝, IV 改进法抽提平板菌丝

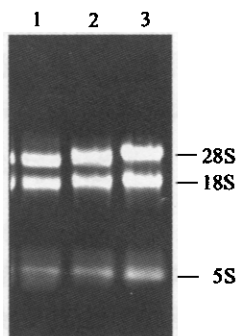


图2 改进法抽提的 RNA 的电泳图

1 未保温直接上样, 2 37℃保温 30min 后上样, 3 65℃保温 10min 后上样

2.2.2 上样前保温的影响: 图 2 是 RNA 样品未保温直接上样, 在 37℃保温 30 min 和在 65℃保温 10 min 后上样的对比图, 结果发现 3 种情况下的 28S 和 18S 不水平且粗细不同, 分析原因是由于二级结构的逐步打开造成的差异。泳道 1 中显示 28S 和 18S 仅为 1:1, 是由于直接上样未打开二级结构。由此可见用改进法提的 RNA 满足对后继实验的要求, 充分打开二级结构后, 泳道 3 显示 28S 和 18S 的比例在 1.5~2.5:1 的范围内, 无明显降解发生。

3 结论

在提取草菇的 RNA 时发现, 采用液体摇瓶获得的液体菌丝来抽提时, 培养液在菌球中残留较多, 从而富含 RNase 和多糖, 因此始终得不到完整的 RNA。因此我们作了如下改进: (1) 将液体培养改为固体平板培养, 草菇菌丝较易收获, 只需小心不要将培养基刮下即可, 这样几乎不含有多糖, 且液氮破碎容易进行。(2) 改进酚: 氯仿: 异戊醇抽提的浓度和比例, 使蛋白清除干净, 并且去除了 DNA 污染。(3) 加大变性液的用量, 这样在细胞破碎后就强烈的抑制住内源性 RNase 活性, 在无 RNase 的环境下, 将 RNA 去除蛋白。然后利用 RNA 与细胞内其他大分子成分在溶解性和沉降性上的差异进行物理分离, 从而获得完整且均一的 RNA。总之, 我们针对草菇, 对其 RNA 的抽提步骤进行了选择和修改, 选择草菇菌丝作为抽提原料, 提高了变性液的浓度, 改变了酚: 氯仿: 异戊醇的浓度和次数, 这样获得的 RNA 样品完整性好, 又消除了 RNase 和 DNA 污染。该方法得到的 RNA 样品可用于后继的 cDNA 合成或 RT-PCR 等实验中。

参考文献

- [1] Dieffenbach C W, Dveksler G S. PCR Primer a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. 113.
- [2] Vauti F, Siess W. Nucleic Acids Res, 1993, 21 (20): 4852~4853.
- [3] Joseph S, David W R. Molecular Cloning. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 7.4.
- [4] Raul R, Nieves V, Ruben M, et al. J Microbiol Methods, 2001, 47: 59~63.
- [5] 李明春, 王俊琦, 邢来君. 菌物系统, 1999, 18 (1): 108~111.