

吴思琪, 宋静颐, 秦倩, 等. 一种高效稳定的微生物总 RNA 提取方法[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 517-523.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.006

## 一种高效稳定的微生物总 RNA 提取方法

吴思琪<sup>1</sup>, 宋静颐<sup>1</sup>, 秦倩<sup>2</sup>, 张策<sup>3</sup>, 金君华<sup>1</sup>, 谢远红<sup>1</sup>, 刘慧<sup>1</sup>, 张红星<sup>1</sup>

(1.北京农学院食品科学与工程学院食品质量与安全北京实验室/农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室/微生物制剂关键技术开发北京市工程实验室/北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京 102206; 2.中国青年政治学院, 北京 100089; 3.北京市经济管理学校, 北京 100142)

**摘要:** 本研究通过对玻璃珠-酚仿 RNA 提取方法进行改进优化, 实现对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌这 3 类微生物 RNA 高效稳定的提取。结果表明, 玻璃珠-酚仿提取法能有效提取的 RNA 最低菌体细胞量为  $1 \times 10^7$  个, 远低于试验所选商业化试剂盒所需细胞量。以  $1 \times 10^7$  个细胞量为例, 利用 Beadbeater 仪破碎 30 s, 使用直径 100  $\mu\text{m}$  的玻璃珠破碎提取得到的细菌 RNA 浓度显著高于使用直径 500  $\mu\text{m}$  的玻璃珠提取的。使用 2 种直径的玻璃珠所得酵母菌 RNA 浓度无显著性差异。在直径 100  $\mu\text{m}$  的条件下, 破碎 30 s 即可保证 RNA 的高效提取, 对于长双歧杆菌、大肠杆菌和酵母菌, 破碎时间长达 150 s 也不会引起 RNA 降解。本法所提 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  为 1.96~2.10,  $A_{260}/A_{230}$  为 2.03~2.44, 浓度和纯度均优于试验所选商业化试剂盒所提的 RNA。

**关键词:** 微生物; RNA 提取; 玻璃珠-酚仿

中图分类号: Q522 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)03-0517-07

## A high-efficiency and stable method for extracting total RNA from micro-organisms

WU Si-qi<sup>1</sup>, SONG Jing-yi<sup>1</sup>, QIN Qian<sup>2</sup>, ZHANG Ce<sup>3</sup>, JIN Jun-hua<sup>1</sup>, XIE Yuan-hong<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, ZHANG Hong-xing<sup>1</sup>

(1. Food Science and Engineering College, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety/ Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residues in Agricultural Products/ Beijing Engineering Laboratory of Probiotics Key Technology Development/ Beijing Engineering Technology Research Center of Food Safety Immune Rapid Detection, Beijing 102206, China; 2. China Youth University for Political Sciences, Beijing 100089, China; 3. Beijing Economic Management School, Beijing 100142, China)

**Abstract:** In this study, the glass bead-phenol/chloroform RNA extraction method was optimized to realize the highly efficient and stable extraction of RNA from three kinds of microorganisms, gram positive bacteria, gram negative bacteria and fungus. The minimum thalli cell number that could be extracted by glass bead-phenol RNA extraction was  $1 \times 10^7$ , far

less than that extracted by commercialized kit. The concentration of bacterial RNA extracted by glass beads with  $\Phi = 100 \mu\text{m}$  from  $1 \times 10^7$  cells was significantly higher than that with  $\Phi = 500 \mu\text{m}$ . For the yeast, there was no significant difference in RNA concentration extracted by glass beads with different diameters. Glass beads with 100  $\mu\text{m}$  diameter breaking for 30 s could ensure the efficient extraction of RNA, and the degradation of RNA did not happen even broken for 150 s for *Bifidobacterium longum*, *Escherichia coli* and yeast. The concentration and purity of

收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 北京市教委科研计划支持项目 (KM201610020015); 北京市属高等学校高层次人才引进与培养长城学者计划 (CIT&TGD20140315); 杨胜先生门生社群项目 (C2016028)

作者简介: 吴思琪 (1994-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。 (Tel) 15010295516; (E-mail) siqi-wu0127@163.com。宋静颐为共同第一作者。

通讯作者: 张红星, (Tel) 13810688219; (E-mail) hxzhang511@163.com

the RNA extracted by optimized method were better than those by commercialized kit.

**Key words:** microorganism; RNA extraction; glass bead-phenol/chloroform

纯度高且完整性好的总 RNA 提取技术是分子生物学基础试验的支撑之一<sup>[1-2]</sup>,是 cDNA 文库构建、荧光定量 PCR、RNA-seq<sup>[3]</sup>、Northern 杂交<sup>[4]</sup>等研究的首要条件<sup>[5]</sup>。RNA 的高效提取更是核酸工业发展的重要条件之一<sup>[6]</sup>。植物乳杆菌、长双歧杆菌具有多种益生功能<sup>[7-9]</sup>,作为益生菌制剂被广泛应用于食品和医药行业。目前微生物的研究热点集中在分子水平上,对其功能机制进行探讨。大肠杆菌<sup>[10]</sup>和酵母菌<sup>[11]</sup>作为常用工程菌株,也是分子机制研究的模式菌株<sup>[12]</sup>。因此,对这 4 种微生物(植物乳杆菌、长双歧杆菌、大肠杆菌、酵母菌)RNA 提取方法的研究尤为重要。

植物乳杆菌和长双歧杆菌作为革兰氏阳性细菌,其细胞壁具有较厚且致密的肽聚糖结构,而酵母作为单细胞真核细菌,细胞壁具有交联的甘露聚糖和葡聚糖,厚度可达 25 nm。因此,这 3 种细菌在核酸和其他内容物提取时均需要有效的细胞壁破碎方法。目前提取 RNA 的常见方法中,强变性剂(异硫氰酸胍、盐酸胍、饱和酚等)法<sup>[13]</sup>、SDS-Phenol 法<sup>[14]</sup>、CTAB 法<sup>[15]</sup>、热硼酸法和改良热硼酸法<sup>[16]</sup>主要都是利用研磨法来破碎植物组织等的真核细胞,而关于提取细菌 RNA 所用破碎方法的报道较少。商业化细菌提取 RNA 常用的试剂盒有天根生化科技有限公司的 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(离心柱型),TaKaRa 公司的 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取试剂盒和 Invitrogen 公司的 Trizol 总 RNA 提取试剂盒<sup>[17-18]</sup>等。

本研究拟以植物乳杆菌、长双歧杆菌、大肠杆菌、酵母菌为试验材料,对高效稳定的微生物总 RNA 提取方法进行优化,以可提取的最低细胞量为例,针对玻璃珠直径、细胞破碎时间和 RNA 沉淀方法,对玻璃珠-酚仿 RNA 提取不同类型微生物的方法进行进一步优化,以期对分子生物学的进一步研究提供重要的试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

植物乳杆菌 Zhang-LL(CGMCC 6936)、长双歧杆菌 BBMN68(CGMCC 2265)、大肠杆菌 BL21

(DE3)(ATCCPTA-5976)均为本实验室保存菌种,酵母菌为安琪酵母股份有限公司的安琪高活性干酵母菌种(*Saccharomyces cerevisiae*)(ATCC 204508)。

### 1.2 培养基

MRS 培养基:胰蛋白胨 10.00 g、牛肉膏 10.00 g、酵母浸粉 5.00 g、柠檬酸三铵 2.00 g、葡萄糖 20.00 g、吐温 80 1 ml、乙酸钠 5.00 g、磷酸氢二钾 2.00 g、硫酸镁 0.50 g、硫酸锰 0.25 g、水 1 L,在 pH 6.5、121 °C 下灭菌 15 min。

MRSC 培养基:在 MRS 培养基上添加终浓度为 0.05%(质量体积比)的 L-半胱氨酸盐酸盐。

LB 培养基:胰蛋白胨 10.00 g、酵母浸粉 5.00 g、氯化钠 10.00 g、水 1 L,在 pH 7.0、121 °C 下灭菌 15 min。

酵母培养基:麦芽浸粉 20.00 g、水 1 L,在 121 °C 下灭菌 15 min。

### 1.3 材料与试剂

三氯甲烷、无水乙醇和异丙醇均为分析纯,由北京化工厂提供。水饱和酚(pH 4.7~5.5)由北京市双翔达生化试剂仪器经销部提供,玻璃珠(直径 100 μm 和 500 μm)由北京科奥生物科技有限公司提供,10×DNase I buffer、Recombinant DNase I、RNase Inhibitor 2313A 均由日本 TaKaRa 公司提供,TIAN-GEN 法 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)DP430 由天根生化科技(北京)有限公司提供,Nuclease-Free Water 由美国 Promega 公司提供,RNaseAway 高效固体表面 RNase 清除剂由北京艾德莱生物科技发展有限公司提供。

50×TAE:242.0 g Tris、57.1 ml 冰乙酸和 100.0 ml 0.5 mol/L EDTA,加水定容至 1.0 L,pH 8.0。

裂解缓冲液:3 mol/L 乙酸钠 1.66%,EDTA 二钠 2.00%,浓度 10.00%的 SDS 溶液 10.00%,121 °C 下灭菌 15 min,冷却,二次灭菌后使用。

试验使用的枪头和离心管均经过 121 °C 灭菌 15 min,冷却,二次灭菌后使用。

### 1.4 仪器与设备

主要仪器设备有 Mini-Beadbeater-16(BIOSPEC PRODUCTS 公司产品)、MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅(Sanyo Electric 公司产品)、DYCP-32B 型琼脂糖水

平电泳仪(北京六一生物科技有限公司产品)、WD-9413B 凝胶成像分析仪(北京六一生物科技有限公司产品)和 Scan Drop 100 超微量核酸蛋白测定仪(Aanalytikjena 公司产品)等。

## 1.5 方法

1.5.1 微生物培养 植物乳杆菌 Zhang-LL 按 2% 接种量接种于 MRS 培养基中,37 °C 摇床培养 12 h。长双歧杆菌 BBMN68 按 2% 接种量接种于 MRSC 培养基中,37 °C 静置培养 12 h。大肠杆菌 BL21(DE3)按 2% 接种量接种于 LB 培养基中,37 °C 摇床培养 12 h。酵母菌按 2% 接种量接种于麦芽培养基中,28 °C 摇床培养 24 h。

1.5.2 玻璃珠-酚仿法提取 RNA 核酸提取:根据 Vandecasteele 等<sup>[19]</sup>的方法,改进后进行试验。在 4 °C、12 000 g 下离心 5 min 得到细胞沉淀。将沉淀重悬于 500.0 µl 裂解缓冲液中,加入 500.0 µl 水饱和酚-氯仿溶液(5:1,体积比),转入装有 0.3 g 玻璃珠的均质管中。在 Mini-Beadbeater-16 上破碎,冷却 2 min,转入 1.5 ml 离心管。12 000 g、4 °C 下离心 5 min。取 450.0 µl 上清至新管中,加入 520.0 µl 异丙醇和 35.0 ml 3 mol/L 乙酸钠,轻轻颠倒混匀并于 4 °C 下,12 000 g 离心 5 min,弃上清,用 1.0 ml 70% 冰乙醇(Nuclease-Free Water 配置)洗涤沉淀,4 °C 下 12 000 g 离心 5 min,弃上清,室温放置 5~10 min,重悬于 150.0 µl Nuclease-Free Water 中,-80 °C 保存备用。

消化 DNA:在 1.5 ml 离心管中配制下列反应液,核酸提取样品 42.5 µl、10×DNase buffer 5.0 µl、Recombinant DNase I 2.0 µl、RNase Inhibitor 0.5 µl,37 °C 反应 30 min 后取出并转入 1.5 ml 离心管,加入 2.5 µl 0.5 mol/L EDTA 二钠,混匀,80 °C 处理 2 min 后加入 47.5 µl Nuclease-Free Water,定容至 100.0 µl。加入 10.0 µl 3 mol/L 乙酸钠和 250.0 µl 冰乙醇,混匀后-80 °C 放置 30 min。4 °C 下 12 000 g 离心 10 min,弃上清,用 1 ml 70% 冰乙醇(Nuclease-Free Water 配置)洗涤沉淀,4 °C 下 12 000 g 离心 5 min,弃上清,室温放置 5~10 min,用 42.5 µl Nuclease-Free Water 重悬,-80 °C 保存备用。

消化 DNA 方法改良:参照消化 DNA 的方法进行优化,样品与乙酸钠(3 mol/L)和冰乙醇混匀,在-80 °C 下放置 30 min,加入 360.0 µl 异丙醇,混匀并在室温下放置 30 min,4 °C 下 12 000 g 离心 10 min,

弃上清,用 1.0 ml 70% 冰乙醇(Nuclease-Free Water 配置)洗涤沉淀,4 °C 下 12 000 g 离心 5 min,弃上清,室温放置 5~10 min,用 42.5 µl Nuclease-Free Water 重悬,-80 °C 保存备用。

1.5.3 TIANGEN 试剂盒 参照 TIANGEN 公司的 RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(离心柱型,DP430)使用说明提取 RNA。

1.5.4 RNA 质量检测 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析:取 RNA 样品 5 µl,在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,10 V/cm 条件下电泳 7 min。利用凝胶成像仪获取 RNA 图像并观察分析 RNA 条带。

RNA 的产量和浓度鉴定:取 2 µl RNA 样品,以 Nuclease-Free Water 为参照,用核酸浓度测定仪测量  $A_{260}/A_{230}$ 、 $A_{260}/A_{280}$  和 RNA 提取液浓度。

1.5.5 数据分析 本试验使用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计分析。Student-Newman-Keuls 检验用于比较玻璃珠-酚仿法和 TIANGEN 试剂盒法提取总 RNA 的吸光值和产量。

## 2 结果与分析

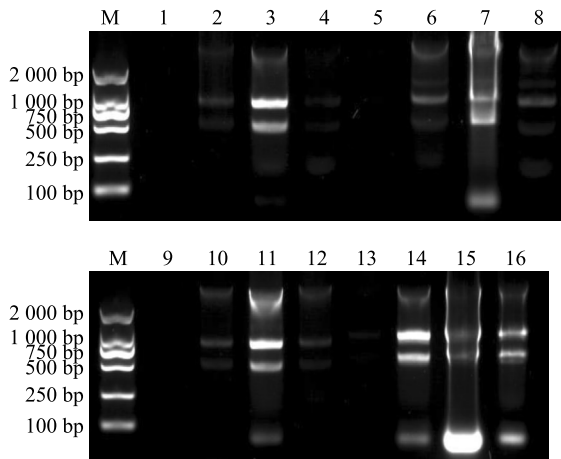
### 2.1 玻璃珠-酚仿法可有效提取微生物 RNA 最低细胞数量的确定

采用玻璃珠-酚仿法首先要进行总核酸提取,电泳图(图 1)中展现的是 DNA 和 RNA 共同存在时的提取结果,泳道的第一个条带是 DNA。本研究首先在破碎时间 30 s,玻璃珠直径为 100 µm 条件下,检测到玻璃珠-酚仿法可有效提取的 RNA 最低细胞量。

图 1 显示,玻璃珠-酚仿法提取不同类型微生物 RNA 时可提取的最低细菌细胞数量一致。植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21 和酵母菌在细胞数量为  $1 \times 10^6$  个时,RNA 检测均无条带出现,说明该细胞量无法得到电泳可检测到的 RNA。各试验菌株细胞数量为  $1 \times 10^7$  个时,RNA 条带完整且清晰可见(泳道 2、泳道 6、泳道 10、泳道 14)。上述结果表明,玻璃珠-酚仿法对试验中的 4 种微生物有效提取 RNA 的最低细菌细胞数量为  $1 \times 10^7$  个。图 1 还显示,细菌细胞数量达到  $1 \times 10^8$  个后,长双歧杆菌 BBMN68(泳道 7)的 23 S rRNA 与 16 S rRNA 电泳条带相连,酵母菌(泳道 15)的 28 S rRNA 与 18 S rRNA 电泳条带相连,这是由于电泳上样量过大所致。将 RNA 稀释 10 倍后进行电泳检



测,得到的均为清晰完整的 RNA 条带(泳道 8、泳道 16)。在凝胶电泳试验时,泳道 8、泳道 11 和泳道 16 均出现 4 条条带而不是常规的 3 条条带,多出的条带可能是 RNA 成熟过程中的前体物质。



M: Marker DL2000; 1~3: 细胞数量分别为  $1 \times 10^6$  个、 $1 \times 10^7$  个和  $1 \times 10^8$  个的植物乳杆菌 Zhang-LL; 5~7: 细胞数量分别为  $1 \times 10^6$  个、 $1 \times 10^7$  个和  $1 \times 10^8$  个的长双歧杆菌 BBMN68; 9~11: 细胞数量分别为  $1 \times 10^6$  个、 $1 \times 10^7$  个和  $1 \times 10^8$  个的大肠杆菌 BL21(DE3); 13~15: 细胞数量分别为  $1 \times 10^6$  个、 $1 \times 10^7$  个和  $1 \times 10^8$  个的酵母菌; 4、8、12、16: 分别为植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3)、酵母菌在细胞数量为  $1 \times 10^8$  个条件下所提取 RNA 的 10 倍稀释液。

图 1 玻璃珠-酚仿法提取 RNA 最低菌体细胞数量确定电泳图  
Fig.1 Determination of the minimum number of microbial cells in RNA extracted by glass bead-phenol method

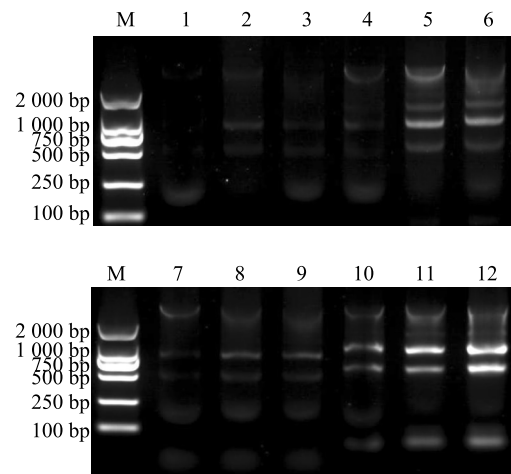
## 2.2 不同微生物最佳破碎条件的确定

有研究指出,提取细胞 RNA 常用的细胞破壁方法有:酶解法、超声波法、液氮研磨法、剧烈震荡法、玻璃珠破壁法等<sup>[20-24]</sup>。本研究采用玻璃珠破壁法对菌体细胞壁进行破碎。因此主要针对破碎时间和破碎时玻璃珠直径对不同微生物 RNA 回收率的影响进行研究,在保证 RNA 提取纯度的同时提高产量。

**2.2.1 破碎时间** 在细菌最低细胞数量的条件下,采用玻璃珠-酚仿法提取植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌的 RNA,玻璃珠直径为  $100 \mu\text{m}$ ,破碎时间为 5~150 s,间隔 5 s。4 种微生物在破碎时间为最短破碎时间(5 s)、最佳破碎时间(30~60 s)和最长破碎时间(150 s)下所得的 RNA 质量结果图(图 2)显示,破

碎 5 s 时植物乳杆菌 Zhang-LL 没有明显条带(泳道 1),破碎到 60 s 时条带最清晰(泳道 2),之后随着破碎时间的延长,条带越来越暗,150 s 时条带几乎不可见(泳道 3)。长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌在破碎至 30 s 时的条带(泳道 5、泳道 8、泳道 11)最亮,即使破碎时间延长至 150 s,条带(泳道 6、泳道 9、泳道 12)仍清晰,RNA 依然保持着很好的完整性。

通过梯度增加每种细菌的破碎时间,最终确定在微生物浓度为  $1 \times 10^7$  个,玻璃珠直径为  $100 \mu\text{m}$  条件下,植物乳杆菌 Zhang-LL 的最佳破碎时间为 60 s,长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌在 30~150 s 的破碎时间范围内条带明亮。

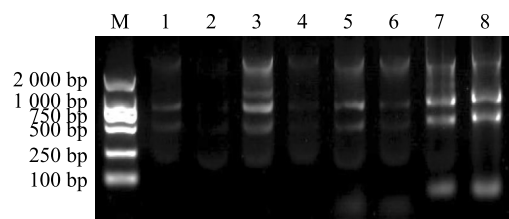


M: Marker DL2000; 1~3: 破碎 5 s、60 s、150 s 的植物乳杆菌 Zhang-LL; 4~6: 破碎 5 s、30 s、150 s 的长双歧杆菌 BBMN68; 7~9: 破碎 5 s、30 s、150 s 的大肠杆菌 BL21(DE3); 10~12: 破碎 5 s、30 s、150 s 的酵母菌。

图 2 破碎时间对玻璃珠-酚仿法提取 4 种微生物 RNA 影响的电泳图  
Fig.2 Effect of breaking time on the RNA extraction from four microorganisms

**2.2.2 玻璃珠直径** 为明确玻璃珠直径大小是否会影响细胞破壁效果,本研究选取直径分别为  $100 \mu\text{m}$  和  $500 \mu\text{m}$  的玻璃珠进行破碎试验。图 3 显示,植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68 和大肠杆菌 BL21(DE3) 在玻璃珠直径为  $100 \mu\text{m}$  的条件下破壁得到的 RNA 条带(泳道 1、泳道 3、泳道 5)明显亮于玻璃珠直径为  $500 \mu\text{m}$  条件下提取的 RNA 条带(泳道 2、泳道 4、泳道 6)。而对于酵母菌,使用直径

为 100  $\mu\text{m}$  和 500  $\mu\text{m}$  玻璃珠所提取 RNA 条带(泳道 7、泳道 8)亮度没有明显差异,表明这 2 种直径玻璃珠对酵母菌的 RNA 提取效率没有明显影响。



M: Marker DL2000; 1~2: 玻璃珠直径为 100  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$  下的植物乳杆菌 Zhang-LL; 3~4: 玻璃珠直径为 100  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$  下的长双歧杆菌 BBMN68; 5~6: 玻璃珠直径为 100  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$  下的大肠杆菌 BL21(DE3); 7~8: 玻璃珠直径为 100  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$  下的酵母菌。

图 3 玻璃珠直径对玻璃珠-酚仿法提取 4 种微生物 RNA 影响的电泳图

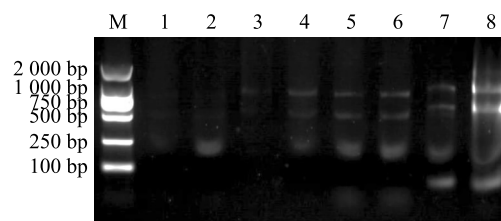
Fig.3 Effect of glass bead diameter on the RNA extraction from four microorganisms

## 2.3 消化 DNA 且回收 RNA 方法的优化

研究中发现,核酸提取液消化 DNA 后,所回收的 RNA 数量明显减少,为了解决这个问题,本研究尝试优化该过程中 RNA 沉淀回收方法,即在冰乙醇超低温沉淀后,加入等体积的异丙醇继续沉淀 30 min。图 4 显示,泳道 1、泳道 3、泳道 5、泳道 7 分别为植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌用冰乙醇沉淀回收的 RNA。泳道 2、泳道 4、泳道 6、泳道 8 分别为植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌用冰乙醇和异丙醇沉淀回收的 RNA。经比较发现,酵母菌 RNA 回收时添加异丙醇可以得到更加明亮的 RNA 条带(泳道 8),而其他 3 种微生物添加异丙醇后效果并不明显,但也可以得到明亮的 RNA 条带(泳道 2、泳道 4、泳道 6)。

## 2.4 TIANGEN 试剂盒法提取 RNA

为进一步评估改进的玻璃珠-酚仿 RNA 提取方法的高效性,本研究选取商业化的 RNA 提取试剂盒进行比较试验。图 5 显示,TIANGEN 试剂盒法可以提取 4 种微生物 RNA,且植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 在细菌细胞数量为  $1 \times 10^9$  个时出现清晰条带(泳道 2、泳道 4、泳道 6),酵母菌在细菌细胞数量为  $1 \times 10^8$  个时出现清晰条带(泳道 8)。虽然试剂盒法可将小分子杂

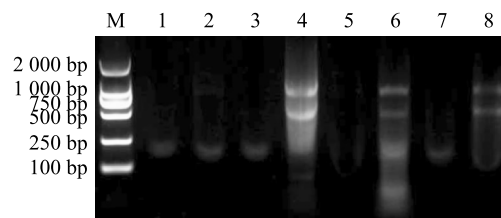


M: Marker DL2000; 1, 3, 5, 7: 植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌用冰乙醇沉淀回收 RNA; 2, 4, 6, 8: 植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68、大肠杆菌 BL21(DE3) 和酵母菌用冰乙醇和异丙醇沉淀回收 RNA。

图 4 玻璃珠-酚仿法消化 DNA 及其优化方法电泳图

Fig.4 RNA recovered by individual and combined use of absolute alcohol

质、大分子蛋白质以及 DNA 一并去除,但与玻璃珠-酚仿法相比,对最低细胞数量要求较高并且相同条件下得到的 RNA 量少、成本高,这与邹晓蕾<sup>[25]</sup>等采用 Qiagen 法提取大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和乳酸乳球菌 RNA 的结果相似。



M: Marker DL2000; 1~2: 细胞数量为  $1 \times 10^8$  个和  $1 \times 10^9$  个的植物乳杆菌 Zhang-LL; 3~4: 细胞数量为  $1 \times 10^8$  个和  $1 \times 10^9$  个的长双歧杆菌 BBMN68; 5~6: 细胞数量为  $1 \times 10^8$  个和  $1 \times 10^9$  个的大肠杆菌 BL21(DE3); 7~8: 细胞数量为  $1 \times 10^7$  个和  $1 \times 10^8$  个的酵母菌。

图 5 TIANGEN 试剂盒法提取 RNA 电泳图

Fig.5 Extraction of RNA by TIANGEN kit

## 2.5 RNA 质量检测

通过超微量核酸蛋白测定仪对提取的 RNA 进行吸光值和产量检测。若  $A_{260}/A_{230}$  值小于 2.00, 表明样品被碳水化合物(糖类)、盐类或有机溶剂污染,需要纯化样品。若  $A_{260}/A_{280}$  值小于 2.00, 说明样品中有蛋白残留。在各自最低可提取微生物细胞数下,比较玻璃珠-酚仿法和 TIANGEN 试剂盒法提取的总 RNA 吸光值和产量。表 1 显示,即使玻璃珠-酚仿法提取 RNA 的微生物细胞数比试剂盒法低 1 至 2 个数量级,但最终得到的 RNA 浓度和纯度显著高于试剂盒法。

表 1 玻璃珠-酚仿法和 TIANGEN 试剂盒法提取的总 RNA 吸光值和产量比较

Table 1 Comparison of absorbance and yield of total RNA extracted by glass bead-phenol extraction method and TIANGEN kit

指标	植物乳杆菌 Zhang-LL		长双歧杆菌 BBMN68		大肠杆菌 BL21(DE3)		酵母菌	
	玻璃珠-酚仿法	TIANGEN 试剂盒法	玻璃珠-酚仿法	TIANGEN 试剂盒法	玻璃珠-酚仿法	TIANGEN 试剂盒法	玻璃珠-酚仿法	TIANGEN 试剂盒法
$A_{260}/A_{280}$	2.10±0.03	2.04±0.06	1.96±0.03	2.01±0.03	1.98±0.06	2.00±0.04	2.01±0.04	1.99±0.04
$A_{260}/A_{230}$	2.11±0.04	0.57±0.04 **	2.03±0.07	0.80±0.04 **	2.27±0.02	0.65±0.02 **	2.44±0.02	0.80±0.02 **
核酸浓度 (ng/μl)	7.58±0.03	6.71±0.03 **	27.19±0.04	32.93±0.04 **	38.26±0.04	28.23±0.04 **	41.34±0.01	25.34±0.03 **

玻璃珠-酚仿法测定 RNA 的最低菌体细胞量为  $1 \times 10^7$  个;TIANGEN 试剂盒法测定 RNA 的最低菌体细胞量为  $1 \times 10^8$  个; \*\* 表示差异显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

RNA 提取是分子生物学研究中最关键、最基础的问题之一,获得完整高纯度的 RNA 是开展基因克隆和表达等研究的前提<sup>[26-28]</sup>,从不同类型原料中提取 RNA 的方法不尽相同<sup>[29-30]</sup>。由于细菌细胞数量对 RNA 提取回收量有较大影响,进而研究玻璃珠-酚仿法可有效提取不同微生物 RNA 的最低细菌细胞数量。当样品珍贵稀少时,得到高回收率的 RNA 便显得尤为重要。

乳酸菌属于革兰氏阳性菌,肽聚糖含量丰富,化学结构保守固定<sup>[31]</sup>,三维细胞壁结构交联紧密<sup>[25]</sup>。大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,细胞壁肽聚糖含量低,易破碎。酵母菌细胞壁厚且成分复杂,难以破碎<sup>[22]</sup>。本研究主要针对原核微生物和真核微生物进行 RNA 提取研究,选取 4 株代表菌株,采用玻璃珠破壁法并根据不同代表微生物细胞壁的特性进行破碎条件的选择和优化。在探究玻璃珠直径对 RNA 提取效率的影响中发现,直径为 100 μm 和 500 μm 的玻璃珠对酵母菌 RNA 提取效率没有显著影响,出现这样结果的原因我们推测可能与细胞大小有关。一般杆菌长 0.5~10.0 μm,宽 0.2~1.0 μm,因此直径较大的玻璃珠导致细胞破碎不充分,无法破开细胞壁,而酵母菌的细胞大小是细菌的 10 倍左右,大小为  $(1 \sim 5 \mu\text{m}) \times (5 \sim 30 \mu\text{m})$ <sup>[32]</sup>,无论是直径为 100 μm 还是 500 μm 的玻璃珠对于破除其细胞壁都是有效果的,故在直径为 100 μm 或 500 μm 的玻璃珠条件下均可较好地提取酵母菌 RNA。

在消化 DNA 回收 RNA 方法优化中,植物乳杆菌 Zhang-LL、长双歧杆菌 BBMN68 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 添加异丙醇后 RNA 回收效果并没有明显改善,而酵母菌在 RNA 回收时添加异丙醇可以提高 RNA 回收量。分析原因,可能是分子大小影响 RNA

沉降效果,酵母菌作为真核微生物,其 rRNA 的分子明显大于原核微生物 rRNA,相同条件更易被醇类物质析出沉降,因此异丙醇更易增加酵母 RNA 的回收率。

本研究选取简便且技术相对成熟的 TIANGEN 试剂盒法与玻璃珠-酚仿法的 RNA 提取效率进行比较。根据文献报道,稳定期乳杆菌  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  个细胞,所提取 RNA 浓度为 20.60 ng/μl,  $A_{260}/A_{230}$  为 0.64, RNA 回收率低,无论是 RNA 浓度还是质量均不及本研究中的玻璃珠-酚仿法,但大肠杆菌的 RNA 回收率和质量均优于玻璃珠-酚仿法<sup>[25]</sup>。

玻璃珠-酚仿法适用于不同类型微生物的 RNA 提取,具有广泛的适用性。其可提取 RNA 的微生物细胞数最低为  $1 \times 10^7$  个,而试剂盒法则最少需要  $1 \times 10^8$  个菌体细胞。研究发现,利用 Beadbeater 细胞破碎仪破碎 30 s 后,不同代表菌株最佳破壁时的玻璃珠直径不尽相同,对于原核细菌试验菌株,使用直径为 100 μm 的玻璃珠破碎提取得到的 RNA 浓度明显高于使用直径为 500 μm 的玻璃珠所得的,而对于酵母菌试验菌株,使用这 2 种直径的玻璃珠所得 RNA 浓度没有明显差异。采用玻璃珠直径为 100 μm, Beadbeater 细胞破碎仪破碎样品 30 s,即可有效破碎细胞,保证 RNA 的高效提取,对于长双歧杆菌、大肠杆菌及酵母菌,破碎时间长达 150 s 也不会引起 RNA 降解,产物  $A_{260}/A_{280}$  为 1.96~2.10,  $A_{260}/A_{230}$  为 2.03~2.44,浓度和纯度均显著优于试剂盒所提 RNA。

### 参考文献:

- [1] LANDOLT L, MARTI H P, BEISLAND C, et al. RNA extraction for RNA sequencing of archival renal tissues [J]. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2016, 76(5): 426-434.

- [2] 刘波,张晓明,郭巧生,等.百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化[J].江苏农业科学,2015,43(1):44-46.
- [3] 张春兰,秦孜娟,王桂芝,等.转录组与 RNA-Seq 技术[J].生物技术通报,2012(12):51-56.
- [4] LI J H, TANG C H, SONG C Y, et al. A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes* [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(15): 1193-1197.
- [5] 尹珍珍,吴光斌,陈发河,等.莲雾果实高质量总 RNA 提取方法的建立[J].食品科学,2015(14):1-4.
- [6] 胡朝辉,安家彦,高慧利.质壁分离剂盐法提取啤酒酵母 RNA [J].煤炭与化工,2012,35(1):33-35.
- [7] ZHU J, ZHAO L, GUO H Y, et al. Immunomodulatory effects of novel bifidobacterium and lactobacillus strains on murine macrophage cells[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(1): 8-15.
- [8] 王海珍,王加启,黄庆生.乳酸菌类微生物制剂的作用机理及其应用[J].养殖与饲料,2005(3):9-11.
- [9] LIDBECK A, ÖVERVIK E, RAFTER J, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans [J]. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 1992, 5(1): 59-67.
- [10] 解庭波.大肠杆菌表达系统的研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2008,5(3):77-82.
- [11] 祁浩,刘新利.大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展[J].安徽农业科学,2016,44(17):4-6.
- [12] KOLIJN K, LEENDERS G J L H. Comparison of RNA extraction kits and histological stains for laser capture microdissected prostate tissue[J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9: 17.
- [13] 陈星,潘迎捷,孙晓红,等.细菌总 RNA 提取方法的研究进展[J].湖南农业科学,2010,2010(5):9-11.
- [14] 罗绍银,高继海,叶生亮,等.一种提取富含油脂植物组织总 RNA 的改良 SDS 酸酚法[J].应用与环境生物学报,2009,15(2):284-287.
- [15] LIAO Z H, CHEN M, GUO L, et al. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo* [J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 34(3): 209-214.
- [16] 申艳红,陈晓静.改良热硼酸小量法提取番木瓜果肉总 RNA [J].中国南方果树,2009,38(2):7-9.
- [17] TAN S C, YIAP B C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present [J]. *BioMed Research International*, 2009, 2009:1-10.
- [18] 于寒松,彭帅,谢远红,等.一种 RNA 提取试剂盒——TRIZOL 的使用方法初探[J].食品科学,2005,26(11):39-42.
- [19] VANDECASTEELE S J, PEETERMANS W E, MERCKX R, et al. Use of gDNA as internal standard for gene expression in staphylococci *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2002, 291(3): 528-534.
- [20] YE W, LIU L, ZHENG W, et al. Comparison of RNA extraction methods applied to gene cloning of the taxol-producing fungi [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(10):632-636.
- [21] TRIANT D A, WHITEHEAD A. Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples [J]. *Journal of Heredity*, 2009, 100(2): 246-250.
- [22] 易弋,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.
- [23] 王佳,易弋,杨军,等.不同破壁方法提取无乳链球菌质粒 DNA 的比较[J].食品科技,2013(5):22-26.
- [24] 戈海泽,郭刚,张瑞,等.玻璃珠法提取基因组 DNA [J].天津医科大学学报,2006,12(2):313-314.
- [25] 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(8):1948-1954.
- [26] 张仕林,许玉超,帅强,等.洋葱不同组织 RNA 提取方法比较分析[J].江苏农业科学,2016,44(10):95-97.
- [27] GANCZ D, GILBOA L. RNA isolation from early drosophila larval ovaries [J]. *Germline Stem Cells*, 2017,1463:75-83.
- [28] 郝雪英,丰震,吕传青.‘鲁红一号’元宝枫叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J].山东农业科学,2015,47(3):5-8.
- [29] 宗成志,左欣欣,严海燕.影响 RNA 提取质量的因素分析[J].广西农学报,2011,26(1):31-34.
- [30] KALUZNA M, KURAS A, MIKICIŃSKI A, et al. Evaluation of different RNA extraction methods for high-quality total RNA and mRNA from *Erwinia amylovora* in planta [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 146(4): 893-899.
- [31] 刘朝,乔建军,朱宏吉.乳酸菌肽聚糖的研究进展[J].微生物学通报,2016,43(1):188-197.
- [32] 沈萍,陈向东.微生物学[M].8版.北京:高等教育出版社,2016:33-34.

(责任编辑:王妮)