

# 改进异硫氰酸/酚/氯仿一步法制备烟曲霉总 RNA

★ 方建茹 谢小梅 (江西中医学院 南昌 330006)

**摘要:**目的:高质量地提取烟曲霉总 RNA,为从转录水平研究烟曲霉病理机制奠定基础。方法:异硫氰酸/酚/氯仿一步法制备烟曲霉总 RNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪照相。结果:提取的 RNA  $OD_{260}/OD_{230}>2.0$ , $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.8~2.0,电泳条带清晰, RNA 纯度及完整性好。结论:该方法可用于制备高质量的烟曲霉总 RNA。

**关键词:**烟曲霉;总 RNA 提取

**中图分类号:**TQ 460.6 **文献标识码:**A

烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)广泛分布在自然界,主要由呼吸道入侵机体,引起支气管或肺部感染,是引起人类曲霉病的主要致病真菌,约 90% 的人类感染与烟曲霉相关<sup>[1]</sup>。近十年来,随着免疫受损人群的增加,侵袭性曲霉感染的发病率急剧上升了 400%。其中烟曲霉引起的侵袭性肺曲霉病(IA)成为白血病、骨髓移植手术和器官移植患者的主要致死原因<sup>[2,3]</sup>。运用分子生物学技术阐明其生理特征和致病机理有重要的临床价值。完整性好、高纯度的总 RNA 的获得成为分子生物学实验的前提条件。本实验采用改进的异硫氰酸/酚/氯仿一步法<sup>[4]</sup>制备烟曲霉总 RNA。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

烟曲霉(CCCCMIDA1)为标准株,中国医学真菌中心收藏(南京)。

### 1.2 实验菌体的制备

将烟曲霉接种于蔡氏斜面,26.5℃培养至快速生长早期(5~7天),活化 2 次,此时菌苔覆盖斜面,加入蔡氏液体,吸管吹打菌苔使孢子游离于培养液中,用 500 目无菌尼龙网过滤,滤液经血细胞计数板计数及紫外分光光度计测定,调整孢子浓度为  $10^5$  /mL。取 2 mL 烟曲菌孢子悬液接种于 200 mL 无菌蔡氏(Ozapek)液体培养基,26℃培养至对数生长期,分别在培养的第 6、7、10、13 天收集鲜菌,-80℃冰箱保存备用。

### 1.3 器材

研钵,匀浆器,高速冷冻离心机,紫外分光光度仪,电泳仪,真菌培养箱,复日凝胶成像分析仪。

### 1.4 主要试剂配制

(1)CBS 缓冲液:42 mmol/L 柠檬酸钠,0.83% (W/V)十二烷基硫酸钠,0.2 mmol/L 巯基乙醇(使用

前加入)。(2)变性匀浆剂:4 mol/L 异硫氰酸胍,溶于 CBS 缓冲液。(3)5×甲酰胺凝胶电泳缓冲液:40 mmol/L 乙酸钠,5 mmol/L EDTA(pH 8.0),0.1 mmol/L MOPS(pH 7.0)。(4)Rnase-free 水:每 100 mL 水中加入 0.2 mL DEPC 原液,放于摇床上充分流匀并于室温下作用 12 小时以上,高压灭菌 15 分钟使 DEPC 失活。

水饱和酚、3-N-吗啉代-丙酮酸(MOPS)、焦碳酸二乙酯(DEPC)、异硫氰酸胍、十二烷基硫酸钠、β-巯基乙醇、溴酚蓝、二甲苯青、溴化乙锭均为上海化工产品。氯仿、异戊醇、柠檬酸钠、乙酸钠、蔗糖、葡萄糖、无水乙醇、甲醛均为上海试剂一厂产品。

### 1.5 实验器皿和试剂的去 RNA 酶处理

所有玻璃用品在 180℃烘烤 12 小时以上,离心管、Tip 头等塑料用品用 DEPC 水浸泡 12 小时以上,高压灭菌后烘干。除 RNA-free 水,水饱和酚,氯仿,异戊醇外,所有试剂均为 DEPC 水配制。

### 1.6 实验步骤

1.6.1 RNA 的抽提 (1)称取菌丝体 3 g,在液氮存在的情况下研磨 30 分钟成极细粉末后转入匀浆器。(2)匀浆器内加入 18 mL 变性匀浆液,0.72 mL β-巯基乙醇,冰浴中匀浆 30 分钟,匀浆液转入离心管。(3)离心管内加入 1.8 mL 2 mol/L NaAC (pH 4.0)以及等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),充分震荡,冰浴 5 分钟,4℃13 000 r/min 离心 15 分钟。(4)取上清,加入等体积水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),震荡,冰浴 5 分钟,4℃13 000 r/min 离心 15 分钟。重复抽取至界面无沉淀。(5)取上清加入等体积异丙醇,-20℃沉淀 30 分钟。4℃13 000 r/min 离心 15 分钟。(6)弃上清,沉淀用 1 mL 75%乙醇洗涤两次,洗涤时用枪吹散沉淀。(7)弃上清,沉淀用 3 mL RNA-free 水溶解,再加入 4.5

mL 4 mol/L NaAC, 0 °C 过夜。(8)次日,将沉淀样品 4 °C 13 000 r/min 离心 15 分钟,弃上清,沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤两次,空气干燥 10 分钟,0.4 mL RNA-free 水溶解。-80 °C 保存备用。

### 1.6.2 甲醛琼脂糖变性凝胶电泳<sup>[5]</sup>检验完整性

(1)10% SDS 冲洗电冰槽。(2)蒸馏水冲洗,乙醇干燥,3% 双氧水处理 10 分钟。DEPC 水彻底冲洗。(3)将琼脂糖按 1.2% 的比例溶于一定量的 1 × MOPS 缓冲液,加入终浓度为 18% 的甲醛,灌注电泳胶。(4)凝胶在 1 × 甲醛凝胶电泳缓冲液中预电泳 5 分钟,电压 110 V。(5)上样,取 10 μL 样品,短暂离心,加入 2 μL loading buffer。以 110 V 电压进行电泳。每隔 20 分钟转换阴阳极电极。

电泳结束后将凝胶放入 0.5 μg/mL 的 EB 中染色 20 分钟,超纯水浸泡 30 分钟,用复日 FR-200 生物图像分析系统并照相。

1.6.3 紫外分光光度法测定纯度 取 5 μL 样品,放入 95 μL RNase-free 水,至微量比色皿,轻轻混匀,以 100 μL RNase-free 水为本底对照。分别测定样品在 230 nm、260 nm、280 nm 处的 OD 值。通过计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 比值确定总 RNA 的质量。

## 2 结果与分析

高质量的总 RNA 在甲醛琼脂糖凝胶电泳上可见典型的 18 S 与 28 S 两条带,其比值若为 2:1,表明 RNA 无降解<sup>[6]</sup>。图一电泳成像可见 28 S 和 18 S 两条带清晰,说明 RNA 未降解,完整性好;OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 1.8~2.0,说明样品无蛋白质污染,无抽取液成分残留。OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 比值大于 2.0,说明无小分子或盐等干扰杂质存在。

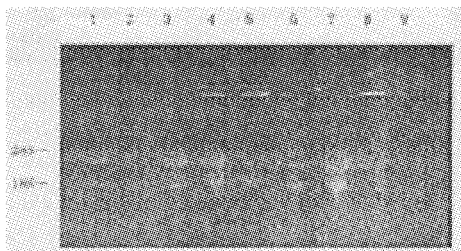


图 1 烟曲霉总 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图

## 3 讨论

RNA 的提取是分子生物学研究中最基本最关键的技术之一,要获得完整丰富的全长 cDNA,最关键的是获得完整性好未被降解的 RNA,RNA 的质量决定着可被反转录为 cDNA 的最大序列信息。

RNA 酶是一类生物活性非常稳定的酶类。它耐热耐酸耐碱,蛋白变性剂可使之暂时失活,但变性剂去除后可恢复活性,而且其活性不需辅助因子,二价金属离子整合剂对它的活性毫无影响。创造一个无 RNA 酶的环境,极力减少其对 RNA 的降解作用是实验的关键<sup>[4]</sup>。

RNA 酶的外部来源有灰尘、实验器材和试剂、人体的汗液唾液等,故整个操作过程应戴手套口罩,并在较洁净的环境中进行;资料器材要用新的一次性用品,试剂最好为提取 RNA 专用的新包装,所在器材试剂均需无 RNA 酶处理。提取过程中应勤换手套,尤其是抽提的每一步都要更换手套。细胞破碎的同时,内源性的 RNA 酶同时释放出来成为降解 RNA 的重要危险,所以要在提取的起始阶段使用强有力的抑制剂进行有效抑制。异硫氰酸胍是已知的最强的蛋白变性剂,与 β-巯基乙醇(破坏 RNA 酶中的二硫键)和 SDS 联合使用,使 RNA 酶的活性极度受抑。整个过程要保证在温度低于 4 °C 下降低 RNA 酶活性和效率。烟曲霉的细胞壁致密坚硬,变性匀浆器很难彻底破壁,采用液氮研磨可以较好破壁,并保持低温防止 RNA 酶的污染。抽提中使用醋酸钠沉淀细胞壁中的多糖成分,提高了 RNA 的完整性和纯度。

氯化铯/硫氰酸胍是经典的 RNA 提取法,但其设备要求高且 RNA 制品的含盐量高;TRIZZOL 试剂 RNA 快速提取法快速简捷,但费用较高,且只适于小样品提取。采用异硫氰酸胍变性及酚氯仿抽取法适用于普通实验室。该方法制备的 RNA 可用于 Northern 印迹,RT-PCR, cDNA 文库及体外翻译等实验。

### 参考文献

- [1] Brajtburg, J, and J, Bolafd. Carrier effects on biological activity of amphotericin B[J]. Clin. Microbiol. Rew, 1996(9):512
- [2] Dewhurst, A. G. M. J. Cooper, S. M. Khan, A. P. Pallett, and J. R. E. Dathan. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients: potential hazard of hospital building work[J]. Br. Med. J., 1990, 301:802
- [3] Salonen, J, and J, Nikoskelainen. Lethal infections in patients with hematological malignancies[J]. Eur. J. Haematol. 1993, 51:102
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999. 10
- [5] GRAHAM G C. A method for extraction of total RNA from Pinus rod ia- to and other conifers[J]. Plant Mol Bio 1 Repr, 1993, 11(2):32
- [6] CHOM CZYNSKI P, SACCHI, Single step method of RNA isolation by aciguanithiocyanate-phenol-chilcofrom extraction[J]. Annuals of Biochemistry, 1987, 162(2):156

(收稿日期:2004-09-10)