

## 微囊藻群体总 RNA 提取方法的比较\*

高胜玲<sup>1,2</sup>, 黄亚新<sup>1</sup>, 卢亚萍<sup>1\*\*</sup>, 施丽梅<sup>2\*\*</sup>, 孔繁翔<sup>2</sup>, 张小倩<sup>1</sup>

(1: 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

**摘要:** 微囊藻群体富含多糖类物质是影响微囊藻 RNA 提取的关键因素. 为了获得高质量的微囊藻群体总 RNA, 对比分析 4 种针对多糖含量较高的方法——方法 1 PGTX-bead 法、方法 2 CTAB-bead 法、方法 3 FastRNA® Pro Blue Kit 和方法 4 RNeasy Mini Kit 对微囊藻群体总 RNA 的提取效果. 采用琼脂糖凝胶电泳检测微囊藻群体 RNA 的完整性, Nanodrop ND1000 分光光度计检测 RNA 纯度及浓度, 并采用 qPCR 检测 DNA 污染情况. 结果表明, 4 种方法都能从微囊藻群体中提取获得 RNA, 并在去除 DNA 后都可以进行 RT-PCR 等后续实验. 方法 1 PGTX-bead 提取的 RNA 产量最高, 纯度好, DNA 污染小, 成本低, 适合从微囊藻群体中大量提取 RNA; 方法 2 CTAB-bead 提取的 RNA 样品产量也较高, 但 DNA 污染严重, 适合需要同时提取 DNA 和 RNA 的样本; 方法 3 FastRNA® Pro Blue Kit 和方法 4 RNeasy Mini Kit 提取的 RNA 产量都较低, 但方法 4 操作简单, 耗时短, 所检测目的基因的相对表达量较高, 更适合从少量的微囊藻群体中提取总 RNA.

**关键词:** 微囊藻群体; RNA 提取; qPCR; 多糖

## Comparison of RNA extraction methods from *Microcystis* colonies

GAO Shengling<sup>1,2</sup>, HUANG Yaxin<sup>1</sup>, LU Yaping<sup>1\*\*</sup>, SHI Limei<sup>2\*\*</sup>, KONG Fanxiang<sup>2</sup> & ZHANG Xiaoqian<sup>1</sup>

(1: College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, P.R. China)

(2: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R. China)

**Abstract:** *Microcystis* colonies are rich in polysaccharide materials which are the key factors influencing RNA extraction. In order to obtain high-quality total RNA from *Microcystis* colonies, comparative study of several methods including Method 1 PGTX-bead, Method 2 CTAB-bead, Method 3 FastRNA® Pro Blue Kit and Method 4 RNeasy Mini Kit was conducted. All these methods were suitable for polysaccharide-rich materials. The integrity of RNA was analyzed by agarose gel electrophoresis, RNA concentration and purity were detected by Nanodrop ND1000 spectrophotometer, and DNA contamination was determined by qPCR. The results demonstrated that all the four methods were able to extract RNA from *Microcystis* colonies, and they were able to be used for downstream experiments, such as RT-PCR, after the contaminated DNA was removed. Method 1 (PGTX-bead extraction) yielded RNA of highest concentration, good purity, low DNA contamination and it was low cost; Method 2 (CTAB-bead extraction) also yielded RNA of high concentration, but with heavy DNA contamination. This method was suitable for samples that need simultaneous isolation of RNA and DNA. Method 3 (FastRNA® Pro Blue Kit) and Method 4 (RNeasy Mini Kit) extraction yielded RNA of low concentration, but Method 4 had simpler protocol, less time consuming, higher relative expression of the detected function gene, thus was suitable for extracting total RNA from small amount of *Microcystis* colonies.

**Keywords:** *Microcystis* colonies; RNA extraction; qPCR; polysaccharide

蓝藻水华在富营养化湖泊中广泛存在, 微囊藻 (*Microcystis*) 是形成水华的优势类群, 从而受到高度重视, 是水华藻类中研究最多的一种<sup>[1]</sup>. 它们繁殖快, 产生毒素, 给生态环境带来了很大的危害<sup>[2]</sup>. 微囊藻具有与

\* 国家自然科学基金项目 (31370509) 和江苏省自然科学基金项目 (BK20131466) 联合资助. 2017-04-17 收稿; 2017-07-06 收修修改稿. 高胜玲 (1988 ~), 女, 硕士研究生; E-mail: 2015116108@njau.edu.cn.

\*\* 通信作者; E-mail: lyphwq@njau.edu.cn; lmshi@niglas.ac.cn.

革兰氏阴性细菌相似的细胞壁<sup>[3]</sup>,具有较强的暗适应和低温适应等生理特点<sup>[4]</sup>,并具有不同的形态种,存在群落结构的演替<sup>[4]</sup>,这些都引起了科学家们越来越多的关注,但是目前其形成水华的机理仍在进一步探索中<sup>[5]</sup>. 而从 RNA 分子水平上研究微囊藻应对环境的响应机制,有助于从微囊藻自身生理特性以及从转录水平上研究揭示水华发生机理<sup>[6]</sup>.

微囊藻大多以群体形式存在于自然水体中,从微囊藻群体中提取高质量的 RNA 是微囊藻分子生物学研究的重要前提. 任何 RNA 基础分析的技术,如 Northern 杂交、mRNA 纯化、PCR 扩增、cDNA 合成和文库构建等研究都需要纯度高和完整性好的 RNA<sup>[7-9]</sup>. 然而,不同的 RNA 提取方法能够产生不同质量的 RNA<sup>[10-11]</sup>. 微囊藻群体细胞壁外层的胶鞘较厚,影响 RNA 提取的物质如蛋白质、酚类等的含量较高, RNase 的活性也比较高,导致微囊藻群体 RNA 的提取困难. 同时,微囊藻群体中含有丰富的胞外多糖,使 RNA 的提取更加困难<sup>[12-14]</sup>,因此是否能够去除多糖等杂质是影响 RNA 提取质量的关键因素. 目前,有许多种方法能够从多糖丰富的样品中提取 RNA<sup>[13,15-16]</sup>. 为了选择一个最适合囊藻群体 RNA 提取的方法,本研究以室内培养的微囊藻群体为材料,对比分析 4 种针对多糖含量较高的 RNA 提取方法对微囊藻群体总 RNA 提取的效果,以期筛选出最适合微囊藻群体 RNA 的提取方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 藻种及培养 采用本实验室自野外分离纯化的铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 群体 D2 (由蔡元锋博士在 2011 年从太湖分离得到), 作为 RNA 提取的样本. 采用 BG-11 培养基<sup>[17]</sup> 在光照培养箱中进行微囊藻群体的培养. 光照培养箱温度设为 25℃, 光暗比为 12 h:12 h, 光照强度为 27  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . 待藻群体生长到对数生长期, 叶绿素 a 浓度为  $28.47 \pm 2.12 \mu\text{g}/\text{L}$  时, 取相同体积 (40 ml) 藻液若干份, 用孔径为 3  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜 (millipore) 收集藻群体, -80℃ 保存, 用于 RNA 提取.

1.1.2 主要仪器与试剂 光照培养箱 (GZL-P380B, 合肥华德利科学器材有限公司), 超净工作台 (SW-CJ-1FD, 苏州安泰), 小型高速冷冻离心机 (Centrifuge 5415R, Eppendorf 公司), 电泳仪 (DYCP-32B, 北京六一仪器厂), 实时荧光定量 PCR 仪 (Mastercycler ep Realplex, Eppendorf, Germany), 凝胶成像仪 (ChemiDoc MP, BIO-RAD), 快速核酸提取仪 (美国 MP FastPrep-24).

FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit 试剂盒 (美国 Mpbio 公司)、Qiagen RNeasy Mini Kit 试剂盒、溴化乙锭 (EB)、琼脂糖、无水乙醇、75% 乙醇、DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O、氯仿、西曲溴铵 (CTAB)、 $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME) 和琼脂粉, 其它均为分析纯试剂.

### 1.2 实验方法

选取 4 种针对多糖含量丰富的样品中提取总 RNA 的方法, 分别从含有微囊藻群体的 3  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜中提取 RNA, FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit 和 Qiagen RNeasy Mini Kit 2 种试剂盒法本身包含机械破碎过程, PGTX 和 CTAB 法增加机械破碎过程如下: 将样品转移到 2 ml 裂解管 E (Lysing Matrix E, MP Biomedicals, 美国) 中, 反复颠倒混匀, 将裂解管 E 放置于 FastPrep-24 样品处理仪器中, 6 m/s 条件下破碎 30 s.

1.2.1 方法 1 PGTX-bead 参考 Pinto 等<sup>[13]</sup> 方法提取 RNA, 并作出适当改进. 具体过程如下: ①向样品中加入 PGTX (苯酚 19.8 g, 甘油 3.45 ml, 8-羟基喹啉 0.05 g, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 0.29 g, 乙酸钠 0.4 g, 异硫氰酸胍 4.75 g, 盐酸胍 2.3 g, 1 ml Triton-X 100, 用灭菌的 DEPC 水定容到 50 ml) 缓冲液后, 使用机械破碎过程和 95℃ 水浴 5 min 相结合的方法裂解细胞, 然后立即冰浴 5 min, 加入 1-溴-3 氯丙烷, 剧烈涡旋混匀, 室温下放置 10 min; ②离心后转移上清液到新的离心管中, 加入等体积的异丙醇沉淀, 室温放置 10 min 后弃上清液; ③加入无菌 DEPC 水配置的 75% 的乙醇洗涤, 离心后倒掉液体, 无菌操作台干燥; ④用无菌 DEPC 水溶解沉淀.

1.2.2 方法 2 CTAB-bead 参考 Wang 等<sup>[15]</sup> 的方法, 并作出适当改进. 具体过程如下: ①用预热的 CTAB (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 20 mmol/L EDTA, 1%  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)) 缓冲液悬浮样品, 涡旋; ②进行机械破碎; ③裂解液用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 2 次; ④吸取上层水相, 加入等体积的异丙醇沉淀 RNA; ⑤用 75% 的冷乙醇洗涤沉淀; ⑥沉淀在无菌操作台干燥, 最后用无菌 DEPC 水溶

解沉淀.

1.2.3 方法 3 FastRNA® Pro Blue kit 主要按照说明书的步骤进行,并做如下改进,具体过程:①用 RNApro 溶液悬浮收集的藻体,并进行涡旋;②将涡旋后的样品进行机械破碎;③在 4℃ 条件下进行全速离心,转移上清液到新的离心管中;④加入氯仿涡旋 10 s,室温静置 5 min,再离心,转移上清液到新的离心管中;⑤用氯仿/异戊醇(24:1)进行抽提,转移上清到新的离心管中;⑥加入冷的无水乙醇沉淀 RNA,上下颠倒混匀,离心后弃上清;之后用 75% 的乙醇洗涤沉淀,最后用无酶无菌水(RNase-free water)溶解沉淀,-80℃ 条件下保存.

1.2.4 方法 4 Qiagen RNeasy mini kit 主要按照说明书的步骤进行,并做如下改进:①用缓冲液 RLT 悬浮收集到的藻细胞,涡旋;②进行机械破碎;③在 13000 转/min、4℃ 条件下离心 15 s,上清液用等体积的 70% 乙醇混合,然后将混合物转移到柱子上;④用 RW1 和 RPE 2 种缓冲液各冲洗 2 次;⑤用 50  $\mu$ l 无酶无菌水(RNase-free water)溶解沉淀,-80℃ 条件下保存.

1.2.5 RNA 完整性及质量检测 取 2  $\mu$ l RNA 样品,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测完整性. Nanodrop ND1000 分光光度计测定 RNA 浓度,并测定  $D_{260}/D_{280}$  和  $D_{260}/D_{230}$  的比值以确定 RNA 纯度.

1.2.6 荧光定量 PCR 为验证 4 种方法提取的 RNA 样品中 DNA 污染情况,扩增光合作用相关基因:核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco, RbcL),引物序列:上游为 5'-CGTTTCCCGTCGCTTT-3',下游为 5'-CCGATTTGGGTTTGATGCT-3',扩增片段长度 128 bp<sup>[13,18]</sup>,分别对上述 4 种方法提取的 RNA 和用 DNase 处理后的 RNA 用 Mastercycler ep Realplex(Eppendorf, Germany) 荧光定量 PCR 仪和 SYBR Premix Ex Taq II kit (TaKaRa) 进行荧光定量 PCR,反应总体积为 25  $\mu$ l,包含 1 $\times$ SYBR Premix Ex Taq™, 0.4  $\mu$ mol/L 的上下游引物和模板. 扩增程序:95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环.

1.2.7 RNA 中的污染 DNA 去除 用 RNase-free DNase I (TaKaRa) 去除 DNA,操作按照说明书的步骤进行,具体过程:①反应体系:RNA 20~50  $\mu$ g, 5  $\mu$ l 10 $\times$ DNase I 缓冲液, 2  $\mu$ l DNase I (RNase-free, 5 U/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l RNase 抑制剂(40 U/ $\mu$ l), 补水至总体积 50  $\mu$ l;②37℃ 反应 20~30 min;③加入 50  $\mu$ l 灭菌的 DEPC 水,再加入 100  $\mu$ l 的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),充分混匀;④离心,将上层(水层)移至另一微量离心管,加入 100  $\mu$ l 的氯仿/异戊醇(24:1),充分混匀;⑤离心,取上层(水层)移至另一微量离心管,加入 10  $\mu$ l 的 3 mol/L 的乙酸钠(pH 5.2)和 250  $\mu$ l 的冷无水乙醇,-20℃ 条件下放置 30~60 min;⑥离心回收沉淀,用 70% 的冷乙醇清洗沉淀,真空干燥,用适量无菌 DEPC 水溶解.

1.2.8 反转录荧光定量 PCR 去除 DNA 污染后,根据不同方法提取的 RNA 浓度不同,计算 400 ng 所需体积进行反转录. 按照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书的要求进行反转录:加入 1  $\mu$ l Anchored-oligo(dT) 和 2  $\mu$ l 随机六聚物引物,400 ng RNA 和适量 PCR 级别的水,使总体积为 13  $\mu$ l,混合之后在 PCR 仪中 65℃ 温浴 10 min. 温浴之后再依次加入 4  $\mu$ l transcriptor reverse transcriptase reaction 缓冲液、0.5  $\mu$ l RNA 抑制剂、2  $\mu$ l 脱氧核苷酸混合剂和 0.5  $\mu$ l transcriptor reverse transcriptase,混匀之后放在 PCR 仪上反应,设置 PCR 仪的程序为 25℃ 10 min, 55℃ 30 min 以及 85℃ 5 min. 将反应完之后的 PCR 管立即放置冰上,将得到的 cDNA 保存在-20℃ 中备用.

PCR 过程中以微囊藻特异 16S rRNA 为内参基因,引物序列为:上游为 5'-GCCGCRAGGTGAAAMCTAA-3',下游为 5'-AATCCAAARACCTTCCTCCC-3',PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 10 s, 55℃ 复性 10 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 45 个循环<sup>[19]</sup>. 目的基因为 RbcL,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系和扩增程序如上所述(1.2.6). 每个样品的内参基因 Ct 值与目的基因 Ct 值之差即为  $\Delta$ Ct,用 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup>法计算出各个样品相对于内参基因的相对表达量<sup>[16]</sup>,然后再进行样品间相对表达量的比较.

## 2 结果与分析

### 2.1 PGTX 和 CTAB 法增加机械破碎前、后的 RNA 提取效果比较

为了阐明加入机械破碎对提取微囊藻群体总 RNA 效果的影响,本文采用 FastPrep-24 快速核酸提取仪对 PGTX 和 CTAB 2 种方法进行机械破碎前后的 RNA 提取效果比较. PGTX 和 CTAB 2 种方法提取 RNA 的  $D_{260}/D_{280}$  和  $D_{260}/D_{230}$  的比值变化不大,表明机械破碎前、后对 RNA 的纯度影响不大;但 PGTX 法增加机械破碎后产量大约是破碎前的 3 倍,CTAB 法增加机械破碎后产量大约是破碎前的 2 倍,表明机械破碎能够显著

增加微囊藻群体总 RNA 的提取产量(图 1).

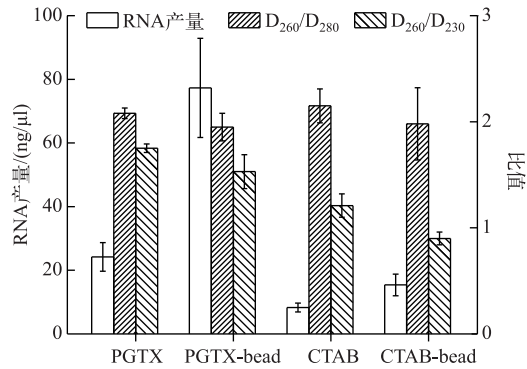


图 1 PGTX 和 CTAB 法增加机械破碎前后提取的 RNA 产量和纯度  
Fig.1 Yield and purity of RNA extracted before and after the addition of mechanical disruption of the PGTX and CTAB methods

## 2.2 RNA 完整性检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,结果表明 4 种方法都能够从微囊藻群体中提取到总 RNA(图 2),方法 1 和方法 2 电泳条带(23S/16S)清晰明亮, RNA 完整性好,但方法 2 能观察到清晰的 DNA 条带, DNA 污染严重;方法 3 和方法 4 电泳条带微弱,结合表 1 可知,这 2 种方法提取的 RNA 完整性较好,但产量低.

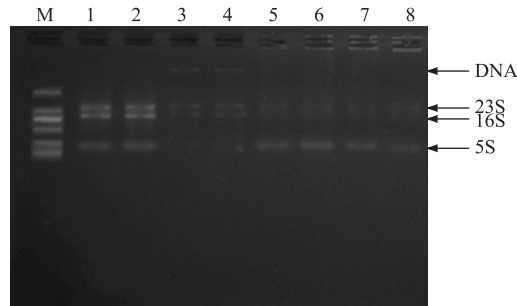


图 2 4 种方法提取的微囊藻群体 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱  
(1~2:方法 1 提取的总 RNA;3~4:方法 2 提取的总 RNA;5~6:方法 3 提取的总 RNA;7~8:方法 4 提取的总 RNA;M:DL2000 Marker)

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for RNA extracted from *Microcystis* colonies by the four methods  
(1~2:RNA extracted from Method 1;3~4:RNA extracted from Method 2;  
5~6:RNA extracted from Method 3;7~8:RNA extracted from Method 4;M:DL2000 Marker)

## 2.3 RNA 的产量和纯度分析

方法 1 和方法 2 从微囊藻群体中提取的 RNA 浓度分别为 77.3 和 15.4 ng/μl,而方法 3 和方法 4 提取的 RNA 浓度仅分别为 8.9 和 7.4 ng/μl(表 1). 方法 1 提取的 RNA 浓度明显高于其他 3 种方法( $P<0.05$ ),大约是方法 4 的 10 倍. Nanodrop ND1000 分光光度计检测结果表明,4 种方法获得的 RNA 样品  $D_{260}/D_{280}$  的比值都接近 2.0,表明 RNA 样品中没有蛋白质等杂质的污染;而  $D_{260}/D_{230}$  的比值都小于 2.2,说明存在酚类和糖类杂质污染,方法 1 提取的 RNA 酚类和糖类等污染较小,方法 3 污染最严重.

表 1 4 种方法提取的 RNA 的产量和纯度比较

Tab.1 Comparison of RNA yield and purity obtained by the four methods

提取方法	RNA 产量/(ng/ $\mu$ l)	D <sub>260</sub> /D <sub>280</sub>	D <sub>260</sub> /D <sub>230</sub>
PGTX-bead	77.3 $\pm$ 15.6	1.95 $\pm$ 0.13	1.53 $\pm$ 0.16
CTAB-bead	15.4 $\pm$ 3.4	1.98 $\pm$ 0.34	0.90 $\pm$ 0.06
FastRNA <sup>®</sup> Pro BlueKit	8.9 $\pm$ 1.9	1.86 $\pm$ 0.10	0.84 $\pm$ 0.15
RNeasy Mini Kit	7.4 $\pm$ 1.2	1.92 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.10

#### 2.4 qPCR 检测基因组 DNA 污染

qPCR 结果(图 3)可知,方法 2 提取的 RNA 样品直接进行荧光定量 PCR,Ct 值仅为 14.34 $\pm$ 0.05,DNA 污染最严重;方法 1 和方法 4 提取的 RNA 样品直接进行荧光定量 PCR,Ct 值分别为 20.9 $\pm$ 0.06 和 22.92 $\pm$ 0.02,DNA 污染较小;用 DNase 处理后,4 种方法提取的 RNA 样品进行荧光定量 PCR,Ct 值都在 30.0 左右,与未加模板的阴性对照的荧光定量 PCR Ct 值接近(30.52 $\pm$ 0.24),表明 RNA 样品中的基因组 DNA 基本被去除。

#### 2.5 反转录荧光定量 PCR 检测 RbcI 基因的 mRNA 水平

qPCR 结果表明不同 RNA 提取方法之间存在差异(表 2)。因为 16S rRNA 更加丰富和稳定,所以 qPCR 结果受到特定信使 RNA 检测的高度影响。方法 4 提取的 RNA 的 RbcI 基因相对表达水平最高,为 7.88 $\times 10^{-4}$ ,方法 1 次之,为 6.18 $\times 10^{-4}$ ,而方法 3 和方法 2 提取的 RNA 的 RbcI 基因表达水平都较低(表 2)。

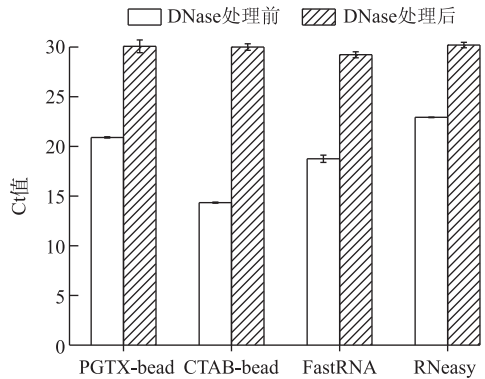


图 3 4 种方法提取的微囊藻群体总 RNA 用 DNase 处理前、后 qPCR 分析

Fig.3 qPCR analysis of total RNA extracted from *Microcystis* colonies using the four methods before and after DNase treatment

表 2 4 种方法提取 RNA 的 RbcI 基因相对表达量

Tab.2 Relative expression of RbcI gene using RNA extracted from the four methods

提取方法	16S rRNA Ct	RbcI Ct	RbcI 表达
PGTX-bead	13.58 $\pm$ 0.23	24.24 $\pm$ 0.15	6.18 $\times 10^{-4}$
CTAB-bead	13.56 $\pm$ 0.17	24.99 $\pm$ 0.28	3.62 $\times 10^{-4}$
FastRNA <sup>®</sup> Pro Blue kit	11.69 $\pm$ 0.47	26.16 $\pm$ 0.49	4.41 $\times 10^{-5}$
RNeasy Mini Kit	12.81 $\pm$ 0.28	23.12 $\pm$ 0.19	7.88 $\times 10^{-4}$

### 3 讨论

铜绿微囊藻群体中含有丰富的胞外多糖,通常情况下,胞外多糖以粘液层或胶鞘的形式围绕在群体周围,其粘度值相当于甚至高于黄原胶<sup>[20]</sup>,不仅难以实现完全的细胞溶解,还干扰大多数核酸净化过程<sup>[21-22]</sup>;同时,铜绿微囊藻细胞也含有丰富的核酸内切酶、核酸外切酶和光合色素,它们可以抑制酶促反应,尤其是逆转录<sup>[23-24]</sup>和 PCR<sup>[25-26]</sup>。这些因素的存在使 RNA 的提取更加困难,严重地降低了 RNA 的提取产量和纯度。RNA 的提取方法有很多,提取过程大致可分为 3 个部分:细胞裂解、从周围基质中提取 RNA 和纯化,细胞裂解在提取过程中最为重要<sup>[27]</sup>。提取 RNA 的基本原理都是将细胞裂解后,把 RNA 与蛋白质、糖类和 DNA 等杂质分离开。RNA 的纯度和提取量是评价核酸提取方法的一个重要指标,因为提取产量高、纯度好的 RNA 是进行各种后续研究的前提。因此,根据所用微囊藻群体自身理化性质的不同,选择最适合从微囊藻群体中提取总 RNA 的方法至关重要。

方法 1 PGTX-bead 法是一种强变性剂法,PGTX 缓冲液能够迅速抑制 RNase 的活性。苯酚和胍盐是非常

有效的蛋白质变性剂, 他们的结合使核糖核酸酶快速变性<sup>[28-29]</sup>. 同时加入 8-羟基喹啉, 它既是苯酚稳定剂又是核糖核酸酶抑制剂<sup>[30]</sup>. 该方法的优点是蛋白变性剂的存在, 能够强烈抑制 RNase 的活性, 可用于大量细菌总 RNA 的提取. 与改进前<sup>[13]</sup>相比, 使用机械破碎和 95°C 水浴 5 min 相结合的方法裂解细胞, 总 RNA 提取量明显增加. 在 4 种方法中, 方法 1 提取的 RNA 质量和产量最高, 且成本较低, 目的基因表达水平较高, 最适合从微囊藻群体中提取总 RNA.

方法 2 CTAB-bead 法, 浓度较高的 CTAB 可沉淀核酸和酸性多聚糖, 有效地裂解细菌细胞壁, 与  $\beta$ -巯基乙醇共同作用使蛋白变性<sup>[31]</sup>. 因此, 在含有大量多聚糖的有机体中提取核酸时, 可以利用 CTAB 作为裂解液<sup>[32]</sup>. 再与机械破碎法相结合, 在 FastPrep 均质破碎仪中激烈振荡使微囊藻细胞壁及其外层的胶鞘充分裂解, 从而有效地提取总 RNA. 方法 2 提取的 RNA 样品凝胶电泳图像(图 1)和 qPCR(图 2)结果可知, 此方法提取的微囊藻群体总 RNA 中 DNA 污染严重, 适合需要同时提取 DNA 和 RNA 的样本.

方法 3 FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit 法, 是一种能够从革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌中快速有效的提取总 RNA 的试剂盒法. RNApro 溶液在细胞裂解过程中使 RNase 失活, 防止 RNA 降解. 从表 1 和图 2 结果可知, 方法 3 FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit 法提取的微囊藻群体总 RNA 浓度低, DNA 污染较严重, 目的基因表达水平很低, 而且成本较高, 不适合从微囊藻群体中提取 RNA.

方法 4 Qiagen RNeasy Mini Kit 是一种应用比较广泛的 RNA 提取试剂盒, 使用硫氰酸胍盐缓冲液溶解样品, 用硅胶膜核酸纯化柱净化 RNA. 此种试剂盒法提取的微囊藻群体总 RNA 浓度较低, 但 DNA 污染小, RNA 完整性好, 目的基因表达水平最高, 且操作简单, 可以用于从少量微囊藻群体中提取总 RNA.

此外, 在实验初期, 我们也使用了 trizol 法进行微囊藻群体总 RNA 提取, 但实验结果并不理想. 本研究所采用的 4 种方法中, 对 PGTX 和 CTAB 2 种方法机械破碎增加前后 RNA 产量及纯度进行了对比, 结果表明, 机械破碎能够显著增加 RNA 产量, 同时, 另外 2 种试剂盒在提取步骤中也自带对样品进行机械破碎这一步, 说明机械破碎能够使细胞充分裂解, 降低微囊藻群体 RNA 提取难度, 增加提取产量, 对提取 RNA 是非常必要的步骤. Nanodrop ND1000 分光光度计测定总 RNA 的  $D_{260}/D_{280}$  和  $D_{260}/D_{230}$  比值, 来衡量 RNA 纯度. 一般  $D_{260}/D_{280}$  的比值大约为 2.0, 表明 RNA 样品中不存在蛋白质等污染;  $D_{260}/D_{230}$  的比值在 2.2 左右, 表明 RNA 样品中不存在酚类和糖类污染<sup>[15]</sup>. 从实验结果可以看出, 4 种方法提取的微囊藻群体总 RNA 都不存在蛋白质等污染, 但  $D_{260}/D_{230}$  比值都小于 2.2, 说明存在酚类和糖类污染. 结合微囊藻群体的特点, 我们推测, 之所以所有方法的  $D_{260}/D_{230}$  比值都比较小, 可能是因为微囊藻群体中大量胞外多糖的存在, 它不仅影响细胞裂解过程, 也有极少部分随 RNA 一起被提取出来.

此外, 在凝胶电泳图谱中, CTAB-bead 法有明显的 DNA 条带, 说明存在 DNA 污染, 其他 3 种方法电泳图谱检测不到 DNA 条带, 因此本研究采用了更加灵敏的 qPCR 方法检测 4 种方法提取的 RNA 样品中基因组 DNA 污染情况及基因组 DNA 去除情况<sup>[11]</sup>. 同时, 对去除 DNA 后的样品进行反转录荧光定量 PCR, 检测提取的 RNA 中 RbcI 基因的表达水平, 结果表明方法 1 PGTX-bead 法提取的 RNA 不仅产量高, 目的基因表达水平也高; 方法 4 Qiagen RNeasy Mini Kit 法虽然产量低, 但目的基因表达水平最高; 而方法 3 FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue Kit 法目的基因表达水平较低. 类似不同的 RNA 提取方法导致目的基因表达水平不同的结果在其他微生物 RNA 提取过程中也有相关报道<sup>[16, 33-34]</sup>. 由此可见, 选择合适、统一的 RNA 提取方法对系统研究微生物的功能的重要性.

## 4 结论

本研究的 4 种方法, 都能够从微囊藻群体中提取到 RNA. 方法 1 提取量高、纯度好、成本低, 且适合大量提取, 是最适合从微囊藻群体中提取 RNA 的方法. 方法 2 适合于需要同时提取 DNA 和 RNA 的样本. 方法 4 是试剂盒提取法, 成本高、产量低, 但 RNA 质量较好, 且操作简单、耗时短, 所检测目的基因的相对表达量高, 可用于从少量的微囊藻群体中提取总 RNA. 由于不同提取方法可能导致目的基因相对表达水平的不同, 因此, 在同批生物样本的研究中, 建议选择统一的 RNA 提取方法, 以减少方法的偏好性带来的误差.

## 5 参考文献

- [1] Kong FX, Gao G. Hypothesis on cyanobacteria bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes. *Acta Ecologica*

- Sinica*, 2005, **25**(3): 589-595. [孔繁翔, 高光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考. 生态学报, 2005, **25**(3): 589-595.]
- [ 2 ] Jiang JL, Song R, Ren JH *et al.* Advances in pollution of cyanobacterial blooms-producing microcystins and their ecotoxicological effects on aquatic organisms. *Progress in Chemistry*, 2011, **23**(1): 246-253. [姜锦林, 宋睿, 任静华等. 蓝藻水华衍生的微囊藻毒素污染及其对水生生物的生态毒理学研究. 化学进展, 2011, **23**(1): 246-253.]
- [ 3 ] Gan N, Xiao L, Zhu L *et al.* The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp.. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(3): 730-742.
- [ 4 ] Zhao XX. The phytoplankton community dynamics and driving factor during bloom period in Taihu Lake [Dissertation]. Hefei: Anhui University, 2013. [赵秀侠. 太湖蓝藻水华形成过程中的浮游植物群落动态及其驱动因素研究[学位论文]. 合肥:安徽大学, 2013.]
- [ 5 ] Ma JR, Deng JM, Qin BQ *et al.* Progress and prospects on cyanobacteria bloom-forming mechanism in lakes. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, **33**(10): 3020-3030. [马健荣, 邓建明, 秦伯强等. 湖泊蓝藻水华发生机理研究进展. 生态学报, 2013, **33**(10): 3020-3030.]
- [ 6 ] Harke MJ, Gobler CJ. Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. *PLoS ONE*, 2013, **8**(7): e69834.
- [ 7 ] Murillo I, Raventos D, Jaek E *et al.* Isolation of total RNA and mRNA from plant tissues. *Promega Notes Mag*, 1995, **54**: 2-7.
- [ 8 ] Hu GC, Honda CH, Kita MY *et al.* A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, **20**(1): 69a-69g.
- [ 9 ] Wang D, Douglas D, Kreader C *et al.* An integrated high-throughput system for mRNA purification and quantitation for use in identifying gene knockdown by RNA interference. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2006, **11**(5): 314-318.
- [ 10 ] Nour AM, Barbour EK, Depint F *et al.* Comparison of five RNA extraction methods from rabbit's blood. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2010, **1**(4): 448-450.
- [ 11 ] Rump LV, Asamoah B, Gonzalez-Escalona N. Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from Salmonella cells. *BMC Research Notes*, 2010, **3**(1): 211.
- [ 12 ] Reynolds C, Jaworski G, Cmiech H *et al.* On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1981, **293**(1068): 419-477.
- [ 13 ] Pinto F, Thapper A, Sontheim W *et al.* Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biology*, 2009, **10**(1): 1-8.
- [ 14 ] Singh S, Sinha R, Daiker V *et al.* Quantitative and qualitative extraction of RNA from a filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Journal of Applied Phycology*, 2010, **22**(1): 113-116.
- [ 15 ] Wang L, Stegemann J. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 2010, **31**(7): 1612-1618.
- [ 16 ] Franca A, Melo L, Cerca N. Comparison of RNA extraction methods from biofilm samples of *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Research Notes*, 2011, **4**(1): 572.
- [ 17 ] Allen M, Stanier R. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *Journal of General Microbiology*, 1968, **51**(2): 203-209.
- [ 18 ] Qian H, Yu S, Sun Z *et al.* Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 2010, **99**(3): 405-412.
- [ 19 ] Rinta-Kanto J, Ouellette A, Boyer G *et al.* Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science & Technology*, 2005, **39**(11): 4198-4205.
- [ 20 ] Ren XX, Jiang H, Leng X *et al.* Ecological significance and industrial application of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, **32**(3): 762-771. [任欣欣, 姜昊, 冷欣等. 蓝藻胞外多糖的生态学意义及其工业应用. 生态学杂志, 2013, **32**(3): 762-771.]
- [ 21 ] Porter RD. DNA transformation. *Methods in Enzymology*, 1988, **167**: 703-712.
- [ 22 ] Wilkins T, Smart L eds. Isolation of RNA from plant tissue. In: Krieg PA ed. *A laboratory guide to RNA: Isolation, analy-*

- sis, and synthesis. New York: Wiley-Liss, 1996: 21-42.
- [23] Cardellina J, Munro M, Fuller R *et al.* A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. *Journal of Natural Products*, 1993, **56**: 1123-1129.
- [24] Lau A, Siedlecki J, Anleitner J *et al.* Inhibition of reverse transcription activity by extracts of cultured blue-green algae. *Planta Medica*, 1993, **59**: 148-151.
- [25] Cohen M, Wallis J, Campbell E *et al.* Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives. *Microbiology*, 1994, **140**: 3233-3240.
- [26] Neilan B. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria using a RAPD PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 2286-2291.
- [27] Zhong WH, Wang W, Lin XG *et al.* Application of nucleic acid-based methods in the study of soil microbial diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, **46**(2): 334-341.
- [28] Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 1993, **15**(3): 532-537.
- [29] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, **162**(1): 156-159.
- [30] Emmett M, Petrack B. Rapid isolation of total RNA from mammalian tissues. *Analytical Biochemistry*, 1988, **174**(2): 658-661.
- [31] Yang ZJ, Gu SQ, Zhang J. Characteristics of several extraction methods on total RNA in plant tissues and strategies to problems. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, **37**(18): 8341-8342.
- [32] Tan S, Yiap B. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009, **11**: 1-10.
- [33] Franca A, Bento J, Cerca N. Variability of RNA quality extracted from biofilms of foodborne pathogens using different kits impacts mRNA quantification by qPCR. *Current Microbiology*, 2012, **65**(1): 54-59.
- [34] Carvalhais V, Delgado-Rastrollo M, Melo L *et al.* Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, **95**(2): 195-200.