

# 羊肚菌菌丝体总 RNA 提取方法的比较

陈国梁, 贺晓龙, 高小鹏, 任桂梅, 梁倩男, 马 波

(延安大学 生命科学学院, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心 陕西 延安 716000)

**摘 要:** 采用 SDS 抽提法、TRIzol 法、CTAB-LiCl、DEPC 水法对羊肚菌菌丝体进行了总 RNA 的提取, 并对其进行了紫外及琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明: 4 种提取方法中 DEPC 水法提取的总 RNA 质量最好, SDS 抽提法次之, CTAB-LiCl 法和 TRIzol 法效果最差。从 RNA 质量、操作简单、经济与否等方面综合分析, DEPC 水法是羊肚菌菌丝体总 RNA 提取较为理想的方法。

**关键词:** 羊肚菌; 总 RNA; 提取方法

**中图分类号:** S 646.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0150-02

提取纯度高、完整性好的 RNA 是开展分子克隆实验以及进行基因表达分析的一个重要环节。从目的材料中提取高质量的 RNA 已成为进行分子生物学研究首先要解决的问题。目前, 从动、植物组织中提取高质量的总 RNA 已有多种方法, 食用菌总 RNA 的提取方法也有报道<sup>[1-4]</sup>, 羊肚菌总 RNA 的提取未见报道。基于此, 现采用 4 种方法对羊肚菌菌丝体进行总 RNA 的提取, 旨在找出一较适合羊肚菌菌丝体总 RNA 提取的方法, 为其分子生物学研究奠定基础, 也为其它食用菌总 RNA 提取提供有益的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

编号为 M-延 5 的羊肚菌菌种, 由延安大学生命科学学院食用菌实验室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 羊肚菌菌丝体的培养** 用摇瓶液体培养, 滤纸法收集菌丝体, 并用 DEPC 水冲洗 3~5 次, 液氮速冻, 置于一 75℃冰箱中保存备用。

**1.2.2 RNA 的提取** 称取上述预处理材料 100 mg, 分别采用 SDS 抽提法、TRIzol 法、CTAB-LiCl 法与 DEPC 水法进行总 RNA 的抽提。

**1.2.3 RNA 质量的检验** RNA 的纯度检验: RNA 的纯度检验用核酸蛋白检测仪进行检测<sup>[5]</sup>。RNA 的完整性: 根据所测的浓度, 取相同含量的 RNA 于 1.0% 琼脂

糖凝胶上 200 V 稳压电泳 6~10 min, 取出 EB 染色 5~10 min, 在凝胶成像系统中成像观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 样品的纯度分析

将所提取的总 RNA 经紫外检测其 230、260、280 nm 的 OD 值并计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 与 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值, 结果见表 1。

表 1 4 种方法提取的 RNA 纯度及产量

	SDS 法	TRIzol 法	CTAB-LiCl 法	DEPC 水法
OD <sub>230</sub>	0.141	0.219	0.221	0.391
OD <sub>260</sub>	0.264	0.375	0.378	0.740
OD <sub>280</sub>	0.129	0.172	0.181	0.358
OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	1.872	1.712	1.710	1.893
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	2.047	2.180	2.138	2.067
浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10.56	15.00	15.12	29.60
RNA 产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	0.4224	0.6000	0.6048	1.084

注: RNA 浓度 =  $40 \times \text{OD}_{260} / \mu\text{g} / \text{mL}$ ; RNA 产量 = (RNA 浓度  $\times$  总体积数) / 来源材料的质量。

从表 1 可看出, 4 种方法提取的总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值在 2.047~2.180 之间接近于 2.0, OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 的比值均小于 1.9, 表明 4 种方法提取的总 RNA 纯度较高, 能有效地去除了多糖、苯酚、氯仿等杂质, 但有蛋白及盐分的残留。同时可能有部分 RNA 发生降解导致 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值偏离 2.0, 这也与电泳结果(图 1)相吻合; 从整体数据分析可得出 DEPC 水法和 SDS 法提取的羊肚菌菌丝体总 RNA 纯度高于 CTAB-LiCl 法和 TRIzol 法。

### 2.2 RNA 的完整性分析

4 种方法提取羊肚菌菌丝体总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳(图 1)均出现整齐、较清楚的 28S 与 18S 条带。其中 DEPC 水法提取的总 RNA 电泳结果显示 28S、18S 与 5S 带型整齐, 无拖尾, 且 28S 带的亮度约为 18S 带的 2 倍, 5S 带很弱, 点样孔中及其附近也未发现有 DNA 的污染, 可看出 DEPC 水法提取得到的总 RNA 纯度高、降解少, 完整性好, 得率高; SDS 法提取的总 RNA 电泳结果

第一作者简介: 陈国梁(1974), 男, 陕西定边人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。

通讯作者: 任桂梅(1955), 女, 教授, 研究方向为应用微生物与食用菌。E-mail: glc9359@163.com。

基金项目: 陕西省教育厅资助项目(09JK822); 延安大学大学生科技创新训练资助项目(YD2009-209)。

收稿日期: 2010-07-29

出现了 28S、18S 2 条完整性好且清晰的条带,但亮度较 DEPC 水法的暗,表明 SDS 法提取的 RNA 量较 DEPC 水法低;TRIzol 法、CTAB-LiCl 法提取得到的总 RNA 电泳结果显示 28S、18S 2 条条带较为模糊,表明 RNA 有不同程度的降解。4 种方法的 5S 带很弱或没有则表明所使用的样品比较新鲜,而且裂解液比例适当,成分也很适合该样品的提取。

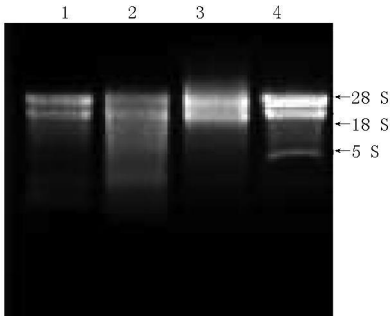


图 1 不同方法提取的羊肚菌菌丝体总 RNA 电泳图  
注:泳道 1: SDS 法;泳道 2: TRIzol 法;泳道 3: CTAB-LiCl 法;泳道 4: DEPC 水法。

3 结论与讨论

该试验所采用的 4 种方法均需研磨、抽提、沉淀、洗涤 4 个步骤。4 种方法除研磨和洗涤 2 个步骤完全相同外,其在抽提过程所用试剂、抽提次数及沉淀过程中所用试剂和沉淀次数均有所不同,所耗费时间也不同(表 2)。结合紫外及电泳检测结果可得出 4 种提取方法中 DEPC 水法提取的总 RNA 质量最好,SDS 抽提法次之,CTAB-LiCl 法和 TRIzol 法效果最差。DEPC 水法所用的全部试剂均为常规试剂,这使得试验成本大大降低,而且整个提取过程操作非常简单、易行,耗时较短,不需要特别的仪器设备,所得 RNA 完整且纯度较高,可满足分子水平实验的要求,是一种较简单、高效、经济的适合

表 2 羊肚菌菌丝体总 RNA 4 种提取方法的比较

	SDS 法	TRIzol 法	CTAB-LiCl 法	DEPC 水法
研磨	SDS 提取液	*	*	*
抽提	酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 2 次	TRIzol 试剂,氯仿 1 次	CTAB 提取液,氯仿/异戊醇 (24:1)3 次	DEPC 水 1:1 酚仿 2 次,氯仿 1 次
沉淀	NaAc 和无水乙醇沉淀 1 次	异丙醇 1 次	LiCl 沉淀 1 次,NaAc 和无水乙醇沉淀 1 次	LiCl 和无水乙醇共同 1 次
洗涤	*	*	*	*
时间	约 3.5 h	约 2 h	约 6 h	约 3 h
质量	+++	+	++	++++

注: \*表示此步骤过程相同, + 的多少表示提取质量的好坏

食用菌总 RNA 提取的好方法。

与动、植物组织相比,食用菌含有较多的 Rnase 及酚类化合物,尤其是高含量的多糖以及糖蛋白会形成难溶的胶状物等物质会严重的影响 RNA 的提取效率,进一步影响到其后续实验操作。该试验针对羊肚菌菌丝体富含多糖的特点,在 4 种的提取方法上,均进行了简单的优化,即在抽提的过程中加入 1/3 体积的 5 mol/L (pH 4.8) 醋酸钾溶液以沉淀多糖,收到了较好的效果。同时加大了变性液的用量及抽提次数,抑制了内源性 RNase 活性,使蛋白清除干净,从而获得完整且均一的 RNA。

参考文献

[1] 李迅 裴建军 邵蔚蓝. 担子菌草菇总 RNA 的快速抽提方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 81-84.  
[2] 钱程 赵敏, 孙立娜, 等. 白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)总 RNA 提取方法的建立[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2006, 38(8): 179-181.  
[3] 胡文军. 灵芝中总 RNA 的提取[J]. 药物生物技术, 2005, 12(3): 183-185.  
[4] 税丕容, 郑晓冰, 林俊芳, 等. 简便高质量的食用菌总 RNA 提取方法[J]. 食用菌学报, 2008, 15(1): 32-36.  
[5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 582-584.

Comparison of Several Methods for Extracting of Total RNA from *Morchella mycelium*

CHEN Guo-liang, HE Xiao-long, GAO Xiao-peng, REN Gui-mei, LIANG Qian-nan, MA Bo

(College of Life Science, Yan'an University; Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conversation and Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an, Shaanxi, 716000)

**Abstract:** The main object of this paper was to study total RNA extracted from *Morchella mycelium* by the 4 methods including SDS method, TRIzol method, CTAB-LiCl method and DEPC water method and to carry out comparative analysis of the method and to carry out comparative analysis of the eletrophoretic results and purity of total RNA. The results showed that the purity and integrality of extracted total RNA was as following: DEPC water method> SDS method> CTAB-LiCl method> TRIzol method. Comprehensive analysis from the RNA quality, operation, economic and so on, DEPC water was the best one of extracting total RNA from *Morchella mycelium*.

**Key words:** *Morchella*; total RNA; extraction method